

## OBEČNÉ ČLÁNKY

### ANTICORPORA MONOCLONALIA AD USUM HUMANUM

7.3:2031

#### Monoklonální protilátky pro humánní použití

##### DEFINICE

Jsou to imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinu, např. F(ab')<sub>2</sub>, s definovanou specificitou, vytvářené vždy jedním buněčným klonem. Mohou být navázány na jiné látky, včetně radioaktivně značených.

Lze je získat z imortalizovaných B-lymfocytů, klonovaných a pěstovaných jako kontinuální buněčné linie, nebo z buněčných linií upravených rekombinantní DNA technologií.

Při zkoušení za vhodných podmínek viditelnosti jsou prakticky prosté částic.

V současné době se rekombinantními technologiemi získávají následující protilátky.

*Chimerické monoklonální protilátky:* variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců lidské protilátky se nahradí stejnými oblastmi nehumánních druhů obsahujícími požadovanou antigenní specificitu.

*Humanizované monoklonální protilátky:* tři krátké vysoce variabilní sekvence odvozené z komplementárních oblastí variabilních domén každého řetězce nehumánního původu se vloží do rámce variabilních domén lidské protilátky. Vazbu antigenu je možné zlepšit dalšími změnami sekvencí.

*Rekombinantní lidské monoklonální protilátky:* variabilní těžké a lehké řetězce domén lidské protilátky se kombinují s konstantní oblastí lidské protilátky.

Monoklonální protilátky získané z buněčných linií modifikovaných rekombinantní DNA technologií také vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Producta ab ADN recombinante (0784)*.

Tento článek se vztahuje na monoklonální protilátky, včetně konjugátů, pro léčebné a preventivní použití a k použití jako diagnostika *in vivo*. Článek se nevztahuje na monoklonální protilátky používané jako zkoumadla při výrobě léčivých přípravků ani na monoklonální protilátky produkované v ascitech, pro které stanovuje požadavky oprávněná autorita.

##### VÝROBA

###### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výroba je založena na systému jednotné inokulace s použitím banky základních buněk a, kde je to vhodné, banky pracovních buněk odvozené z klonovaných buněk. Výrobní metoda se v průběhu vývojových studií validuje, aby se zabránilo přenosu infekčních agens do konečného přípravku. Všechny biologické materiály a buňky použité pro výrobu se charakterizují a vyhovují stati 5.2.8 *Minimalizace rizika přenosu agens zvířecí spongiiformní encefalopatie humánními a veterinárními léčivými přípravky*. Pokud se monoklonální protilátky pro humánní použití vyrábějí za použití materiálů lidského nebo živočišného původu, vyhovují také požadavkům stati 5.1.7 *Virová bezpečnost*. Imunogen, po-

kud se použil, se charakterizuje a metoda imunizace se zdokumentuje.

**Validace postupu.** Při vývojových studiích se výrobní metoda validuje z hledisek:

- shodnosti výrobního postupu včetně buněčné kultivace/fermentace, purifikace a, kde je to vhodné, metody fragmentace;
- odstranění nebo inaktivace infekčních agens;
- odpovídajícího odstranění nečistot vztahujících se k přípravku a k přípravě (např. bílkovin a DNA hostitelských buněk, proteinu A, antibiotik, složek buněčných kultur);
- specifity a biologické aktivity monoklonální protilátky;
- nepřítomnosti pyrogenů jiných, než jsou endotoxiny, kde je to vhodné;
- opakovaného použití purifikačních složek (např. materiálu kolony), limitů nebo kritérií přijatelnosti zařazených jako funkce validace;
- metod použitých pro konjugaci, kde je to vhodné.

**Charakteristika přípravku.** Přípravek se charakterizuje, aby se získala odpovídající informace včetně strukturální integrity, izotypu, pořadí aminokyselin, sekundární struktury, podílu cukrů, disulfidových můstků, struktury, specifity, afinity, biologické aktivity a heterogenity (charakteristika izoformem).

Použijí se vhodné analytické metody včetně chemických, fyzikálních, imunochemických a biologických zkoušek (např. mapování peptidů, sekvenování N- a C-terminálních aminokyselin, hmotnostní spektrometrie, chromatografické, elektroforetické a spektroskopické metody). Další zkoušky se provádějí, aby se získala informace o křížové reaktivitě s lidskými tkáněmi.

U přípravků, které jsou modifikovány fragmentací nebo konjugací, se charakterizuje vliv metod použitých na protilátky.

**Meziprodukty při výrobě.** Jestliže se výrobní meziprodukty skladují, určí se pro každý z nich doba použitelnosti nebo doba skladování na základě stabilitních údajů.

**Stanovení biologické účinnosti.** Stanovení biologické účinnosti se vybere podle účelu, ke kterému je monoklonální protilátka určena.

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek pro zkoušku totožnosti, zkoušky na čistotu a zkoušku účinnosti se použije šarže, jejíž stabilita se prokázala a která byla shledána vhodnou při klinickém hodnocení, nebo reprezentativní šarže. Referenční přípravek se vhodně charakterizuje požadavky uvedenými v odstavci Charakteristika přípravku, s výjimkou toho, že není nezbytné zkoušet každou šarži referenčního přípravku na křížovou reaktivitu.

**Definice šarže.** Definice šarže se požaduje pro celý výrobní proces.

##### ZDROJOVÉ BUŇKY

Zdrojové buňky zahrnují partnery fúze, lymfocyty, myelomové buňky, vyživovací a hostitelské buňky pro expresi rekombinantní monoklonální protilátky.

Dokumentuje se původ a charakteristika rodičovských buněk, včetně informace o zdravotním stavu dárců, a o partnerovi použitém k fúzi (např. myelomová buněčná linie, lidská lymfoblastoidní linie B-buňky).

Kde je to možné, vyšetří se zdrojové buňky vhodnou metodou na cizorodá a vnitřní agens. Výběr virů pro tyto zkoušky závisí na použitém druhu a výchozí tkáni.

#### BUNĚČNÁ LINIE VYTVÁŘEJÍCÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Vhodnost buněčné linie vytvářející monoklonální protilátky se prokáže:

- vývojovými záznamy o buněčné linii, včetně popisu buněčné fúze, imortalizace nebo transfekce a klonovacího postupu;
- charakteristikou buněčné linie (např. fenotypem, izoenzymovou analýzou, imunochemickými a cytogenetickými markery);
- charakteristikou důležitých znaků protilátky;
- shodností kritických atributů protilátky až do nebo za úroveň dvojnásobného namnožení buněk nebo počtu generací v běžné výrobě;
- pro rekombinantní DNA přípravky: shodností kódovací sekvence konstrukce exprese v buňkách namnožených na úroveň *in vitro* věku buněk použitých ve výrobě nebo nad tuto úroveň, buď testováním nukleových kyselin, nebo analýzou produktu.

#### BUNĚČNÉ BANKY

Banka základních buněk je homogenní suspenze buněčné linie vytvářející monoklonální protilátku, rozplněná v jedné operaci do jednotlivých nádob pro skladování ve stejných objemech.

Banka pracovních buněk je homogenní suspenze buněk pocházejících z banky základních buněk v určité úrovni pasáží, rozplněná v jedné operaci do jednotlivých nádob pro skladování ve stejných objemech.

Postprodukční buňky jsou buňky kultivované na nebo nad úroveň dvojnásobného namnožení buněk nebo počtu generací používaných k běžné výrobě.

V bance základních buněk se provádějí následující zkoušky: ověření životaschopnosti, totožnost, nepřítomnost kontaminace bakteriemi, houbami a mykoplasmaty, charakterizace vyráběné monoklonální protilátky. Náhodná virová kontaminace se ověřuje *in vivo* a *in vitro* zkouškami ve vhodném rozsahu. Přítomnost retrovirů a ostatních endogenních virových kontaminantů se zkouší *in vitro* zkouškami ve vhodném rozsahu.

V bance pracovních buněk se provádějí následující zkoušky: ověření životaschopnosti, totožnost, nepřítomnost kontaminace bakteriemi, houbami a mykoplasmaty. Náhodná virová kontaminace se ověřuje *in vivo* a *in vitro* zkouškami ve vhodném rozsahu. Pro první banku pracovních buněk se provádějí zkoušky na postprodukčních buňkách, pocházejících z této banky pracovních buněk; pro následné banky pracovních buněk vzniklé z první banky pracovních buněk se jednotlivé *in vitro* a *in vivo* zkoušky mohou provádět přímo na buňkách pracovních bank nebo na postprodukčních buňkách.

Pro banku základních buněk a banku pracovních buněk se provádějí zkoušky na specifické viry, použije-li se během přípravy buněčných bank biologický materiál s možnou kontaminací, v úvahu se bere i druhový původ materiálu. Toto zkoušení není nutné, jestliže se materiál inaktivuje validovanými postupy.

Na postprodukčních buňkách se provádí zkouška na nepřítomnost kontaminace bakteriemi, houbami a mykoplasmaty. Náhodná virová kontaminace se ověřuje *in vivo* a *in vitro* zkouškami ve vhodném rozsahu. Přítomnost retrovirů a ostatních endogenních virových kontaminantů se zkouší *in vitro* zkouškami ve vhodném rozsahu.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ

**Výroba do konečné pasáže (jednotlivá sklizeň).** Buňky se kultivují do dosažení definovaného nejvyššího počtu pasáží nebo do zdvojení populace, nebo do pevně stanovené doby sklizeň (v souladu se stabilitou buněčné linie). Produkt se sklídí v jednom výrobním postupu.

#### Kontinuální kultivační výroba (mnohonásobná sklizeň).

Buňky se kultivují kontinuálně po definovanou dobu (v souladu se stabilitou systému a shodností výroby). Je nezbytné sledovat kulturu po celou dobu jejího života; doporučená četnost a způsob sledování závisí na povaze výrobního systému.

Každá sklizeň se zkouší na obsah protilátek, na mikrobiologickou zátěž, na obsah endotoxinu a na mykoplasmata. Ve vhodném stadiu, v závislosti na povaze výrobního postupu a na použitých materiálech, se provedou obecné nebo specifické zkoušky na náhodné viry. Pro postupy používající výrobu do úrovně konečné pasáže (jednotlivá sklizeň) se vhodnými *in vitro* metodami zkoušejí na náhodné viry nejméně tři sklizeň.

Kritéria přijatelnosti pro sklizeň určené k dalšímu zpracování jsou jasně definována a jsou spojena se schématem použitého sledování. Při jakémkoliv nálezu náhodných virů se pečlivě vyšetří výrobní postup, aby se určila příčina kontaminace, a sklizeň se dále nepoužije. Sklizeň, u kterých byly nalezeny endogenní viry, se nepoužijí pro purifikaci, pokud se nedefinuje vhodný plán opatření zamezujících přenos infekčních agens do konečného přípravku.

#### PURIFIKACE

Sklizeň a meziprodukty se mohou před následujícím postupem smíchat. Purifikační postup zahrnuje kroky, které vedou k odstranění a/nebo inaktivaci neobalených a obalených virů. Použije se validovaný purifikační postup, jehož schopnosti odstranit a/nebo inaktivovat infekční agens a odstranit nečistoty vztahující se k výrobku nebo k postupu se prokázaly. Definované kroky výroby vedou k purifikované monoklonální protilátce (léčivé látce) stále jakosti a biologické účinnosti.

#### LÉČIVÁ LÁTKA

Program zkoušení léčivé látky závisí na validaci postupu, na prokázání shodnosti výroby a na očekávaném množství nečistot vztahujících se k přípravku a k výrobě. Léčivá látka se zkouší vhodnými analytickými metodami na vzhled, totožnost, mikrobiologickou zátěž a bakteriální endotoxiny, látky vztahující se k přípravku, nečistoty vztahující se k přípravku a k výrobě včetně bílkoviny hostitelské buňky,

DNA hostitelské buňky a vektoru, strukturální integritu, obsah bílkoviny a biologickou účinnost; v případě potřeby se použije porovnání s referenčním přípravkem. Pokud je léčivá látka konjugovaná nebo transformovaná protilátkou, musí se použít vhodné zkoušky před i po konjugaci/modifikaci.

Pokud se předpokládá skladování meziproductů, zhodnotí se odpovídajícími stabilitními studiemi vliv skladování na jakost nebo dobu použitelnosti konečného přípravku.

#### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka se připraví z jedné šarže nebo spojením více šarží léčivé látky. Při výrobě konečné várky se mohou přidat vhodné stabilizátory a jiné pomocné látky.

Konečná várka se musí skladovat za validovaných podmínek s ohledem na mikrobiologickou kontaminaci a stabilitu.

#### KONEČNÁ ŠARŽE

Konečná várka se sterilně filtruje a rozplní se za aseptických podmínek do sterilních obalů, následně se může lyofilizovat.

Součástí mezioperační kontroly každého obalu (lahvička, injekční stříkačka nebo ampule) je kontrola po naplnění, aby byly odstraněny obaly obsahující viditelné částice.

V průběhu vývoje přípravku se musí prokázat, že při postupu buď nevznikají v konečné šarži viditelné bílkovinné částice, nebo se tyto částice redukují na úroveň, která je zdůvodněna a schválena.

#### VLASTNOSTI

Tekuté přípravky jsou číré nebo slabě opalizující, bezbarvé nebo slabě zbarvené tekutiny. Lyofilizované přípravky jsou bílé nebo slabě zbarvené prášky nebo pevné drobné hmoty. Po rekonstituci mají stejné vlastnosti jako tekuté přípravky.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Zkoušky totožnosti se provádějí vhodnými validovanými metodami porovnáním přípravku s referenčním přípravkem, kde je to vhodné. Zkouška Stanovení účinnosti je zároveň zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Vzhled.** Tekuté nebo rekonstituované lyofilizované přípravky vyhovují limitům schváleným pro daný přípravek z hlediska stupně opalescence (2.2.1) a stupně zbarvení (2.2.2). Jsou prosté viditelných částic, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

**Rozpustnost.** Lyofilizované přípravky se v definovaném čase úplně rozpustí v předepsaném objemu tekutiny k rekonstituci, jak je schváleno pro daný přípravek.

**Hodnota pH** (2.2.3). Vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

**Osmolalita** (2.2.35). Nejméně 240 mosmol/kg, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

**Využitelný objem** (2.9.17). Vyhovuje zkoušce.

**Celkové bílkoviny** (2.5.33). Vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

**Distribuce velikosti molekul.** Stanoví se vhodnou metodou, např. vylučovací chromatografií (2.2.30). Vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

**Molekulová totožnost a strukturální integrita.** V závislosti na povaze monoklonální protilátky, její mikroheterogenitě (uspořádání mikročástic) a na přítomnosti izoforem se může použít množství různých zkoušek prokazujících molekulovou totožnost a strukturální integritu, jako je např. mapování peptidů, izoelektrická fokusace, iontová vylučovací chromatografie, hydrofobní interaktivní chromatografie, mapování oligosacharidů, stanovení obsahu monosacharidů a hmotnostní spektrometrie.

**Čistota.** Provedou se vhodné validované zkoušky na nečistoty vztahující se k výrobnímu postupu a k přípravku. Zkoušky na nečistoty vztahující se k výrobnímu postupu provedené u léčivé látky nebo u konečné várky s vyhovujícími výsledky se mohou u konečné šarže vynechat.

**Stabilizátor.** Kde je to vhodné, vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Lyofilizované přípravky vyhovují limitům schváleným pro daný přípravek.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

**Zkoušky použité na modifikované protilátky.** Provedou se vhodné zkoušky v závislosti na typu modifikace.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se vhodné biologické stanovení účinnosti porovnáním s referenčním přípravkem. Plán zkoušky a výpočet výsledků se provedou za použití obvyklých principů (např. 5.3).

#### SKLADOVÁNÍ

Skladuje se za podmínek uvedených v označení na obalu.

**Doba použitelnosti.** Doba použitelnosti se vypočítá z data sterilní filtrace, data rozplnění (pro tekuté přípravky) nebo data lyofilizace, podle toho, co je vhodné.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet jednotek v mililitru, kde je to vhodné;
- množství bílkoviny v obalu;
- množství monoklonální protilátky v obalu;
- pro tekuté přípravky: objem přípravku v obalu;
- pro lyofilizované přípravky:
  - název a objem tekutiny, která se použije k rekonstituci;
  - doba, po kterou je možné monoklonální protilátku po rekonstituci použít;
- ředění přípravku před použitím, kde je to vhodné.

## CORPORA AD USUM PHARMACEUTICUM

7.5:2034

### Látky pro farmaceutické použití

#### DEFINICE

Látky pro farmaceutické použití jsou jakékoliv organické nebo anorganické látky, které se používají jako léčivé látky

nebo pomocné látky pro výrobu léčivých přípravků pro humánní použití nebo pro veterinární použití. Mohou se získávat z přírodních zdrojů nebo mohou být vyrobeny extrakcí z výchozích materiálů, fermentací nebo syntézou.

Tento článek není určen pro rostlinné drogy, rostlinné drogy pro homeopatické přípravky, přípravky obsahující rostlinné drogy, extrakty nebo matečné tinktury pro homeopatické přípravky, které jsou předmětem samostatných obecných článků [*Plantae medicinales* (1433), *Plantae medicinales ad praeparata homoeopathica* (2045), *Plantarum medicinalium praeparata* (1434), *Extracta* (0765), *Tincturae maternae ad praeparata homoeopathica* (2029)]. Není určen pro suroviny pro homeopatické přípravky, s výjimkou těch, na které se vztahují jednotlivé články látek uvedených v nehomeopatické části lékopisu.

Pokud se v léčivých přípravcích připravených pro zvláštní potřeby jednotlivých pacientů používají látky pro farmaceutické použití, které nejsou popsány v jednotlivých člancích lékopisu, potřeba shody s tímto obecným článkem se rozhodne posouzením rizik a přinosh dostupné jakosti látky pro dané použití.

Pokud se léčivé přípravky vyrábějí za použití látek pro farmaceutické použití lidského nebo živočišného původu, vyhovují požadavkům stati 5.1.7 *Virová bezpečnost*.

Látky pro farmaceutické použití se mohou používat jako takové, nebo jako výchozí materiály pro další zpracování na léčivé přípravky. V závislosti na složení se určité látky mohou použít jako léčivé látky nebo jako pomocné látky. Pevné látky mohou být zhutněné, obalené, granulované, upráškované na určitý stupeň jemnosti nebo jiným způsobem upravené. Úprava přidáním pomocných látek je povolena pouze tam, kde je to specifikováno v definici jednotlivého článku.

*Látky pro farmaceutické použití zvláštní jakosti.* Není-li v jednotlivých člancích uvedeno nebo omezeno jinak, je látka pro farmaceutické použití určena pro humánní a veterinární použití a má vhodnou jakost pro výrobu všech lékových forem, ve kterých se může použít.

*Polymorfie.* Jednotlivé články obvykle nespecifikují krystalickou nebo amorfní formu látky, pokud je zachována biologická dostupnost. Všechny formy látky pro farmaceutické použití vyhovují požadavkům příslušného článku, není-li uvedeno jinak.

## VÝROBA

Látky pro farmaceutické použití se vyrábějí postupy, které zaručují shodnou jakost a které zajistí splnění požadavků jednotlivých článků nebo schválených specifikací.

Ustanovení obecné statě 5.10 se vztahují na kontrolu nečistot v látkách pro farmaceutické použití.

V jednotlivých člancích se specifikuje, zda látka pro farmaceutické použití je nebo není:

- rekombinantní bílkovina nebo jiná látka získaná přímo výrobou založenou na genetické úpravě, kde je to vhodné, látka vyhovuje také požadavkům obecného článku *Producta ab ADN recombinante* (0784);
- získaná ze zvířat schopných přenášet spongiformní encefalopatie jinak než experimentální čelenzí, kde je to vhodné, látka vyhovuje také požadavkům obecného člán-

ku *Producta cum possibili transmissione vectorium encephalopathiarum spongiformium animalium* (1483);

- získaná fermentačním postupem a zda použité mikroorganismy byly nebo nebyly upraveny tradičními metodami nebo rekombinantní DNA technologií, kde je to vhodné, látka také vyhovuje požadavkům obecného článku *Producta fermentationis* (1468).

Pokud se v průběhu výroby použijí rozpouštědla, mají vhodnou jakost. Je rovněž třeba přihlížet k jejich toxicitě a k limitům pro zbytková rozpouštědla (5.4). Jestliže se v průběhu výroby použije voda, má rovněž vhodnou jakost. Jestliže se látky vyrábějí nebo zpracovávají do vhodné formy nebo jakosti, vyhovuje tato forma nebo jakost látky požadavkům příslušného článku. Mohou být popsány určité funkční zkoušky pro kontrolu vlastností, které mohou ovlivnit vhodnost látky a následně vlastnosti lékových forem z ní připravených.

*Práškované látky.* Látky se mohou upravit na určitý stupeň jemnosti (2.9.35).

*Zhutněné látky.* Látky se upraví tak, aby se zvětšila velikost částic nebo se dosáhlo jejich specifického tvaru a/nebo se získala látka s vyšší sypanou hustotou.

*Potahované léčivé látky.* Látky se upraví tak, aby obsahovaly částice léčivé látky potažené vrstvou jedné nebo více vhodných pomocných látek.

*Granulované léčivé látky.* Látky se upraví tak, aby obsahovaly částice specifikované velikosti a/nebo formy získané granulací léčivé látky přímo nebo za použití jedné nebo více vhodných pomocných látek.

Jestliže se léčivé látky zpracovávají společně s pomocnými látkami, vyhovují tyto pomocné látky požadavkům příslušného článku. Pokud takový článek neexistuje, pomocná látka vyhovuje schválené specifikaci.

Kde byly léčivé látky při výrobě zpracovávány společně s pomocnými látkami, např. při úpravě potahováním nebo granulací, výrobní postup se provádí za podmínek správné výrobní praxe a zpracováváné látky se považují za meziprodukty při výrobě léčivého přípravku.

## VLASTNOSTI

Ustanovení uvedená v části Vlastnosti (např. údaje o rozpustnosti nebo teplotě rozkladu) jsou informativní a nejsou považována za striktní požadavky.

Pokud je látka polymorfnní, může se tato skutečnost uvést v části Vlastnosti, aby se na ni upozornil uživatel, který může vzít tuto vlastnost v úvahu při vývoji (formulaci) léčivého přípravku.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Pokud jednotlivé články obsahují rozdělení zkoušek totožnosti na první totožnost (1.) a druhou totožnost (2.), zkouška nebo zkoušky tvořící první totožnost se mohou použít za všech okolností. Zkoušku nebo zkoušky tvořící druhou totožnost je možné použít k identifikaci v lékárnách pod podmínkou, že látku nebo přípravek lze zcela prokazatelně vysledovat k ověřené šarži, která vyhovuje všem požadavkům lékopisného článku.

Určité články obsahují dvě nebo více skupin zkoušek na první totožnost, které jsou rovnocenné a mohou se použít

**Tab. 1** Uvádění, identifikace a kvalifikace organických nečistot v léčivých látkách

Použití	Maximální denní dávka	Mezní hodnota pro uvádění	Mezní hodnota pro identifikaci	Mezní hodnota pro kvalifikaci
pro humánní nebo pro humánní a veterinární použití	≤ 2 g/den	> 0,05 %	> 0,10 % nebo denní příjem >1,0 mg (podle toho, který je nižší)	> 0,15 % nebo denní příjem >1,0 mg (podle toho, který je nižší)
pro humánní nebo pro humánní a veterinární použití	> 2 g/den	> 0,03 %	> 0,05 %	> 0,05 %
pouze pro veterinární použití	neuveдено	> 0,10 %	> 0,20 %	> 0,50 %

nezávisle. Jedna nebo více těchto skupin zkoušek obvykle obsahují odkazy na zkoušku předepsanou v části Zkoušky na čistotu daného článku. To umožňuje zjednodušení práce analytikovi, který provádí zkoušku totožnosti a předepsanou zkoušku na čistotu. Např. jedna skupina zkoušek totožnosti obsahuje odkazy na zkoušku enantiomerní čistoty, zatímco druhá skupina zkoušek uvádí zkoušku na specifickou optickou otáčivost: zamýšleným účelem obou je totéž, tedy ověření, že je přítomen správný enantiomer.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Polymorfie** (5.9). Jestliže povaha krystalické nebo amorfni formy látky omezuje její použití v přípravcích, identifikuje se povaha specifické krystalické nebo amorfni formy, její morfologie se dostatečně kontroluje a její identita se uvede v označení na obalu.

**Příbuzné látky.** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, organické nečistoty v léčivých látkách se musí uvádět, kdekoli je to možné identifikovat a kvalifikovat, jak je uvedeno v tabulce 1, nebo (pro peptidy získané chemickou syntézou) v tabulce 2.

**Tab. 2** Uvádění, identifikace a kvalifikace organických nečistot v peptidech získaných chemickou syntézou

Mezní hodnota pro uvádění	Mezní hodnota pro identifikaci	Mezní hodnota pro kvalifikaci
> 0,1 %	> 0,5 %	> 1,0 %

Specifické mezní hodnoty (limity) se mohou použít pro nečistoty, o nichž je známo, že jsou neobyčejně účinné nebo vykazují toxické či neočekávané farmakologické účinky. Jestliže jednotlivý článek neumožňuje vhodnou kontrolu nové nečistoty, musí se vyvinout nová zkouška, která se zahrne do specifikace látky.

Výše uvedené požadavky se nevztahují na biologické a biotechnologické produkty, oligonukleotidy, radiofarmaka, produkty fermentace a semisyntetické produkty od nich odvozené nebo na látky rostlinného či živočišného původu nebo rostlinné produkty.

**Zbytková rozpouštědla** jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati (5.4) s využitím obecné stati (2.4.24) nebo jiných vhodných metod.

Kde se zbytkové rozpouštědlo stanovuje kvantitativně a neprovádí se zkouška Ztráta sušením, bere se v úvahu obsah

zbytkového rozpouštědla při výpočtu obsahu látky, specifické optické otáčivosti a specifické absorbance.

**Mikrobiologická jakost.** Jednotlivé články uvádějí kritéria přijatelnosti pro mikrobiologickou jakost tam, kde je tato kontrola nezbytná. Tabulka 5.1.4-2 *Kritéria přijatelnosti pro mikrobiologickou jakost nesterilních látek pro farmaceutické použití* uvedená ve stati 5.1.4 *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* poskytuje obecná doporučení týkající se mikrobiologické jakosti pro látky, které mají sklon k mikrobiální kontaminaci. V závislosti na povaze látky a jejím zamýšleném použití mohou být zdůvodněna různá kritéria přijatelnosti.

**Sterilita** (2.6.1). Pokud je látka pro farmaceutické použití určena k výrobě sterilních lékových forem bez dalšího vhodného sterilizačního postupu nebo, je-li deklarována jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Pokud je látka pro farmaceutické použití deklarována jako prostá bakteriálních endotoxinů, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny. Limit a metoda zkoušky se uvedou v jednotlivých člancích (pokud se nejedná o gelovou metodu, Metoda A). Limit se vypočítá podle obecné stati *Pokyny pro použití zkoušky na bakteriální endotoxiny* (5.1.10), odstavec *Zkouška na bakteriální endotoxiny*, pokud není nižší limit odůvodněn výsledky při výrobě šarží nebo jej nepožaduje oprávněná autorita. Kde je předepsána zkouška na bakteriální endotoxiny, nepožaduje se zkouška na pyrogenní látky.

**Pyrogenní látky** (2.6.8). Jestliže se zdůvodní zkouška na pyrogenní látky spíše než zkouška na bakteriální endotoxiny a jestliže se látka deklaruje jako prostá pyrogenních látek, vyhovuje látka pro farmaceutické použití zkoušce na pyrogenní látky. Limit a metoda zkoušky se uvedou v jednotlivých člancích nebo je schválená oprávněná autorita. Na základě vhodné validace zkoušek na bakteriální endotoxiny a pyrogenní látky se může zkouška na pyrogenní látky nahradit zkouškou na bakteriální endotoxiny.

**Další vlastnosti.** Kontrola dalších vlastností (např. fyzikální charakteristiky, funkční charakteristiky) může být nezbytná pro jednotlivé výrobní postupy nebo pro složení (formulaci) přípravku. Stupně jakosti (jako je sterilita, nepřítomnost endotoxinů, nepřítomnost pyrogenních látek) se mohou produkovat s ohledem na výrobu přípravků pro parenterální použití nebo výrobu jiných lékových forem

a vhodné požadavky se mohou specifikovat v jednotlivých článcích.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, stanoví se obsahy látek pro farmaceutické použití. Použijí se vhodné metody.

#### OZNAČOVÁNÍ

Označování je všeobecně záležitostí, která podléhá nadnárodním a národním předpisům a mezinárodním dohodám. Údaje uvedené v odstavci Označování nejsou proto vyčerpávajícím seznamem a kromě toho jsou pro účely lékopisu závazné pouze ty údaje, které jsou nezbytné k prokázání shody nebo neshody s údaji uvedenými v článku. Jakékoliv další údaje v označení na obalu jsou chápány pouze jako doporučení. Pokud se v lékopisu použije pojem „označení na obalu“, znamená to, že údaje se mohou uvést na vnitřním obalu, na vnějším obalu, v příbalové informaci nebo v analytickém certifikátu, podle rozhodnutí oprávněné autority.

Kde je to vhodné, označení obsahuje zejména údaje, že látka:

- je určena pro zvláštní použití;
- má odlišnou krystalickou formu;
- má zvláštní stupeň jemnosti;
- je upravena zhutněním;
- je upravena potažením;
- je upravena granulací;
- je sterilní;
- je prostá bakteriálních endotoxinů;
- je prostá pyrogenních látek;
- obsahuje kluzné látky.

Kde je to vhodné, uvede se v označení na obalu:

- stupeň hydratace;
- název a koncentrace jakýchkoliv přidaných pomocných látek.

## ETHEROLEA

6.0:2098

### Silice

*Synonymum.* Aetherolea

*Ustanovení uvedená v tomto článku jsou určena ke čtení společně s jednotlivými články silic v Evropské části Českého lékopisu. O použití článku pro jiné silice může rozhodnout oprávněná autorita.*

#### DEFINICE

Jsou to vonné látky, obvykle komplexního složení, získané z botanicky definovaných rostlinných surovin destilací s vodní parou, suchou destilací nebo vhodným mechanickým postupem bez zahřívání. Silice se obvykle oddělují od vodné fáze fyzikálním postupem, který významně neovlivňuje jejich složení.

Silice se mohou podrobit vhodným následným úpravám a mohou tedy být komerčně dostupné jako deterpenované, deseskviterpenované, rektifikované nebo neobsahující složku „x“.

*Deterpenovaná silice* je silice, ze které byly částečně nebo úplně odstraněny monoterpenické uhlovodíky.

*Deterpenovaná a deseskviterpenovaná silice* je silice, ze které byly částečně nebo úplně odstraněny mono- a seskviterpenové uhlovodíky.

*Rektifikovaná silice* je silice, která byla podrobena frakční destilaci za účelem odstranění určitých složek nebo k úpravě složení.

*Silice neobsahující složku „x“* je silice, která byla podrobena částečnému nebo celkovému odstranění jedné nebo více složek.

#### VÝROBA

V závislosti na článku může být rostlinná surovina čerstvá, zvadlá, sušená, celá, rozlámaná nebo rozemletá.

*Destilace s vodní parou.* Silice se získává proháněním vodní páry surovinou rostlinného původu ve vhodné aparatuře. Pára se může přivádět z vnějšího zdroje nebo může vznikat varem vody pod surovinou, nebo varem vody, ve které je surovina ponořena. Páry vody i silice kondenzují. Voda a silice se oddělí dekantací.

*Suchá destilace.* Silice se získává ohřevem lodyh, větvíček nebo kůry na vysokou teplotu ve vhodné aparatuře bez přidání vody nebo páry.

*Mechanický proces.* Silice, obvykle označovaná jako „lisovaná za studena“, se získává mechanickým postupem bez jakéhokoliv ohřevu. Tento postup se používá zejména pro citrusové plody a zahrnuje lisování oleje z oplodí a následné oddělení fyzikálními prostředky.

V některých případech se může k silici přidat vhodná antioxidační látka.

#### VLASTNOSTI

Určí se vzhled a pach silice.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Silice se identifikují jejich chromatografickým profilem (plynová chromatografie) nebo, pokud není uveden, jinou požadovanou zkouškou (např. tenkovrstvá chromatografie).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### OBECNÉ ZKOUŠKY

Silice vyhovují předepsaným limitům následujících zkoušek.

**Relativní hustota** (2.2.5).

**Index lomu** (2.2.6).

**Optická otáčivost** (2.2.7).

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích** (2.8.7).

##### DOPLŇUJÍCÍ ZKOUŠKY

Je-li třeba, vyhovuje silice předepsaným limitům následujících zkoušek.

**Teplota tuhnutí** (2.2.18).

**Číslo kyselosti** (2.5.1).

**Číslo peroxidové** (2.5.5).

**Cizí estery v silicích** (2.8.6).

**Zbytek po odpaření silic** (2.8.9).

**Voda v silicích** (2.8.5).

**Rozpustnost silic v ethanolu (2.8.10).**

**Padělký.** Je-li to vhodné, mohou se provést zkoušky na přítomnost jednoho nebo více padělků tenkovrstvou chromatografií (2.2.27), plynovou chromatografií (2.2.28), je-li třeba za použití chirální kolony nebo jinými vhodnými metodami.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

Kromě testu způsobilosti uvedeného v jednotlivém článku je nezbytné ověřit vhodnost chromatografického systému následujícím způsobem, který se musí provádět pravidelně v rámci provozní kvalifikace.

Chromatogram uvedený na obrázku 1 se uvádí jako příklad. Porovnávací roztok. *Silice CRL*. Je-li třeba, zředí se porovnávací roztok *heptanem R*.

**Kolona:**

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (0,25  $\mu$ m).

**Nosný plyn.** *Helium pro chromatografii R*.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 500. Poměr dělicího poměru a nastříkovaného objemu se může nastavit tak, aby byl vhodný pro použitý přístroj a zajišťoval stejnou zátěž kolony.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–15	70
	15–100	70 → 240
	100–105	240
nastříkový prostor		250
detektor		270

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nastřík.** 1  $\mu$ l.

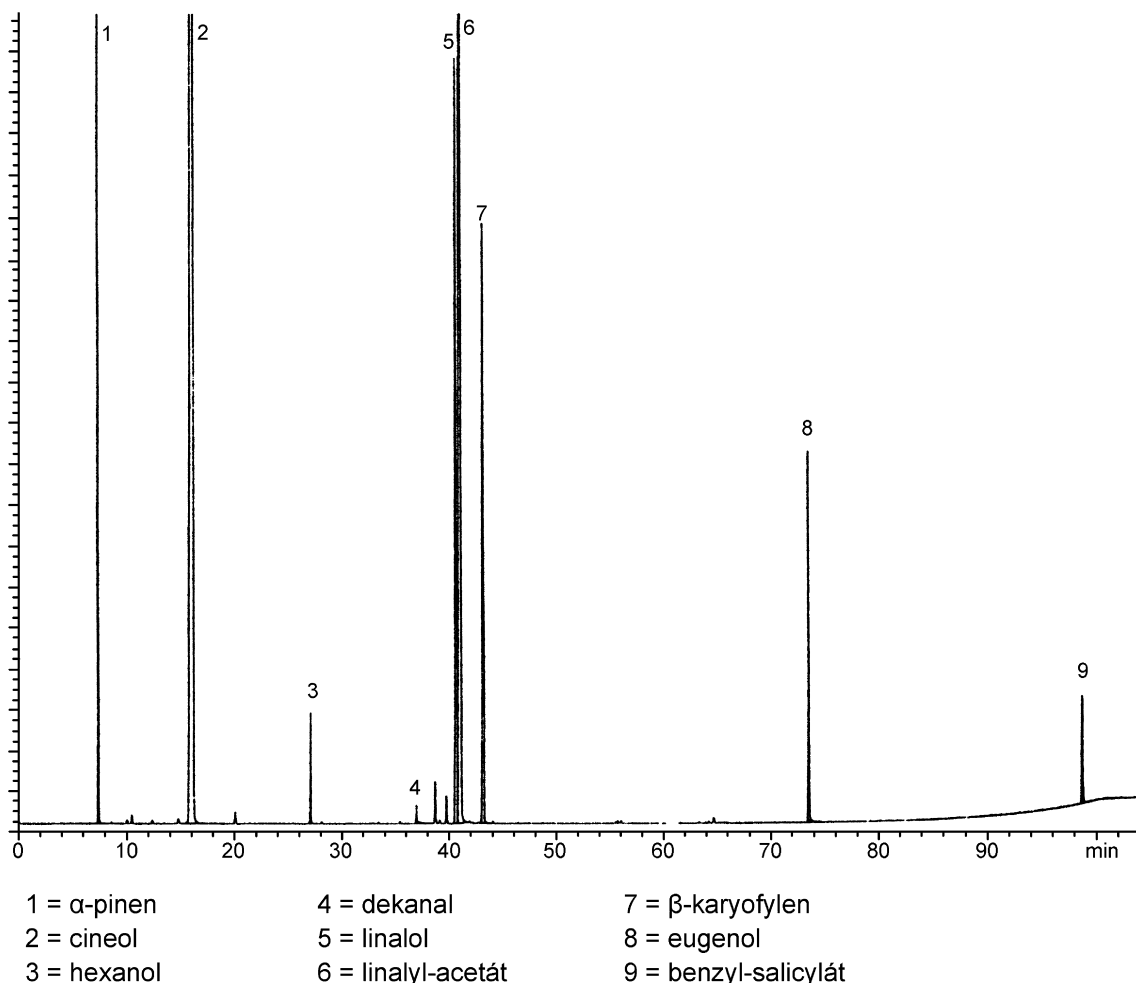
**Identifikace složek.** Použije se chromatogram dodávaný se *silicí CRL*.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem linalolu a píkem linalyl-acetátu;
- *poměr signálu k šumu:* nejméně 100 pro pík dekanalu;
- *limity:* obsah každé z devíti složek v procentech je ve shodě s limity uvedenými v příbalové informaci dodávané se *silicí CRL*.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněny před světlem.



**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v silicích

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- vědecký název použité rostlinné suroviny;
- typ a/nebo chemotyp silice, kde je to vhodné;
- metoda výroby, kde je to vhodné;
- název a koncentrace jakékoliv přidané antioxidační látky, kde je to vhodné;
- další výrobní postupy, které nejsou uvedeny v odstavci Definice, kde je to vhodné.

**EXTRACTA****6.1:0765****Extrakt****DEFINICE**

Jsou to přípravky tekuté (tekuté extrakt a tinktura), polotuhé (husté extrakt a oleoprskyřice) nebo pevné (suché extrakt), obvykle připravované z usušených rostlinných nebo živočišných drog.

Pokud se vyrábějí léčivé přípravky za použití extraktů z materiálů lidského nebo živočišného původu, vyhovují požadavkům stati 5.1.7 *Virová bezpečnost*.

Rozlišují se různé typy extraktů. Standardizované extrakt se upraví v přijatelném rozsahu na požadovaný obsah látek se známým léčebným účinkem; standardizace se dosahuje úpravou extraktu inertní látkou nebo smícháním extraktů různých šarží. Kvantifikované extrakt se upraví na požadovaný obsah látek; úprava se provede smícháním extraktů různých šarží. Ostatní extrakt jsou definovány zejména výrobním postupem (charakterem rostlinné nebo živočišné drogy použité k extrakci; druhem rozpouštědla a podmínkami extrakce) a svými vlastnostmi.

**VÝROBA**

Extrakt se vyrábějí vhodnými metodami za použití ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel. Různé šarže rostlinných nebo živočišných drog se před extrakcí smíchají. Extrahované rostlinné nebo živočišné drogy se mohou předem upravit, např. inaktivací enzymů, rozdrobněním nebo odtučněním. Kromě toho se mohou po extrakci odstranit nežádoucí látky.

Rostlinné i živočišné drogy a organická rozpouštědla používá k výrobě extraktů vyhovují příslušnému lékopisnému článku. U hustých a suchých extraktů, u nichž se organické rozpouštědlo odstraňuje odpařováním, se může získané nebo recyklované rozpouštědlo znovu použít za předpokladu, že procesy zpětného získávání se kontrolují a monitorují tak, aby se zajistilo, že rozpouštědla vyhovují příslušným standardům před opětovným použitím nebo smícháním s jinými schválenými látkami. Voda použitá pro přípravu extraktů má vhodnou jakost. S výjimkou zkoušky Bakteriální endotoxiny vyhovuje voda požadavkům článku *Aqua purificata (0008)*, části Čištěná voda nerozplněná. K výrobě extraktu se může použít pitná voda, jestliže vyhovuje definovaným požadavkům, které umožňují standardní výrobu extraktu.

Kde je to vhodné, provede se vhodnými metodami úprava na žádanou konzistenci extraktu, obvykle za sníženého tlaku a za teploty, při které dochází k minimálnímu rozkladu léčivých látek. Silice oddělené během výroby se mohou vrátit zpět do extraktu ve vhodné fázi výrobního postupu. Pomocné látky se mohou přidávat v různých fázích výrobního postupu, např. ke zlepšení technologických vlastností, jako je homogenita nebo konzistence. Mohou se přidávat i vhodné stabilizátory a protimikrobní látky.

Extrakce daným rozpouštědlem vede k typickému zastoupení charakteristických složek v extrahovaném materiálu; během výroby standardizovaných a kvantifikovaných extraktů purifikačními postupy se může toto zastoupení zvýšit nad očekávané hodnoty, takové extrakt se označují jako čištěné.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Použijí se vhodné metody.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

Kde je to vhodné, použijí se výsledky zkoušení uvedené u jednotlivých použitých rostlinných a živočišných drog. U extraktů se provádějí, s přihlédnutím k výrobnímu postupu, zkoušky na mikrobiologickou jakost (5.1.4), těžké kovy, aflatoxiny a zbytky pesticidů (2.8.13).

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kdekoliv je to možné, provede se stanovení obsahu vhodnou metodou.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- název použité rostlinné nebo živočišné drogy;
- zda se jedná o tekutý, hustý nebo suchý extrakt, nebo zda se jedná o tinkturu;
- u standardizovaných extraktů obsah složek se známým léčebným účinkem;
- u kvantifikovaných extraktů obsah složek (markerů) použitých pro kvantifikaci;
- poměr výchozího materiálu k získanému extraktu (extrakt bez pomocných látek) (DER);
- název rozpouštědla nebo rozpouštědel použitých k extrakci;
- kde je to vhodné, zda byla použita čerstvá rostlinná nebo živočišná droga;
- kde je to vhodné, že se jedná o čištěný extrakt;
- název a množství použitých pomocných látek, včetně stabilizátorů a protimikrobních látek;
- kde je to vhodné, zbytek po vysušení v procentech.

**Extracta fluida****Tekuté extrakt****DEFINICE**

Jsou to tekuté přípravky, u nichž obvykle jeden hmotnostní nebo objemový díl odpovídá jednomu hmotnostnímu dílu usušené rostlinné nebo živočišné drogy. Tyto přípravky jsou, je-li třeba, upraveny tak, že odpovídají požadavkům na obsah rozpouštědla a, kde je to vhodné, i na obsah složek.



**VÝROBA**

Tekuté extrakty se vyrábějí extrahováním rostlinných nebo živočišných drog za použití ethanolu vhodné koncentrace nebo vody, nebo rozpouštěním hustého nebo suchého extraktu (za použití stejné koncentrace extrakční tekutiny, jaká se použila k přípravě tekutého extraktu přímou extrakcí) rostlinných nebo živočišných drog buď ethanolem vhodné koncentrace, nebo vodou. Je-li třeba, tekuté extrakty se filtrují.

Stáním se může vytvořit nepatrný sediment, který je přípustný, jestliže se složení tekutého extraktu významně nemění.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Relativní hustota** (2.2.5). Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku.

**Obsah ethanolu** (2.9.10). U tekutých ethanolických extraktů se provádí stanovení obsahu ethanolu. Obsah ethanolu vyhovuje předepsaným požadavkům.

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Tekuté ethanolické extrakty obsahují nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu, není-li předepsáno jinak.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku. Je-li třeba, upraví se požadavky s ohledem na množství použité pomocné látky.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se, kromě údajů uvedených výše, uvede:

– kde je to vhodné, obsah ethanolu v procentech (V/V) v konečném extraktu.

**Tincturae****Tinktury****DEFINICE**

Jsou to tekuté přípravky obvykle získávané za použití jednoho dílu rostlinné nebo živočišné drogy a deseti dílů extrakční tekutiny nebo jednoho dílu rostlinné nebo živočišné drogy a pěti dílů extrakční tekutiny.

**VÝROBA**

Tinktury se vyrábějí macerací nebo perkolací (přehled postupů je uveden dále) rostlinných nebo živočišných drog za použití pouze ethanolu vhodné koncentrace, nebo rozpouštěním hustého nebo suchého extraktu (za použití stejné koncentrace extrakční tekutiny, jaká se použila k přípravě tinktury přímou extrakcí) z rostlinných nebo živočišných drog ethanolem vhodné koncentrace. Je-li třeba, tinktury se filtrují.

Tinktury jsou obvykle čiré. Stáním se může vytvořit nepatrný sediment, který je přípustný, jestliže se složení tinktury významně nemění.

**Výroba macerací.** Není-li předepsáno jinak, rozdrobní se rostlinná nebo živočišná droga určená k extrakci na kousky vhodné velikosti, promíchá se důkladně s předepsanou extrakční tekutinou a nechá se stát v uzavřené nádobě po vhodnou dobu. Zbytek drogy po extrakci se oddělí od extrakční tekutiny a, je-li třeba, vylisuje se. V tomto případě se obě tekutiny spojí.

**Výroba perkolací.** Je-li třeba, rozdrobní se rostlinná nebo živočišná droga určená k extrakci na kousky vhodné velikosti, důkladně se promíchá s částí předepsané extrakční tekutiny a nechá se po vhodnou dobu stát. Pak se převede do perkolátoru a nechá se perkolovat při teplotě místnosti pomalu tak, aby extrahovaná rostlinná nebo živočišná droga byla vždy překryta zbývající extrakční tekutinou. Zbytek drogy se může vylisovat a získaná tekutina se spojí s perkolátem.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Relativní hustota** (2.2.5). Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku.

**Obsah ethanolu** (2.9.10). Obsah ethanolu vyhovuje předepsaným požadavkům.

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu, není-li předepsáno jinak.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16) Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku. Je-li třeba, upraví se požadavky s ohledem na množství použité pomocné látky.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se, kromě údajů uvedených výše, uvede:

– u tinktur, které nejsou standardizovány a kvantifikovány, poměr výchozího materiálu k extrakční tekutině nebo výchozího materiálu ke konečné tinktuře;  
– obsah ethanolu v procentech (V/V) v konečné tinktuře.

**Extracta spissa****Extrakty husté****DEFINICE**

Jsou to polotuhé přípravky získané odpařením nebo částečným odpařením tekutiny použité k extrakci.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Vyhovuje limitům příslušného článku.

**Rozpouštědla.** Provede se postupem uvedeným v kapitole 5.4, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem.

**Oleoresina****Oleopryskyřice****DEFINICE**

Jsou to polotuhé extrakty tvořené roztokem pryskyřice v sílici a/nebo v mastném oleji, získané odpařením roztoku/roztoků použitých při jejich výrobě.

Tento článek se vztahuje na oleopryskyřice získané extrakcí, ne na přírodní oleopryskyřice.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Voda** (2.2.13). Vyhovuje limitům příslušného článku.

**Rozpouštědla.** Provede se postupem uvedeným v kapitole 5.4, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem.

**Extracta sicca****Suché extrakty****DEFINICE**

Jsou to tuhé přípravky získané odpařením extrakční tekutiny použité při jejich výrobě. U suchých extraktů je ztráta sušením nejvýše 5 %, nejsou-li limity zkoušky Ztráta sušením odlišné od limitů zkoušky Voda uvedené v článku.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Voda** (2.2.13). Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku.

**Ztráta sušením** (2.8.17). Kde je to vhodné, vyhovuje limitům uvedeným v příslušném článku.

**Rozpouštědla.** Provede se postupem uvedeným v kapitole 5.4, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve vzduchotěsných obalech, chráněny před světlem.

**IMMUNOSERA AD USUM  
VETERINARIUM****6.0:0030****Imunoséra pro veterinární použití****DEFINICE**

Jsou to přípravky obsahující imunoglobuliny, purifikované imunoglobuliny nebo imunoglobulinové fragmenty získané ze séra nebo plazmy imunizovaných zvířat. Mohou to být přípravky nativních polyklonálních antisér nebo purifikované přípravky.

Imunoglobuliny nebo imunoglobulinové fragmenty specificky neutralizují antigen použitý k imunizaci. Antigeny zahrnují mikrobiální nebo jiné toxiny, bakteriální a virové antigeny, hadí jedy a hormony. Přípravek je určen k parentálnímu podání, aby zajistil pasivní imunitu.

**VÝROBA****OBEČNÁ USTANOVENÍ**

Imunoséra se získávají ze séra nebo plazmy zdravých zvířat imunizovaných podáním jednoho nebo více vhodných antigenů.

Výrobní metoda má prokazatelně poskytovat shodné šarže imunoséra s přijatelnou bezpečností (5.2.6) a účinkem (5.2.7).

**DÁRCOVSKÁ ZVÍŘATA**

Použitá zvířata jsou určena výhradně k výrobě imunoséra. Drží se za podmínky, které je chrání před zavlečením nákazy, jak nejvíce je to možné. Dárcovská zvířata a všechna zvířata, která jsou s nimi ve styku, se vyšetří a prokáže se, že jsou prostá infekčních agens uvedených na seznamu. Vyšetření se opakuje ve vhodných intervalech. Seznam infekčních agens pro vyšetřování zahrnuje nejen ta agens, která mají význam pro dárcovské zvíře, ale také ta, která mají význam pro cílový živočišný druh zvířat, pro která je přípravek určen. Jestliže se u dárcovských zvířat neprokáže, že jsou prostá příslušného patogenu, musí se podat zdůvodnění a provést validovaná inaktivace, nebo se musí do výrobního postupu zařadit purifikační postup. Krmivo pochází z kontrolovaného zdroje. Jestliže jsou dárcovskými zvířaty kuřata, použijí se kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2). Kde je to u určitých druhů vhodné, přijmou se opatření, aby se zabránilo kontaminaci agens přenosných spongiformních encefalopatií. Jak jen je to možné, pocházejí zvířata, která mají být začleněna do stáda, ze známého zdroje a mají známou historii plemeničky a chovu. Zařazení zvířat do stáda následují specifikované postupy, včetně definovaných karanténních opatření. Během období karantény se zvířata pozorují a vyšetřují, aby se potvrdilo, že jsou prostá agens uvedených na seznamu významných pro dárcovská zvířata. Může být nutné vyšetřit zvířata v karanténě na nepřítomnost dalších agens, v závislosti na jejich známé historii plemeničky a nebo pokud chybí nějaká informace o jejich zdroji.

Musí se zaznamenat každé běžné ošetření nebo terapeutické podání léčiv zvířatům, která jsou v karanténě nebo po ní.

**IMUNIZUJÍCÍ ANTIGEN**

Zásady popsané v odstavci Výroba článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062) se vztahují i na výrobu imunogenu. Použitý antigen se identifikuje a charakterizuje. Výchozí materiály použité pro přípravu antigenu se musí kontrolovat, aby se minimalizovalo riziko kontaminace cizími agens. Antigen se může smíchat se vhodným adjuvans. Imunogen se vyrábí v šaržích. Šarže se musí připravit a zkoušet takovým způsobem, který zajistí, že každá šarže bude stejně bezpečná a prostá cizích agens a vytvoří uspokojivou a shodnou imunitní odpověď.

**IMUNIZACE**

Dárcovská zvířata se imunizují podle stanoveného návodu. U každého zvířete se zaznamenají podrobnosti o dávce imunizujícího antigenu, způsobu podání a data podání. Zvířata se drží za podmínek všeobecného zdravotního dozoru a ve vhodných obdobích imunizačního procesu se sleduje vývoj specifických protilátek.

### ODBĚR KRVE NEBO PLAZMY

Před každým odběrem se zvířata pečlivě vyšetří. Jako dárcovská zvířata se mohou použít pouze zdravá zvířata. Odběr krve se provádí venepunkcí nebo plazmaferézou. Místo vpichu se oholí, očistí a dezinfikuje. Metoda odběru a objem, který se má odebrat, se pro každý případ specifikuje. Krev nebo plazma se odebírá takovým způsobem, aby se zachovala sterilita přípravku. Jestliže se sérum nebo plazma před dalším zpracováním skladuje, přijmou se preventivní opatření, aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci.

Odběr krve nebo plazmy se provede na místě odděleném od prostoru, kde se zvířata drží nebo chovají a odděleném od prostoru, kde se imunosérum dále zpracovává.

Stanoví se jasná kritéria pro vymezení doby mezi imunizací a prvním odběrem krve nebo plazmy, stejně jako doba mezi následujícími odběry a délka doby, po kterou se provádějí odběry. Použitá kritéria musí brát v úvahu účinek odběrů na zdraví a pohodu zvířete během odběru, stejně jako účinek na shodnost výroby šarží konečného přípravku po celou dobu.

Je třeba vzít v úvahu stupeň odstranění všech reziduí, která mohou být důsledkem imunizujícího antigenu nebo podaného léčiva. V případě rizika zbytkových chemických látek je třeba věnovat pozornost stanovení ochranné lhůty pro konečný přípravek. Jestliže je imunizujícím agens živý mikroorganismus, může čas mezi imunizací a odběrem brát v úvahu dobu, kterou potřebuje dárce k eliminaci imunogenu, zejména pokud by nějaké reziduální živé mikroorganismy mohly být pro příjemce škodlivé.

### PŘÍPRAVA KONEČNÉHO VÝROBKU

Pro vytvoření nerozplněné várky (bulk) k přípravě šarže se může spojit několik jednotlivých odběrů plazmy nebo séra od jednoho nebo více zvířat. Definuje se počet odběrů, který se může použít pro vytvoření nerozplněné várky a velikost nerozplněné várky. Jestliže se neprovádí spojení, musí se výrobní postup velmi pečlivě kontrolovat, aby byla zaručena uspokojivá shodnost výrobku.

Aktivní látka se podrobí purifikaci a/nebo inaktivačnímu postupu, pokud není vypuštění takového kroku zdůvodněno a schváleno oprávněnou autoritou. Použitý postup se musí validovat a nesmí mít nepříznivý dopad na biologickou aktivitu přípravku. Validační studie se musí zaměřit na schopnost postupu inaktivovat nebo odstranit všechny potenciální kontaminanty, jako jsou patogeny, jež se mohou přenést z dárcovského na přijímací cílový druh zvířat, na infekční agens a taková agens, která způsobují ubikvitární infekce u dárcovských zvířat a nedají se snadno u těchto dárcovských zvířat eliminovat.

U purifikovaných imunosér se mohou globuliny obsahující imunní látky získat z nativního imunoséra ošetřením enzymem a frakční precipitací, nebo jinými vhodnými chemickými nebo fyzikálními postupy.

**Protimikrobní látky.** Protimikrobní látky se používají k prevenci znehodnocení nebo k prevenci nežádoucích účinků způsobených mikrobiální kontaminací v průběhu používání výrobku. Protimikrobní látky nejsou obsaženy u lyofilizovaných výrobků, ale je-li to vzhledem k maximální doporučené době použití po rekonstituci zdůvodněno, mohou být součástí rozpouštědel pro vícedávkové lyofilizované výrobky. U jednodávkových tekutých přípravků

není přítomnost protimikrobních látek obvykle přijatelná, ale může se použít, když se např. stejný výrobek určený pro použití u živočišných druhů, které nejsou určeny k výživě lidí, plní do jednodávkových i vícedávkových obalů. U vícedávkových tekutých přípravků se hodnotí potřeba účinné protimikrobní konzervace vzhledem k pravděpodobné kontaminaci během používání a k maximální doporučené době použití po prvním otevření obalu.

Účinnost protimikrobních látek po dobu použitelnosti se má prokázat během vývojových studií k uspokojení oprávněné autority.

Účinek protimikrobní látky se hodnotí způsobem popsáním v obecné stati (5.1.3); u vícedávkových přípravků se odeberou dodatečné vzorky k monitorování účinku protimikrobních látek během celé navržené doby použitelnosti. Pokud se nemohou splnit požadavky A ani požadavky B, pak se v odůvodněných případech u antisér pro veterinární použití použijí tyto požadavky: bakterie, za 24 h a 7 dnů nedochází ke zvýšení počtu, po 14 dnech dojde ke snížení počtu o 3 log, po 28 dnech nedochází ke zvýšení počtu; houby, za 14 dnů a za 28 dnů nedochází ke zvýšení počtu.

Přidání antibiotik jako protimikrobní ochrany není přijatelné. Pokud není v článku předepsáno jinak, konečná nerozplněná várka se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů, které se uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace. Přípravek se může lyofilizovat.

*Zkoušky při výrobě.* V průběhu výroby se provádějí vhodné zkoušky, takové jako u vzorků z odběrů před spojením pro vytvoření nerozplněné várky.

### ZKOUŠKY ŠARŽE

Zkoušky, které jsou nutné, aby se prokázala vhodnost šarže výrobku, budou různé a jsou ovlivněny řadou faktorů, včetně podrobností v postupu výroby. Zkoušky, které má výrobce provádět s daným výrobkem, schvaluje oprávněná autorita. Jestliže je výrobek ošetřen validovaným postupem inaktivace cizích agens, může se zkouška na cizí agens u tohoto přípravku se souhlasem oprávněné autority vynechat. Jestliže je výrobek ošetřen validovaným postupem pro inaktivaci mykoplazmat, zkouška na mykoplazmata se může se souhlasem oprávněné autority u daného výrobku vynechat.

Pouze šarže, která vyhovuje odpovídajícím požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti a/nebo odpovídajícím požadavkům v příslušném specifickém článku, se může uvolnit k použití. Se souhlasem oprávněné autority se mohou vynechat určité zkoušky, které při výrobě poskytly stejnou nebo lepší záruku, že šarže bude vyhovovat, nebo byly-li provedeny alternativní zkoušky validované se zřetelem na lékopisnou metodu.

Určité zkoušky, např. zkoušky na protimikrobní látky, zkoušky na cizí bílkoviny a zkoušky na albumin, může výrobce provést s konečnou nerozplněnou várkou, spíše než se šarží, šaržemi nebo podšaržemi konečného výrobku z ní připravených. Za určitých okolností, např. když se odběry provádějí do plazmaferézových vaků a každý z nich je v podstatě šarží, mohou se se souhlasem oprávněné autority zkoušet směsné vzorky.

V souladu se Všeobecnými zásadami (1.1 *Obecná ustanovení*) je u zavedeného antiséra oprávněnou autoritou povoleno upustit od běžného provádění zkoušky bezpečnosti v zájmu pohody zvířat, když bylo při výrobě dostatečného počtu po sobě následujících výrobních šarží zjištěno, že vyhověly zkoušce, a tak byla prokázána shodnost výrobního postupu. Při významných změnách výrobního postupu se může vyžadovat návrat k provádění běžného zkoušení pro opětovné schválení shodnosti. Počet po sobě následujících šarží, který se má zkoušet, závisí na řadě faktorů, jako je typ antiséra, frekvence výroby šarží a zkušenosti s antisérem během vývoje zkoušek bezpečnosti a během provádění zkoušky bezpečnosti šarže. Na základě informací dostupných pro dané antisérum a bez toho, aby bylo dotčeno rozhodnutí oprávněné autority, bude pro většinu výrobků pravděpodobně postačující zkoušení deseti po sobě následujících šarží. U výrobků s přirozeným bezpečnostním rizikem může být nutné pokračovat v provádění zkoušky bezpečnosti u každé šarže.

**Zkoušky na zvířatech.** V souladu s ustanoveními Evropské dohody o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely musí být zkoušení provedeno takovým způsobem, aby se použil minimální počet zvířat a způsobila se co nejmenší bolest, utrpení, úzkost nebo trvalé poškození. Na základě těchto skutečností se musí použít kritéria pro posuzování zkoušek v člancích. Jestliže je např. uvedeno, že zvíře se považuje za pozitivní, infikované atd., jakmile se vyskytnou typické klinické příznaky, potom co nejdříve po získání dostatečných údajů o pozitivním výsledku se má příslušné zvíře buď šetrně utratit, nebo vhodně ošetřit tak, aby se předešlo zbytečnému utrpení. V souladu se Všeobecnými zásadami se mohou použít alternativní metody zkoušení k prokázání shody s článkem, používání takových zkoušek se podporuje tam, kde je možné nahradit nebo snížit použití zvířat nebo snížit jejich utrpení.

**Hodnota pH (2.2.3).** Hodnota pH nativních a purifikovaných imunoser je v rozmezí limitů stanovených pro přípravky.

**Formaldehyd.** Jestliže se pro výrobu imunoséra použije formaldehyd, provede se zkouška na volný formaldehyd, jak je předepsáno v odstavci Zkoušky na čistotu.

**Jiná inaktivační činidla.** Když se použijí jiné metody inaktivace, provedou se vhodné zkoušky, aby se prokázalo, že inaktivační činidlo bylo odstraněno nebo sníženo na přijatelnou zbytkovou úroveň.

**Zkouška účinnosti šarže.** Jestliže existuje pro výrobek specifický článek, není nezbytně nutné provádět při běžném zkoušení šarží antiséra zkoušku popsanou v odstavci Stanovení účinnosti. Typ zkoušky účinnosti šarže bude záviset na požadavcích na výrobek. Kdykoliv je to možné, musí se použít zkoušky *in vitro*. Typ požadované zkoušky může zahrnovat stanovení množství protilátek proti specifikovaným infekčním organismům, stanovení typu protilátky (např. neutralizující nebo opsonizující). Všechny zkoušky se musí validovat. Kritéria přijatelnosti se musí stanovit vzhledem k šarži, u které již bylo prokázáno, že vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti, jestliže existuje pro přípravek specifický článek, a která mě-

la prokazatelně vyhovující účinek v souladu s požadavky stanovenými pro přípravek.

**Celkové imunoglobuliny.** Provede se zkouška na množství celkových imunoglobulinů a/nebo celkových gamaglobulinů a/nebo specifických tříd imunoglobulinů. Získané výsledky musí být v rámci limitů stanovených pro výrobek a schválených oprávněnou autoritou. Šarže neobsahuje více než hladinu prokázanou jako bezpečnou ve studiích bezpečnosti a pokud zkouška účinnosti specificky nepokrývá všechny příslušné imunoglobuliny, jejich úroveň v šarži není menší než v šarži nebo šaržích, které byly prokazatelně účinné ve studiích účinku.

**Celková bílkovina.** U výrobků, kde byly stanoveny požadavky na obsah bílkoviny, stejně jako u šarže, u které byl stanoven pouze horní limit, má šarže prokazatelně obsahovat nejméně takové množství, jako v šarži nebo šaržích prokazatelně účinných ve studiích účinku.

**Cizí agens.** Ke zkoušce popsané v odstavci Zkoušky na čistotu se navíc mohou požadovat specifické zkoušky v závislosti na charakteru přípravku, jeho riziku kontaminace a použití výrobku. Zejména se mohou požadovat specifické zkoušky pro významné potenciální patogeny, kde dárce a příjemce jsou stejného živočišného druhu, a když tato agens nemusí být spolehlivě zjištěna obecnou screeningovou zkouškou popsanou v odstavci Zkoušky na čistotu.

**Voda.** Kde je to vhodné, zkontroluje se lyofilizační postup stanovením vody a prokáže se, že obsah vody je v rozmezí stanoveném pro výrobek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost přípravku se stanoví imunologickými zkouškami a kde je to nutné, stanovením biologické aktivity. K potvrzení totožnosti může také sloužit zkouška Stanovení účinnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Následující požadavky platí pro tekutá imunoséra a rekonstituovaná lyofilizovaná imunoséra.*

**Cizí bílkoviny.** Při precipitačních zkouškách se specifickými antiséry proti plazmatickým bílkovinám vhodného rozmezí živočišných druhů se prokáže pouze přítomnost bílkoviny uvedeného živočišného druhu.

**Albumin.** Purifikovaná imunoséra vyhovují zkoušce na albumin. Pokud není v článku uvedeno jinak, obsahují purifikovaná imunoséra zkoušená elektroforézou nejvyšší stopy albuminu, obsah albuminu není v žádném případě vyšší než 30 g/l rekonstituovaného přípravku, kde je to vhodné.

**Celková bílkovina.** Zkoušený přípravek, se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci asi 15 mg bílkoviny ve 2 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku v odstředivkové zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se, odstředí se po dobu 5 min, supernatantní tekutina se odstraní a zkumavka se obrátí dnem vzhůru a nechá se odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) a obsah bílkoviny se vypo-

čítá vynásobením faktorem 6,25. Získané výsledky nejsou vyšší než horní limit uvedený v označení na obalu.

**Protimikrobní látky.** Vhodnou fyzikálně-chemickou metodou se stanoví množství protimikrobní látky. Množství není menší než minimální množství, které bylo prokazatelně účinné, a není větší než 115 % množství uvedeného v označení na obalu.

**Formaldehyd (2.4.18).** Pokud byl při výrobě použit formaldehyd, není koncentrace volného formaldehydu vyšší než 0,5 g/l, nebyla-li prokázána bezpečnost vyšší koncentrace.

**Sterilita (2.6.1).** Imunoséra pro veterinární použití vyhovují zkoušce na sterilitu. Když je objem tekutiny v obalu větší než 100 ml, použije se metoda membránové filtrace, kdekoliv je to možné.

Jestliže se použije tato metoda, inkubují se živné půdy nejméně po dobu 14 dnů. Kde se metoda membránové filtrace nemůže použít, může se použít metoda přímého očkování do živných půd. Kde je objem tekutiny v každém obalu nejméně 20 ml, minimální objem, který se má použít pro každou živnou půdu je 10 % obsahů obalů nebo 5 ml, podle toho, co je méně. Přiměřený počet zkoušených jednotek (2.6.1) je 1 % šarže, nejméně 4 a nejvýše 10.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Imunoséra pro veterinární použití vyhovují zkoušce na mykoplazmata.

**Bezpečnost.** Zkouška se provede na jednom ze živočišných druhů, pro který je výrobek doporučen. Pokud není v označení na obalu výslovně kontraindikováno předávkování, podá se doporučeným způsobem dvojnásobek maximální doporučené dávky pro použitý živočišný druh. Jestliže je uvedeno varování před předávkováním, podá se jedna dávka. Pro výrobky, které se mají použít u savců, se použijí dvě zvířata minimálního stáří, pro která je výrobek doporučen. U výrobců pro ptáky se použije nejméně deset ptáků minimálního doporučeného stáří. Ptáci se pozorují po dobu 21 dnů. Ostatní živočišné druhy se pozorují po dobu 14 dnů. Nevyskytne se žádná abnormální místní nebo systémová reakce.

**Cizí agens.** Provede se zkouška na cizí agens inokulací do buněčných kultur citlivých k patogenům živočišného druhu dárcovského zvířete a do buněk citlivých k patogenům každého předepsaného cílového živočišného druhu, který je uveden v návodu na obalu (2.6.25). Buňky se pozorují 14 dnů. Během této doby se provede nejméně jedna pasáž. Buňky se kontrolují denně na cytopatický účinek a na konci období 14 dnů se vyšetří na přítomnost hemadsorbujícího agens. Šarže vyhovuje zkoušce, jestliže se nevyskytuje žádný důkaz přítomnosti cizího agens.

U imunoséra ptačího původu, jestliže zkouška v buněčné kultuře nepostačuje ke zjištění potenciálních cizích agens, se provede zkouška inokulací embryonovaných vajec z chovů prostých specifikovaných patogenů (5.2.2) nebo nějakou jinou vhodnou metodou (např. polymerasovou řetězovou reakcí (PCR)).

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se vhodná zkouška účinnosti.

Kde existuje specifický článek, provede se biologické stanovení účinnosti předepsané v článku a výsledek se vyjádří

v mezinárodních jednotkách v mililitru, jestliže takové vyjádření existuje.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem, při teplotě (5 ±3) °C. Tekutá imunoséra nesmí zmraznout.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že přípravek je určen pro veterinární použití;
- zda je přípravek purifikovaný nebo není;
- minimální počet mezinárodních jednotek v mililitru, jestliže takové vyjádření existuje;
- objem přípravku v obalu;
- indikace pro výrobek;
- návod k použití, obsahující interval mezi všemi opakovanými podáními a maximální doporučený počet podání;
- cílový živočišný druh, který je příjemcem imunoséra;
- dávka doporučená pro různé živočišné druhy;
- způsob (způsoby) podání;
- název dárcovského živočišného druhu;
- maximální množství celkové bílkoviny;
- název a množství každé protimikrobní látky nebo jiné látky přidané do imunoséra;
- všechny kontraindikace použití výrobku, včetně všech požadovaných varování před nebezpečím předávkování;
- u lyofilizovaných imunosér;
  - název nebo složení a objem tekutiny pro rekonstituci;
  - období, během které má být imunosérum po rekonstituci spotřebováno.

## IMMUNOSERA EX ANIMALE AD USUM HUMANUM

6.0:0084

### Zvířecí imunoséra pro humánní použití

#### DEFINICE

Jsou to tekuté nebo lyofilizované přípravky obsahující purifikované imunoglobuliny nebo imunoglobulinové fragmenty získané ze séra nebo plazmy imunizovaných zvířat různých druhů.

Imunoglobuliny nebo imunoglobulinové fragmenty mají schopnost specificky neutralizovat nebo vázat se na antigeny použité k imunizaci. Tyto antigeny zahrnují mikrobiální nebo jiné toxiny, lidské antigeny, suspenze bakteriálních a virových antigenů a hadí, štíří a pavoučí jedy. Přípravek je určen k intravenóznímu nebo intramuskulárnímu podání, po naředění, kde je to vhodné.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat stejnorodá imunoséra s přijatelnou neškodností a účinností u člověka a vhodnou stabilitou.

Všechny látky biologického původu použité při výrobě imunoséra mají být prosté bakterií, hub a virů. Výroba zvířecích imunosér pro humánní použití vyhovuje obecným

požadavkům stati 5.1.7 *Virová bezpečnost* společně s vyššími požadavky na virovou bezpečnost uvedenými v tomto článku. Výrobní postup zahrnuje krok nebo kroky prokazatelně odstraňující nebo inaktivující známá infekční agens.

Postupy použité pro výrobu jsou validované, účinné, reprodukovatelné a neoslabují biologickou účinnost přípravku.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek pro vysokomolekulární bílkoviny a zkoušky na čistotu se použije šarže, která byla v klinických zkouškách vyhovující, nebo jedna reprezentativní šarže.

### ZVÍŘATA

Použijí se zvířata druhů schválených oprávněnou autoritou, zdravá a určená výhradně pro výrobu imunosér, která jsou testována a prokazatelně prosta infekčních agens uvedených v seznamu. Zařazení zvířat do uzavřených stád se provádí specifikovanými postupy, včetně stanovení karanténních podmínek. Kde je to vhodné, uvažuje se ještě o dalších specifických agens v závislosti na zeměpisné poloze zařízení použitého pro chov a produkci zvířat. Krmivo pochází z kontrolovaných zdrojů a nepřidávají se živočišné proteiny. Dodavatelé zvířat jsou certifikováni oprávněnou autoritou.

Jestliže jsou zvířata ošetřena antibiotiky, stanoví se vhodné vyčkávací období před odběrem krve nebo plazmy. Zvířata se neošetřují penicilinovými antibiotiky. Je-li podána živá vakcína, provede se odběr krve nebo plazmy pro výrobu imunoséra po uplynutí vhodného čekacího období.

### IMUNIZACE

Kde je to vhodné, identifikují a charakterizují se použité antigeny názvem a číslem šarže, zaznamená se informace o původu a přípravě a kde je to relevantní, prokáže se nepřítomnost cizích infekčních agens.

Vybraná zvířata se izolují nejméně jeden týden před imunizací podle stanoveného schématu s posilovací dávkou ve vhodných intervalech. Mohou se použít adjuvans.

Zvířata se drží pod celkovým zdravotním dohledem a v každém imunizačním cyklu se kontroluje tvorba specifických protilátek.

Před odběrem krve nebo plazmy se zvířata důkladně vyšetří. Jestliže některé zvíře vykazuje patologické léze nesouvisící s imunizací, nepoužije se, stejně jako ostatní zvířata z téže skupiny, pokud není zjevné, že jejich použití nesníží bezpečnost přípravku.

### ODBĚR KRVE NEBO PLAZMY

Odběr krve se provádí ze žíly nebo plazmaferézou. Místo vpichu se oholí, očistí a dezinfikuje. Může se použít anestezie, pokud neovlivní jakost přípravku. Není-li předepsáno jinak, může se přidat protimikrobní látka. Krev nebo plazma se odeberou způsobem zajišťujícím sterilitu přípravku. Krev nebo plazma se odebírají mimo prostor, kde jsou zvířata chována nebo kde přijímají potravu, a mimo prostor, kde probíhá purifikace imunoséra. Jestliže se krev nebo plazma před dalším zpracováním uchovávají, přijmou se opatření, aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci.

Několik jednotlivých odběrů plazmy nebo séra se může před purifikací smíchat. Jednotlivé nebo smíchané vzorky se před purifikací podrobí následujícím zkouškám.

**Zkouška na kontaminující viry.** Pokud se přidá protimikrobní látka, musí se se před provedením zkoušky neutralizovat, nebo se zkouška provede na vzorku odebraném před přidáním protimikrobní látky. Každá směs se zkouší na kontaminující viry vhodnou zkouškou *in vitro*.

Každá směs se zkouší inokulací na buněčnou kulturu schopnou detekce širokého spektra virů relevantních pro daný přípravek.

**Účinnost.** Proveďte se biologické stanovení účinnosti, jak je uvedeno v článku. Kde je to vhodné, vyjádří se výsledky v mezinárodních jednotkách na mililitr. Použije se validovaná *in vitro* metoda.

**Obsah bílkovin.** Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na roztok obsahující asi 15 mg bílkovin ve 2 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se v odstředivkové zkumavce s kulatým dnem přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se, 5 min se odstředí, supernatantní tekutina se odstraní a zkumavka se obrátí dnem vzhůru a nechá se odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25. Obsah bílkovin je ve schváleném rozmezí.

### PURIFIKACE A VIROVÁ INAKTIVACE

Imunoglobuliny se koncentrují a purifikují frakcionovanou precipitací, chromatografií, imunoabsorpcí nebo jinou chemickou nebo fyzikální metodou. Mohou se získávat i působením enzymů. Zvolené metody se validují tak, aby se zamezilo kontaminaci ve všech krocích postupu a zamezilo se tvorbě bílkovinných agregátů, které působí na imunobiologickou charakteristiku přípravku. Pro přípravky, které mají obsahovat imunoglobulinové fragmenty, se metody validují tak, aby zaručily úplnou fragmentaci. Purifikační metody se používají tak, aby se nevytvářely vedlejší složky, které by ovlivnily jakost a bezpečnost přípravku.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, používají se k odstranění a/nebo k inaktivaci virů validované postupy, které se zvolí tak, aby se zabránilo tvorbě polymerů nebo agregátů, a jestliže nemá přípravek obsahovat Fab' fragmenty, aby se minimalizovalo štěpení F(ab')<sub>2</sub> na fragmenty Fab'.

Po purifikaci a zpracování se může k odstranění a/nebo inaktivaci virů přidat k meziproductu stabilizátor a meziproduct se může skladovat po dobu vyplývající ze stabilitních údajů.

Pouze meziproduct, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky.

**Čistota.** Proveďte se elektroforéza na neredukujícím polyakrylamidovém gelu (2.2.31). Intenzita pásů se porovná s referenčním přípravkem; žádné další pásy nejsou nalezeny.

### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka se připraví z jednotlivých meziproductů nebo směsí meziproductů získaných od zvířat téhož druhu. Mohou se smíchat meziproducty různých specifit.

Může se přidat protimikrobní látka a stabilizátor. Jestliže se protimikrobní látka přidala ke krvi nebo plazmě, v konečné várce se použije stejná protimikrobní látka.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou fyzikálně-chemickou metodou. Přípravek obsahuje 85 % až 115 % množství uvedeného v označení na obalu.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### ŠARŽE

Konečná várka se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Ty se uzavřou tak, aby se zabránilo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavech Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Jestliže se zkoušky Osmolalita, Obsah bílkovin, Distribuce velikosti molekul, Protimikrobní látka, Stabilizátor, Čistota, Cizí bílkoviny, Albuminy a Stanovení účinnosti provedou v konečné várce s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vynechat.

*Zkoušený přípravek se rekonstruuje způsobem uvedeným v označení na obalu těsně před provedením Zkoušky totožnosti, Zkoušek na čistotu (s výjimkou zkoušky Rozpustnost a Voda) a Stanovení účinnosti.*

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Stanoví se imunologickými zkouškami a, kde je to nutné, stanovením biologické účinnosti. Stanovení biologické účinnosti může být zároveň zkouškou totožnosti.

#### VLASTNOSTI

Imunoséra jsou čiré až opalizující, bezbarvé až velmi slabě nažloutlé tekutiny bez zákalu. Lyofilizované přípravky jsou bílé nebo světle žluté prášky nebo tuhé drobné hmoty. Po rekonstituci vykazují stejné vlastnosti jako tekuté přípravky.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozpustnost.** Do obalu zkoušeného přípravku se přidá objem rozpouštědla určeného k rekonstituci, který je uveden v označení na obalu. Přípravek se zcela rozpustí za dobu uvedenou v označení na obalu.

**Využitelný objem (2.9.17).** Vyhovuje požadavkům pro využitelný objem.

**Hodnota pH (2.2.3).** Hodnota pH je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Osmolalita (2.2.35).** Nejméně 240 mosmol/kg po zředění, kde je to vhodné.

**Obsah bílkovin.** 90 % až 110 % množství uvedeného v označení na obalu a, není-li zdůvodněno a schváleno jinak, nejvýše 100 g/l.

Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na roztok obsahující asi 15 mg bílkovin ve 2 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se v odstředivkové zkumavce s kulatým dnem přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové proste dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se a 5 min se odstředí, supernatantní tekutina se odstraní, zkumavka se

obráti dnem vzhůru a nechá se odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) a obsah bílkoviny se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

**Distribuce velikosti molekul.** Provede se kapalinová chromatografie (2.2.29 nebo 2.2.30). Vyhovuje požadavkům schváleným pro daný přípravek.

**Protimikrobní látka.** Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou fyzikálně-chemickou metodou. Množství protimikrobní látky není menší, než nejmenší prokazatelně účinné množství a není větší než 115 % množství uvedeného v označení na obalu.

**Fenol (2.5.15).** Nejvýše 2,5 g/l, v přípravcích obsahujících fenol.

**Stabilizátor.** Množství stabilizátoru se stanoví vhodnou fyzikálně-chemickou metodou. Přípravek obsahuje 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu.

**Čistota.** Provede se elektroforéza na neredukujícím polyakrylamidovém gelu (2.2.31). Intenzita pásů se porovná s referenčním přípravkem; žádné další pásy nejsou nalezeny.

**Cizí bílkoviny.** Při precipitačních zkouškách se specifickými antiséry se pouze prokáže přítomnost bílkoviny deklarovaného živočišného druhu, není-li předepsáno jinak, např. když byl při výrobě použit materiál lidského původu.

**Albuminy.** Pokud není v článku předepsáno jinak, stanoví se elektroforeticky. Obsah albuminu není větší než limit schválený pro daný přípravek; v žádném případě nepřesáhne 3 %.

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše 3 %.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Není-li předepsáno a schváleno jinak, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Pokud není předepsáno jinak, podá se 1 ml na 1 kg hmotnosti králíka.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se biologické stanovení účinnosti, jak je uvedeno v článku, a pokud je to vhodné, vyjádří se výsledek v mezinárodních jednotkách v mililitru. Může se použít validovaná *in vitro* metoda.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem, při teplotě uvedené v označení na obalu. Tekuté přípravky nesmí zmrznout.

*Doba použitelnosti.* Počítá se od počátku stanovení účinnosti.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mezinárodních jednotek v mililitru, kde je to vhodné;
- množství bílkoviny v obalu;
- pro lyofilizované přípravky:
  - název a objem přiložené tekutiny pro rekonstituci;
  - že imunosérum se použije ihned po rekonstituci;
  - doba nutná k úplnému rozpuštění přípravku;
- způsob podání;
- podmínky skladování;

- doba použitelnosti; pouze u obalů menších než 1 ml, pokud jsou baleny jednotlivě, může být doba použitelnosti z označení na vnitřním obalu vypuštěna za předpokladu, že je uvedena na vnějším obalu a že na vnějším obalu je uvedeno, že nádobka musí být uložena ve vnějším obalu až do použití;
- původ zvířecího druhu;
  - název a množství protimikrobní látky, stabilizátoru a ostatních látek přidávaných k imunoseru.

## OLEA PLANTARUM PINGUIA

6.4:1579

### Rostlinné masné oleje

*Synonymum.* Olea herbaria

#### DEFINICE

Jsou to převážně tuhé nebo tekuté triacylglyceroly mastných kyselin. Mohou obsahovat malá množství jiných lipidů, jako jsou vosky, volné masné kyseliny, parciální acylglyceroly nebo nezmýdelnitelné látky. Rostlinné masné oleje se získávají ze semen, plodů nebo jader různých rostlin lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem, následně se mohou čistit a hydrogenovat. Je-li třeba, může se přidat vhodná antioxidační látka.

*Panenský olej.* Olej získaný z čerstvé drogy vysoké kvality mechanickými postupy (např. lisováním za studena nebo odstředováním).

*Čištěný olej.* Olej získaný lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem a následně buď alkalickým přečištěním (následované bělením a případnou dezodorací), nebo fyzikálním přečištěním.

*Hydrogenovaný olej.* Olej získaný lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem a následně buď alkalicky, nebo fyzikálně přečištěný, případně bělený, následně sušený, hydrogenovaný a dále bělený a dezodorizovaný.

Pro výrobu parenterálních lékových forem se používají pouze oleje alkalicky přečištěné.

#### VÝROBA

Provedou se opatření, aby se zajistilo, že obsah benzo[*a*]pyrenu vyhoví limitu stanovenému oprávněnou autoritou. V Nařízení komise (EC) č. 208/2005 se uvádí limit 2,0 µg/kg.

#### PŘÍPRAVA SUROVÉHO OLEJE

Pokud má rostlina vysoký obsah oleje, získává se olej obvykle lisováním za tepla s následnou extrakcí; pokud je obsah oleje nízký, získává se olej obvykle přímou extrakcí.

#### Mechanické postupy

##### A. Lisování

*Lisování šnekovým lisem za vysokého tlaku.* Skládá se z některých nebo ze všech následujících kroků: čištění, sušení, loupání (odstranění obalných pletiv semen), mletí, vaření a vločkování.

Během *čištění* se odstraní cizí příměsi. *Sušení* je nezbytné, jestliže vlhkost semen je vyšší, než je žádoucí

pro plynulé zpracování. *Loupání (odstranění obalných pletiv semen)* slouží k získání drti bohaté na bílkoviny snížením obsahu vlákniny a ke snížení obsahu nečistot v oleji. *Vaření* slouží různým účelům: ke kompletnímu rozpadu buněk s obsahem oleje, ke snížení viskozity oleje, ke koagulaci bílkovin v drti, k úpravě vlhkosti, ke sterilizaci semen, k detoxikaci nežádoucích složek obsahových látek (gossypol v bavlníkových semenech), ke stabilizaci některých fosfolipidů v drti, a tak ke snížení ztrát následným přečištěním. Účinnost tohoto postupu je taková, že pouze 3 % až 6 % oleje zůstává v drti.

*Lisování šnekovým lisem za mokra.* Hrozny plodů (palmové plody) se umístí do koše a vloží se do horizontálního sterilizátoru, kde se vystaví účinkům páry a teploty. Účelem je inaktivace enzymů, uvolnění plodů z hroznů, koagulace bílkovin apod. Po zahřátí v autoklávu se drť dodává do šnekového lisu. Olej se vyčeří odstředěním a vakuově vysuší.

*Předlisování následované extrakcí rozpouštědlem.* Postupuje se ve stejném pořadí, jak je uvedeno výše. Hlavní funkcí předlisování je získání drti s vynikající propustností pro následující stadium extrakce rozpouštědlem. Extrakce se provádí buď v perkolátoru, nebo v zařízení pro ponornou extrakci. Účinnost extrakce je taková, že pouze 1 % zbytkového oleje zůstává v drti.

##### B. Odstředování

Odděluje olejovou fázi od vodné fáze, která obsahuje ve vodě rozpustné složky a zbytky pevných částic. Tento postup se může provádět za použití:

- samočisticí kádě nebo talířové odstředivky;
- superdekantérů, které se skládají z vodorovných turbín vybavených válcovitou kádí, mírně se zužující na jednom konci, a z plynule se otáčejícího šroubu, který seškrabává stěny kádě; šroub a kád' se otáčejí rozdílnými rychlostmi; pevné částice se odstraňují zúženým koncem kádě a druhým koncem vytéká olej.

**Extrakce rozpouštědlem.** Před extrakcí se provádějí následující kroky: semena se udržují asi jeden týden při teplotě nižší než 24 °C tak, aby se uvolnily slupky ze semen a bylo možné dosáhnout stejnoměrné vlhkosti semene. Potom se semena čistí, melou, loupají a vločkují. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je směs obsahující hlavně *n*-hexan a methylpentany (*TV*: 65 °C až 70 °C) obecně označovaná jako „hexan“. Vzhledem k většímu nebezpečí požáru a výbuchu této směsi se mohou použít i metody využívající zkapalněné plyny a plyny superkritické.

#### ČIŠTĚNÍ

Cílem čištění je odstranění nečistot a látek znečišťujících oleje při co nejmenším poškození triacylglycerolů a minimální ztrátě oleje. Snižuje se obsah následujících látek:

- volných mastných kyselin, které mohou způsobit znehodnocení oleje oxidací, nevhodnou kouřovou chutí po zahřátí a ostrým pachem (při alkalickém čištění);
- vody, která podporuje enzymatické hydrolytické reakce (při alkalickém čištění a sušení);
- parciálních acylglycerolů, které mohou způsobit pěníení a hořkou chuť (při neutralizaci a praní);
- fosfolipidů a fosforečných sloučenin, které mají emulgační vlastnosti, mohou způsobit sedlinu, tmavnutí oleje při



- zahřívání, zakalení a špatnou organoleptickou stabilitu (při alkalickém čištění);
- barviv, jako jsou chlorofyl (při alkalickém čištění) a karotenoidy (při bělení);
- glykolipidů, které mohou tvořit koloidní roztoky ve vodě;
- volných uhlovodíků, parafinu, vosků a pryskyřičných látek;
- kovů (Fe, Cu, Pb, Sn, Pt, Pd, apod.), které jsou silnými katalyzátory oxidace;
- pigmentů, jako je gossypol (v bavlníkovém oleji), nebo mykotoxinů, jako je aflatoxin (hlavně v podzemnicových semenech);
- pesticidů;
- oxidačních produktů (aldehydy, peroxidy);
- bílkovin majících možné alergické reakce;
- nezmýdelnitelných látek (steroly, tokoferoly a další vitaminy);
- polycyklických aromatických uhlovodíků.

**Alkalické čištění.** Zahrnuje tyto postupy: odstranění slizů, je-li třeba, alkalickou neutralizaci, praní a sušení.

**Odstranění slizů.** Během tohoto kroku čištění, tj. zpracováním vodou a/nebo kyselinou fosforečnou a/nebo chloridem sodným, jsou odstraněny fosfolipidy, fosforečné sloučeniny a kovy. Použití tohoto kroku závisí na povaze oleje.

**Alkalická neutralizace.** Tento krok snižuje obsah volných kyselin na méně než 0,1 %; mastné kyseliny se převedou do mýdel nerozpustných v oleji a také další látky se mohou odstranit adsorpcí na tato mýdla, jsou to slizy, fosfolipidy, oxidační produkty, barviva aj. Všechny látky, které se stanou nerozpustnými v oleji, se hydratací odstraní. Nevýhodou alkalické neutralizace je možnost zmýdelnění části neutrálního oleje, zvláště není-li neutralizace dobře provedena.

**Praní.** Tento postup spočívá v odstranění nadbytku nejen mýdla a louhu, ale i zbývajících stop kovů, fosfolipidů a dalších nečistot za použití horké vody.

**Sušení.** Zbytková voda se před dalším zpracováním odstraní ve vakuu, jako např. před bělením.

**Fyzikální čištění.** Zahrnuje zpracování oleje parou ve vysokém vakuu při teplotě vyšší než 235 °C. Tato metoda se může použít pouze u olejů s přirozeně nízkým obsahem fosfolipidů a kovů (palmový a kokosový olej) nebo u olejů, ze kterých byly fosfolipidy a kovy odstraněny koncentrovanou kyselinou fosforečnou a následným adsorptivním zpracováním aktivovanou bělicí hlinkou (slunečnicový, řepkový a sójový olej). Tento postup však nelze použít u tepelně nestálých olejů (bavlníkový olej), které tmavnou.

**Bělení.** Obecná metoda bělení využívá adsorpčního postupu v oleji, obvykle zahřátého na 90 °C ve vakuu po dobu 30 min s bělicí (přírodní nebo aktivovanou) hlinkou nebo uhlím (aktivovaným nebo neaktivovaným); mohou se také přidat syntetické křemičitanové adsorbenty. Tímto postupem se odstraní látky, které nebyly zcela odstraněny během čištění, např. karotenoidy a chlorofyl.

**Dezodorace.** Odstraňuje se pach, těkavé látky a jakákoliv zbytková extrakční rozpouštědla; provádí se zavedením suché páry do oleje, který se udržuje ve vakuu při vysoké teplotě. Používají se různé teploty v závislosti na druhu

oleje: 1 h 30 min až 3 h při teplotě 200 °C až 235 °C nebo 30 min při teplotě přesahující 240 °C.

Jednou z hlavních vedlejších reakcí je tepelné odbarvení jako následek rozkladu karotenoidů při teplotě přesahující 150 °C. Tato metoda přispívá ke ztrátě látek, které mohou být oddestilovány (volné mastné kyseliny, steroly, tokoferoly, část čištěného oleje), a může způsobit *cis/trans*-izomeraci na dvojných vazbách nenasyčených mastných kyselin.

#### ČIŠTĚNÍ OCHLAZENÍM (WINTERIZACE)

Je to odstranění pevných částic a vosků filtrací za snížené teploty (nazývané též odvoskování). Tyto nežádoucí pevné částice a vosky mohou poškozovat vzhled oleje a být příčinou vzniku usazenin.

#### HYDROGENACE

Hydrogenace vysušeného a/nebo běleného oleje se provádí při teplotách 100 °C až 200 °C zaváděním vodíku pod tlakem za přítomnosti katalyzátoru (např. Ni, Pt, Pd). Katalyzátor se potom odstraní filtrací při 90 °C. Vodík musí být čistý, prostý katalyzátorových jedů, bezvodý, s nízkým obsahem oxidu uhličitého, methanu a dusíku. Mohou vzniknout malá množství polymerů. Při parciální hydrogenaci vznikají *trans*-mastné kyseliny.

#### CHROMATOGRAFICKÉ ČIŠTĚNÍ

Pro použití vyžadující vysoké parametry čistoty, zejména parenterální použití, se předpokládá další čištění oleje průchodem přes kolonu obsahující aktivní hlinku. Ke zlepšení účinku je možné použít rozpouštědla. Přednostně se odstraní vysoce polární molekuly, jako jsou oxidované materiály, kyseliny, alkoholy, parciální acylglyceroly a volné steroly. Je-li olej používán k přípravě parenterálních lékových forem, může mít odlišné limity pro číslo kyselosti, číslo peroxidové a obsah vody, než jsou uvedeny v článku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- zda byl olej získán lisováním nebo extrakcí, kde je to vhodné;
- zda je olej vhodný pro výrobu parenterálních lékových forem, kde je to vhodné;
- název a koncentrace přidané antioxidační látky.

## PLANTAE MEDICINALES

7.3:1433

### Rostlinné drogy

#### DEFINICE

Jsou to většinou celé, rozlámané nebo rozdrobněné rostliny, části rostlin, řasy, houby nebo lišejníky v nezpracovaném stavu, obvykle usušené, někdy čerstvé. Mezi rostlinné drogy se řadí také vybrané exsudáty, které nejsou specificky zpracovávány. Rostlinné drogy jsou jednoznačně definovány botanickým vědeckým názvem podle binominálního systému (rod, druh, odrůda a jméno autora).

Jako *celé* se označují rostlinné drogy, jejichž velikost nebyla zmenšena a jsou přítomné (sušené nebo nesusené)

v podobě, v jaké byly sklizeny; např. šípek, plod fenyklu obecného pravého nebo sladkého, květ heřmánku římského. Jako *rozlámané* se označují rostlinné drogy, jejichž velikost byla po sklizni zmenšena pro snadnější zacházení s nimi, sušení a/nebo balení; např. chinovníková kůra, reveňový kořen, mučenková nať.

Jako *rozdrobněné* se označují rostlinné drogy, jejichž křehčí části se v průběhu sušení, balení nebo přepravy rozdrobily; např. rulíkový list, heřmánkový květ, chmelová šištice.

Jako *řezané* se označují rostlinné drogy, jejichž velikost byla zmenšena jiným způsobem než práškováním, kterým se zmenšuje velikost částic rostlinných drog na stupeň, ve kterém již nelze použít makroskopický popis v článku. Pokud jsou rostlinné drogy nařezány ke specifickým účelům, jejichž výsledkem je homogenizace rostlinných drog, např. nařezání na léčivé čaje, jedná se o přípravky z rostlinných drog. Určité rostlinné drogy zpracované tímto způsobem mohou být předmětem samostatných článků.

Rostlinné drogy, které vyhovují svým článkům, a následně jsou nařezány pro účely extrakce, by měly danému článku vyhovět i v řezané formě s výjimkou makroskopického popisu, není-li zdůvodněno jinak.

Pojem *rostlinné drogy* je synonymem pro pojem *rostlinné látky*, který používá Evropské společenství pro legislativu rostlinných léčivých přípravků.

## VÝROBA

Rostlinné drogy se získávají z pěstovaných nebo planě rostoucích rostlin. Jakost rostlinných drog je podstatně zaručena vhodným sběrem, pěstováním, sklizní, sušením, rozdrobňováním a skladovacími podmínkami. Rostlinné drogy jsou, je-li to možné, prosté nečistot, jako jsou zemina, prach, nečistoty a jiné kontaminanty, jako jsou plísňe, hmyz a ostatní živočišné kontaminanty. Rostlinné drogy nenesou známky hniloby.

Při použití dekontaminace je třeba prokázat, že obsahové látky v droze nebyly dotčeny a že droga neobsahuje škodlivé zbytky. Použití ethylenoxidu není pro dekontaminaci rostlinných drog povoleno.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost rostlinných drog je prokázána makroskopickým a mikroskopickým popisem a dále se mohou požadovat další zkoušky (např. tenkovrstvá chromatografie).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2 %, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak. Zkouška se provede, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak. K vyloučení záměn rostlinných drog se mohou provádět vhodné specifické dodatečné zkoušky. Pro specifické účely nebo pro extrakce se nemusí provádět zkouška na cizí příměsi u rostlinných drog, které jsou nařezané, jak je popsáno v odstavci Definice. Za těchto okolností se předpokládá, že řezaný materiál vyhovuje zkoušce na cizí příměsi, pokud byla tato zkouška vyhovující při provádění s ještě nenařezanou drogou.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Zkouška se provede, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Zkouška se provede místo zkoušky Ztráta sušením u rostlinných drog s vysokým obsahem silic.

**Zbytky pesticidů** (2.8.13). Rostlinné drogy vyhovují požadavkům zkoušky. Požadavky zohledňují charakter rostliny a, kde je to nutné, přípravek, v němž může být rostlina použita, a, kde je to vhodné, i úplné záznamy o zacházení s drogou určité šarže.

**Těžké kovy** (2.4.27). Není-li v jednotlivém článku předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak:

- kadmium: nejvýše 1,0 µg/g;
- olovo: nejvýše 5,0 µg/g;
- rtuť: nejvýše 0,1 µg/g.

Kde je to nutné, mohou se stanovit limity pro další těžké kovy.

Kde je to třeba, vyhovují rostlinné drogy dalším zkouškám, např.:

**Celkový popel** (2.4.16).

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

**Extrahovatelné látky.**

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4).

**Číslo hořkosti** (2.8.15).

**Aflatoxin B<sub>1</sub>** (2.8.18). Kde je to nutné, mohou se požadovat limity pro aflatoxiny.

**Ochratoxin A** (2.8.22). Kde je to nutné, může se požadovat limit pro ochratoxin A.

**Radioaktivní kontaminace.** V některých specifických případech je nutné zvážit riziko radioaktivní kontaminace.

**Mikrobiální kontaminace.** Kde je rostlinná droga použita celá, řezaná nebo práškováná jako součást/léčivého přípravku, je mikrobiální kontaminace kontrolována podle stati 5.1.8 *Mikrobiologická jakost rostlinných léčivých přípravků pro perorální použití* nebo 5.1.4 *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* (např. pro kožní použití).

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se vhodnou metodou, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem.

## PLANTAE MEDICINALES AD POTIONEM AQUOSAM

6.0:1435

Rostlinné drogy určené k přípravě čajů

*Synonymum.* Plantae ad ptisanam

## DEFINICE

Čaje se skládají výhradně z jedné nebo více rostlinných drog určených k přípravě perorálních vodných přípravků,

jako jsou odvary, nálevy nebo maceráty. Přípravují se v čas potřeby.

Obvykle jsou distribuovány nerozplněné (bulk) nebo v sáčcích.

Rostlinné drogy vyhovují požadavkům jednotlivých příslušných článků Českého lékopisu, nebo v případě, že články nejsou vypracovány, vyhovují požadavkům článku *Plantae medicinales (1433)*.

Doporučení na mikrobiologickou jakost čajů (*5.1.4 – Kategorie 4*) bere v úvahu předepsaný způsob přípravy čaje (použije se vroucí nebo nevroucí voda).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost rostlinných drog v čajích se určuje botanickým hodnocením.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Stanovení podílu jednotlivých rostlinných drog v čajové směsi se provádí vhodnými metodami.

Čaje v sáčcích vyhovují následující zkoušce.

**Hmotnostní stejnoměrnost.** Stanoví se průměrná hmotnost dvaceti namátkově vybraných jednotek; plné sáčky čaje se jednotlivě zváží. Sáček se pak otevře tak, aby nedošlo k žádným ztrátám, důkladně se za pomoci štětce vyprázdní, prázdný sáček se zváží a z rozdílu se vypočítá hmotnost obsahu. Postup se opakuje s devatenácti zbývajících sáčků. Není-li uvedeno jinak, nelší se více než dva sáčky z dvaceti jednotlivých sáčků od průměrné hmotnosti o více procent, než uvádí tabulka; žádný ze sáčků se nelší o více než dvojnásobek.

Průměrná hmotnost	Odchylka v procentech
méně než 1,5 g	15 %
1,5 g až 2,0 g včetně	10 %
více než 2,0 g	7,5 %

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem.

## PLANTARUM MEDICINALIUM PRAEPARATA

6.8:1434

### Přípravky z rostlinných drog

*Synonyma.* Plantae medicinales praeparatae,  
Rostlinné přípravky

#### DEFINICE

Jsou to homogenní produkty, které se připravují extrakcí, destilací, lisováním, rozdrobňováním, čištěním, zahušťováním nebo fermentací z rostlinných drog.

Zahrnují např. extrakty, silice, lisované šťávy, zpracované exsudáty a rostlinné drogy, rozdrobňené pro specifická použití, např. rostlinné drogy řezané do léčivých čajů nebo práškované pro naplnění do tobolek.

Čaje připravené z rostlinných drog vyhovují požadavkům článku *Plantae medicinales ad potionem aquosam (1435)*.

*Poznámka.* Pojem „rozdrobňený“, který používá Evropské společenství pro legislativu rostlinných léčivých přípravků zahrnuje rostlinné drogy buď řezané, nebo práškované.

Pojem *přípravky z rostlinných drog* je synonymem pro pojem *rostlinné přípravky*, který používá Evropské společenství pro legislativu „rostlinných léčivých přípravků“.

## PRODUCTA AB ADN RECOMBINANTE

6.0:0784

### Přípravky vyrobené rekombinantní DNA technologii

*Synonymum.* Producta ab arte ADN recombinandorum

*V tomto článku jsou uvedeny požadavky na vývoj a výrobu přípravků vyrobených rekombinantní DNA technologií (rDNA). Tyto požadavky nejsou zcela úplné a v jednotlivých případech nebo rozhodne-li oprávněná autorita mohou být jednotlivé články rozšířeny o dodatečné nebo doplňující požadavky.*

*Tento článek není možno použít pro upravené živé organismy používané přímo u lidí a zvířat, např. jako živé vakcíny.*

#### DEFINICE

Produkty technologie rDNA se vyrábějí genetickou modifikací, při níž je DNA obsahující kódy pro požadovaný produkt vložena pomocí plazmidu nebo virového vektoru do vhodného mikroorganismu nebo buněčné linie, kde nastává exprese DNA a tvorba bílkoviny. Žádaný přípravek se pak získá extrakcí a purifikací. Buňka nebo mikroorganismus se před vložením vektoru nazývá hostitelskou buňkou a její stabilní spojení s vektorem, používané ve výrobním procesu, se nazývá hostitelsko-vektorový systém.

#### VÝROBA

Výroba je založena na validovaném systému jednotné inokulace užívajícím hostitelsko-vektorovou kombinaci, která splňuje požadavky oprávněné autority. Systém jednotné inokulace používá banku základních buněk a banku pracovních buněk, které se odvozují od základního hostitelsko-vektorového systému. Dále se mají podrobně popsat postupy kultivace, extrakce a purifikace a zavést definice výrobní šarže.

Kde se léčivé přípravky vyrobené rekombinantní DNA technologií vyrábějí za použití materiálů lidského nebo živočišného původu, vyhovují požadavkům stati *5.1.7 Virová bezpečnost*.

Určení vhodnosti spojení hostitele s vektorem a validace systému jednotné inokulace zahrnuje následující prvky.

#### KLONOVÁNÍ A EXPRESE

Vhodnost hostitelsko-vektorového systému, zvláště z hlediska mikrobiologické čistoty, se prokáže:

- *charakteristikou hostitelské buňky, včetně zdroje, fenotypu a genotypu a média buněčné kultury;*
- *dokumentací o strategii klonování genu a charakteristikou rekombinantního vektoru, která zahrnuje:*
  - i. původ a charakteristiku genu;

- ii. sekvenční analýzu nukleotidů klonovaného genu a kontrolu styčných oblastí vektoru exprese. Klonované sekvence se omezí na minimum a všechny důležité exprimované sekvence se jasně identifikují a ověří na úrovni RNA. Sekvence DNA klonovaného genu se běžně potvrdí na úrovni výchozí kultury po a případně i nad normální hranici populačního zdvojení pro celou stupnici fermentace. V některých systémech, kde je např. mnoho kopií genu vloženo do genomu kontinuální buněčné linie, není vhodné provádět sekvenční analýzu klonovaného genu na úrovni výroby. V těchto případech může pomoci „southern blot“ analýza celkové buněčné DNA nebo sekvenční analýza mediátorové RNA (mRNA). Zvláště je nutné věnovat pozornost charakterizaci exprimované bílkoviny;
  - iii. konstrukci, genetiku a strukturu úplného vektoru exprese;
- *charakteristikou hostitelsko-vektorového systému, která zahrnuje:*
- i. mechanismus přenosu vektoru do hostitelské buňky;
  - ii. počet kopií, fyzikální stav a stabilitu vektoru uvnitř hostitelské buňky;
  - iii. opatření použitá pro podporu a kontrolu exprese.

#### SYSTÉM BUNĚČNÉ BANKY

*Banka základních buněk* je homogenní suspenze původních buněk již změněných vektorem exprese, který obsahuje požadovaný gen. Pro skladování (např. v tekutém dusíku) se rozdělí ve stejné objemech do jednotlivých nádob. V některých případech je nutné vytvořit oddělené banky základních buněk pro vektor exprese a hostitelské buňky.

*Banka pracovních buněk* je homogenní suspenze buněčného materiálu odvozeného z banky základních buněk na úrovni konečné pasáže. Pro skladování (např. v tekutém dusíku) se rozdělí ve stejné objemech do jednotlivých nádob.

Pro obě buněčné banky platí, že všechny nádoby se uchovávají stejným způsobem a jestliže se jednou vyjmou z buněčného skladu, nesmí se tam znovu vrátit.

Buněčná banka se může použít pro výrobu na úrovni konečné pasáže nebo pro výrobu s kontinuální kultivací.

#### *Výroba na úrovni konečné pasáže*

Tato kultivační metoda je definovaná limitujícím počtem pasáží nebo zdvojení populace, které nesmí být při výrobě překročeno. Maximální počet zdvojení buněk nebo úroveň pasáží musí při běžném postupu výroby splňovat dále popsaná kritéria.

#### *Výroba s kontinuální kultivací*

U této kultivační metody není omezen počet pasáží nebo zdvojení populace skutečněných od počátku výroby. Kritéria pro výtěžek, jakož i pro ukončení výroby jsou definována výrobcem. Kulturu je nutné během jejího života monitorovat. Požadovaná frekvence a typ monitorování závisí na povaze výrobního systému a výrobku.

Požadované jsou také informace o molekulární neporušenosti exprimovaného genu a o fenotypové a genotypové charakteristice hostitelské buňky po dlouhodobé kultivaci. Souhlas s výtěžky pro další postup je jasně spojen se sché-

matem požadovaného monitorování. Další postup výroby je také podmíněn jednoznačnou definicí šarže výrobku.

#### VALIDACE BUNĚČNÝCH BANK

Validace buněčných bank obsahuje následující údaje:

- i. o stabilitě buňky získané měřením životaschopnosti a schopnosti udržení vektoru;
- ii. o identitě buněk podle fenotypových vlastností;
- iii. kde je to vhodné, důkaz nepřítomnosti zdrojů potenciálně onkogenních nebo náhodně infekčních agens (viry, bakterie, houby nebo mykoplazmata) v buněčných bankách; zvláštní pozornost se musí věnovat virům, které mohou běžně kontaminovat druhy, ze kterých je odvozena buněčná linie; některé buněčné linie obsahují endogenní viry, např. retroviry, jejichž odstranění je ne snadné; sleduje se proto exprese těchto organismů za různých podmínek, o nichž je známo, že ji mohou indukovat;
- iv. pro savčí buňky buněčné banky se mají získat podrobnosti o jejich potenciální schopnosti nádorového bujení.

#### KONTROLA BUNĚK

Za daných podmínek uchovávání a obnovy buněk se musí pro všechny buněčné banky podrobně dokumentovat původ, forma, skladování, použití a stabilita buněk při předpokládaném způsobu použití. Nové buněčné banky se musí v plné míře validovat.

#### VALIDACE VÝROBNÍHO POSTUPU

##### Extrakce a purifikace

Kapacita každého stupně extrakčního a purifikačního postupu odstranění a/nebo inaktivace kontaminujících látek odvozených z hostitelské buňky nebo kultivačního média, včetně zejména virových částic, bílkovin, nukleových kyselin a přidaných látek, se musí validovat.

Validační studie se provádějí tak, aby ukázaly, že výrobní postup běžně splňuje následující kritéria:

- vyloučení náhodných agens z výrobku; provedou se studie zahrnující např. viry s odpovídající fyzikálně-chemickou strukturou a stanoví se kapacita snížení takovýchto kontaminantů v každém odpovídajícím stupni purifikace;
- přiměřené odstranění vektoru, hostitelské buňky, kultivačního média a kontaminace zkoumadly z výrobku; kapacita snížení DNA se stanoví metodou záměrné kontaminace; redukce bílkovin živočišného původu se může stanovit imunochemickými metodami;
- dodržování stanovených limitů výtěžku produktu kultury;
- dostatečná stabilita všech meziproduktů a/nebo výnosů výroby, pokud se během výroby předpokládá jejich skladování.

##### Charakteristika látky

Nejprve se ověří totožnost, čistota, účinnost a stabilita konečné várky produktu pomocí širokého spektra chemických, fyzikálních, imunochemických a biologických zkoušek. Před propuštěním kontroluje výrobce každou šarži výrobku na totožnost a čistotu a provede vhodné stanovení obsahu.

**Shodnost výroby**

Provedou se vhodné zkoušky dokládající shodnost výroby a purifikace. Ty zahrnují zvláště charakteristické zkoušky, prováděné mezioperační zkoušky a zkoušky konečného výrobku, jako např.:

**SLOŽENÍ AMINOKYSELIN**

*Částečná aminokyselinná sekvenční analýza.* Sekvenční údaje umožňují potvrzení správnosti *N*-terminálního zpracování a detekují ztrátu *C*-terminálních aminokyselin.

*Mapování peptidů.* Chemické a/nebo enzymatické štěpení bílkovinného produktu a analýza peptidů vhodnou metodou, jako je dvourozměrná gelová elektroforéza, kapilární elektroforéza nebo kapalinná chromatografie, nesmí ukázat žádné významné rozdíly mezi zkoušenou bílkovinou a referenčním přípravkem. Peptidové mapování se může také použít k důkazu správných disulfidických vazeb.

**STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI**

*Udržení klonovaného genu.* Oprávněnou autoritou je povolen minimální procentuální podíl buněk po kultivaci, obsahujících vektor nebo klonovaný gen.

*Celková bílkovina.* Stanoví se výtěžek bílkoviny.

*Chemická čistota.* Čistota bílkovinného přípravku se ověří porovnáním s referenčním přípravkem vhodnými metodami, jako je kapalinná chromatografie, kapilární elektroforéza nebo elektroforéza v polyakrylovém gelu s natrium-dodecyl-sulfátem.

*Bílkoviny hostitelské buňky.* Pokud není předepsáno jinak, prokáží se bílkoviny hostitelské buňky imunochemickými metodami, např. pomocí polyklonálních antisér proti bílkovině složky hostitelsko-vektorového systému používaného při výrobě přípravku. Mohou se použít následující typy metod: metody vytěsnění v kapalně fázi (např. radioimunoanalýza), metody přímé vazby v kapalně fázi a metody přímé vazby pomocí antigenu imobilizovaného na nitroceluloso-vých (nebo podobných) membránách (např. metoda dot-immunoblot, Western blots). Všeobecné požadavky pro validaci imunochemických metod jsou uvedeny ve stati *Imunochemické metody (2.7.1)*. Navíc musí imunochemické metody pro stanovení kontaminace hostitelské buňky vyhovovat následujícím požadavkům:

- *antigenní přípravky:* antiséra jsou vytvořena proti antigenům odvozeným z hostitelského organismu, do kterého byl vložen vektor použitý při výrobě postrádající specifický gen kódující žádanou látku; tato hostitelská buňka se kultivuje a bílkoviny se extrahují za stejných podmínek kultivace a extrakce, jaké se použily při výrobě. Pro přípravu antiséra se mohou také použít přípravky antigenů částečně purifikovaných některým ze způsobů purifikace používaným při výrobě;
- *kalibrace a standardizace:* kvantitativní údaje získané porovnáním kalibračních křivek závislosti odpovědi na dávce za použití referenčních přípravků antigenů odvozených od hostitelských bílkovin; protože tyto přípravky jsou směsí špatně definovaných bílkovin, referenční přípravek se připraví a kalibruje vhodnou metodou pro stanovení bílkovin; tento přípravek se uchovává ve vhodném stabilním stavu, který umožňuje jeho použití v delším časovém období;

- *antiséra:* obsahují vysoce aviditní protilátky schopné ve směsi antigenů rozpoznat tolik různých bílkovin, kolik je možné, a nedávají vedlejší reakce s výrobkem.

*DNA pocházející z hostitelské buňky nebo vektoru.* Zbytková DNA se zjišťuje hybridizační analýzou pomocí vhodné citlivé analytické metody nezávislé na sekvenci nebo jinou dostatečně citlivou analytickou metodou.

**Hybridizační analýza**

Ve zkoušeném vzorku je DNA denaturována na jednovláčkovou DNA, imobilizuje se na membráně z nitrocelulosity nebo jiné vhodné membráně a hybridizuje se se značenou DNA připravenou z výrobního hostitelsko-vektorového systému (sondy DNA). V rámci široké možnosti experimentálních přístupů pro stanovení hostitelsko-vektorové DNA mají všechny hybridizační metody splňovat následující kritéria:

- *sondy DNA:* purifikovaná DNA se získá z hostitelsko-vektorového systému rostoucího ve stejných podmínkách jako při výrobě; také se mohou použít vzorky hostitelské chromozomální DNA a vektorové DNA připravené odděleně;
- *kalibrace a standardizace:* kvantitativní údaje se získají porovnáním s odpověďmi získanými při použití referenčních přípravků; pro sondy chromozomální DNA a sondy vektorové DNA se použijí referenční přípravky chromozomální DNA a vektorové DNA; referenční přípravky se kalibrují spektroskopicky a uchovávají se ve vhodném stabilním stavu, který umožňuje používání po delší časové období;
- *podmínky hybridizace:* přesnost hybridizačních podmínek jako takových zajišťuje specifickou hybridizaci mezi sondami a referenčním přípravkem DNA; přípravek v použité koncentraci nesmí ovlivnit hybridizaci.

**Metody nezávislé na sekvenci**

Vhodné metody zahrnují:

- detekci sulfonovaných cytosinových zbytků v jednovláčkové DNA (kde DNA je imobilizovaná na filtru a cytosiny jsou derivatizované *in situ* před detekcí a kvantitativním stanovením pomocí protilátek proti sulfonovaným skupinám);
- detekci jednovláčkové DNA pomocí fragmentu jednovláčkové DNA, vázaného na bílkovinu a protilátky proti této bílkovině.

Žádný z těchto postupů nepožaduje použití specifické hostitelské nebo vektorové DNA jako referenčního přípravku pro stanovení. Nicméně se tato metoda musí validovat, aby se zajistil rovnoběžný průběh s použitým referenčním přípravkem DNA, linearita odpovědi a to, že přípravek nebo pomocné látky nebudou v použité koncentraci ovlivňovat stanovení účinnosti.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI, ZKOUŠKY NA ČISTOTU, STANOVENÍ OBSAHU**

Požadavky na konečný výrobek (konečná várka nebo léčivá forma), kterým musí vyhovovat po dobu jeho použitelnosti, a specifické zkušební metody jsou uvedeny v jednotlivých člancích.

## PRODUCTA ALLERGENICA

7.3:1063

## Alergenové přípravky

*Tento článek se nevztahuje na chemikálie, které se používají pouze k diagnostice kontaktní dermatitidy; produkty chemické syntézy; alergeny získané rekombinantní DNA technologií. Není nezbytně nutné jej používat pro alergenové přípravky pro veterinární použití.*

## DEFINICE

Jsou to farmaceutické přípravky získané z extraktů přírodních materiálů, které obsahují alergeny, což jsou látky, které jsou příčinou a/nebo podnětem k vyvolání alergické reakce. Alergenové složky jsou nejčastěji látky bílkovinné povahy. Tyto přípravky jsou určeny k diagnostice *in vivo* nebo k léčbě alergických onemocnění, přičítaných těmto alergenům.

Alergenové přípravky jsou dostupné jako hotové výrobky a jako hotové výrobky používané pro konkrétní pacienty. Obvykle jsou to přípravky určené k parenterálnímu podání, podání do oka, inhalačnímu, perorálnímu, sublinguálnímu podání nebo jako přípravky pro kožní testy.

K *in vivo diagnostickým účelům* pro kožní prick-testy se obvykle připravují jako neupravený extrakt v roztoku glycerolu 50% (V/V). Pro intradermální diagnostiku nebo k provokačním testům při podání do nosu, oka nebo bronchů se může připravit vhodné ředění alergenových přípravků zředěním vodných nebo glycerolových extraktů nebo rekonstitucí neupravených lyofilizovaných extraktů.

Pro *specifickou imunoterapii* mohou být alergenové přípravky buď neupravené, nebo chemicky upravené extrakty a/nebo extrakty adsorbované na různé nosiče (např. hydroxid hliníkový, fosforečnan vápenatý nebo tyrosin).

## VÝROBA

## VÝCHOZÍ MATERIÁLY

Výchozí materiály pro alergenové přípravky jsou živočišného nebo rostlinného původu, většinou pyly, plísňe, roztoči, zvířecí epitelie a kožní deriváty (jako jsou chlupy a peří) a/nebo šupiny, toxiny blanokřídlého hmyzu, hmyz a určité potraviny.

Pokud se alergenové přípravky vyrábějí za použití materiálů lidského nebo živočišného původu, vyhovují požadavkům státi 5.1.7 *Virová bezpečnost*.

Výchozí materiály jsou charakterizovány svým původem, podstatou, metodou sběru nebo výroby a předběžného zpracování. Jsou stanoveny metody kontroly a kritéria přijatelnosti vztahovaná na totožnost a čistotu. Kritéria přijatelnosti musí zajistit shodnost výchozích materiálů z kvantitativního i kvalitativního hlediska. Skladují se v definovaných podmínkách odvozených ze stabilitních údajů.

Sběr nebo výroba, stejně jako zacházení s výchozími materiály jsou takové, aby byla od šarže k šarži zaručena co možná největší stejnorodost složení.

Obsah významných zbytkových rozpouštědel, těžkých kovů a pesticidů se stanoví na počtu šarží podle odpovídajícího vzorkovacího plánu. Limity zbytkových rozpouštědel a pesticidů se stanoví podle pravidel uvedených ve státech 2.4.24

*Totožnost a kontrola zbytkových rozpouštědel a 2.8.13 Zbytky pesticidů.*

**Pyly.** Musí se minimalizovat možné chemické kontaminanty, jako jsou pesticidy, těžké kovy a rozpouštědla. Obsah cizích pylů musí být nejvýše 1 % celkových pylů a 0,5 % jednotlivého pylu při mikroskopickém stanovení počtu částic. Detekovatelné spory plísní nesmí překročit 1 %. Kontaminace částicemi rostlinného původu, jinými než pyly, se musí minimalizovat. Maximum povolené kontaminace se musí zdůvodnit.

**Plísňe.** Musí se minimalizovat biologicky aktivní kontaminanty, jako jsou mykotoxiny v plísních a jakákoliv jejich přítomnost se musí zdůvodnit. Musí se přijmout vhodná opatření k zamezení kontaminace cizími kmeny plísní. Musí se věnovat péče minimalizaci přítomnosti všech alergenních složek v kultivačních půdách a médiích plísní sloužících jako výchozí materiály. Použití kultivační půdy/média obsahující látky lidského nebo živočišného původu se musí zdůvodnit, a je-li požadována, musí se vhodně ošetřit tak, aby se inaktivovala nebo vyloučila možná přenosná agens nemocí.

Výrobní metody se validují, aby se prokázalo, že alergenové přípravky získané z plísní a určené pro parenterální podání, budou-li zkoušeny, vyhoví zkoušce na neškodnost určené pro imunoséra a vakcíny pro humánní použití (2.6.9).

**Roztoči.** Musí se přijmout vhodná opatření k zamezení kontaminace cizími kmeny roztočů. Musí se věnovat péče minimalizaci přítomnosti všech alergenních složek v kultivačních půdách a médiích roztočů sloužících jako výchozí materiály. Použití kultivační půdy/média obsahující látky lidského nebo živočišného původu se musí zdůvodnit, a je-li požadována, musí se přijmout vhodná opatření, aby se zajistila inaktivace nebo vyloučila možná přenosná agens nemocí.

**Zvířecí epitelie a epitelové útvary.** Získávají se ze zdravých zvířat vybraných tak, aby se vyloučila možná přenosná agens nemocí.

**Toxiny blanokřídlého hmyzu.** Druhy blanokřídlého hmyzu, ze kterých se jedy extrahují, se definují a specifikují. Metody sběru hmyzu a extrakce jedů se popisují a musí se zajistit, že výchozí materiály mají správnou jakost.

**Potraviny.** Kde je to vhodné, uvedou se vědecké názvy (druh, odrůda, kmen apod.) živočišných a rostlinných druhů, jejichž části se použijí. Potraviny musí být v jakosti vhodné k výživě člověka. Uvede se původ potravinového materiálu, stejně jako stupeň jeho zpracování.

## VÝROBNÍ POSTUPY

Alergenové přípravky se obecně získávají extrakcí a mohou se purifikovat z výchozích materiálů za použití vhodných metod, které prokazatelně uchovávají alergenní vlastnosti složek. Pro alergeny, pro které není dostatek pacientů k určení celkové alergenní aktivity *in vivo* nebo *in vitro*, se minimálně požaduje extrakční poměr udávající relativní podíl (m/V) alergenních výchozích materiálů a rozpouštědel. Alergenové přípravky pro parenterální podání, podání do oka, inhalační podání a přípravky pro kožní testy se vyrábějí v aseptických podmínkách.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci alergenových přípravků zamýšlených pro jiný způsob podání se přijmou vhodná opatření, aby se zajistila jejich mikrobiální jakost; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati 5.1.4 *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití*.

Všechny alergenové přípravky se vyrábějí v podmínkách navržených k minimalizaci exogenní a endogenní enzymatické degradace.

Purifikační postup je navržen tak, aby minimalizoval obsah jakýchkoliv potenciálních dráždicích složek o nízké molekulové hmotnosti nebo jiných nealergenních složek.

Alergenové přípravky mohou obsahovat vhodnou protimikrobní látku, jejíž podstata a koncentrace se musí zdůvodnit.

Výrobní postup zahrnuje různé etapy:

- výchozí materiál;
- aktivní složka, je to obecně upravený nebo neupravený alergenový extrakt; kde je to vhodné, skladuje se v podmínkách zajišťujících její stabilitu, např. lyofilizovaná;
- konečné přípravky.

Všechny ostatní stupně výroby jsou považovány za meziprodukty.

#### PRACOVNÍ REFERENČNÍ PŘÍPRAVEK

Jako pracovní referenční přípravek se vybere vhodný reprezentativní přípravek charakterizovaný a používaný k ověření shodnosti šarží. Uchovává se ve vhodně velkém množství v podmínkách, které zaručují jeho stabilitu, např. lyofilizovaný.

#### Charakterizace pracovního referenčního přípravku.

*Rozsah charakterizace pracovního referenčního přípravku závisí na výchozím materiálu, znalosti alergenních složek a dostupnosti vhodných zkoumadel, stejně jako na zamýšleném použití. Charakterizovaný laboratorní/pracovní referenční přípravek se používá jako referenční při kontrole šarží aktivních složek a meziproductů a také, je-li to možné, ke kontrole šarží konečných přípravků.*

Pracovní referenční přípravek se charakterizuje stanovením obsahu bílkovin a profilem bílkovin odpovídajícími metodami (jako je izoelektrická fokusace, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s natrium-dodecyl-sulfátem, imunoelektroforéza, kapilární elektroforéza, chromatografické metody a hmotnostní spektrometrie).

Alergenní složky se mohou detekovat vhodnými metodami (např. imunoblotem nebo dvojrozměrnou radioimunoelktroforézou). Charakterizace alergenních složek může zahrnovat identifikaci významných alergenů založenou na sérologických nebo jiných metodách používajících směsi nebo jednotlivá séra alergických pacientů nebo alergen-specifické polyklonální nebo monoklonální protilátky.

Stanovení obsahu významných alergenů se provede, kdekoliv je to možné. Výběr významných alergenů se musí zdůvodnit. Jednotlivé alergeny se identifikují, kdekoliv je to možné, podle mezinárodně ustanoveného názvosloví.

Biologická účinnost prvního pracovního referenčního přípravku se stanoví metodami *in vivo*, jako jsou kožní testy, a vyjádří se v jednotkách biologické účinnosti, kromě případu, není-li k dispozici dostatek pacientů. V tomto případě se stanoví biologická účinnost prvního pracovního refe-

renčního přípravku metodami *in vitro*. Následně se biologická účinnost dalších pracovních referenčních přípravků stanoví metodami *in vitro* porovnáním s výsledky prvního pracovního referenčního přípravku. Účinnost *in vitro* se může stanovit vhodnými imunoanalýzami (např. těmi, které jsou založeny na inhibici vazebné kapacity protilátek specifického imunoglobulinu IgE).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Zkoušky totožnosti se ve výrobním procesu provádějí co nejpozději je to možné. V případě přípravků používaných pro konkrétní pacienty se provádí kontrola aktivní složky a/nebo v mezioperačním stupni mezi aktivní složkou a konečným přípravkem.

Totožnost se potvrdí porovnáním s pracovním referenčním přípravkem za použití profilu bílkovin vhodnými metodami (např. izoelektrickou fokusací, elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s natrium-dodecyl-sulfátem, imunoelektroforézou, imunoblotem, kapalinovou chromatografií nebo hmotnostní spektrometrií).

Ve výjimečných případech, pokud není pracovní referenční přípravek k dispozici, se pro zkoušku totožnosti může použít reprezentativní šarže.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Zkoušky na čistotu se ve výrobním procesu provádějí co nejpozději je to možné. V případě přípravků používaných pro konkrétní pacienty se provádí kontrola aktivní složky a/nebo v mezioperačním stupni mezi aktivní složkou a konečným přípravkem.

Pro kvalitativní a kvantitativní charakteristiku alergenů byly vyvinuty různé biochemické a imunologické zkoušky. Případy, kde se tyto metody nemohou použít, zvláště stanovení alergenní účinnosti a alergenního profilu a/nebo profilu bílkovin, se musí zdůvodnit.

**Voda** (2.5.12 nebo 2.5.32). Nejvýše 5 % u lyofilizovaných přípravků. V případě perorálních lyofilizátů může být obsah vody vyšší než 5 %, je-li to zdůvodněno a schváleno.

**Sterilita** (2.6.1). Alergenové přípravky určené k parenterálnímu podání, podání do oka, k inhalačnímu podání nebo přípravky pro kožní testy vyhovují zkoušce na sterilitu.

**Mikrobiální kontaminace.** Pro nesterilní alergenové přípravky jsou uvedena příslušná doporučení ve stati 5.1.4 *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití*.

**Obsah bílkovin** (2.5.33). 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu, není-li zdůvodněno a schváleno jinak. Pokud lze stanovit biologickou účinnost, potom se stanovení obsahu bílkoviny provádí jako zkouška shodnosti šarží a obsah bílkoviny je v rozmezí 50 % až 150 % množství uvedeného v označení na obalu. Pokud konečný výrobek obsahuje pomocné látky bílkovinné povahy, provede se zkouška Obsah bílkovin co nejpozději během výroby před přidáním těchto bílkovinných pomocných látek.

**Profil bílkovin.** Profil bílkovin provedený vhodnými metodami odpovídá pracovnímu referenčnímu přípravku. Kde je to možné, ověří se přítomnost odpovídajících alergenních složek. Výběr zkoušených odpovídajících alergenních složek se musí zdůvodnit.

*Mohou se provést různé dodatečné zkoušky se vzrůstající selektivitou, ale v případě přípravků k terapeutickému použití se musí vždy provést validované stanovení účinnosti (celková alergenní účinnost, stanovení jednotlivých alergenů nebo jiné zdůvodněné zkoušky).*

**Hliník (2.5.13).** 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu, ale v žádném případě ne výše než 1,25 mg v jedné lidské dávce, není-li zdůvodněno a schváleno jinak; stanoví se, pokud se jako adsorbent použil hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý.

**Vápník (2.5.14).** 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu; stanoví se, pokud se jako adsorbent použil fosforečnan vápenatý.

**Alergenní profil.** Významné alergenní složky se identifikují pomocí vhodných metod za použití alergen-specifických lidských nebo zvířecích protilátek.

**Celková alergenní účinnost.** 50 % až 150 % množství uvedeného v označení na obalu při stanovení inhibiční vazebné kapacity protilátek specifického imunoglobulinu E nebo jinou vhodnou odpovídající *in vitro* metodou.

**Jednotlivé alergeny.** 50 % až 200 % množství uvedeného v označení na obalu pro příslušnou alergenní složku, stanoví se vhodnou metodou.

#### SKLADOVÁNÍ

Adsorbované alergenní přípravky nemají zmrazovat, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název alergenního přípravku;
- biologická účinnost a/nebo obsah bílkoviny a/nebo extrakční koncentrace;
- způsob podání a zamýšlené použití;
- podmínky skladování;
- kde je to vhodné, název a množství přidávané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, u lyofilizovaných přípravků:
  - název, složení a objem tekutiny, která se použije k rekonstituci přípravku;
  - doba, po kterou se přípravek po rekonstituci může použít;
- kde je to vhodné, že přípravek je sterilní;
- kde je to vhodné, název a množství adsorbentu.

## PRODUCTA CUM POSSIBILI TRANSMISSIONE VECTORIUM ENCEPHALOPATHIARUM SPONGIFORMIUM ANIMALIUM

**6.0:1483**

Přípravky s rizikem přenosu původců zvířecích spongiformních encefalopatií

#### DEFINICE

Jsou to deriváty tkání nebo sekretů živočichů vnímavých k přenosným spongiformním encefalopatiím vyvolaným jinak než experimentální čelenží. Tento článek platí pro

všechny látky nebo přípravky získané z takových zvířat a všechny látky nebo přípravky, u nichž se výrobky získané z těchto zvířat použily jako účinné nebo pomocné látky nebo látky použité během výroby, např. jako suroviny nebo zdroje materiálů, výchozí materiály nebo zkoumadla.

#### VÝROBA

Vyhovuje obecné stati *Minimalizace rizika přenosu původců zvířecí spongiformní encefalopatie léčivými přípravky (5.2.8)*.

## PRODUCTA FERMENTATIONIS

**6.0:1468**

### Produkty fermentace

*Synonymum.* Producta ab fermentatione

*Článek se vztahuje na nepřímé genové produkty získané fermentací. Netýká se:*

- *lékopisných článků na vakcíny pro humánní nebo veterinární použití;*
- *přípravků odvozených z kontinuálních buněčných linií humánního nebo zvířecího původu;*
- *přímých genových produktů získaných transkripcí a translací z nukleové kyseliny na bílkovinu, ať jsou či nejsou vystaveny posttranslační modifikaci;*
- *produktů získaných semisynteticky z produktů fermentace a produktů získaných biokatalytickou transformací;*
- *úplných živných koncentrátů nebo surových fermentačních produktů.*

*Tento článek uvádí obecné požadavky na vývoj a výrobu produktů fermentace. Tyto požadavky nejsou v každém článku bezpodmínečně úplné. Doplňující a dodatečné požadavky mohou být uvedeny u jednotlivých článků nebo vyžadovány oprávněnou autoritou.*

#### DEFINICE

Pro účely tohoto článku se jako produkty fermentace chápu léčivé nebo pomocné látky vyráběné kontrolovanou fermentací jako nepřímé genové produkty. Jsou to primární nebo sekundární genové metabolity mikroorganismů, jako jsou bakterie, kvasinky, houby a mikroskopické řasy, ať jsou či nejsou modifikovány tradičními postupy nebo rekombinační DNA technologií. Tyto metabolity zahrnují vitaminy, aminokyseliny, antibiotika, alkaloidy a polysacharidy.

Mohou se získávat buď jednorázovou, nebo kontinuální fermentací, po níž následují postupy, jako jsou extrakce, koncentrace, purifikace a izolace.

#### VÝROBA

Výroba je založena na postupu, který byl validován a ukázala se jeho vhodnost. Rozsah validace závisí na kritické povaze případného postupného kroku.

#### CHARAKTERISTIKA PRODUKČNÍCH MIKROORGANISMŮ

Historie mikroorganismu použitého k výrobě se dokumentuje. Mikroorganismus se přiměřeně charakterizuje. Charakteristika může obsahovat stanovení fenotypu mikroorga-



nismu, makroskopické i mikroskopické metody a biochemické zkoušky, a je-li to vhodné, stanovení genotypu mikroorganismu a molekulární genetické zkoušky.

#### POSTUPY POUŽÍVAJÍCÍ SYSTÉM JEDNOTNÉ INOKULACE

*Banka základních buněk* je homogenní suspenze nebo lyofilizát původních buněk rozplněných do jednotlivých obalů pro skladování. Prokáže se životaschopnost a produktivita buněk ve vybraných podmínkách skladování a jejich vhodnost pro zahájení uspokojivého výrobního procesu po skladování.

Pomnožení banky základních buněk se provede systémem jednotné inokulace, který používá banku pracovních buněk.

*Banka pracovních buněk* je homogenní suspenze nebo lyofilizát buněčného materiálu pocházejícího z banky základních buněk, rozplněná ve stejných objemech do jednotlivých obalů pro skladování (např. v tekutém dusíku).

Výroba se může provádět buď jednorázovou, nebo kontinuální kultivací a může se ukončit za definovaných podmínek.

Všechny nádoby buněčné banky se skladují ve stejných podmínkách. Vyjmu-li se jednotlivé ampule, lahvičky nebo kapiláry s kulturou během skladování z buněčné banky, již se do ní nevrátí.

#### POSTUPY UŽÍVAJÍCÍ FÁZOVÝ RŮST V BUNĚČNÝCH KULTURÁCH

K přípravě inokula ve vhodném médiu se použijí obsahy obalů banky pracovních buněk, je-li třeba po resuspendování. Ve vhodné růstové fázi se kultury použijí k zahájení fermentačního procesu po prekulivaci v prefermentoriu, je-li třeba. Podmínky používané pro každý výrobní stupeň se definují a v každém výrobním cyklu se musí splnit.

#### KONTROLA ZMĚN

Dojde-li k takové změně výrobního postupu, která způsobí významnou změnu v profilu nečistot výrobku, validují se znovu kritické kroky spojené s touto změnou v profilu nečistot.

Provedla-li se významná změna v mikroorganismech použitých při výrobě, která způsobí významnou změnu v profilu nečistot výrobku, validují se znovu všechny kritické kroky výrobního postupu spojené s touto změnou, zvláště průběh purifikace a izolace.

Revalidace také zahrnuje prokázání, že nové nečistoty přítomné ve výrobku jako výsledek této změny se při zkušebním postupu náležitě kontrolují. Je-li třeba, zavedou se dodatečné nebo alternativní zkoušky, které musí zahrnovat vhodné limity. Způsobí-li změna ve výrobě nebo v mikroorganismu vzestup hladiny trvale přítomné nečistoty, určí se přijatelnost takového vzestupu.

Při přemístění banky základních buněk se musí znovu validovat kritické kroky výrobního postupu v rozsahu nezbytném k prokázání, že nedošlo k nepříznivým změnám v jakosti a bezpečnosti výrobku. Je-li do postupu zaveden modifikovaný nebo nový mikroorganismus, musí se věnovat zvláštní pozornost možným změnám v profilu nečistot přípravku.

#### SUROVINY

Suroviny použité k fermentaci a/nebo v následujících výrobních postupech jsou ve vhodné kvalitě pro zamýšlené použití. Suroviny se zkouší, aby se zajistilo, že vyhovují předepsaným požadavkům.

Hladiny mikrobiologické zátěže v živných půdách nebo v přívodu vzduchu pro zavzdušnění se sniží na tak nízkou úroveň, aby se zajistilo, že případná mikrobiologická kontaminace nebude mít nepříznivý účinek na jakost, čistotu a bezpečnost výrobku. Složky, jako jsou živiny, prekurzory a substráty, se přidávají v průběhu fermentace asepticky.

#### MEZIOPERAČNÍ KONTROLY

Mezioperační kontroly se provádějí k zajištění trvale stejných podmínek při fermentaci a při následných výrobních postupech a k zajištění jakosti izolovaného produktu.

Zvláštní pozornost se musí věnovat zabezpečení, že při prováděných kontrolách se zjistí jakákoliv mikrobiologická kontaminace, která by nepříznivě ovlivnila jakost, čistotu a bezpečnost výrobku.

Výrobní podmínky se mohou monitorovat odpovídajícími postupy vhodnými pro řízení a kontrolu:

- teploty;
- hodnoty pH;
- stupně zavzdušnění;
- stupně protřepávání;
- tlaku;

a sledování koncentrace požadovaného produktu.

#### NÁSLEDUJÍCÍ VÝROBNÍ POSTUPY

Na konci fermentace se produkční mikroorganismus inaktivuje nebo odstraní. Další postupy jsou určeny ke snížení obsahu reziduí pocházejících z kultivační živné půdy na přijatelnou úroveň a k zajištění toho, aby se požadovaný produkt získával ve stále stejné jakosti.

Použité purifikační postupy (např. čištění aktivním uhlím, ultrafiltrace, extrakce rozpouštědly) prokazatelně snižují na minimum nebo odstraňují:

- rezidua z produkčního mikroorganismu, kultivační živné půdy, substrátů a prekurzorů;
- nežádoucí produkty transformace substrátů a prekurzorů.

Je-li třeba, provedou se vhodné zkoušky buď při mezioperačních kontrolách, nebo na izolovaném produktu fermentace.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI, ZKOUŠKY NA ČISTOTU A STANOVENÍ OBSAHU

Požadavky, kterým produkt po dobu platnosti vyhovuje, jsou stejně jako specifické zkušební metody uvedeny v jednotlivých lékopisných člancích.

## RADIOPHARMACA

6.0:0125

## Radiofarmaka

*Synonymum.* Radiopharmaceutica

## DEFINICE

Tento obecný článek Radiofarmaka pracuje s následujícími pojmy a jejich definicemi:

- radiofarmakum: jakýkoliv léčivý přípravek obsahující jeden nebo více radionuklidů (radioaktivních izotopů) včleněných za účelem dosažení léčivého účinku;
- radionuklidový generátor: systém obsahující vázaný mateřský radionuklid, jehož přeměnou vzniká dceřiný radionuklid, který se odděluje elucí nebo jiným způsobem a používá se k přípravě radiofarmak;
- kit pro přípravu radiofarmaka: jakýkoliv přípravek určený k rekonstituci a/nebo spojení s radionuklidy za účelem přípravy radiofarmaka (obvykle před jeho podáním);
- prekurzor radiofarmaka: jakýkoliv radionuklid vyrobený pro radioaktivní značení jiné látky před jejím podáním.

Nuklid je druh atomu charakterizovaný počtem protonů a neutronů ve svém jádře (tudíž jeho atomovým číslem  $Z$  a hmotnostním číslem  $A$ ) a také energetickým stavem jádra. Izotopy daného prvku jsou nuklidy se stejným atomovým číslem, ale rozdílným hmotnostním číslem. Nuklidy s nestabilní kombinací počtu protonů a neutronů či jen ve vzbuzeném energetickém stavu se samovolně přeměňují buď na stabilní, nebo jiné nestabilní nuklidy. Tato přeměna (rozpad) probíhá s konstantní statistickou pravděpodobností (poločasem rozpadu). Takové nuklidy jsou považovány za radioaktivní a nazývají se radionuklidy. Počáteční nestabilní nuklid se označuje jako mateřský radionuklid a produkt jeho přeměny jako dceřiný nuklid.

Radioaktivní rozpad (přeměna) může být provázen emisí nabitých částic, záchytem elektronu (elektronový záchyt, EZ) nebo emisí fotonu (izomerní přechod, IP). Nabitě částice emitované z jádra jsou buď částice alfa (jádra helia s hmotnostním číslem 4), nebo částice beta (nabitě buď záporně, tj. elektrony, nebo kladně, tj. pozitrony). Emise nabitých částic z jádra či elektronový záchyt mohou být doprovázeny okamžitou emisí záření gama způsobenou deexcitací vzbuzených stavů dceřiného jádra. Toto záření je emitováno také při izomerním přechodu. Deexcitace nemusí probíhat jen emisí záření gama, ale také přenosem excitační energie na některý z elektronů v atomovém obalu (vnitřní konverze). Tento jev, podobně jako elektronový záchyt, zapříčiňuje sekundární emisí rtg záření (je způsoben reorganizací elektronů v atomovém obalu). Alternativou této sekundární emise může být opět vyzaření elektronů z vyšších slupek atomového obalu (tzv. Augerovy elektrony). Radionuklidy tvořené neutronově deficitními jádry se mohou přeměňovat emisí pozitronů. Tyto radionuklidy se nazývají pozitronové zářiče. Pozitron jako antičástice elektronu při kontaktu s ním zaniká (anihiluje) za vzniku dvou fotonů gama emitovaných do opačných směrů (do úhlu  $180^\circ$ ), z nichž každý má energii 511 keV. Tento jev se nazývá anihilace a emitované fotony anihilační záření.

Rozpad (přeměna) radionuklidu se řídí zákony pravděpodobnosti, charakterizuje jej rozpadová (přeměnová) konstanta  $\lambda$  a počet jader radionuklidu klesá v čase exponenciálně. Doba, za kterou množství radionuklidu (počet jeho jader) klesne na polovinu počáteční hodnoty, se nazývá poločas rozpadu (přeměny) a označuje se  $T_{1/2}$ .

Pronikavost každého záření se značně liší v závislosti na jeho druhu a energii. Částice alfa jsou zcela absorbovány vrstvou látky o tloušťce několika mikrometrů až desítek mikrometrů. Částice beta jsou zcela absorbovány vrstvou látky o tloušťce od několika milimetrů do několika centimetrů. Záření gama není úplně absorbováno, ale pouze exponenciálně zeslabeno a tloušťka vrstvy potřebná k desetinasobnému zeslabení může být např. až několik centimetrů olova. Ve většině případů platí, že čím je hustota absorbentu vyšší, tím kratší je dosah částic alfa a beta a tím větší je zeslabení záření gama.

Každý radionuklid je charakterizován konstantním poločasem rozpadu vyjádřeným v jednotkách času a dále druhem a energií záření. Energie je udávána v elektronvoltech (eV), kiloelectronvoltech (keV) nebo v megaelectronvoltech (MeV).

Pojmem radioaktivita se obecně označuje jak jev radioaktivní přeměny, tak fyzikální veličina charakterizující její intenzitu (*v češtině se užívá pro fyzikální veličinu pouze slova aktivita, nikoliv radioaktivita*). Aktivita přípravku je počet jaderných rozpadů (přeměn) za jednotku času.

V mezinárodní soustavě jednotek (SI) se aktivita vyjadřuje v becquerelech (Bq), což je jedna jaderná přeměna za sekundu. Absolutní měření aktivity vyžadují specializovanou laboratoř, ale totožnost a aktivita radionuklidů se mohou stanovit na přístrojích kalibrovaných etalony (standards) záření poskytovanými laboratořemi uznávanými oprávněnou autoritou.

**Radionuklidová čistota** je poměr aktivity daného radionuklidu a celkové aktivity radiofarmaka v daném čase vyjádřený v procentech. Relevantní radionuklidové nečistoty pro daný radionuklid jsou spolu s limity uvedeny v jednotlivých člancích.

**Radiochemická čistota** je poměr aktivity daného radionuklidu přítomného v radiofarmaku v určité chemické formě a celkové aktivity tohoto radionuklidu vyjádřený v procentech. Relevantní radiochemické nečistoty jsou spolu s limity uvedeny v jednotlivých člancích.

**Chemická čistota** se v člancích radiofarmak kontroluje specifikováním limitů chemických nečistot.

**Nosič izotopu** je stabilní izotop daného prvku (ať už od počátku přítomný, nebo přidáný k radioaktivnímu přípravku) ve stejné chemické formě jako radionuklid.

**Hmotnostní (specifická) aktivita** je aktivita radionuklidu vztažená na jednotku hmotnosti příslušného prvku nebo příslušného prvku v téže chemické formě, v jaké se v přípravku nachází radionuklid.

**Objemová aktivita** je aktivita radionuklidu vztažená na jednotku objemu.

**Celková aktivita** je aktivita radionuklidu vztažená na jednotku (lahvičku, tobolečku, ampuli, generátor atd.).

**Vstupní suroviny** jsou všechny složky, ze kterých je radiofarmakum vyrobeno.

**Doba použitelnosti** je doba, po kterou musí vyhovovat specifikaci uvedené v článku. Musí být jednoznačně určeno datum, v případě potřeby i přesný čas použitelnosti (expirace).

## VÝROBA

Článek každého radiofarmaka popisuje způsob výroby příslušného radionuklidu tak přesně, jak to umožňuje jeho rozsah. Radiofarmakum obsahuje radionuklid v různých formách:

- jako prvek ve formě atomu nebo molekuly, např. [ $^{133}\text{Xe}$ ], [ $^{15}\text{O}$ ] $\text{O}_2$ ;
- jako iont, např. [ $^{131}\text{I}$ ]jodid, [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]technecistan;
- včleněný nebo připojený do organické molekuly chelatací, např. [ $^{111}\text{In}$ ]oxin nebo kovalentně vázaný, např. 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluor-2-deoxy-D-glukosa.

Radionuklidy pro výrobu radiofarmak nebo určené přímo jako radiofarmaka lze připravit následujícími způsoby:

- ozařováním terčových materiálů neutrony (obvykle v jaderných reaktorech);
- ozařováním terčových materiálů urychlenými těžkými nabitými částicemi (v urychlovačích, zejména cyklotronech);
- jaderným štěpením terčů z těžkých nuklidů (obvykle ozařováním neutrony nebo částicemi);
- elucí radionuklidových generátorů.

## OZAŘOVÁNÍ NEUTRONY NEBO TĚŽKÝMI NABITÝMI ČÁSTICEMI

Jaderná reakce a pravděpodobnost jejího výskytu v jednotce času závisí na druhu a fyzikálních vlastnostech terčového materiálu a na druhu, energii a množství dopadajících částic.

Jaderná přeměna (reakce), k níž dochází při ozařování (bombardování) terčového jádra částicemi, může být zapsána ve formě:

terčové jádro (dopadající částice, emitovaná částice nebo záření) vzniklé jádro

Příklady:  $^{58}\text{Fe}(n,\gamma)^{59}\text{Fe}$   
 $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$

Kromě žádoucí jaderné reakce probíhají většinou na tomtéž terčovém jádře i další jaderné reakce. Počet a intenzita těchto reakcí i reakce žádoucí jsou ovlivněny energií dopadajících částic a čistotou terčového materiálu. Tyto další jaderné reakce mohou být příčinou vzniku radionuklidových nečistot.

## JADERNÉ ŠTĚPENÍ

Malý počet nuklidů s vysokým atomovým číslem je štěpitelných. Nejčastěji se v praxi užívá štěpení uranu-235 neutrony v jaderném reaktoru. Štěpením uranu-235 se může připravit jod-131, molybden-99 a xenon-133. Jejich extrakce ze směsi více než 200 jiných radionuklidů musí být pečlivě řízena a kontrolována, aby se minimalizoval obsah radionuklidových nečistot.

## RADIONUKLIDOVÉ GENERÁTORY

Radionuklidové generátory využívají obvykle mateřského radionuklidu s relativně delším poločasem rozpadu, než je poločas rozpadu dceřiného radionuklidu.

Oddělením dceřiného radionuklidu z mateřského radionuklidu chemickým nebo fyzikálním postupem lze dceřiný radionuklid využívat ve značné vzdálenosti od místa výroby generátorů, i když má velmi krátký poločas rozpadu.

## TERČOVÉ MATERIÁLY

Izotopické složení a čistota terčového materiálu určují relativní procento hlavního radionuklidu a radionuklidových nečistot. Použití izotopicky obohaceného terčového materiálu, ve kterém bylo zastoupení žádoucího terčového radionuklidu uměle zvýšeno, může zlepšit výtěžek a čistotu požadovaného radionuklidu.

Chemická forma, čistota, fyzikální forma a chemické příměsi, stejně jako podmínky ozařování a fyzikální a chemické okolí určují chemickou formu a čistotu vyráběných radionuklidů.

Při výrobě radionuklidů a zvláště radionuklidů s krátkým poločasem přeměny nemusí být možné stanovit žádné z těchto jakostních kritérií před dalším zpracováním a výrobou radiofarmak. Proto musí být každá šarže terčového materiálu otestována před použitím pro rutinní výrobu radionuklidu a přípravou radiofarmak, aby se zajistilo, že za daných podmínek lze na terči připravit radionuklid v požadovaném množství a kvalitě.

Při přípravě radionuklidů ozařováním terče svazkem těžkých nabitých částic může být skupenství terčové matrice v držáku pevné, kapalné i plynné. Při ozařování neutrony je terčový materiál v pevném skupenství obvykle uzavřen v křemenných ampulích nebo nádobkách z vysoce čistého hliníku nebo titanu. Je nutné zajistit, aby mezi nádobkou a jejím obsahem za daných ozařovacích podmínek (teplota, tlak, čas) nedocházelo k žádným interakcím.

V případě ozařování těžkými nabitými částicemi je držák pro terčový materiál obvykle z hliníku nebo jiného vhodného kovu, je opatřen vstupy a výstupy, chladičím systémem a oddělen od trasy svazku tenkým kovovým terčovým okénkem (platí pro plynové a kapalné terče). Vlastnosti a tloušťka terčového okénka mohou mít jistý vliv na výtěžek jaderné reakce i na radionuklidovou čistotu.

Výrobní postup detailně popisuje:

- terčový materiál;
- konstrukci držáku terčového materiálu;
- způsob plnění terčového materiálu do držáku;
- podmínky ozařování;
- separaci požadovaného radionuklidu

a vyhodnocení všech vlivů na účinnost výroby z hlediska jakosti a množství vyrobeného radionuklidu.

Chemický stav izolovaného radionuklidu může hrát hlavní roli při následném zpracování.

## PREKURZORY PRO SYNTÉZU

Tyto prekurzory se obvykle nevyrábějí ve velkém množství. Některé se připravují v laboratořích pro výrobu radiofarmak, jiné se dodávají specializovanými výrobci nebo laboratořemi.

Zkoušky totožnosti, zkoušky chemické čistoty a stanovení obsahu musí být provedeny validovanými metodami.

Jestliže jsou šarže prekurzorů uvolněny k použití na základě údajů z analytických certifikátů, musí se provést důkaz spolehlivosti analýzy výrobce a musí se provést nejméně jedna zkouška totožnosti. Doporučuje se, aby zkouška způsobilosti prekurzoru pro přípravu daného radiofarmaka proběhla před jeho použitím k rutinní výrobě, aby bylo zajištěno, že za daných podmínek poskytuje prekurzor radiofarmakum v požadovaném množství a kvalitě.

### VÝKONNOST VÝROBNÍHO SYSTÉMU

Všechny operace od přípravy terče až po rozplnění konečného radiofarmaka musí být jasně dokumentovány, včetně jejich vlivu na čistotu konečného výrobku a účinnost postupu. Kde je to možné, provedou se mezioperační kontroly a zaznamenají se výsledky každého výrobního kroku, aby se zjistilo, ve kterém stupni mohlo dojít k odchylce od normálního výrobního postupu.

- Výroba radiofarmak se může provádět mechanickým nebo automatizovaným postupem používaným ve farmaceutickém průmyslu s tím, že se přizpůsobí specifickým vstupní radioaktivní suroviny a požadavkům radiační ochrany.
- Pro radiofarmaka s obsahem radionuklidu s krátkým poločasem přeměny, jakými jsou např. určité pozitronové zářiče, se obvykle používají dálkově řízené výrobní systémy a automatizované radiosyntézy. Pro radionuklidy s velmi krátkým poločasem přeměny (kratším než 20 min) je důležitým opatřením k zajištění kvality radiofarmak ještě před jejich propuštěním kontrola výkonnosti výrobního systému.
- Každý výrobní postup se musí validovat provozní zkouškou před použitím v rutinní výrobě radiofarmak, aby se zajistilo, že při daných výrobních podmínkách poskytne výrobní systém radiofarmaka v požadovaném množství a odpovídající jakosti.
- Příprava lékové formy konečného radiofarmaka se v praxi nukleární medicíny týká obecně omezeného množství výchozí aktivity, ať už se vychází z hotových radiofarmak, generátorů nebo kitů a prekurzorů. Všechny podmínky, které mohou mít vliv na jakost výrobku (např. na radiochemickou čistotu a sterilitu), musí být jasně stanoveny a musí zahrnovat přiměřená opatření k zajištění radiační ochrany.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**Radioaktivní rozpad (přeměna)** probíhá exponenciálně s rozpadovou konstantou charakteristickou pro daný radionuklid.

Rozpadovou křivku vyjadřuje vzorec:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t},$$

v němž značí:

$A_t$  – aktivitu v čase  $t$ ;

$A_0$  – aktivitu v čase  $t = 0$ ;

$\lambda$  – rozpadovou (přeměnovou) konstantu charakteristickou pro každý radionuklid;

$e$  – základ přirozených logaritmů (Eulerovo číslo).

Poločas rozpadu (přeměny)  $T_{1/2}$  souvisí s rozpadovou (přeměnovou) konstantou  $\lambda$  podle vzorce:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (\ln 2 \approx 0,693).$$

Totožnost radionuklidu se určuje stanovením jeho poločasu rozpadu nebo druhem a energií emitovaného záření nebo obojím podle toho, co je uvedeno v článku.

**Měření poločasu rozpadu (přeměny).** Poločas rozpadu se měří vhodným detekčním přístrojem, jakým je ionizační komora, Geigerův-Müllerův počítač, scintilační detektor (pevný krystal nebo kapalina) nebo polovodičový detektor. Zkoušený přípravek se měří buď bez úpravy, nebo ředěný, nebo jako odparek po vhodném zředění. Zvolená hodnota aktivity zohledňující experimentální podmínky musí být dostatečně vysoká, aby umožnila detekci během několika předpokládaných poločasů rozpadu, ale ne příliš vysoká, aby nedocházelo ke snížení četnosti, např. v důsledku nesprávné či chybějící korekce na mrtvý čas.

Radioaktivní zářič se připraví tak, aby se vyloučila ztráta materiálu během zacházení s ním. Kapalina (roztok) se plní do lahvíček nebo uzavřených zkumavek. Pevná látka (případně odparek v misce) se překryje plátkem z adhezivního acetátu celulosy nebo z jiného materiálu.

Stejný zářič se měří za shodných geometrických podmínek v intervalech obvykle odpovídajících polovině poločasu rozpadu po dobu rovnou asi třem poločasům. Správná funkce přístroje se kontroluje zářičem s dlouhým poločasem rozpadu a, je-li třeba, provede se korekce četnosti (viz odstavec Měření radioaktivity).

Do grafu se vynese časová závislost logaritmu relativní odezvy přístroje (např. četnosti). Vypočítaný poločas rozpadu by se neměl lišit o více než o 5 % od hodnoty udané v lékopisu, pokud není stanoveno jinak.

**Stanovení druhu a energie záření.** Druh a energie emitovaného záření se mohou stanovit několika postupy včetně sestrojení křivky zeslabení a použití spektrometrie. Pro analýzu záření beta se obvykle používá sestrojení křivky zeslabení; pro stanovení totožnosti záření gama a detekovatelného rtg záření se většinou používá spektrometrie.

*Křivka zeslabení* se měří u čistých zářičů beta v případě, že není k dispozici spektrometr záření beta, nebo pro smíšené zářiče beta s doprovodným zářením gama v případě, kdy není k dispozici spektrometr záření gama. Tato metoda odhadu maximální energie záření beta poskytuje pouze přibližné výsledky. Zářič se upevní do konstantní vzdálenosti od tenkého okénka Geigerova-Müllerova počítače nebo proporcionálního detektoru. Zářič se zajistí tak, jak je popsáno výše. Měří se četnost impulzů zářiče, přičemž se mezi něj a detektor postupně umístí nejméně šest hliníkových fólií se zvyšující se plošnou hustotou. Plošná hustota nejsilnější fólie v případě čistého beta zářiče se volí tak, aby se měřená četnost v případě přidání další fólie už neměnila. Fólie se vkládají tak, aby nedocházelo ke změně geometrie měření. Do grafu se vynese závislost logaritmu četnosti impulzů proti plošné hustotě fólií vyjádřená v miligramech na čtverečný centimetr. Stejným způsobem se vynese graf pro referenční přípravek. Hmotnostní součinitele zeslabení

se vypočítají ze středních částí křivek, které jsou prakticky lineární.

*Hmotnostní součinitel zeslabení* ( $\mu_m$ ), vyjádřený ve čtverečných centimetrech na miligram, závisí na energii záření beta a na druhu a fyzikálních vlastnostech fólie; proto umožňuje stanovení totožnosti beta zářičů. Vypočítá se podle vzorce:

$$\mu_m = \frac{\ln A_1 - \ln A_2}{m_2 - m_1},$$

v němž je

$m_1$  – plošná hustota (hmotnost na jednotku plochy) nejtenčí fólie;

$m_2$  – plošná hustota nejsilnější fólie;  $m_1$  a  $m_2$  se nacházejí v lineární části křivky zeslabení;

$A_1$  – četnost impulzů pro plošnou hustotu  $m_1$ ;

$A_2$  – četnost impulzů pro plošnou hustotu  $m_2$ .

Takto vypočítaný hmotnostní součinitel zeslabení  $\mu_m$  se neliší o více než o 10 % od součinitele zeslabení referenčního přípravku stejného radionuklidu, který byl stanoven za stejných podmínek.

Dolet částic beta je dalším parametrem, který lze použít pro stanovení energie záření beta. Získá se z grafu popsaného výše jako plošná hustota odpovídající průsečíku extrapolace lineární části křivky zeslabení a vodorovné přímky pozadí.

*Kapalné scintilátory* se mohou použít k získání spektra  $\alpha$  a  $\beta^-$  zářičů (viz Měření radioaktivity).

*Gama spektrometrie* se používá ke stanovení totožnosti radionuklidů určením energie a intenzity jejich gama a rtg záření.

Pro spektrometrii gama a rtg záření se přednostně používá polovodičový germaniový detektor. Také se používá scintilační NaI(Tl) detektor, který má však podstatně horší energetické rozlišení.

Detektor záření gama se musí kalibrovat za použití standardních zářičů, neboť detekční účinnost je funkcí energie záření gama a rtg záření a závisí na formě zdroje (bodový, objemový) a na vzdálenosti detektoru od zdroje. Účinnost detekce se může změřit za použití kalibrovaného zářiče stanoveného radionuklidu nebo se většinou používá obecnějšího grafu závislosti logaritmu účinnosti detekce na logaritmu energie za použití několika standardů záření o velmi dobře známé aktivitě a s dobře známými energiemi a intenzitami linek emitovaného záření gama (např.  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{133}\text{Ba}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  a  $^{152}\text{Eu}$ ).

Spektrum záření gama a rtg záření radionuklidu je pro každý radionuklid charakteristické a je určeno energiemi linek záření a jejich intenzitou (počtem fotonů dané energie emitovaných na 100 rozpadů mateřského radionuklidu). Tato vlastnost se využívá ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení radionuklidů obsažených v měřeném zdroji záření i k odhadu obsahu radionuklidových nečistot detekcí piků jiných radionuklidů.

Pomocí spektrometrie lze měřit rovněž pokles aktivity, neboť amplituda a plocha piků ve scintilačním nebo polovodičovém spektru zářiče klesá s jeho poločasem rozpadu. Je-li v takovém zářiči přítomna radioaktivní nečistota s rozdílným poločasem rozpadu, lze ji detekovat později při určení

charakteristického píku nebo piků, jejichž amplitudy se snižují rozdílnou rychlostí než u hlavního radionuklidu v zářiči. Stanovení poločasu přeměny těchto dalších piků opakovanými měřeními vzorku může pomoci při identifikaci nečistot.

*Tabulka fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)* uvedená v lékopisu shrnuje obecně přijaté fyzikální charakteristiky radionuklidů používaných v přípravcích, které jsou v člancích lékopisu uvedeny. V tabulce jsou navíc uvedeny i fyzikální charakteristiky hlavních potenciálních radionuklidových nečistot zmíněných v člancích.

„Pravděpodobnost přechodu“ znamená pravděpodobnost přechodu jádra v daném energetickém stavu na jiný přesně definovaný energetický stav.

„Pravděpodobnost emise“ znamená pravděpodobnost, že atom radionuklidu při svém rozpadu (přeměně) bude emitovat danou částici či záření.

Místo výrazu „pravděpodobnost“ se často používají pojmy „intenzita“ a „relativní zastoupení“.

V obou případech se pravděpodobnost (intenzita) udává v procentech, tj. v počtu příznivých případů na 100 rozpadů (přeměn).

## MĚŘENÍ RADIOAKTIVITY

Radioaktivita přípravku je vztažena k datu, a je-li třeba, i k času.

Absolutní měření radioaktivity daného vzorku je možné jen v případě, že je známo schéma přeměny radionuklidu, ale v praxi je třeba k dosažení správného výsledku provést mnoho korekcí. Z toho důvodu je obvyklé měření pomocí primárního standardního zářiče. Primární standardy pro radionuklidy s velmi krátkým poločasem přeměny, tj. pozitronové zářiče, nejsou k dispozici. Měřicí přístroje se kalibrují za použití vhodných standardů pro jednotlivé radionuklidy. Standardy se získávají z laboratorů uznaných oprávněnou autoritou. Ionizační komory a Geigerovy-Müllerovy počítače lze použít k měření zářičů beta a beta/gama; scintilační a polovodičové detektory nebo ionizační komory se používají pro měření zářičů gama; beta zářiče s nízkou energií vyžadují měření kapalnými scintilačními detektory. Pro detekci a měření zářičů alfa je třeba zvláštní vybavení a technika. Pro přesné měření aktivity je nezbytné, aby standardy a vzorky byly změřeny za prakticky stejných podmínek.

Nízkoenergetické zářiče beta se měří pomocí kapalných scintilátorů. Vzorek se rozpustí v roztoku obsahujícím jednu nebo častěji dvě organické fluorescenční látky (primární a sekundární scintilátory). Část kinetické energie ionizujícího záření se transformuje na fotony viditelného záření, které jsou snímány fotonásobičem a převáděny na elektrické impulzy. Při použití detektoru s kapalným scintilátorem se provádí korekce na zhášecí efekt. Přímá měření se provádějí, kdekoliv je to možné, za stejných podmínek (tj. objemy a druhy roztoků) pro zkoušený vzorek i pro standardní zářič.

Všechna měření aktivity se musí korigovat odečtením pozadí způsobeného přirozenou radioaktivitou a šumem přístroje vznikajícím v samotném detekčním zařízení bez vnějších příčin.

Při měření vysokých aktivit některými přístroji je třeba korigovat výsledky na ztrátu četnosti impulzů v důsledku konečného časového rozlišení (mrtvý čas) detektoru a připojeného elektronického zařízení. Pro detekční systém s daným mrtvým časem  $\tau$  se po každém impulzu provádí korekce podle vzorce:

$$N = \frac{N_{poz}}{1 - N_{poz} \tau}$$

v němž značí:

- $N$  – skutečnou četnost impulzů za sekundu;  
 $N_{poz}$  – pozorovanou četnost impulzů za sekundu;  
 $\tau$  – mrtvý čas v sekundách.

U některých zařízení se tato korekce provádí automaticky. Korekce četnosti na mrtvou dobu se provádí dříve než korekce na pozadí.

Jestliže není doba daného měření  $t_m$  zanedbatelně krátká ve srovnání s poločasem rozpadu  $T_{1/2}$  měřeného radionuklidu, musí se výsledek korigovat na jeho rozpad během měření. Po korekci daného přístroje (četnost, ionizační proud atd.) na pozadí a, je-li to nutné, také na ztráty způsobené elektronickým zpracováním signálu, lze provést korekci na rozpad během doby měření podle vzorce:

$$R_{kor} = \frac{R \frac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}}{1 - \exp\left(-\frac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}\right)}$$

v němž značí:

- $R_{kor}$  – záznam přístroje korigovaný k počátku jednotlivého měření;  
 $R$  – záznam přístroje před korekcí na rozpad, ale již korigovaný na pozadí atd.

Výsledky měření aktivity vykazují variabilitu, která je zejména důsledkem pravděpodobnostní povahy jaderných přeměn. Pro kompenzaci kolísání v počtu přeměn za jednotku času se musí zaznamenat dostatečný počet impulzů. Směrodatná odchylka je druhou odmocninou počtu impulzů, proto je třeba nejméně 10 000 impulzů k získání relativní směrodatné odchylky menší než 1 % (mez spolehlivosti: 1 sigma).

Všechny údaje o aktivitě jsou doplněny údaji o datu a, je-li to nutné, i času, kdy bylo měření provedeno. Tyto údaje o aktivitě musí být vztaheny k časovému pásmu (SEČ, GMT). Aktivita v jiném čase se může vypočítat z exponenciální rovnice pro pokles aktivity nebo z tabulek, které jsou pro daný radionuklid na jejím základě vypočítány.

Aktivita roztoku se vyjadřuje na jednotku objemu, tj. jako objemová aktivita.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Ve většině případů musí být známa radionuklidová čistota radiofarmaka a totožnost každého přítomného radionuklidu a jeho aktivita. Všeobecně je nejpoužívanější metodou zkoušky na radionuklidovou čistotu gama spektrometrie. Není to zcela spolehlivá metoda, protože nečistoty emitující částice alfa a beta nejsou vždy snadno detekovatelné, a po-

užijí-li se NaI(Tl) detektory, jsou píky nečistot emitujících záření gama často překryty spektrem hlavního radionuklidu. Jednotlivé články stanovují požadavky na radionuklidovou čistotu (např. spektrum gama se výrazně neliší od spektra referenčního přípravku) a mohou udávat limity pro určité radionuklidové nečistoty (např. kobalt-60 v kobaltu-57). Ačkoliv jsou tyto požadavky nezbytné, samy o sobě nezaručují, že radionuklidová čistota radiofarmaka je vyhovující pro humánní použití. Výrobce musí provádět podrobné zkoušení svých výrobků; zvláště u přípravků obsahujících radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu musí stanovit nečistoty s delším poločasem rozpadu v době, kdy došlo k poklesu aktivity krátkodobého radionuklidu na přijatelnou úroveň. Tímto způsobem se získávají informace o přiměřenosti jednotlivého výrobního procesu i zkušebních postupů. V případě, kdy je třeba identifikovat a/nebo rozlišit od sebe dva pozitronové radionuklidy, jež neemitují žádné jiné záření gama než anihilační fotony, jako např. příměs  $^{18}\text{F}$  v přípravcích s  $^{13}\text{N}$ , je třeba navíc ke spektrometrii gama provést stanovení poločasu rozpadu.

Vzhledem k rozdílným poločasům rozpadu různých radionuklidů obsažených v radiofarmacích se radionuklidová čistota mění s časem. Požadavky na radionuklidovou čistotu musí plně vyhovovat po dobu použitelnosti. Někdy je obtížné tyto zkoušky provést před propuštěním šarže, jestliže poločas přeměny radionuklidu v přípravku je příliš krátký. Zkouška je pak součástí systému jistění jakosti výroby.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Stanovení radiochemické čistoty spočívá v oddělení různých chemických forem radionuklidu a ve výpočtu procenta aktivity spojené s danou chemickou látkou. Radiochemické nečistoty mohou pocházet z:

- výroby radionuklidu;
- následného chemického zpracování radionuklidu;
- neúplné preparativní separace;
- chemických změn během skladování.

Požadavky na radiochemickou čistotu musí vyhovovat během celé doby použitelnosti.

V zásadě se může ke stanovení radiochemické čistoty použít jakákoliv analytická separace. Články jednotlivých radiofarmak mohou např. odkazovat na papírovou chromatografii (2.2.26), tenkovrstvou chromatografii (2.2.27), elektroforézu (2.2.31), vylučovací kapalinovou chromatografii (2.2.30), plynovou chromatografii (2.2.28) a kapalinovou chromatografii (2.2.29). Technický popis těchto analytických metod se uvádí v člancích. Z důvodu radiační bezpečnosti se navíc musí dodržovat odpovídající opatření. Ve zdravotnických zařízeních se nejvíce používá tenkovrstvá a papírová chromatografie. U papírové a tenkovrstvé chromatografie se nanáší na start objem předepsaný v článku způsobem popsáním v obecných statích pro chromatografii. Upřednostňuje se zkoušený přípravek neředit, ale je důležité nanést takové množství aktivity, při němž ještě nedochází ke snížení četnosti impulzů zahlcením detekčního zařízení. V případě nanášení velmi malého množství radioaktivního materiálu se může přidat nosič, pokud je to v daném článku uvedeno. Po vyvíjení se vrstva usuší a určí se polohy radioaktivních ploch autoradiograficky nebo

měření radioaktivity podél proužků chromatogramu za použití vhodného kolimátoru nebo nastříháním proužků a měření jednotlivých částí chromatogramu. Poloha skvrn nebo pásů umožňuje chemickou identifikaci látky porovnáním s roztoky stejných chemických látek (neradioaktivních) vhodnou detekční metodou.

Aktivita se může měřit integrálně přístrojem s automatickým vyhodnocováním nebo digitálním počítačem. Poměry ploch píků jsou úměrné poměrům objemových aktivit chemických látek. Jsou-li proužky nastříhány na jednotlivé části, poměry jejich aktivit udávají poměr koncentrací radioaktivních chemických látek.

#### HMOTNOSTNÍ (SPECIFICKÁ) AKTIVITA

Hmotnostní aktivita se obvykle počítá z objemové aktivity (aktivita na jednotku objemu) a z koncentrace sledované chemické látky po ověření, že aktivita odpovídá pouze danému radionuklidu (radionuklidová čistota) a dané chemické látce (radiochemická čistota).

Hmotnostní aktivita se mění s časem, udává se k referenčnímu datu a, je-li třeba, i k času. Požadavky na hmotnostní aktivitu musí plně vyhovovat po celou dobu použitelnosti.

#### CHEMICKÁ ČISTOTA

Určení chemické čistoty, které vyžaduje stanovení obsahu jednotlivých chemických nečistot, je uvedeno v článku.

#### ENANTIOMERNÍ ČISTOTA

Kde je to vhodné, má se ověřit stereoizomerní čistota.

#### FYZIOLOGICKÁ DISTRIBUCE

Je-li třeba, je pro určitá radiofarmaka předepsáno stanovení fyziologické distribuce. Distribuce aktivity v určitých orgánech, tkáních nebo ostatních částech těla na vhodných druzích zvířat (obvykle potkanech nebo myších) může spolehlivě indikovat očekávanou distribuci u lidí a tím přiměřenost pro zamýšlené použití.

Jednotlivý článek popisuje podrobnosti týkající se provedení zkoušky a požadavky na fyziologickou distribuci, kterým musí radiofarmakum vyhovovat. Fyziologická distribuce potvrzuje správnou distribuci radioaktivních sloučenin v určeném cílovém orgánu nebo tkáni u lidí a limity jejich distribuce v oblastech, které nejsou cílovým orgánem nebo tkání.

Zkouška se obvykle provádí takto:

Každému ze tří zvířat se intravenózně podá zkoušený přípravek. Je-li to vhodné, definuje se článkem druh, pohlaví, rod, hmotnost a/nebo věk zvířat. Zkoušený injekční roztok je radiofarmakum určené pro humánní použití. Je-li třeba, přípravek se rekonstruuje podle předpisu výrobce. V některých případech se může přípravek před podáním zředit.

Podání se provádí obvykle intravenózní cestou, použije se vena caudalis. Ve zvláštních případech se mohou použít i jiné žíly, jako je vena saphena, vena femoralis, vena jugularis nebo vena penile. Zvířata, u kterých se prokáže, že nedošlo k intravenóznímu podání (extravazace pozorovaná v průběhu podání nebo následně stanovením aktivity ve tkáni), se ze zkoušky vyřadí.

Těsně po injekčním podání se každé zvíře umístí do zvláštní klece, kde se sbírají exkreta a zamezuje se kontaminaci povrchu těla zvířat.

Ve specifikovaném čase po injekčním podání se zvířata šetrným způsobem usmrtí a provede se pitva. Vhodným přístrojem, jak je uvedeno v tomto článku, se změří aktivita vybraných orgánů a tkání. Vypočítá se fyziologická distribuce a vyjádří se jako procento aktivity nalezené v každém vybraném orgánu nebo tkáni. Pro tento účel se aktivita v orgánu vztahuje k podané aktivitě vypočítané z obsahu aktivity ve stříkačce změřené před injekčním podáním a po něm. Pro některá radiofarmaka může být vhodné určit poměr aktivity ve zvážených vzorcích vybraných tkání (aktivita/hmotnost).

Aby přípravky vyhověly zkoušce, musí distribuce radioaktivity zcela vyhovovat nejméně u dvou ze tří zvířat.

#### STERILITA

Radiofarmaka určená pro parenterální podání se musí připravovat za podmínek vylučujících mikrobiální kontaminaci a zaručujících sterilitu. Zkouška na sterilitu se provádí, jak je popsáno v obecné stati Zkouška na sterilitu (2.6.1).

U radiofarmak vznikají určité problémy v důsledku krátkého poločasu rozpadu některých radionuklidů, malých šarží a rizika radiační zátěže pracovníků. Není vždy možné čekat na výsledky zkoušky sterility před uvolněním určité šarže k použití. Parametrické uvolňování (5.1.1) přípravku, který byl vyroben plně validovaným postupem, je v takových případech metodou volby. Jestliže se použije aseptický způsob výroby, zkouška na sterilitu se provádí jako součást systému jištění jakosti výroby.

Jestliže je velikost šarže radiofarmak limitována jedním nebo několika vzorky (např. terapeutická radiofarmaka nebo radiofarmaka s velmi krátkým poločasem přeměny), vzorkování šarže na sterilitu se nepoužívá. Jsou-li radiofarmaka sterilizována filtrací a/nebo vyráběna asepticky (5.1.1), je zásadní procesní validace výroby.

Jestliže je poločas rozpadu radionuklidu velmi krátký (tj. menší než 20 min), podání radiofarmak pacientům obecně přímo navazuje na validovaný výrobní systém.

Z bezpečnostních důvodů (vysoké aktivity) nelze použít pro zkoušku sterility takové množství radiofarmak, jaké je požadováno ve Zkoušce na sterilitu (2.6.1). Pro snížení radiační zátěže pracovníků se upřednostňuje metoda membránové filtrace.

Požadavky týkající se použití protimikrobních látek uvedené v článku *Parenteralia (0520)* nejsou závazné pro radiofarmaka ve vícecívkových obalech, pokud to není předepsáno v článku.

#### BAKTERIÁLNÍ ENDOTOXINY – PYROGENNÍ LÁTKY

Pro určitá radiofarmaka je předepsána zkouška na bakteriální endotoxiny. Zkouška se provádí v souladu s obecnou statí (2.6.14) při dodržení nezbytných předpisů zabezpečujících radiační ochranu pracovníků provádějících zkoušku.

Limit pro bakteriální endotoxiny je uveden v jednotlivém článku.

Jestliže je radiofarmakum původcem vzájemné interference (zpomalením nebo urychlením) a není možné tyto interferující faktory vyloučit, může se zkouška na pyrogenní látky (2.6.8) konkrétně pro dané radiofarmakum upravit.

Někdy je obtížné provést tyto zkoušky před propuštěním šarže k použití, protože poločas radionuklidu v přípravku je

krátký. Zkouška je pak součástí systému jištění jakosti výroby.

### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech na dostatečně stíněném místě, aby pracovníci byli chráněni před primárním nebo sekundárním zářením. Místo musí vyhovovat národním i mezinárodním předpisům týkajícím se skladování radioaktivních látek. Následkem ozařování mohou skleněné obaly během skladování ztmavnout; toto ztmavnutí však nutně neznamená zhoršení jakosti přípravků.

Radiofarmaka jsou určena k rychlé spotřebě a expirace musí být zřetelně uvedena.

### OZNAČOVÁNÍ

Označování radiofarmak je v souladu s národními a evropskými předpisy.

V označení na vnitřním obalu se uvede:

- název přípravku a/nebo jeho zkratka;
- jméno výrobce;
- identifikační číslo;
- u kapalných a plyných přípravků celková aktivita v obalu nebo objemová aktivita v mililitru vztažená k datu, a je-li třeba, i k času, a objem kapaliny v obalu;
- pro pevné přípravky (jako jsou lyofilizáty) celková aktivita vztažená k datu a, je-li třeba, i k času; po rekonstituci vhodným roztokem je přípravek považován za kapalný;
- pro tobolky: aktivita každé tobolky vztažená k datu, a je-li třeba, i k času, a počet tobolek v obalu.

Označení může být v určitých případech změněno (např. u radiofarmak obsahujících radionuklidy s krátkým poločasem přeměny).

Na vnějším obalu se dodatečně uvede:

- způsob podání;
- doba použitelnosti (datum, v případě potřeby i čas);
- název a koncentrace jakýchkoliv přidaných protimikrobiálních látek;
- je-li třeba, zvláštní podmínky skladování.

## VACCINA AD USUM HUMANUM

7.3:0153

### Vakcíny pro humánní použití

*Synonymum.* Vaccinae ad usum humanum

#### DEFINICE

Jsou to přípravky obsahující antigeny schopné vyvolat u člověka specifickou a účinnou imunitu proti infekčnímu agens nebo jím vytvořenému toxinu či antigenu. Ochrana organismu zahrnuje vrozenou a získanou (buněčnou, humorální) imunitní odpověď. U vakcín pro humánní použití se má prokázat, že při dodržení zamýšleného vakcinačního schématu mají přijatelnou imunogenní účinnost a jsou bezpečné pro člověka.

Mohou obsahovat: celé mikroorganismy (bakterie, viry, parazity) inaktivované vhodnými chemickými nebo fyzikálními prostředky při zachování imunogenních vlastností; celé živé mikroorganismy přirozeně nevirulentní nebo

vhodně ošetřené k oslabení jejich virulence při zachování odpovídajících imunogenních vlastností; antigeny extrahované z mikroorganismů nebo jimi vylučované, nebo připravené genovým inženýrstvím nebo chemickou syntézou.

Tyto antigeny se mohou použít v přirozené podobě nebo mohou být chemicky či fyzikálně detoxikovány, agregovány, polymerizovány nebo konjugovány na nosič, aby se zvýšila jejich imunogenita. Vakcíny mohou obsahovat adjuvans. Pokud je antigen adsorbován na minerální adjuvans, označují se vakcíny jako „adsorbované“.

Terminologie použitá v článcích pro humánní vakcíny je definována v obecné stati 5.2.1.

*Bakteriální vakcíny obsahující celé buňky* jsou suspenze s různým stupněm zákalu v bezbarvých nebo téměř bezbarvých tekutinách, nebo mohou být lyofilizované. Tyto vakcíny mohou být adsorbované. Koncentrace živých nebo inaktivovaných bakterií se vyjadřuje v mezinárodních zákalových jednotkách nebo, kde je to vhodné, se stanoví přímým spočítáním buněk nebo u živých bakterií stanovením počtu životaschopných zárodků.

*Bakteriální vakcíny obsahující bakteriální složky* jsou suspenze nebo lyofilizované produkty. Tyto vakcíny mohou být adsorbované. Obsah antigenu se stanoví vhodnými validovanými metodami.

*Bakteriální toxoidy* se připravují z toxinů snížením jejich toxicity na akceptovatelnou úroveň nebo úplným odstraněním toxicity fyzikálními nebo chemickými postupy při zachování příslušných imunogenních vlastností. Toxiny se získávají z vybraných kmenů mikroorganismů. Postup výroby je takový, aby nedošlo ke zpětné přeměně toxoidu na toxin. Toxoidy jsou purifikované. Purifikace se provádí před a/nebo po odstranění toxicity. Toxoidové vakcíny mohou být adsorbované.

*Virové vakcíny* se připravují z virů kultivovaných na zvířatech, ve fertilizovaných vejcích, ve vhodných buněčných kulturách, ve vhodných tkáních nebo v kulturách buněk získaných genovým inženýrstvím. Jsou to tekutiny různého stupně opalescence podle typu přípravku nebo mohou být lyofilizované. Tyto vakcíny mohou být adsorbované. Tekuté přípravky a lyofilizované přípravky po rekonstituci mohou být zbarveny podle indikátoru pH použitého v kultivačním médiu, jako je např. fenolová červeň.

*Syntetické antigenní vakcíny* jsou obecně číré nebo bezbarvé tekutiny. Koncentrace složek se obvykle vyjadřuje jako obsah specifických antigenů.

*Složené vakcíny* jsou vícesložkové přípravky formulované tak, že různé antigeny se podávají společně. Rozdílné antigenní složky jsou určeny k ochraně proti různým kmenům nebo typům téhož organismu a/nebo proti různým organismům. Složená vakcína může být dodávána výrobcem buď jako samotná tekutina nebo lyofilizovaný přípravek, nebo jako více složek, které se podle pokynů smíchají před použitím. Tam, kde nejsou vytvořeny články zahrnující dané kombinace, vyhovuje vakcína článkům na jednotlivé složky, se všemi potřebnými úpravami schválenými oprávněnou autoritou.

*Adsorbované vakcíny* jsou suspenze a mohou tvořit sediment na dně obalu.



## VÝROBA

**Všeobecná ustanovení.** Výrobní postup daného výrobku musí prokazatelně poskytovat shodné šarže srovnatelné se šarží, která byla ověřena z hlediska klinického účinku, imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Měly by se provádět specifikace hotového produktu včetně mezioperačních zkoušek. Specifické požadavky na výrobu včetně mezioperačních zkoušek jsou uvedeny v jednotlivých člancích. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se některé zkoušky vynechat, jestliže se může prokázat, např. validačními studii, že výrobní postup rovnoměrně zajišťuje výrobky vyhovující zkoušce.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, používá se při výrobě vakcín systém jednotné inokulace. Metody přípravy se navrhnou tak, aby se při zachování odpovídajících imunogenních vlastností vytvořil neškodný přípravek a zabránilo se kontaminaci cizími agensy.

Vyrábějí-li se vakcíny pro humánní použití z látek lidského nebo živočišného původu, vyhovují obecným požadavkům stati 5.1.7 *Virová bezpečnost*, společně se specifickými požadavky na virovou bezpečnost uvedenými v tomto článku, ve statích 5.2.2 *Chovy kuřat prosté specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín*, 5.2.3 *Buněčné substráty pro výrobu humánních vakcín*, 2.6.16 *Důkaz cizích agens v humánních virových vakcínách* a v jednotlivých lékopisných člancích.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, nepoužije se při výrobě šarže vakcíny vyšší počet pasáží viru nebo vyšší počet subkultur bakterie od matečného inokula, než kolik se jich použilo při výrobě vakcíny, která byla v klinických studiích prokazatelně uspokojivá z hlediska bezpečnosti a účinku nebo imunogenity.

Vakcíny, pokud možno, neobsahují složky, o nichž je známo, že způsobují toxické, alergické nebo další nežádoucí reakce u člověka. Mohou se přidat vhodné přísady, včetně stabilizátorů a adjuvancií. Penicilin a streptomycin se nepřidávají v žádném stupni výroby ani se nepřidávají do konečného výrobku. Pro výrobu se však může použít matečné inokulum, připravené v médiu obsahujícím penicilin nebo streptomycin, je-li to zdůvodněno a schváleno.

Důležitým ukazatelem výroby vakcín je shodnost výroby. Články vakcín pro humánní použití uvádějí limity pro různé zkoušky prováděné během výroby vakcíny a u šarže. Tyto limity mohou být uvedeny jako nejvyšší hodnoty, nejnižší hodnoty nebo nejvyšší a nejnižší přípustné odchylky od dané hodnoty. Splnění těchto požadovaných limitů však nemusí být dostačující pro zajištění shodnosti výroby dané vakcíny. Výrobce proto musí u každého výrobku definovat příslušné zkoušky se vhodným akčním nebo propouštěcím limitem nebo limity stanovenými na základě výsledků zjištěných u klinicky zkoušených šarží a těch, u kterých byla shodnost výroby prokázána. Tyto limity se mohou následně upravit na základě statistického zpracování výrobních údajů.

**Substráty pro pomnožení.** Substráty pro pomnožení vyhovují souvisejícím požadavkům lékopisu (5.2.2, 5.2.3) nebo, pokud takové požadavky chybí, požadavkům oprávněné autority. Práce s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí v aseptických podmínkách v prostoru, kde se nepracuje s jinými buňkami. Sérum a trypsin po-

užité k přípravě buněčné suspenze prokazatelně neobsahují cizí agensy.

**Inokula/buněčné banky.** Matečná inokula nebo buněčné banky se identifikují vývojovými záznamy, které obsahují informace o jejich původu a následném zacházení s nimi. Přijmou se vhodná opatření zajišťující, že v inokulu nebo buněčné bance není přítomno cizí agens nebo nežádoucí látka.

**Kultivační média.** Kultivační média jsou, co nejvíce je to možné, prostá složek, o nichž je známo, že způsobují u člověka toxické, alergické nebo jiné nežádoucí reakce; jestliže je přítomnost takových složek nezbytná, má se prokázat, že jejich množství v šarži je sníženo na stupeň zaručující bezpečnost výrobku. Schválené sérum živočišného původu (nikoli lidské) se může použít v růstovém médiu buněčných kultur, ale médium použité pro udržování buněčných kultur během multiplikace viru nemá sérum obsahovat, není-li stanoveno jinak. Média pro buněčné kultury mohou obsahovat indikátor pH, jako je např. fenolová červen, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Přednostně se pro výrobu použije médium bez antibiotik.

**Pomnožování a sklizeň.** Inokulační kultury se pomnožují a sklízí se za definovaných podmínek. Čistota sklizně se ověřuje vhodnými zkouškami uvedenými v člancích.

**Kontrolní buňky.** U vakcín vyráběných na buněčných kulturách se kontrolní buňky udržují a zkoušejí, jak je předepsáno. K zajištění platnosti kontroly se tyto buňky musí udržovat v zásadě stejných podmínkách jako výrobní buňky, včetně použití stejných šarží média a výměn média.

**Kontrolní vejce.** U živých vakcín vyráběných na vejcích se kontrolní vejce inkubují a zkoušejí, jak je předepsáno v příslušném článku.

**Purifikace.** Kde je to vhodné, použije se validovaný purifikační postup.

**Inaktivace.** Inaktivované vakcíny se vyrábějí za použití validovaného inaktivačního postupu, jehož účinnost a shodnost byly prokázány. Je-li známa možná kontaminace sklizně cizími agensy, např. u vakcín vyráběných na vejcích ze zdravých ne-SPF chovů, validuje se inaktivační proces také vzhledem k možným kontaminantům reprezentovaným možnými cizími agensy. Zkouška účinnosti inaktivace se provede co nejdříve po ukončení inaktivačního procesu.

**Konečná várka.** Konečná várka se připraví aseptickým spojením všech složek vakcíny. Pro netekuté vakcíny podávané jiným než parenterálním způsobem podání se konečná várka připraví spojením složek za vhodných podmínek.

**Adjuvans.** Do formulace vakcíny se může k navýšení a/nebo úpravě imunitní odpovědi na antigen (antigeny) zařadit jedno nebo více adjuvans. Adjuvans se může zařadit do formulace konečné vakcíny nebo se může předkládat odděleně. Prokáže se shodnost výroby určením vhodných charakteristik pro kontrolu jakosti adjuvans samotného a v kombinaci s antigenem (antigeny) a stanoví se specifikace jakosti adjuvans samotného i v kombinaci s antigenem (antigeny).

**Adsorbenty jako adjuvancia.** Vakcíny mohou být adsorbované na hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, fosforečnan

vápenatý nebo jiný vhodný adsorbent. Adsorbenty se připravují ve zvláštních podmínkách, které jim zajistí vhodnou fyzikální formu a adsorpční vlastnosti.

Kde se adsorbent používá jako adjuvans a vytváří se *in situ* v průběhu výroby vakcíny, stanoví se jakostní specifikace pro každou složku a pro každý vzniklý adsorbent ve vakcíně. Jakostní specifikace jsou určeny ke kontrole, zejména:

- kvalitativního a kvantitativního chemického složení;
- fyzikálních forem a souvisejících adsorpčních vlastností, zejména je-li adjuvans použito jako adsorbent;
- interakcí mezi adjuvans a antigenem;
- čistoty, včetně obsahu bakteriálního endotoxinu a mikrobiologické jakosti;
- jakýchkoliv dalších parametrů identifikovaných jako kritické pro funkčnost.

V průběhu vývojových studií se stanoví stabilita každého adjuvans samotného i v kombinacích s antigenem (antigeny), zejména pro kritické parametry.

**Protimikrobní látky.** Používají se k prevenci znehodnocení přípravků nebo nežádoucích účinků, způsobených mikrobiální kontaminací, ke které může dojít během používání vakcíny. Protimikrobní látky nejsou obsaženy v lyofilizovaných výrobcích. U jednodávkových tekutých přípravků nejsou protimikrobní látky běžně přijatelné. U vícedávkových tekutých přípravků se potřeba účinné protimikrobní ochrany vyhodnotí podle pravděpodobnosti kontaminace během používání a maximální doporučené doby použití po prvním otevření obalu. Při použití protimikrobní látky se má prokázat, že látka nenaruší bezpečnost nebo účinek vakcíny. Přidání antibiotik jako protimikrobních látek není běžně přijatelné.

Během vývojových studií se k uspokojení oprávněné autority prokáže účinnost protimikrobní látky po dobu použitelnosti.

Účinek protimikrobní látky se hodnotí podle stati (5.1.3). Nelze-li použít kritéria A nebo B, mohou se v odůvodněných případech použít u vakcín pro humánní použití následující kritéria: množství bakterií se za 24 h a za 7 dnů nezvýší, za 14 dnů se sníží o 3 log a za 28 dnů se nezvýší; množství hub se nezvýší za 14 dnů a za 28 dnů.

**Stabilita meziproductů.** Při výrobě vakcíny se v různých stadiích získávají meziproducty a někdy se uchovávají dlouhou dobu. Meziproducty zahrnují:

- inokula a buněčné banky;
- živé nebo inaktivované sklizně;
- purifikované sklizně, které mohou být tvořeny toxiny nebo toxoidy, polysacharidy, bakteriálními nebo virovými suspenzemi;
- purifikované antigeny;
- adsorbované antigeny;
- konjugované polysacharidy;
- konečnou várku vakcíny;
- vakcínu v konečném uzavřeném obalu skladovanou při teplotě nižší, než jaká byla použita pro stabilitní studie konečného výrobku, určenou k propuštění bez dalšího zkoušení.

Kromě meziproductů, které se použijí během krátkého období, se provádí stabilitní studie u meziproductů v předpokládaných podmínkách skladování, aby se potvrdila očeká-

vaná míra degradace. U konečné várky vakcíny se provedou stabilitní studie s reprezentativními vzorky v podmínkách odpovídajících předpokládaným podmínkám pro skladování. U každého meziproductu (s výjimkou inokul a buněčných bank) se stanoví doba použitelnosti za předpokládaných podmínek skladování, kde je to vhodné, na základě stabilitních studií.

**Šarže.** Šarže se připraví aseptickým rozplněním konečné várky do sterilních a zabezpečených obalů, které se po případné lyofilizaci uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace. U netekutých vakcín pro jiné než parenterální podání se šarže připraví rozplněním konečné várky do sterilních zabezpečených obalů za vhodných podmínek. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se určité zkoušky předepsané pro šarži provést u konečné várky, pokud se prokáže že následující výrobní postupy neovlivní shodu.

**Vzhled.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, každý obal (lahvička, injekční stříkačka nebo ampule) v každé šarži se vizuálně nebo mechanicky kontroluje na přípustný vzhled.

**Stupeň adsorpce.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, hodnotí se u adsorbovaných vakcín stupeň adsorpce na základě výsledků zjištěných u šarží použitých v klinickém zkoušení. Ze stabilitních údajů získaných u vakcíny se musí prokázat, že stupeň adsorpce ke konci doby použitelnosti nebude menší než u šarží použitých v klinické studii.

**Tepelná stabilita.** Kde je v člancích pro živé atenuované vakcíny předepsaná zkouška tepelné stability, provádí se u šarže, aby se mezi šaržemi sledovala shodnost tepelné citlivosti virových/bakteriálních částic v přípravku. Vhodné podmínky jsou uvedeny v jednotlivých člancích. Zkouška se může vypustit se souhlasem oprávněné autority, jakmile byla jednou při běžné zkoušce prokázána shodnost výrobního postupu pro daný přípravek, za použití odpovídajících parametrů, jako je shodnost výtěžku, poměr infekčních virů (životaschopných bakterií) před a po lyofilizaci, účinnost při propuštění, reálná stabilita za předepsaných podmínek a také tepelná stabilita. Pokud dojde k významným změnám ve výrobním postupu, ať už při přípravě antigenu/antigenů, nebo ve složení, požaduje se znovuzavedení zkoušky.

**Stabilita.** Během vývojových studií se má prokázat zachování účinnosti šarže po dobu její použitelnosti. Stanoví se pokles účinnosti za doporučených skladovacích podmínek. Větší pokles i v rozmezí přijatelné účinnosti může být ukazatelem, že vakcína nevyhovuje.

**Doba použitelnosti.** Není-li stanoveno jinak, doba použitelnosti se vypočítá od začátku zkoušky nebo od počátku první zkoušky u složené vakcíny. U vakcín skladovaných při nižších teplotách, než pro jaké je zpracována stabilitní studie, a mají-li být uvolněny bez dalšího zkoušení, se doba použitelnosti počítá od data přemístění z nižší teploty. Jestliže se u dané vakcíny neprovedlo stanovení účinnosti, vypočítá se doba použitelnosti šarže z údajů schválených zkoušek indikujících stabilitu, nebo když chybí, od data lyofilizace nebo data naplnění do konečných obalů. U složené vakcíny, jejíž složky jsou dodávány v oddělených obalech, se doba použitelnosti rovná době použitelnosti té složky, jejíž doba použitelnosti končí nejdříve.

Doba použitelnosti platí pro vakcíny skladované za předepsaných podmínek.

**Zkoušky na zvířatech.** V souladu s ustanoveními Evropské dohody o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) se zkoušky na zvířatech musí provádět takovým způsobem, aby se použil minimální počet zvířat a působilo co nejméně bolesti, utrpení, stresu a trvalého poškození. Kritéria pro posuzování zkoušek v člancích se používají s ohledem na tato ustanovení. Např. je-li předepsáno, že zvířata se považují za pozitivní, infikovaná atd., jestliže vykazují typické klinické příznaky nebo úhyn, pak se při zjištění dostatečných pozitivních příznaků buď šetrným způsobem utratí, nebo odpovídajícím způsobem ošetří, aby se předešlo zbytečnému utrpení. V souladu s Obecnými zásadami se mohou použít alternativní zkušební metody prokazující shodu s článkem a použití takových zkoušek se zvláště doporučuje, neboť vede k nahrazení nebo snížení počtu zvířat nebo ke snížení jejich utrpení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Vakcíny vyhovují zkouškám předepsaným v jednotlivých člancích, které zahrnují, kde je to vhodné, tyto zkoušky:

**Hodnota pH (2.2.3).** Tekuté vakcíny, kde je to vhodné po rekonstituci, vyhovují limitům pH schváleným pro daný přípravek.

**Adjuvans.** Jestliže vakcína obsahuje adjuvans, stanoví se jeho obsah. Má být v rozmezí přijatelných limitů vzhledem k předpokládanému obsahu (viz také odstavce Hliník a Vápník).

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg hliníku (Al) v jedné lidské dávce; pokud byl ve vakcíně použit hliníkový adsorbent, není-li stanoveno jinak.

**Vápník (2.5.14).** Nejvýše 1,3 mg vápníku (Ca) v jedné lidské dávce, pokud byl ve vakcíně použit vápníkový adsorbent, není-li stanoveno jinak.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l volného formaldehydu v konečném výrobku, pokud byl při výrobě vakcíny použit formaldehyd, není-li stanoveno jinak.

**Fenol (2.5.15).** Nejvýše 2,5 g/l v konečném výrobku; pokud byl při výrobě vakcíny použit fenol, není-li stanoveno jinak.

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše 3,0 % vody u lyofilizované vakcíny, není-li stanoveno jinak.

**Využitelný objem (2.9.17).** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, vyhovuje Zkoušce na využitelný objem parenterálních přípravků.

**Bakteriální endotoxiny.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, provádí se v konečném výrobku zkouška na bakteriální endotoxiny. Pokud nejsou v jednotlivých člancích uvedeny limity, obsah bakteriálních endotoxinů určený vhodnou metodou (2.6.14) je nižší než limit schválený pro daný produkt.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem, není-li stanoveno jinak, skladují se při teplotě (5 ± 3) °C. Tekuté adsorbované vakcíny nesmějí zmrznout.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název přípravku;
- údaj identifikující šarži;
- doporučená lidská dávka a způsob podání;
- podmínky skladování;
- doba použitelnosti;
- název a množství jakékoliv protimikrobní látky;
- název jakékoliv antibiotika, adjuvans, příchuti nebo stabilizátoru přítomných ve vakcíně;
- kde je to vhodné, že vakcína je adsorbovaná;
- název jakékoliv složky, která může způsobit nežádoucí reakce, a jakákoliv kontraindikace použití vakcíny;
- u lyofilizovaných vakcín:
  - název nebo složení a objem přiložené tekutiny k rekonstituci přípravku;
- doba, do které je třeba vakcínu po rekonstituci použít.

## VACCINA AD USUM VETERINARIUM

7.2:0062

### Vakcíny pro veterinární použití

*Synonymum.* Vaccinae ad usum veterinarium

*V případě složených vakcín se ke každé složce, která je předmětem lékopisného článku, vztahují opatření tohoto článku způsobená podle potřeby, jak je dále popsáno, viz Zkoušky na čistotu (Bezpečnost), Hodnocení bezpečnosti veterinárních vakcín (5.2.6) a Hodnocení účinku veterinárních vakcín (5.2.7).*

*Pokud je imunologický přípravek pro veterinární použití určený pro minoritní použití, mohou se vypustit některé zkoušky, což je předmětem schválení oprávněnou autoritou<sup>1</sup>.*

#### 1 DEFINICE

Jsou to přípravky obsahující antigenní látky a podávají se k vyvolání specifické a aktivní imunity proti onemocněním způsobeným bakteriemi, toxiny, viry, houbami nebo parazity. Živé nebo inaktivované vakcíny vyvolávají aktivní imunitu, která se může pasivně přenést mateřskými protilátkami, proti imunogenům, jež vakcíny obsahují, a někdy též proti antigenně příbuzným organismům. Vakcíny mohou obsahovat bakterie, toxiny, viry nebo houby, živé nebo inaktivované, parazity nebo antigenní frakce či látky vytvářené těmito organismy. Jsou neškodné, přitom si uchovávají všechny nebo alespoň část svých antigenních vlastností. Vakcíny mohou také obsahovat kombinace těchto složek. Antigeny se mohou připravit rekombinantní DNA technologií. Ke zvýšení imunizačních vlastností vakcín se mohou použít vhodná adjuvancia.

<sup>1</sup> Poznámka: Pokyn týkající se požadavků na imunologické veterinární medicínální přípravky určené pro minoritní použití nebo pro minoritní druh zvířat/limitovaný trh (Guideline on data requirements for IVMPs intended for minor use or minor species/limited markets) EMA/CVMP/IWP/123243/2006, včetně následných revizí tohoto dokumentu.

Terminologie použitá v člancích vakcín pro veterinární použití je definována v obecné stati (5.2.1).

### 1-1 BAKTERIÁLNÍ VAKCÍNY A BAKTERIÁLNÍ TOXOIDY

Bakteriální vakcíny a bakteriální toxoidy se připravují z kultur pomnožených na vhodných pevných nebo tekutých živných půdách či jiným vhodným způsobem. Požadavky uvedené v této části se nevztahují na bakteriální vakcíny připravené na buněčných kulturách nebo na živých zvířatech. Použitý kmen bakterie se mohl genetickým inženýrstvím změnit. U každé použité bakteriální kultury se pečlivě kontroluje totožnost, antigenní účinnost a čistota.

Bakteriální vakcíny obsahují inaktivované nebo živé bakterie nebo jejich antigenní složky. Tyto přípravky jsou buď tekuté o různém stupni zákalu, nebo mohou být lyofilizované.

Bakteriální toxoidy se připravují z toxinů snížením jejich toxicity na velmi nízkou úroveň nebo úplným odstraněním toxicity fyzikálními či chemickými prostředky při zachování odpovídající imunizační účinnosti. Toxiny se získávají z vybraných kmenů specifikovaných mikroorganismů pomnožením na vhodných živných půdách nebo jinými vhodnými prostředky, např. chemickou syntézou.

Toxoidy mohou být:

- tekuté;
- vysrážené síranem draselno-hlinitým nebo jiným vhodným činidlem;
- purifikované a/nebo adsorbované na fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý, fosforečnan vápenatý nebo jiný adsorbent uvedený v příslušném článku.

Bakteriální toxoidy jsou čiré nebo slabě opalizující tekutiny. Adsorbované toxoidy jsou suspenze nebo emulze.

Některé toxoidy mohou být lyofilizované.

Není-li uvedeno jinak, vztahují se ustanovení a požadavky dále uvedené stejně na bakteriální vakcíny, na bakteriální toxoidy a na přípravky obsahující kombinaci bakteriálních buněk a toxoidu.

### 1-2 VIROVÉ VAKCÍNY

Virové vakcíny se připravují kultivací ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), tkáních, mikroorganismech, embryonovaných vejcích nebo, pokud není jiná možnost, na živých zvířatech nebo jinými vhodnými prostředky. Použitý kmen viru se mohl genetickým inženýrstvím změnit. Jsou to tekuté nebo lyofilizované přípravky jednoho nebo více virů, virových subjednotek nebo peptidů.

Živé virové vakcíny se připravují z virů, které mají oslabenou virulenci nebo mají přirozeně nízkou virulenci pro cílový živočišný druh.

Inaktivované virové vakcíny se zpracovávají validovaným postupem inaktivace viru a mohou se purifikovat a koncentrovat.

### 1-3 VEKTOROVÉ VAKCÍNY

Vektorové vakcíny jsou tekuté nebo lyofilizované přípravky, které obsahují jeden nebo více typů živých mikroorganismů (bakterií nebo virů), které nejsou patogenní nebo mají nízkou patogenitu pro cílový druh a do kterých byl vložen jeden nebo více genů kódujících antigeny, které stimulují imunitní odpověď chránící proti jiným mikroorganismům.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Metody přípravy, které se liší podle typu vakcíny, se volí tak, aby se zachovala totožnost a imunogenita antigenu a aby se zabránilo kontaminaci cizími agens.

Látky živočišného původu použité při výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům obecné stati (5.2.5). Ostatní látky použité při výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům lékopisu (pokud existuje odpovídající článek) a vyrábějí se způsobem, který zabráňuje kontaminaci vakcíny.

**2-1-1 Substráty pro výrobu.** Buněčné kultury použité k výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům obecné stati (5.2.4).

Odkazuje-li článek na chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů (SPF), vyhovují tyto chovy požadavkům popsaným v obecné stati (5.2.2).

Pro výrobu inaktivovaných vakcín, kde jsou organismy vakcíny pomnožovány v drůbežích embryích, pocházejí tato embrya buď z SPF chovů (5.2.2), nebo ze zdravých ne-SPF chovů, prostých určitých agens a jejich protilátek, jak je specifikováno v příslušném článku. Může být nezbytné prokázat účinnost postupu inaktivace proti specifikovaným možným kontaminantům. Pro výrobu matečného inokula a pro všechny pasáže mikroorganismu, včetně pracovního inokula, se používají vejce z SPF chovů (5.2.2).

Pokud je ve výrobě vakcín pro veterinární použití nevyhnutelné použít zvířata nebo živočišné tkáně, mají být tato zvířata prostá specifikovaných patogenů z hlediska použití tohoto druhu a cílového zvířete pro vakcínu.

### 2-1-2 Média použitá pro přípravu výchozí kultury a pro výrobu.

Musí se zaznamenat alespoň kvalitativní složení média použitého pro přípravu výchozí kultury a pro výrobu. Jakost všech uvedených složek se specifikuje. Pokud jsou média nebo jejich složky označeny jako výrobní vlastnictví, je to uvedeno a je zaznamenán vhodný popis. Složky živočišného původu jsou specifikovány živočišným druhem, který je zdrojem, a zemí původu a musí vyhovovat požadavkům obecné stati (5.2.5). Postup přípravy použitých médií, včetně sterilizačních postupů, se dokumentuje.

Přidání antibiotik při výrobním postupu je obvykle omezeno na tekutiny buněčných kultur a jiná média, na inokula vajec a materiál získaný z kůže nebo jiných tkání.

### 2-1-3 Inokula

#### 2-1-3-1 Bakteriální inokula

**2-1-3-1-1 Všeobecné požadavky.** Uvede se rod a druh, a kde je to vhodné, též kmeny bakterií použitých ve vakcíně. Kdykoliv je to možné, používá se systém jednotné inokulace. Každé matečné inokulum se zkouší, jak je popsáno dále. Pro každé matečné inokulum se vedou záznamy o původu, datu izolace, průběhu pasážování (včetně purifikace a charakterizačních postupů) a podmínkách skladování. Každé matečné inokulum má přidělený specifický kód k identifikačním účelům.

**2-1-3-1-2 Pomnožování.** Před zahájením výroby se stanoví minimální a maximální počet subkultivací každého matečného inokula. Dále se dokumentují metody použité pro při-

pravu inokulačních kultur, příprava suspenzí pro inokulaci, techniky inokulace kultur, titr a koncentrace inokula a použité živné půdy. Má se prokázat, že se těmito subkultivacemi nemění charakteristické znaky kultury (např. disociace nebo antigenita). Dokumentují se podmínky, za kterých se každé inokulum skladuje.

2-1-3-1-3 Totožnost a čistota. Každé matečné inokulum prokazatelně obsahuje pouze uvedený bakteriální druh a kmen. Zaznamená se krátký popis metody použité k prokázání totožnosti každého kmene biochemickými, sérologickými a morfologickými charakteristikami a jeho co možná největší rozlišení od příbuzných kmenů a také metoda ke zjištění čistoty kmene. Jestliže se prokáže, že matečné inokulum obsahuje jiné živé organismy, než je uvedený druh a kmen, je toto inokulum nevhodné pro výrobu vakcíny.

#### 2-1-3-2 Virová inokula

2-1-3-2-1 Všeobecné požadavky. U virů používaných ve výrobě je zaveden systém jednotné inokulace. Každé matečné inokulum se zkouší, jak je popsáno dále. Pro každé matečné inokulum se vedou záznamy o původu, datu izolace, průběhu pasážování (včetně purifikace a charakterizačních postupů) a podmínkách skladování. Každé matečné inokulum má přidělený specifický kód k identifikačním účelům. K výrobě vakcíny se obvykle nepoužívá virus po více než pěti pasážích od matečného inokula. Ve zkouškách matečného inokula dále popsaných, pokud není uvedeno jinak, nemají použité organismy na počátku zkoušek více než pět pasáží od matečného inokula.

Tam, kde je matečné inokulum obsaženo v permanentně infikovaných základních buňkách, provádějí se následující zkoušky na vhodném objemu viru z rozrušených základních buněk. Kde se provedly odpovídající zkoušky na rozrušených buňkách k validaci vhodnosti základních buněk, není nutné tyto zkoušky opakovat.

2-1-3-2-2 Pomnožování. Matečné inokulum a všechny následující pasáže se pomnožují v buňkách, v embryonovaných vejcích nebo na zvířatech, u nichž bylo prokázáno, že jsou vhodné pro výrobu vakcíny (viz výše). Pokud se použijí látky živočišného původu, vyhovují požadavkům obecné stati (5.2.5).

2-1-3-2-3 Totožnost. Musí se použít vhodná metoda k identifikaci vakcinačního kmene a jeho co možná největšího rozlišení od příbuzných kmenů.

2-1-3-2-4 Bakteriální a houbová kontaminace. Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

2-1-3-2-5 Mykoplazmata (2.6.7). Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (kultivační metoda a metoda s indikátorem v buněčné kultuře).

2-1-3-2-6 Nepřítomnost cizích virů. Články mohou obsahovat požadavky na nepřítomnost cizích agens, nejsou-li uvedeny, uplatňují se požadavky uvedené dále.

Přípravky monoklonálních nebo polyklonálních protilátek obsahující vysoké hladiny neutralizační protilátky proti viru inokula se připravují po šaržích za použití antigenu, který není získán z žádné úrovně pasáže izolátu viru, z níž bylo připraveno matečné inokulum. Každá šarže séra se 30 min zahřívá při 56 °C, aby se inaktivoval komplement. U každé šarže se prokáže, že neobsahuje protilátky proti možným kontaminantům výchozího viru a že nemá žádné nespeci-

fické inhibující účinky na schopnost virů infikovat a dále se množit v buňkách (nebo vejcích, kde je to vhodné). Pokud nelze takové sérum získat, použijí se jiné metody, které specificky odstraní nebo neutralizují virus inokula.

Jestliže virus inokula ovlivňuje provedení a citlivost zkoušky na cizí viry, vzorek matečného inokula se ošetří minimálním množstvím monoklonální nebo polyklonální protilátky tak, aby vakcinační virus byl co možná nejvíce neutralizován nebo odstraněn. V konečné směsi viru a séra má být, jestliže je to možné, titr viru nejméně deseti dávek vakcíny v 0,1 ml u ptačích vakcín a v 1 ml u jiných vakcín. U ptačích vakcín je třeba provést zkoušení inokul podle obecné stati 2.6.24. U savčích vakcín se inokulum nebo směs inokula a antiséra zkouší na nepřítomnost cizích agens následujícím způsobem.

Směs se inokuluje do kultur požadovaného typu buněk o ploše nejméně 70 cm<sup>2</sup>. Kultury se mohou inokulovat v jakémkoli vhodném stupni růstu až do 70 % souvislého porostu. Nejméně jedna jednovrstvá kultura každého typu buněk (monolayer) se musí ponechat jako kontrolní. Kultury se musí denně prohlížet po dobu jednoho týdne. Na konci tohoto období se kultury třikrát zmrazí a opět rozmrazí, odstředí se, aby se odstranila buněčná drť, a znovu se inokulují do stejného typu buněk, jak je uvedeno výše. Tento postup se dvakrát opakuje. K provedení dále uvedených zkoušek se v konečné pasáži musí získat dostatečné množství buněk ve vhodných nádobách.

Přítomnost cytopatických a hemadsorpčních agens se zkouší metodami popsanými v příslušných statích o zkoušení buněčných kultur (5.2.4). Metody, jako je imunofluorescence, se použijí ke zjištění specifických kontaminantů pro zkoušky v buněčných kulturách. Matečné inokulum se inokuluje do:

- primárních buněk druhu, z něhož virus pochází;
- buněk citlivých na viry patogenní pro druh, pro který je vakcína určena;
- buněk citlivých na pestiviry.

Jestliže se prokáže, že matečné inokulum obsahuje jiné živé organismy, než je uvedený druh a kmen viru, nebo cizí virové antigeny, je toto inokulum nevhodné pro výrobu vakcíny.

2-1-4 **Inaktivace.** Inaktivované vakcíny se podrobují validovanému inaktivačnímu postupu. Dále popsané zkoušení inaktivační kinetiky se provádí jednou pro daný výrobní postup. Zbytek tohoto oddílu se vztahuje ke každému výrobnímu cyklu. Při provádění zkoušek na inaktivaci je třeba vzít v úvahu možnost, že ve výrobních podmínkách mohou být organismy fyzikálně chráněny před inaktivační látkou.

2-1-4-1 *Inaktivační kinetika.* Má se prokázat, že ve výrobních podmínkách se mikroorganismus vakcíny inaktivuje inaktivačním činidlem a inaktivačním postupem. O inaktivační kinetice se mají získat náležité údaje. Čas potřebný k inaktivaci obvykle nemá být delší než 67 % trvání celého inaktivačního postupu.

2-1-4-2 *Aziridin.* Jestliže se jako inaktivační činidlo použije sloučenina aziridinu, má se prokázat, že na konci inaktivačního postupu žádné nezůstává. Toho se může dosáhnout neutralizací inaktivačního činidla thiosíranem a prokázáním

zbytkového thiosíranu v inaktivované sklizni na konci inaktivačního postupu.

2-1-4-3 *Formaldehyd*. Jestliže se jako inaktivační činidlo použije formaldehyd, provede se zkouška na volný formaldehyd, jak je předepsáno ve Zkouškách na čistotu.

2-1-4-4 *Ostatní inaktivační činidla*. Jestliže se použijí jiné metody inaktivace, provedou se vhodné zkoušky, aby se prokázalo, že inaktivační činidlo bylo odstraněno nebo sníženo na přijatelnou zbytkovou úroveň.

2-1-4-5 *Zbytkový živý virus/bakterie a/nebo zkoušení detoxikace*. Zkouška na úplnou inaktivaci a/nebo detoxikaci se provede ihned po inaktivaci a/nebo detoxikaci a, pokud je to vhodné, po neutralizaci nebo odstranění inaktivačního nebo detoxikačního činidla.

2-1-4-5-1 *Bakteriální vakcíny*. Vybraná zkouška má být vhodná pro bakterie použité ve vakcíně a má sestávat z nejméně dvou pasáží v produkční živné půdě. Pokud se k výrobě použila pevná živná půda, použije se vhodná tekutá půda nebo půda předepsaná v příslušném článku. Přípravek vyhovuje, jestliže nebyl zjištěn žádný živý mikroorganismus.

2-1-4-5-2 *Bakteriální toxoidy*. Vybraná zkouška má být vhodná pro přítomný toxin nebo toxiny a má být z dostupných zkoušek nejcitlivější.

2-1-4-5-3 *Virové vakcíny*. Vybraná zkouška má být vhodná pro použitý vakcinační virus a musí sestávat z nejméně dvou pasáží v buněkách, embryonovaných vejcích nebo, pokud není k dispozici jiná vhodná citlivá metoda, na zvířatech. Množství buněčných kultur, vajec nebo zvířat má být dostatečné k zajištění požadované citlivosti zkoušky. Pro zkoušky v buněčných kulturách se inokuluje nejméně 150 cm<sup>2</sup> buněčné kultury (monolayeru) 1,0 ml inaktivované sklizně. Přípravek vyhovuje, jestliže nebyl zjištěn žádný živý virus nebo jiný mikroorganismus.

Konečná várka vakcíny se připraví kombinací jedné nebo více šarží antigenu, který vyhověl všem odpovídajícím požadavkům, a dalších pomocných látek, jako jsou adjuvancia, stabilizátory, protimikrobní látky a rozpouštědla.

## 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY A VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Pro výběr složení vakcíny a výběr vakcinačního kmene se vyhodnotí důležitá hlediska, včetně bezpečnosti, účinku a stability. Všeobecné požadavky na hodnocení bezpečnosti a účinku jsou uvedeny ve statích (5.2.6) a (5.2.7). Tyto požadavky se mohou více upřesnit nebo doplnit v odpovídajících člancích.

U živých vakcín se během vývojových studií stanoví maximální titr viru nebo počet bakterií přijatelný z hlediska bezpečnosti. Ten se potom použije jako maximální přijatelný titr pro každou šarží vakcíny při propouštění.

2-2-1 **Účinnost a imunogenita**. Zkoušky uvedené v člancích v odstavcích Stanovení účinnosti a Imunogenita slouží dvěma účelům:

– odstavec Stanovení účinnosti stanovuje v experimentálních podmínkách dobře reprodukovatelnou zkouškou minimální přijatelnou vakcinační kapacitu pro všechny vakcíny v rozmezí definice, která se musí zaručit po celou dobu použitelnosti;

– dobře reprodukovatelné experimentální studie jsou normálně součástí celkového prokázání účinku vakcíny (viz stať 5.2.7); zkouška uvedená v odstavci Imunogenita (kde je obvykle odkaz na odstavec Stanovení účinnosti) je vhodná jako část tohoto zkoušení.

2-2-2 **Způsob podání**. Při vývoji vakcíny se prokáže bezpečnost a imunogenita pro každý doporučený způsob podání. Následující seznam způsobů podání však není vyčerpávající:

- intramuskulární;
- subkutánní;
- intravenózní;
- oční;
- perorální;
- nosní;
- vpichem do běháku;
- do křídlové řasy;
- intradermální;
- intraperitoneální;
- *in ovo*.

2-2-3 **Metody podání**. Při vývoji vakcíny se prokáže bezpečnost a imunogenita pro každou doporučenou metodu podání. Následující seznam metod podání však není vyčerpávající:

- injekční;
- v pitné vodě;
- ve spreji;
- vkápnutí do oka;
- skarifikace;
- implantace;
- koupel.

2-2-4 **Kategorie zvířete**. Články mohou uvádět, že daná zkouška se má provádět pro každou kategorii zvířete cílového druhu, pro který je přípravek doporučen nebo má být doporučen. Je třeba vzít v úvahu následující seznam kategorií, který není vyčerpávající.

- *Savci*:
  - březí zvířata/nebřezí zvířata;
  - zvířata chovná/zvířata chovaná především pro produkci potravin;
  - zvířata minimálního stáří nebo velikosti doporučená pro vakcinaci.
- *Ptáci*:
  - ptáci chovaní především pro produkci vajec/ptáci chovaní především pro produkci masa;
  - ptáci před zahájením snášky/ptáci po zahájení snášky.
- *Ryby*:
  - generační ryby/ryby chované především pro produkci potravin.

2-2-5 **Protimikrobní látky**. Protimikrobní látky se používají k prevenci znehodnocení nebo k prevenci nežádoucích účinků způsobených mikrobiální kontaminací při používání vakcíny; předpokládá se, že vakcína se použije nejdéle do 10 h po prvním otevření. Protimikrobní látky se nezařazují do lyofilizovaných přípravků, ale je-li to zdůvodněno vzhledem k maximální doporučené době použití po rekonstituci, mohou být součástí rozpouštědel pro vícedávkové lyofilizované výrobky. U jednodávkových tekutých přípravků není použití protimikrobních látek přijatelné, pokud

není zdůvodněno a schváleno jinak, ale může být přijatelné, když se např. stejná vakcína určená pro použití u živočišných druhů, které nejsou určeny k výživě lidí, plní do jednodávkových i vícedávkových obalů. U vícedávkových tekutých přípravků se hodnotí potřeba účinné protimikrobní konzervace vzhledem k pravděpodobné kontaminaci během používání a k maximální doporučené době použití po otevření obalu.

Účinnost protimikrobních látek po dobu použitelnosti se má prokázat při vývojových studiích k uspokojení oprávněné autority.

Účinek protimikrobních látek se hodnotí, jak je popsáno v obecné stati (5.1.3), a zkouší se v dodatečných vzorcích ve vhodných intervalech pokrývajících navrženou dobu použitelnosti. Pokud nemohou být splněny požadavky A ani požadavky B, pak se v odůvodněných případech u vakcín pro veterinární použití použijí tyto požadavky: bakterie, za 24 h až 7 dnů nedochází ke zvýšení počtu, po 14 dnech dojde ke snížení počtu o 3 log, po 28 dnech nedochází ke zvýšení počtu; houby, za 14 dnů a za 28 dnů nedochází ke zvýšení počtu.

Přidání antibiotik jako protimikrobní ochrany je obecně nepřijatelné.

**2-2-6 Stabilita.** Stabilita se prokazuje proto, aby se zdůvodnila navržená doba použitelnosti. Tímto prokázáním se rozumějí výsledky titrací viru, zjišťování počtu bakterií nebo zkoušek účinnosti prováděných v pravidelných intervalech až do doby tří měsíců po době použitelnosti nejméně na třech reprezentativních, po sobě vyrobených šaržích vakcín skladovaných v doporučených skladovacích podmínkách, společně s výsledky stanovení vlhkosti (u lyofilizovaných přípravků), fyzikálními zkouškami adjuvans, chemickými zkouškami látek, jako jsou např. pomocné složky a protimikrobní látky, a hodnotami pH, podle toho, co je vhodné.

Kde je to vhodné, provádí se stabilitní studie rekonstituované vakcíny, při níž se použije přípravek rekonstituovaný podle navrženého doporučení.

### 2-3 ZKOUŠKY PŘI VÝROBĚ

Určité zkoušky se mohou provést s konečnou várkou vakcíny, lépe než se šarží nebo šaržemi z ní připravených; takové zkoušky zahrnují zkoušky na protimikrobní látky, na nepřítomnost formaldehydu a stanovení účinnosti u inaktivovaných vakcín.

**2-3-1 Zbytkový živý virus/bakterie a/nebo zkoušení detoxikace.** U inaktivovaných vakcín, kde by mohly pomocné látky ovlivnit zkoušku na inaktivaci a/nebo detoxikaci, se provede zkouška na inaktivaci nebo detoxikaci při přípravě konečné várky potom, co byly smíchány různé šarže antigenu, ale před přidáním pomocných látek; zkouška na inaktivaci nebo detoxikaci se může potom vynechat u konečné várky a šarže.

Kde je riziko zvratu k toxicitě, provede se zkouška na detoxikaci v posledním stupni výrobního postupu, ve kterém není ohrožena citlivost zkoušky (tj. po smíchání různých šarží antigenu, ale před přidáním pomocných látek), je důležité prokázat, že ke zvratu k toxicitě nedojde.

**2-3-2 Zkouška účinnosti šarže.** U většiny vakcín nejsou zkoušky uvedené v odstavci Stanovení účinnosti nebo Imunogenita vhodné pro běžné zkoušení šarží.

U živých vakcín se minimální přijatelný titer viru nebo počet bakterií, který poskytuje vyhovující výsledky ve zkoušce Stanovení účinnosti a dalších studiích účinku, stanoví při vývoji. Při běžném zkoušení se u každé šarže musí prokázat, že titer nebo počet při propuštění je takový, že na konci doby použitelnosti bude podle stabilitních studií vakcína skladovaná v doporučených podmínkách obsahovat nejméně minimální přijatelný titer viru nebo počet bakterií stanovený při vývojových studiích.

U inaktivovaných vakcín, jestliže se nepoužívá pro běžné zkoušení zkouška popsána v odstavci Stanovení účinnosti, se určí zkouška účinnosti šarže při vývoji. Cílem zkoušky účinnosti šarže je zaručit, že každá šarže vakcíny, jestliže bude zkoušena, bude vyhovovat zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti a Imunogenita. Kritéria přijatelnosti pro zkoušku účinnosti šarže by se proto měla určit ve vztahu ke zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Kde je zkouška účinnosti šarže popsána v článku, je to uvedeno jako příklad zkoušky, která se považuje za vhodnou pro stanovení korelace se zkouškou Stanovení účinnosti; mohou se také použít jiné modely zkoušení.

**2-3-3 Šarže.** Pokud není v článku předepsáno jinak, plní se konečná várka vakcíny asepticky do sterilních zabezpečených obalů, které se potom uzavírají tak, aby se vyloučila kontaminace.

Pouze šarže, která vyhověla všem požadavkům uvedeným v odstavci 3 Zkoušky šarže nebo také požadavkům jednotlivých lékopisných článků, se může uvolnit k použití. Se souhlasem oprávněné autority se mohou vynechat určité zkoušky šarže, jestliže zkoušky při výrobě poskytují stejnou nebo lepší záruku, že šarže vyhovuje, nebo kde byly provedeny alternativní zkoušky validované se zřetelem na lékopisné metody.

Zkouška totožnosti se často může vhodně spojit se zkouškou účinnosti šarže, aby se zabránilo zbytečnému používání zvířat. Pro danou vakcínu se může použít validovaná *in vitro* zkouška, aby se zabránilo zbytečnému používání zvířat.

V souladu se Všeobecnými zásadami (stať 1.1 *Obecná ustanovení*) je pro zavedenou vakcínu povoleno oprávněnou autoritou neprovádět běžně zkoušky bezpečnosti v zájmu pohody zvířat, když se při výrobě dostatečného počtu po sobě následujících výrobních šarží zjistilo, že vyhověly zkoušce, a tak se prokázala shodnost ve výrobním postupu. Významné změny ve výrobním postupu mohou vyžadovat návrat k provádění běžného zkoušení pro opětovné schválení shodnosti. Počet po sobě následujících šarží, který se má zkoušet, závisí na řadě faktorů, jako je typ vakcíny, frekvence výroby šarží a zkušenost s vakcínou během vývoje zkoušek bezpečnosti a během provádění zkoušky bezpečnosti šarže. Na základě informací dostupných pro danou vakcínu a bez toho, aby bylo dotčeno rozhodnutí oprávněné autority, bude pro většinu přípravků pravděpodobně postačující zkoušení deseti po sobě následujících šarží. U výrobků s přirozeným bezpečnostním rizikem může být nutné pokračovat v provádění zkoušky bezpečnosti u každé šarže.

2-3-3-1 *Zkoušky na zvířatech.* V souladu s ustanoveními Evropské dohody o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely se musí zkoušení provádět takovým způsobem, aby se použil minimální počet zvířat a způsobila se co nejmenší bolest, utrpení, úzkost nebo trvalé poškození. Na základě těchto skutečností se musí použít kritéria pro posuzování zkoušek v člancích. Jestliže je uvedeno např., že zvíře se považuje za pozitivní, infikované atd., jakmile se vyskytnou typické klinické příznaky, potom co nejdříve, kdy je jasné, že výsledek nebude ovlivněn, se má příslušné zvíře buď šetrně utratit, nebo vhodně ošetřit tak, aby se předešlo zbytečnému utrpení. V souladu se Všeobecnými zásadami se mohou použít alternativní metody zkoušení k prokázání shody s článkem a používání takových zkoušek se podporuje tam, kde je možné nahradit nebo snížit použití zvířat nebo snížit jejich utrpení.

2-3-3-2 *Fyzikální zkoušky.* Vakcína obsahující olejové adjuvans se zkouší vhodnou metodou na viskozitu a výsledky jsou v rozmezí určeném pro přípravek. Má se prokázat stabilita emulze.

2-3-3-3 *Chemické zkoušky.* Provede se stanovení koncentrace vhodných složek, jako je hliník a protimikrobní látky, aby se prokázalo, že jsou v rozmezí určeném pro přípravek.

2-3-3-4 *Hodnota pH.* U tekutých přípravků a rozpouštědel se stanoví hodnota pH a prokáže se, že je v rozmezí určeném pro přípravek.

2-3-3-5 *Voda.* Kde je to vhodné, kontroluje se lyofilizační postup stanovením vody a prokáže se, že obsah vody je v rozmezí určeném pro přípravek.

### 3 ZKOUŠKY ŠARŽE

*Jednotlivé články rovněž určují zkoušky, které se mají provést u každé jednotlivé vakcíny.*

Všechna slepičí vejce, kuřata a kuřecí buněčné kultury pro použití ve zkouškách kontroly jakosti mají pocházet z SPF chovu (5.2.2).

3-1 **Totožnost.** U inaktivovaných vakcín je pro prokázání totožnosti obvykle předepsána zkouška na indukované protilátky, protože tato zkouška je použitelná pro všechny vakcíny.

3-2 **Formaldehyd (2.4.18, Metoda B** se použije, pokud se k neutralizaci přebytečného formaldehydu použil disiřičitan sodný). Jestliže se při výrobě použil formaldehyd, není obsah volného formaldehydu vyšší než 0,5 g/l, pokud se neprokázala bezpečnost vyšší koncentrace.

3-3 **Fenol (2.5.15).** Pokud vakcína obsahuje fenol, není jeho obsah vyšší než 5 g/l.

3-4 **Sterilita (2.6.1).** Vakcíny vyhovují zkoušce na sterilitu. Je-li objem tekutiny v obalu vyšší než 100 ml, použije se, kde je to možné, metoda membránové filtrace. Nemůže-li se metoda membránové filtrace použít, může se použít metoda přímé inokulace. Pokud je objem tekutiny v každém obalu nejméně 20 ml, je minimální objem, který se má použít pro každou živnou půdu, 10 % obsahu nebo 5 ml, podle toho, co je méně. Přiměřené množství vzorků (2.6.1) ke zkoušení je 1 % ze šarže, nejméně čtyři a nejvíce deset vzorků.

U živých bakteriálních a živých houbových vakcín se vhodnými metodami, jako je mikroskopické hodnocení a očkování na vhodné půdy, prokazuje nepřítomnost mikroorganismu jiného než vakcinační kmen.

U živých ptačích virových vakcín, pouze pro podání jiné než parenterální, se požadavek na sterilitu obvykle nahradí požadavky na nepřítomnost patogenních mikroorganismů a na maximálně jeden nepatogenní mikroorganismus na dávku.

3-5 **Cizí agens.** Články předepisují řadu opatření, která přijatá společně dávají přijatelný stupeň jistoty, že konečný přípravek neobsahuje infekční cizí agens. Tato opatření zahrnují:

- 1) kdykoliv je to možné, vyrábí se systémem jednotné inokulace a v rámci systému buněčné banky;
- 2) rozsáhlá zkoušení inokul a buněčné banky na cizí agens;
- 3) požadavky na SPF chovy použité pro zajištění substrátů pro výrobu vakcíny;
- 4) zkoušení látek živočišného původu, které se musí, kdekoli je to možné, podrobit inaktivačnímu postupu;
- 5) u živých vakcín zkoušení konečného výrobku na infekční cizí agens; tato zkoušení jsou méně rozsáhlá než zkoušení prováděná v časnějších stádiích vzhledem k zárukám poskytnutým zkoušením při výrobě.

V případě pochyb se mohou zkoušky určené pro inokulum živé vakcíny použít také pro konečný přípravek. Jestliže se takovou zkouškou zjistí cizí agens, vakcína nevyhovuje článku.

Ptačí živé virové vakcíny vyhovují zkouškám na cizí agens v šaržích konečných výrobků (2.6.25).

3-6 **Mykoplazmata (2.6.7).** Živé virové vakcíny vyhovují zkoušce na mykoplazmata (kultivační metoda).

3-7 **Bezpečnost.** Všeobecně se doporučeným způsobem podají dvě dávky inaktivované vakcíny a/nebo deset dávek živé vakcíny. Za určitých okolností může být nutné snížit předepsaný počet dávek nebo změnit metodu rekonstituce a podání, např. u složené vakcíny, kde je nesnadné rekonstituovat deset dávek živé složky ve dvou dávkách inaktivované složky. Zvířata se pozorují po nejdelší období uvedené v článku. Nevyskytuje se žádná abnormální místní nebo celková reakce. Kde se z konečné várky připraví více šarží, provede se zkouška bezpečnosti s první šarží a potom se u dalších šarží připravených ze stejné konečné várky tato zkouška vynechá.

Během vývojových studií se s ohledem na zkoušení bezpečnosti definuje typ a stupeň reakcí očekávaných po podání vakcíny. Tato definice se potom použije jako součást pracovního postupu pro zkoušení bezpečnosti šarže k vyhodnocení přijatelných a nepřijatelných reakcí.

Stav imunity zvířat, která se mají použít pro zkoušení bezpečnosti, se specifikuje v jednotlivém článku. U většiny článků se specifikuje jedna ze tří následujících kategorií:

- 1) zvířata musí být prostá protilátek proti viru/bakterii/toxinu atd. obsaženým ve vakcíně;
- 2) zvířata jsou přednostně prostá protilátek, ale mohou se použít zvířata s nízkou hladinou protilátky, dokud zvířata nebyla vakcinována a podání vakcíny nezpůsobuje anamnestickou odpověď;



- 3) zvířata nesmí být vakcinována proti nemoci, proti které má být vakcína preventivně použita.

Jako obecné pravidlo se u živých vakcín požaduje kategorie 1. U ostatních vakcín se obvykle požaduje kategorie 2, ale když většina zvířat dostupných pro použití ve zkouškách může splňovat podmínky kategorie 1, může se tento požadavek použít také pro inaktivované vakcíny. Kategorie 3 se požaduje pro některé inaktivované vakcíny, kde stanovení protilátek před zkoušením není nutné nebo je nepraktické. U drůbežích vakcín se jako obecné pravidlo požadují SPF ptáci.

U ptačích vakcín se zkouška bezpečnosti obecně provádí na deseti SPF kuřatech (5.2.2) s výjimkou, že u vakcín nedoporučených pro použití u kuřat se zkouška provede na deseti ptačích jednoho ze živočišných druhů, pro který je vakcína doporučena. Ptáci jsou prosti protilátek proti původci onemocnění, proti kterému má vakcína poskytnout ochranu.

**3-8 Stanovení účinnosti.** Vakcína vyhovuje požadavkům na zkoušku uvedenou v části Imunogenita (část 2-2-1), je-li podána doporučeným způsobem a metodou.

*Doba použitelnosti.* Není-li stanoveno jinak, doba použitelnosti se vypočítá od začátku titrace viru nebo počítání bakterií (pro živé vakcíny) nebo od počátku zkoušky stanovení účinnosti (pro ostatní vakcíny). Pro složené vakcíny se doba použitelnosti rovná době použitelnosti té složky, které končí doba použitelnosti nejdříve. U vakcín skladovaných výrobci při nižších teplotách, než je uvedeno v označení na obalu, prokáže stabilitu pro dané skladování vhodná studie. Doba použitelnosti se potom počítá od data přemístění z nižší teploty do podmínek uvedených v označení na obalu.

Doba použitelnosti platí pro vakcíny skladované za předepsaných podmínek.

#### 4 SKLADOVÁNÍ

Chráněny před světlem, při teplotě (5 ±3) °C, není-li stanoveno jinak. Tekuté přípravky není povoleno zmrazit, není-li stanoveno jinak.

#### 5 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že přípravek je určen pro veterinární použití;
- objem přípravku a počet dávek v obalu;
- způsob podání;
- použitý typ nebo typy bakterií (a, kde je to vhodné, antigenní složky) či virů a pro živé vakcíny nejnižší a nejvyšší počet živých bakterií nebo nejnižší a nejvyšší titer viru;
- kde je to vhodné, u inaktivovaných vakcín minimální účinnost v mezinárodních jednotkách;
- kde je to vhodné, název a množství použité protimikrobní látky nebo jiné látky přidané do vakcíny;
- název jakékoliv látky, která může způsobit vedlejší reakci;
- u lyofilizovaných vakcín:
  - název nebo složení a objem přiložené tekutiny použité k rekonstituci přípravku;
  - doba, během které se má vakcína po rekonstituci spotřebovat;
- u vakcín s olejovým adjuvans uvést, že pokud se vakcína náhodou vstříkne člověku, je nutné ihned vyhledat lékaře;
- živočišný druh, pro který je vakcína určena;
- indikace vakcíny;
- návod k použití;
- veškeré kontraindikace použití přípravku, včetně všech potřebných varování před nebezpečím předávkování;
- dávky doporučené pro různé živočišné druhy.

# OBEČNÉ ČLÁNKY LÉKOVÝCH FOREM

## POZNÁMKY

6.7:1502

*Následující úvodní text uvádí definice a/nebo vysvětlení názvů, které se mohou vyskytovat v obecných člancích lékových forem a příslušných obecných statích pro metody farmaceutické technologie (2.9), ale nejsou jimi definovány. Kde je to možné, jsou uvedeny i ekvivalentní názvy, které se mohou vyskytovat i v jiných publikacích nebo kontextech. Tyto poznámky jsou uvedeny pro informaci.*

### **Emulze** (emulsion)

Emulze je disperzní systém sestávající ze směsi nejméně dvou kapalin, které nejsou vzájemně mísitelné. Jedna kapalina je ve druhé dispergovaná ve formě kapiček.

### **Koloidní disperze** (colloidal dispersion)

Koloidní disperze je systém, ve kterém jsou částice koloidní velikosti (o rozměru přibližně mezi 1 nm až 500 nm) různého skupenství (pevné, kapalné nebo plynné) dispergovány v kontinuální fázi různého složení a/nebo stavu.

### **Léčivá látka** (active substance)

Ekvivalentní názvy: aktivní složka, účinná látka, léčivo, účinná farmaceutická složka.

### **Lékové formy se zpožděným uvolňováním** (delayed-release dosage forms)

Lékové formy se zpožděným uvolňováním jsou lékové formy s řízeným uvolňováním, které uvolňují léčivou látku (léčivé látky) později než lékové formy s neřízeným uvolňováním při podání stejným způsobem. Tohoto záměru se dosáhne speciálním návrhem formulace a/nebo výrobního postupu. Lékové formy se zpožděným uvolňováním zahrnují enterosolventní (acidorezistentní) léčivé přípravky, které jsou definované v obecných člancích pevných perorálních lékových forem.

### **Lékové formy s neřízeným uvolňováním** (conventional-release dosage forms)

Lékové formy s neřízeným uvolňováním jsou léčivé přípravky, které nemají záměrně upravené uvolňování léčivé látky (léčivých látek) zvláštním složením a/nebo výrobními postupy. V případě pevných lékových forem závisí disoluční profil léčivé látky hlavně na jejích vnitřních vlastnostech. Ekvivalentní název: lékové formy s normálním uvolňováním.

### **Lékové formy s řízeným uvolňováním** (modified-release dosage forms)

Lékové formy s řízeným uvolňováním jsou léčivé přípravky, kde rychlost a/nebo místo uvolňování léčivé látky (léčivých látek), jsou odlišné od lékové formy s neřízeným uvolňováním při podání stejným způsobem. Tohoto záměru se dosáhne speciálním návrhem formulace a/nebo výrobního postupu. Lékové formy s řízeným uvolňováním zahrnují lékové formy s prodlouženým uvolňováním, lékové formy se zpožděným uvolňováním a lékové formy s pulzním uvolňováním.

### **Lékové formy s prodlouženým uvolňováním** (prolonged-release dosage forms)

Lékové formy s prodlouženým uvolňováním jsou lékové formy s řízeným uvolňováním, které uvolňují léčivou látku (léčivé látky) pomaleji než lékové formy s neřízeným uvolňováním při podání stejným způsobem. Tohoto záměru se dosáhne speciálním návrhem formulace a/nebo výrobního postupu.

Ekvivalentní název: lékové formy se zpomaleným uvolňováním.

### **Lékové formy s pulzním uvolňováním** (pulsatile-release dosage forms)

Lékové formy s pulzním uvolňováním jsou lékové formy s řízeným uvolňováním, které uvolňují léčivou látku (léčivé látky) po částech. Tohoto záměru se dosáhne speciálním návrhem formulace a/nebo výrobního postupu.

### **Maloobjemové parenterální přípravky** (small-volume parenterals)

Infuze nebo injekce v obalech s jmenovitým objemem 100 ml nebo menším.

### **Roztok** (solution)

Roztok je směs tvořená jednoduchou fází obsahující jednu nebo více rozpuštěných látek, tj. látek v molekulárním stavu dispergovaných v rozpouštědle nebo v mísitelném rozpouštědle.

### **Sféroidy** (spheroids)

Sféroidy jsou považovány za kulovité nebo přibližně kulovité částice s obvykle zvýšenou mechanickou odolností v porovnání s běžnými *granulemi* (0499). Mají hladký jednotný povrch s typickou velikostí v rozsahu 200 µm až 2,8 mm. Sféroidy se mohou připravovat jakoukoli vhodnou metodou.

### **Standardní názvy** (standard terms)

Standardní názvy jsou názvy lékových forem léčivých přípravků, způsobu podání a obalů stanovené Evropskou lékopisnou komisí a vydané ve zvláštní publikaci nazvané Standard Terms.

*V Českém lékopisu se uvádí v Národní části jako Tabulka X – Standardní názvy lékových forem, způsobů podání a obalů.*

### **Suspenze** (suspension)

Suspenze je disperzní systém sestávající ze pevných částic dispergovaných v tekuté nebo polotuhé kontinuální fázi, ve které jsou tyto částice prakticky nerozpustné.

### **Vehikulum** (vehicle)

Vehikulum je nosič léčivé látky (léčivých látek) v tekutém léčivém přípravku, složený z jedné nebo více pomocných látek.

### **Velkoobjemové parenterální přípravky** (large-volume parenterals)

Infuze nebo injekce v obalech s jmenovitým objemem větším než 100 ml.

**Základ (basis)**

Základ je nosič léčivé látky (léčivých látek) v polotuhém nebo pevném léčivém přípravku, složený z jedné nebo více pomocných látek.

**AURICULARIA**

7.1:0652

**Ušní přípravky****DEFINICE**

Jsou to tekuté, polotuhé nebo pevné přípravky určené ke vkapávání, rozprašování, insulaci a podání do zevního zvukovodu nebo k ušnímu výplachu.

Ušní přípravky obvykle obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity, k úpravě nebo stabilizaci hodnoty pH, ke zvýšení rozpustnosti léčivých látek, ke stabilizaci přípravku nebo k zajištění odpovídajících protimikrobních vlastností. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek přípravku nebo nejsou v používaných koncentracích příčinou toxicity nebo přílišné místní dráždivosti.

Přípravky pro podání do poškozeného ucha, zvláště pokud je perforován ušní bubínek nebo, jsou-li podávány před chirurgickým zákrokem, jsou sterilní a bez protimikrobních látek, není-li zdůvodněno a schváleno jinak, a dodávají se v jednodávkových obalech.

Ušní přípravky se dodávají ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech, je-li třeba, opatřených vhodným zařízením pro podání, které může být upraveno tak, aby se zabránilo kontaminaci.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, vodné ušní přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní látky ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy přípravek má vlastní přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Kde je to vhodné, vyhovují obaly pro ušní přípravky požadavkům státi *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů ušních přípravků:

- ušní kapky a spreje;
- polotuhé ušní přípravky;
- ušní zásypy;
- ušní výplachy;
- ušní tampony.

**VÝROBA**

Při vývoji ušního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat nezbytnost použití a účinek této přísady. Vhodná metoda zkoušení společně s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v dané formulaci přípravku je popsána ve státi *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Při vývoji ušního výplachu se má prokázat, že z obalu přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci ušních přípravků se musí přijmout vhodná opatření, aby se zajistila jejich

mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou uvedena ve státi *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4). Sterilní ušní přípravky se připravují za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility, zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve státi *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1). Při výrobě ušních přípravků obsahujících dispergované částice se používají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic s ohledem na odpovídající použití.

**ZKOUŠENÍ**

**Stejnornost dávkových jednotek.** Jednodávkové ušní přípravky vyhovují zkoušce na stejnorodnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnorodnost a/nebo hmotnostní stejnorodnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky obsažené v dávkové lékové formě.

**Obsahová stejnorodnost** (2.9.6). Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, vyhovují jednodávkové ušní přípravky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % celkového obsahu zkoušce B na obsahovou stejnorodnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, pak se požadavky zkoušky vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnorodnost** (2.9.5). Jednodávkové ušní přípravky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnorodnost jednodávkových přípravků. Je-li zkouška na obsahovou stejnorodnost předepsána pro všechny léčivé látky přípravku, nevyžaduje se zkouška hmotnostní stejnorodnosti.

**Sterilita** (2.6.1). Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**SKLADOVÁNÍ**

Je-li přípravek sterilní, skladuje se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- název každé přidané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, že je přípravek sterilní;
- u vícedávkových obalů doba od otevření obalu, po které se již nesmí obsah použít. Tato doba nesmí překročit 4 týdny, není-li to zdůvodněno a schváleno jinak.

**Otoguttae et Praeparata auricularia pro aerodispersione****Ušní kapky a ušní spreje****DEFINICE**

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze jedné nebo více léčivých látek v kapalině (např. ve vodě, v glykolech nebo v olejích) vhodné k podání do zevního zvukovodu, bez nežádoucího tlaku na ušní bubínek. Mohou se také podávat do zvukovodu jako tekutinou impregnovaný tampon.

U emulzí může docházet k oddělování fází, ale protřepáním se znovu snadno uvedou do původního stavu. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze protřepáním snadno roz-

ptýlit; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Ušní kapky se obvykle dodávají ve vícedávkových obalech skleněných nebo vhodných plastových, jejichž součástí je kapátko nebo jsou opatřeny šroubovacím uzávěrem ze vhodných materiálů se zabudovaným kapátkem a gumovým nebo plastovým krytem. Takový kompletní uzávěr se může rovněž dodávat odděleně. Spreje se obvykle dodávají ve vícedávkových obalech opatřených vhodným aplikátorem. Pokud jsou spreje dodávány v tlakových obalech, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu* (0523).

## Auricularia semisolida

### Polotuhé ušní přípravky

#### DEFINICE

Jsou určené k podání do zevního zvukovodu, v případě potřeby jako tampon impregnovaný přípravkem.

Polotuhé ušní přípravky vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Praeparata semisolida ad usum cutaneum* (0132).

Dodávají se v obalech opatřených vhodným aplikátorem.

## Pulveres auriculares

### Ušní zásypy

*Synonymum.* Zásypy do ucha

#### DEFINICE

Jsou určené k podání do zevního zvukovodu, vyhovují požadavkům článku *Pulveres adpersorii* (1166).

Dodávají se v obalech opatřených vhodným zařízením umožňujícím podání nebo insuflacii.

## Lotiones auriculares

### Ušní výplachy

*Synonymum.* Ušní omývadla

#### DEFINICE

Jsou to přípravky určené k očištění zevního zvukovodu, obvykle jako vodné roztoky s hodnotou pH ve fyziologickém rozmezí.

Ušní výplachy určené pro podání na poškozené části nebo pro podání před chirurgickým zákrokem jsou sterilní.

## Tampona auricularia

### Ušní tampony

#### DEFINICE

Jsou určené ke vkládání do zevního zvukovodu. Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata* (1155).

## CAPSULAE

6.0:0016

### Tobolky

*Synonymum.* Kapsle

#### DEFINICE

*Požadavky tohoto článku se netýkají nutně přípravků určených pro jiné než perorální podání. Požadavky vztahující se na takovéto přípravky se mohou nalézt, kde je to vhodné, v jiných článcích, např. Rectalia (1145) a Vaginalia (1164).*

Jsou to pevné přípravky s tvrdými nebo měkkými obaly různých tvarů a velikostí, obvykle obsahující jednu dávku léčivé látky (léčivých látek). Jsou určené pro perorální podání.

Obaly tobolek se vyrábějí ze želatiny nebo jiných látek, jejichž konzistence se může upravovat přidávkem takových látek, jako je glycerol nebo sorbitol. Mohou se přidat pomocné látky, jako jsou povrchově aktivní látky, plniva pro zajištění neprůhlednosti tobolek, protimikrobní látky, sladidla, barviva schválená oprávněnou autoritou a aromatické přísady. Tobolky mohou být na povrchu označené.

Obsah tobolek může mít pevnou, tekutou nebo polotuhou konzistenci. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami, jako jsou rozpouštědla, plniva, kluzné látky (lubrikanty) a rozvolňovačidla, nebo bez nich. Obsah tobolek nezpůsobuje narušení obalu. Obal tobolek je ovšem narušován trávicími šťávami, přičemž se uvolní obsah tobolek.

Kde je to vhodné, vyhovují obaly pro tobolky požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů tobolek:

- tvrdé tobolky;
- měkké tobolky;
- enterosolventní tobolky;
- tobolky s řízeným uvolňováním;
- škrobové tobolky.

#### VÝROBA

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tobolek se používají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Tobolky vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost** (2.9.6). Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, tobolky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % hmotnosti náplně vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více než jednu léčivou látku, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Tobolky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jedna ze zkoušek popsanych ve stati *Zkouška disoluce pevných lékových forem (2.9.3)*.

Je-li předepsána zkouška disoluce, neprovádí se zkouška rozpadavosti.

#### SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřesahující 30 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede název každé přidané protimikrobní látky.

### Capsulae durae

#### Tvrdé tobolky

#### DEFINICE

Obal tvrdých tobolek se skládá ze dvou předem vyrobených válcovitých částí, jejichž jeden konec je zakulacený a uzavřený, druhý je otevřený.

#### VÝROBA

Léčivá látka (léčivé látky) obvykle v pevné formě (prášky nebo granule) se naplní do jedné části obalu, který se uzavře nasazením druhé části jako víčka. Bezpečnost uzávěru se může zvýšit vhodnými prostředky.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Tvrdé tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (2.9.1). Použije se *voda R* jako médium. Je-li to zdůvodněno a schváleno, může se jako médium použít místo vody *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS* nebo *žaludeční šťáva umělá R*. Jestliže tobolky plavou na hladině, mohou se přidat disky. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, přístroj je v chodu po 30 min.

### Capsulae molles

#### Měkké tobolky

#### DEFINICE

Obal měkkých tobolek je silnější než u tvrdých tobolek. Obaly sestávají z jedné části a mají různé tvary.

#### VÝROBA

Měkké tobolky se obvykle formují, plní a uzavírají v jednom pracovním procesu, ale pro použití *ex tempore* se může obal vyrobit předem. Léčivá látka může být součástí materiálu obalu.

Kapaliny mohou být uzavřeny přímo. Pevné látky se obvykle rozpustí nebo dispergují ve vhodném vehikulu na roztok nebo disperzi pastovité konzistence.

Vzhledem k vlastnostem materiálů a kontaktních povrchů může docházet k částečné migraci složek z obsahu tobolky do obalu a naopak.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Měkké tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (2.9.1). Použije se *voda R* jako médium. Je-li to zdůvodněno a schváleno, může se jako médium použít místo vody *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS* nebo *žaludeční šťáva umělá R*. Do každé trubice se přidají disky. Tekuté léčivé látky nacházející se v tobolkách mohou narušovat disk. Za těchto okolností, a je-li to schváleno, se disk nepoužije. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je přístroj v chodu po 30 min a pak se hodnotí stav tobolek. Jestliže se při zkoušce tobolky přilepily k diskům, zkoušku nelze hodnotit a zkouška se opakuje s dalšími šesti tobolkami bez použití disků.

### Capsulae cum liberatione modificata

#### Tobolky s řízeným uvolňováním

#### DEFINICE

Jsou to tvrdé nebo měkké tobolky, jejichž obsah nebo obal, nebo obojí obsahují vybrané pomocné látky, nebo jsou vyrobeny zvláštním postupem umožňujícím řídit rychlost, místo nebo čas uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Tobolky s řízeným uvolňováním zahrnují tobolky s prodlouženým uvolňováním a tobolky se zpožděným uvolňováním.

#### VÝROBA

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

### Capsulae enterosolventes

#### Enterosolventní tobolky

*Synonymum.* Acidorezistentní tobolky

#### DEFINICE

Jsou to tobolky se zpožděným uvolňováním, které odolávají působení žaludeční šťávy a uvolňují léčivou látku (léčivé látky) ve střevní tekutině. Obvykle se připravují naplněním tobolek granulemi nebo částicemi s enterosolventním obalem, nebo v určitých případech se mohou připravit z tvrdých nebo měkkých tobolek s enterosolventním obalem.

#### VÝROBA

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z tobolek naplněných granulemi nebo částicemi s enterosolventním obalem.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** U tobolek s enterosolventním obalem se provádí zkouška rozpadavosti (2.9.1) s následující úpravou. Jako médium se použije *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS*. Přístroj se nechá v chodu bez disků 2 h nebo jinou schválenou dobu a hodnotí se stav tobolek. Doba rezistence vůči kyselému prostředí se mění podle složení

zkoušených tobolek. Obvykle jsou to 2 h až 3 h, ale ani při schválení odchylky nesmí být menší než 1 h. Žádná z tobolek nevykazuje známky rozpadu nebo trhliny dovolující únik obsahu. Kyselina se nahradí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,8* a do každé trubice se přidá disk. Je-li to zdůvodněno a schváleno, použije se *tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,8* s přidavkem pankreatinu prášku (např. 0,35 g *pankreatinu práškového R* ve 100 ml *tlumivého roztoku*). Přístroj se nechá v chodu 60 min a hodnotí se stav tobolek. Jestliže se při zkoušce tobolky přilepily k diskům, zkoušku nelze hodnotit a zkouška se opakuje s dalšími šesti tobočkami bez disků.

**Disoluce.** K určení příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z tobolek, které byly vyrobeny z granulí nebo částic již potažených enterosolventním obalem, se použije vhodná zkouška, např. popsána ve stati *Zkouška disoluce pevných lékových forem (2.9.3)*.

## Capsulae amylaceae

### Škrobové tobolky

#### DEFINICE

Jsou to pevné přípravky s tvrdým obalem, obsahující jednu dávku jedné nebo více léčivých látek. Obal škrobových tobolek je tvořen oplátkami, připravenými obvykle z rýžové mouky, a skládá se ze dvou předem vyrobených mělkých válcovitých částí. Před použitím se tobolky vloží na několik sekund do vody, pak se položí na jazyk a spolknou se s douškem vody.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede způsob podání.

## EMPLASTRA TRANSCUTANEA

6.0:1011

### Transdermální náplasti

#### DEFINICE

Jsou to pružné farmaceutické přípravky různých velikostí obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k podání na neporušenou pokožku. Léčivá látka (léčivé látky) uvolněné z transdermální náplasti se po průchodu kožní bariérou dostávají do systémového oběhu.

Transdermální náplasti se obvykle skládají z vnější krycí vrstvy, zásobníku s léčivou látkou (léčivými látkami) a ochranné vrstvy, která se před použitím transdermální náplasti odstraní.

Krycí vrstva je nepropustná pro léčivou látku (léčivé látky) a obvykle i pro vodu a je nosičem i ochranou pro přípravek. Tato vrstva může mít stejný nebo větší rozměr než zásobník s léčivou látkou. Ve druhém případě je přesahující okraj krycí vrstvy pokryt adhezivními látkami, které po přitlačení zajistí přilnutí náplasti ke kůži.

Zásobník obsahuje léčivou látku (léčivé látky) a pomocné látky, jako jsou stabilizátory, solubilizátory nebo látky

upravující rychlost uvolňování a látky zvyšující transdermální absorpci léčivých látek. Může být přítomna jednovrstevná nebo vícevrstevná tuhá nebo polotuhá matrice. Složení a struktura matrice ovlivňují difuzi léčivé látky (léčivých látek) do kůže. Zásobník může rovněž obsahovat adhezivní látky, které po přitlačení zajistí přilnutí náplasti ke kůži. Přípravek může mít charakter polotuhé matrice, na jejíž jedné straně je membrána, která řídí uvolňování a difuzi léčivé látky (léčivých látek) z přípravku. Adhezivní látky mohou být v tomto případě naneseny na část membrány nebo na celou membránu nebo pouze okolo okraje membrány na krycí vrstvě.

Po přiložení na suchou čistou a neporušenou kůži přilne transdermální náplast po jemném přitlačení dlaní nebo prsty pevně ke kůži. Lze ji odstranit bez většího poškození pokožky nebo odloupení léčivé látky. Náplast nesmí kůži dráždit nebo ji alergizovat ani po opakovaných aplikacích.

Ochranná odstranitelná vrstva je obvykle tvořena plastovým nebo kovovým materiálem. Při odstraňování se neodtrhuje zásobník (matrice nebo rezervoár) nebo adhezivní vrstva z náplasti.

Transdermální náplasti se obvykle balí jednotlivě do uzavřených sáčků.

#### VÝROBA

Při výrobě, balení, skladování a distribuci se využívá vhodných prostředků k zajištění mikrobiální jakosti; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Transdermální náplasti vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, transdermální náplasti vyhovují zkoušce C na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem.

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jedna ze zkoušek popsáných ve stati *Zkouška disoluce pro transdermální přípravky (2.9.4)*. Podle složení, rozměru a tvaru náplasti se použije disková nebo průtoková metoda, nebo metoda rotujícího válce.

Je možné použít membránu z různých materiálů, např. porézní celulosy nebo silikonů, která však nesmí ovlivnit uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z náplasti. Rovněž nesmí obsahovat látky, které by bránily její funkci (např. mastnotu). Před zkouškou je možné upravit membránu vhodným způsobem, např. uložením na 24 h do média použitého při zkoušce. Membrána se umístí na povrch náplasti v místě uvolňování tak, aby nevznikly vzduchové bubliny. Podmínky a hodnocení zkoušky schvaluje oprávněná autorita.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě místnosti, není-li uvedeno jinak.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné, celkové množství léčivé látky (léčivých látek) v náplastí, dávka uvolněná za jednotku času a velikost plochy, z níž se léčivá látka uvolňuje.

**GRANULA****6.0:0499****Granule**

*Synonyma.* Pulveres granulati, Granulata, Granuláty, Zrněné prášky

*Požadavky na granule určené k přípravě perorálních roztoků nebo suspenzí jsou uvedeny v článku Liquida peroralia (0672). Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahují se požadavky tohoto článku na granule pro veterinární použití.*

**DEFINICE**

Jsou to léčivé přípravky tvořené z pevných, suchých shluků částic prášků dostatečně odolných při mechanickém namáhání. Jsou určeny k perorálnímu podání. Polykají se přímo nebo se žvýkají nebo se před podáním rozpustí nebo dispergují ve vodě nebo jiné vhodné tekutině.

Granule obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich, a je-li třeba, barviva schválená oprávněnou autoritou a aromatické přísady.

Granule jsou jednodávkové nebo vícedávkové přípravky. Jednotlivá dávka u vícedávkového přípravku se podává pomocí odměrky či jiné pomůcky umožňující odměření předepsaného množství. Každá dávka jednodávkových granulí je v samostatném obalu, např. v sáčku nebo lahvičce.

Kde je to vhodné, vyhovují obaly pro granule požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů granulí:

- šumivé granule;
- obalené granule;
- enterosolventní granule;
- granule s řízeným uvolňováním.

**VÝROBA**

Při výrobě, balení, skladování a distribuci granulí se používají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

**ZKOUŠENÍ**

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové granule vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost** (2.9.6). Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové granule s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost** (2.9.5). Jednodávkové granule, s výjimkou obalených granulí, vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Hmotnostní stejnoměrnost jednotlivých dávek ve vícedávkových obalech** (2.9.27). Granule dodávané ve vícedávkových obalech vyhovují zkoušce.

**SKLADOVÁNÍ**

Obsahuje-li přípravek těkavé látky nebo musí-li být obsahy obalů dobře chráněny, skladují se ve vzduchotěsných obalech.

**Granula effervescentia****Šumivé granule**

*Synonymum.* Šumivé zrněné prášky

**DEFINICE**

Jsou to neobalené granule obvykle obsahující kyselé látky a uhličitany nebo hydrogenuhličitany, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpouštění nebo dispergaci ve vodě před podáním.

**ZKOUŠENÍ**

**Zkouška rozpadavosti.** Jedna dávka šumivých granulí se převede do nádoby s 200 ml vody R při teplotě 15 °C až 25 °C a sleduje se vznik bublin plynu. Když se zastaví uvolňování plynu z jednotlivých zrnků, granule mají být rozpadlé, a to buď rozpuštěné, nebo dispergované ve vodě. Zkouška se opakuje s pěti dalšími dávkami. Přípravek vyhovuje zkoušce, když se každá ze šesti zkoušených dávek rozpadla do 5 min.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve vzduchotěsných obalech.

**Granula obducta****Obalené granule**

*Synonymum.* Obalené zrněné prášky

**DEFINICE**

Jsou to obvykle vícedávkové přípravky obsahující zrna obalená nebo potažená jednou nebo více vrstvami směsí různých pomocných látek.

## VÝROBA

Látky používané k obalování se obvykle nanášejí ve formě roztoku nebo suspenze za podmínek umožňujících odpaření rozpouštědla.

## ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati *Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem* (2.9.3).

**Granula cum liberatione modificata**

## Granule s řízeným uvolňováním

*Synonymum.* Zrněné prášky s řízeným uvolňováním

## DEFINICE

Jsou tvořené obalenými nebo neobalenými zrny připravenými za použití vybraných pomocných látek nebo vybraných postupů použitých samostatně, nebo v kombinaci tak, aby se dosáhla vhodná rychlost, místo nebo čas uvolňování léčivé látky nebo látek, které jsou uvolňovány.

Granule s řízeným uvolňováním zahrnují granule s prodlouženým uvolňováním a granule se zpožděným uvolňováním.

## VÝROBA

Příslušné uvolňování léčivé látky (léčivých látek) se prokáže vhodnou zkouškou.

## ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati *Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem* (2.9.3).

**Granula enterosolventia**

## Enterosolventní granule

*Synonymuma.* Acidorezistentní granule, Enterosolventní zrněné prášky

## DEFINICE

Jsou to přípravky se zpožděným uvolňováním, a to tak, že jsou odolné vůči žaludeční šťávě a uvolňují léčivou látku (léčivé látky) ve střevní tekutině. Těchto vlastností se dosahuje obalením zrn enterosolventním materiálem (enterosolventní obalené granule) nebo jinými vhodnými postupy.

## VÝROBA

Příslušné uvolňování léčivé látky (léčivých látek) se ověří vhodnou zkouškou.

## ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati *Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem* (2.9.3).

## GUMMI MANDUCABILIA MEDICINALIA

6.0:1239

## Léčivé žvýkací gummy

*Synonyma.* Masticabilia gummis medicata, Gummi manducabile medicinale

## DEFINICE

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky, které tvoří hlavně guma určená ke žvýkání, ne k polykání.

Obsahují jednu nebo více léčivých látek, které se uvolňují při žvýkání. Po rozpuštění nebo dispergaci léčivých látek ve slinách se žvýkací gummy používají k:

- místní léčbě onemocnění dutiny ústní;
- systémové distribuci po absorpci sliznicí dutiny ústní nebo gastrointestinálním traktem.

## VÝROBA

Léčivé žvýkací gummy se získávají z neochuceného měkčeného kaučuku na bázi přírodních nebo syntetických elastomerů. Mohou obsahovat další pomocné látky, jako jsou plniva, změkčovačidla, sladidla, aromatické přísady, stabilizátory, látky podporující plasticitu a oprávněnou autoritou schválená barviva.

Léčivé žvýkací gummy se vyrábějí lisováním, případně změkčením nebo tavením elastomerního základu a postupným přidáváním dalších pomocných látek. V případě tavení se žvýkací gummy zpracují do požadovaného tvaru. Mohou být potaženy ochranným povlakem, např. pokud je třeba je chránit před vlhkostí a světlem.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, provede se vhodná zkouška prokazující průběh uvolňování léčivé látky (léčivých látek). Pro tyto účely lze použít metodu uvedenou ve stati *Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum* (2.9.25).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci léčivých žvýkacích gum se využívá vhodných prostředků k zajištění mikrobiální jakosti; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

## ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Léčivé žvýkací gummy vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost** (2.9.6). Pokud není předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, vyhovují žvýkací gummy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo menším než 2 % celkové hmotnosti, zkoušce A na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Jestliže přípravek obsahuje více léčivých látek, stanovení se provede pouze u těch látek, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnóměrnost** (2.9.5). Nepotažené žvýkací gummy, a pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, i potažené žvýkací gummy, vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost pevných jednodávkových lékových forem. Je-li



zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

#### SKLADOVÁNÍ

Nepotažené léčivé žvýkácké gumy jsou při skladování chráněny před vlhkostí a světlem.

## INHALANDA

7.3:0671

### Inhalační přípravky

#### DEFINICE

Jsou to tekuté nebo pevné přípravky určené k podání ve formě par nebo aerosolů do plic k místnímu nebo celkovému účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek, které mohou být rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném vehikulu.

Inhalační přípravky mohou, podle typu přípravku, obsahovat hnací plyny, rozpouštědla, ředidla, protimikrobní látky, solubilizátory nebo stabilizátory apod. Tyto pomocné látky nemají nepříznivý účinek na funkci mukózy nebo cilií v dýchacích cestách.

Suspenze a emulze jsou snadno dispergovatelné roztřepáním, a musí zůstat jen natolik stabilní, aby bylo možné podání správné dávky.

Inhalační přípravky se dodávají ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech. Jsou-li v tlakovém balení, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu* (0523).

Přípravky určené k podání ve formě aerosolů (disperze pevných nebo kapalných částic v plynu) se podávají jedním z těchto zařízení:

- rozprašovačem (nebulizérem);
- inhalátorem (dávkovacím tlakovým inhalátorem, dávkovacím netlakovým inhalátorem nebo inhalátorem prášků).

Rozlišuje se několik kategorií inhalačních přípravků:

- přípravky k inhalaci parou;
- tekuté přípravky k rozprašování;
- dávkované tlakové přípravky k inhalaci;
- dávkované netlakové přípravky k inhalaci;
- prášky k inhalaci.

#### VÝROBA

Při vývoji inhalačního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat účinnost vybrané konzervační látky. Vhodná metoda zkoušení a kritéria pro posouzení konzervačních vlastností v dané formulaci jsou popsány v obecné stati 5.1.3 *Účinnost protimikrobních konzervačních látek*.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci inhalačních přípravků se vhodným způsobem zajišťuje jejich mikrobiální jakost; odpovídající doporučení jsou uvedena v obecné stati 5.1.4 *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití*.

Při stanovení stejnoměrnosti podané dávky u vícedávkových inhalátorů není dostačující zkoušení jediného inhalátoru. Výrobci musí použít další postupy zahrnující výpočet

dávkové stejnoměrnosti vztažené na jeden inhalátor, tak i na další inhalátory. Vhodný postup založený na zkoušení jednoho inhalátoru by měl zahrnout deset jednotlivých dávek na počátku, uprostřed a na konci vyprazdňování podle počtu dávek uvedených na obalu daného inhalátoru.

#### OZNAČOVÁNÍ

Pro přípravky podávané inhalátorem se v označení na obalu uvede:

- podávaná dávka; alternativně u přípravků, u nichž byla dávka stanovena jako odměřená dávka nebo jako předplněná dávka, se v označení na obalu uvede buď odměřená dávka nebo předplněná dávka, podle toho co je vhodné;
- kde je to vhodné, počet podání z inhalátoru pro dosažení minimální doporučené dávky;
- počet dávek v inhalátoru.

Kde je to vhodné, uvedou se v označení na obalu názvy všech přidávaných protimikrobních látek.

### Inhalanda vaporem formantia

#### Přípravky k inhalaci parou

*Synonymum.* Inhalační přípravky unášené parou

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, suspenze, emulze nebo pevné přípravky, které se obvykle přidávají do horké vody a výpary se inhalují.

### Inhalanda liquida ad nebulisationem

#### Tekuté inhalační přípravky k rozprašování

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, suspenze, emulze nebo pevné přípravky určené k přeměně na aerosoly pomocí rozprašovačů.

Tekuté inhalační přípravky k rozprašování v koncentrované formě se před použitím ředí na předepsaný objem předepsanou kapalinou. Mohou se také připravit z prášků.

Tekuté přípravky k rozprašování mají hodnotu pH 3 až 10.

Tekuté přípravky k rozprašování dodávané ve vícedávkových obalech mohou obsahovat vhodnou protimikrobní látku ve vhodné koncentraci, s výjimkou případu, kdy přípravek samotný má přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Tekuté přípravky k rozprašování dodávané ve vícedávkových obalech, které neobsahují protimikrobní látku, a jestliže přípravek jako takový nemá přiměřené protimikrobní vlastnosti, jsou sterilní a jsou dodávány v obalech zabraňujících mikrobiální kontaminaci obsahu během skladování a použití.

Tekuté přípravky k rozprašování dodávané v jednodávkových obalech jsou sterilní a neobsahují protimikrobní látku, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

Rozprašovače jsou zařízení přeměňující kapaliny na aerosoly pomocí stlačených plynů, ultrazvukových vibrací nebo jinými způsoby. Tato zařízení umožňují, aby byla inhalována dávka aktivní látky vhodnou rychlostí během prodlouženého časového úseku, včetně následných vdechů, a aby

měla vhodnou velikost částic, která zajistí uložení přípravku v plicích.

Rozprašovače mohou být ovládané dechem nebo se používají jiné způsoby úpravy chodu rozprašovače či synchronizace s dýcháním pacientů.

#### VÝROBA

Rychlost podání léčivé látky a její celková dávka se určují za použití metod popsanych v obecné stati 2.9.44 *Přípravky k rozprašování: charakteristika*. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se použít jiné přístroje a postupy.

U tekutých přípravků k rozprašování ve formě roztoků nebo suspenzí se stanoví distribuce velikosti částic za použití zařízení a postupů popsanych v obecné stati 2.9.44 *Přípravky k rozprašování: charakteristika*. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se použít jiné přístroje a postupy.

#### ZKOUŠENÍ

*Tekuté přípravky k rozprašování se připraví, jak je uvedeno v pokynech pro pacienta.*

#### **Aerodynamické posouzení přípravků k rozprašování.**

U suspenzních tekutých přípravků k rozprašování se stanoví hmotnost jemných částic za použití zařízení a postupů popsanych v obecné stati 2.9.44 *Přípravky k rozprašování: charakteristika*. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se použít jiné přístroje a postupy.

### **Inhalanda in vasis cum pressu doses emittentia**

#### **Dávkované přípravky k inhalaci v tlakovém obalu**

*Synonymum.* Dávkované tlakové přípravky pro inhalaci

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, suspenze nebo emulze dodávané ve speciálních nádobách (tlakovkách) opatřených dávkovacím ventilem, jsou udržovány pod tlakem vhodným hnacím plynem (vhodnými hnacími plyny), které mohou současně sloužit jako rozpouštědlo.

Podaná dávka je dávka, která se podá z inhalátoru. U některých přípravků je dávka pevně stanovena jako odměřená dávka. Odměřenou dávku určuje množství přípravku vložené do inhalátoru. Odměřená dávka se může stanovit také přímo.

#### VÝROBA

Velikost inhalovaných částic aerosolu se kontroluje, aby se v plicích usazovala stálá část částic. Pro charakteristiky jemných částic v dávkovaných tlakových přípravcích k inhalaci se použijí postupy popsane v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic*.

Tlakové dávkovací inhalátory se zkoušejí na těsnost.

#### ZKOUŠENÍ

*Pro dávkované tlakové přípravky pro inhalaci ovládané dechem se musí dále popsane podmínky zkoušky upravit tak, aby zajistily iniciaci inhalátoru v souladu se zkouškou. Inhalátor se vždy se připraví, jak je uvedeno v pokynech pro pacienta.*

**Stejnomenost podané dávky.** Tlakové dávkovací inhalátory se obvykle používají v obrácené poloze (ventilem dolů). Pro inhalátory, s nimiž se pracuje ve vzpřímené poloze (ventilem nahoru), se použije odpovídající zkouška využívající metody zajišťující úplné zachycení podané dávky.

Použitá sběrná zařízení musí být schopná kvantitativně zachytit podanou dávku.

Může se použít sběrná zařízení uvedené na obrázku 1. Skládá se z držáku filtru, sběrné trubice a adaptéru pro náustek inhalátoru. V držáku filtru je podložka pro filtr, např. mřížka z nerezové oceli. Sběrnou trubici lze přišroubovat nebo upevnit k držáku filtru. Adaptér má vzduchotěsně upevnit náustek inhalátoru k zařízení. Použije se náustkový adaptér, který zajistí, aby čelo náustku bylo zarovnáno se vstupní částí nebo 2,5mm ramenem vzorkovací sběrné trubice, podle toho, co je vhodné. Přípojka na vakuum se spojí se systémem zahrnujícím zdroj vakua a regulaci průtoku. Sání vzduchu procházejícího celým zařízením, zahrnujícím filtr a nasazený zkoušený inhalátor, je upraveno na rychlost 28,3 l/min ( $\pm 5\%$ ). Vzduch by měl kontinuálně procházet zařízením tak, aby se zabránilo ztrátě léčivé látky do atmosféry. Držák filtru je uzpůsoben k použití kruhových filtrů o průměru 25 mm. Filtr a další materiály tvořící zařízení musí být kompatibilní s léčivou látkou a rozpouštědly použitými k extrakci léčivé látky z filtru. Jeden konec sběrné trubice je přizpůsoben k těsnému uchycení kruhového filtru k základní části držáku filtru. Po sestavení jsou jednotlivé spoje zařízení vzduchotěsné, takže připojením vakua k držáku filtru projde inhalátorem veškerý vzduch procházející dále sběracím zařízením.

Není-li v pokynech pro pacienty předepsáno jinak, třepe se inhalátorem 5 s a vystříkne se jednou do odpadu. Po připojení k zařízení se vystříkne aerosol stisknutím ventilu na dobu zajišťující kompletní výstřík. Celý postup se opakuje až počet výstříků odpovídá minimální doporučené dávce. Obsah ze zařízení se kvantitativně odebere a stanoví se množství léčivé látky.

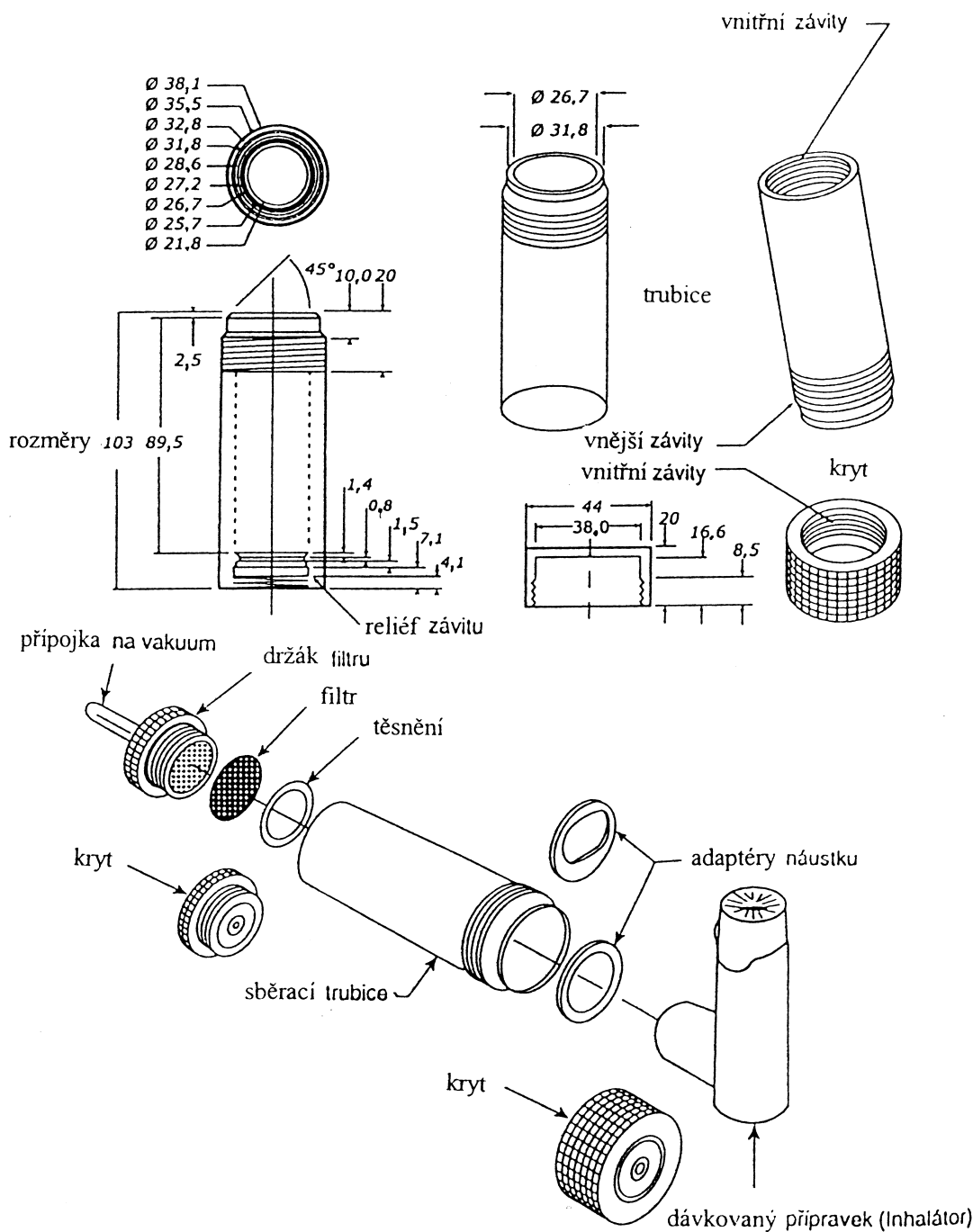
Postup se opakuje s dalšími dvěma dávkami.

Přípravek se vyprazdňuje do odpadu, s přestávkami nejméně 5 s mezi jednotlivými výstříky tak dlouho, až v obalu zůstane  $(n/2) + 1$  dávek, kde  $n$  je počet dávek uvedených v označení na obalu. Výše popsáním postupem se stanoví obsahy čtyř dávek.

Přípravek se dále vyprazdňuje do odpadu s přestávkami nejméně 5 s mezi jednotlivými výstříky, až v obalu zůstane tři dávky. Výše popsáním postupem se stanoví obsahy těchto tří dávek.

U přípravků obsahujících více léčivých látek se provede zkouška stejnoměrnosti podané dávky pro každou léčivou látku.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně devět z deseti výsledků je v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty a všechny výsledky jsou v rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty. Jestliže dva nebo tři výsledky jsou mimo rozmezí 75 % až 125 %, opakuje se zkouška s dalšími dvěma tlakovými nádobami. Nejvýše tři ze třiceti výsledků mohou být mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný výsledek není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty.



**Obr. 1** Přístroj pro sběr dávek pro tlakové dávkovací inhalátory (rozměry v mm)

**Dávka jemných částic.** Použije se zařízení a postup popsaný v obecné stati 2.9.18 Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic (přístroj C, D nebo E) a vypočítá se dávka jemných částic.

**Počet dávkových jednotek v inhalátoru.** Tlaková nádoba s přípravkem (jeden inhalátor) se stisknutím ventilu vyprázdí do odpadu vždy nejméně po dobu 5 s. Celkový počet takto zjištěných dávkových jednotek není menší, než je uvedeno v označení na obalu (tuto zkoušku lze kombinovat se zkouškou na stejnoměrnost podaných dávek).

### Inhalanda in non-pressu vasis doses emittentia

#### Dávkované přípravky k inhalaci v netlakovém obalu

*Synonymum.* Dávkované netlakové přípravky pro inhalaci

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, suspenze nebo emulze pro použití s inhalátory, které přeměňují kapaliny na aerosoly pomocí jednoduchého nebo vícenásobného proudu kapaliny, ultrazvukových vibrací nebo jinými způsoby. Objem kapaliny přemě-

něné na aerosol je odměřený předem nebo dávkovaný inhalátorem a může se inhalovat jedním nebo více nádechy.

Přípravky k inhalaci v netlakovém obalu dodávané ve více-dávkových obalech mohou obsahovat vhodnou protimikrobní látku ve vhodné koncentraci, jestliže přípravek jako takový nemá přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Přípravky k inhalaci v netlakovém obalu dodávané ve více-dávkových obalech, které neobsahují vhodnou protimikrobní látku, a jestliže přípravek jako takový nemá přiměřené protimikrobní vlastnosti, jsou sterilní a jsou dodávány v obalech zabraňujících mikrobiální kontaminaci obsahu během skladování a použití.

Přípravky k inhalaci v netlakovém obalu dodávané v jednodávkových obalech jsou sterilní a neobsahují protimikrobní látku, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

## VÝROBA

Velikost částic aerosolu k inhalaci se kontroluje, aby se v plicích usazovala stálá část částic. Pro charakteristiky jemných částic v dávkovaných netlakových přípravcích pro inhalaci se použijí postupy popsané v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic*. Alternativně se může použít analýza laserovou difrací, která se zvaliduje na metody uvedené v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic (přístroj C, D nebo E)*.

## ZKOUŠENÍ

*Pro dávkované netlakové přípravky pro inhalaci ovládané dechem se musí dále popsané podmínky zkoušky upravit tak, aby zajistily iniciaci inhalátoru v souladu se zkouškou. Inhalátor se vždy se připraví, jak je uvedeno v pokynech pro pacienta.*

**Stejnóměrnost podané dávky.** Použité zařízení musí být schopno kvantitativně zachytit podanou dávku. Může se použít zařízení uvedené ve zkoušce Stejnóměrnost podané dávky pro dávkované tlakové přípravky pro inhalaci.

Inhalátor se vystříkne do zařízení. Celý postup se opakuje až počet vystříknutí odpovídá minimální doporučené dávce. Obsah ze zařízení se kvantitativně odebere a stanoví se množství léčivé látky.

Postup se opakuje s dalšími dvěma dávkami.

Přípravek se vyprazdňuje do odpadu tak dlouho, až v obalu zůstane  $(n/2) + 1$  dávek, kde  $n$  je počet dávek uvedených v označení na obalu. Výše popsáním postupem se stanoví obsahy čtyř dávek.

Přípravek se dále vyprazdňuje do odpadu, až v obalu zůstanou tři dávky. Výše popsáním postupem se stanoví obsahy těchto tří dávek.

U přípravků obsahujících více léčivých látek se provede zkouška stejnoměrnosti podané dávky pro každou léčivou látku.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně devět z deseti výsledků je v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty a všechny výsledky jsou v rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty. Jestliže dva nebo tři výsledky jsou mimo rozmezí 75 % až 125 %, opakuje se zkouška s dalšími dvěma inhalátory. Nejvýše tři ze třiceti výsledků mohou být mimo rozmezí 75 % až

125 % a žádný výsledek není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty.

Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou se použít jiné přístroje a postupy.

**Dávka jemných částic.** Použije se zařízení a postup popsány v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic* (přístroj C, D nebo E) a vypočítá se dávka jemných částic. Použije se stejný postup jako pro dávkované tlakové přípravky k inhalaci s vhodnou úpravou metodiky pro přípravky v netlakovém obalu. V závislosti na povaze přípravků v netlakovém obalu, může být třeba během zkoušky kontrolovat relativní vlhkost a/nebo teplotu.

**Počet dávkových jednotek v inhalátoru.** Vezme se jeden inhalátor a vyprázdní se do odpadu. Celkový počet takto zjištěných dávkových jednotek není menší, než je uvedeno v označení na obalu (tuto zkoušku lze kombinovat se zkouškou na stejnoměrnost podaných dávek).

## Pulveres ad inhalationem

### Prášky k inhalaci

#### DEFINICE

Prášky k inhalaci jsou dodávány v jednodávkových nebo vícedávkových obalech. Pro usnadnění použití mohou být léčivé látky kombinovány se vhodným nosičem. Podávají se pomocí inhalátorů pro prášky. U předem dávkovaných inhalátorů se inhalátor plní prášky z předplněných tobolek nebo z jiných vhodných lékových forem. Pro inhalátory používající prášek ze zásobníku se dávka odměřuje dávkovacím mechanismem v inhalátoru.

Podaná dávka je dávka, která se z inhalátoru podá pacientovi. U některých přípravků je dávka pevně stanovena jako odměřená dávka nebo jako předplněná dávka. Odměřená dávka je určena vložením množství přípravku do inhalátoru k podání dávky. Odměřenou dávku lze stanovit také přímo.

#### VÝROBA

Velikost inhalovaných částic aerosolu se kontroluje, aby se v plicích usazovala stálá část částic. Pro charakteristiky jemných částic v prášcích pro inhalaci se použijí postupy popsané v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic*.

#### ZKOUŠENÍ

*Inhalátor se vždy se připraví, jak je uvedeno v pokynech pro pacienta.*

**Stejnóměrnost podané dávky.** Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit podanou dávku. Sběrné zařízení, podobné zařízení popsanému ve zkoušce pro tlakové dávkované přípravky pro inhalaci, se může použít za předpokladu, že trubice a filtr vyhovují požadované měřené rychlosti průtoku. Vhodná trubice je uvedena na obrázku 1. Trubice se spojí s odsávacím systémem podle schématu a popisu uvedených na obrázku 2 a v tabulce 1.

Není-li předepsáno jinak, určí se rychlost a doba průtoku, za použití trubice pro sběr dávky spojené s odsávacím systémem, vhodným diferenciálním tlakoměrem a vhodným

**Tab. 1** Specifikace zařízení používaného pro inhalátory prášků popsané na obrázku 2

Označení	Název	Popis
A	vzorkovací sběrná trubice	schopna kvantitativně zachytit podanou dávku, např. trubice pro sběr dávky (např. odpovídající sběrná trubice, viz obr. 1) s rozměry: vnitřní průměr 34,85 mm, délka 12 cm (např. výrobek č. XX40 047 00, Millipore Corporation, Bedford, MA 01732, USA s upravenou výstupní trubicí o vnitřním průměru $\geq 8$ mm, opatřený výrobkem Gelman č. 61631) nebo ekvivalentní
B	filtr	47mm filtr, např. A/E filtr ze skleněných vláken (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI 48106, USA) nebo ekvivalentní
C	spojka	vnitřní průměr $\geq 8$ mm, např. krátká kovová spojka, s odbočkou k P3 o malém průměru
D	vakuová hadice	délka vhodné trubice o vnitřním průměru $\geq 8$ mm, a vnitřním objemu $25 \pm 5$ ml
E	dvoucestný solenoidový ventil	dvoucestný solenoidový ventil s minimálním odporem průtoku vzduchu, vnitřním průměrem $\geq 8$ mm a otevíracím časem odezvy $\leq 100$ ms (např. typ 256-A08, Bürkert GmbH, D-74653 Ingelfingen, Německo) nebo ekvivalentní
F	vývěva	vyhovuje kapacitou požadované rychlosti průtoku vzduchu zařízením s inhalátorem prášků napojeným přes náustkový adaptér (např. výrobky typu 1023, 1423 nebo 2565, Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI 49022, USA) nebo ekvivalentní; propojení pumpy dvoucestným solenoidovým ventilem s krátkou a/nebo širokou (vnitřní průměr $\geq 10$ mm) vakuovou hadicí a spojí minimalizujícími snížení kapacity vývěvy
G	časový spínač	schopný řídit dvoucestný solenoidový ventil v požadovaných časových intervalech (např. typ G814, RS Components International, Corby, NN17 9RS, UK) nebo ekvivalentní
P1	tlakový kohoutek	vnitřní průměr 2,2 mm, vnější průměr 3,1 mm, proplachování vnitřního povrchu vzorkovací sběrné trubice, vystředěno, bez hrubých okrajů, 59 mm od ústí; tlakový kohoutek (P1) nesmí být nikdy otevřen vůči atmosféře; diferenciální tlak k atmosféře se měří na P1
P2, P3	tlakoměry	absolutní tlaky
H	průtočný kontrolní ventil	nastavitelný regulační ventil s maximálním $C_v \geq 1$ (např. typ 8FV12LNSS, Parker Hannifin plc., Barnstaple, EX31 1NP, UK) nebo ekvivalentní

objemovým průtokoměrem kalibrovaným pro odtokové měření v souladu s následujícím postupem.

Inhalátor připravený k použití se připojí ke vstupní části zařízení přes náustkový adaptér zajišťující vzduchotěsný spoj. Použije se adaptér, který zajistí, aby čelo náustku sahalo ke vstupní části sběrné trubice. Jeden vstup diferenciálního tlakoměru se připojí k místu P1 (viz obrázek 2) a další se ponechá otevřený do atmosféry. Zapne se vývěva, otevře se dvoucestný solenoidový ventil a kontrolní průtočný ventil se nastaví tak, aby tlak zaznamenaný diferenciálním tlakoměrem po průchodu vzduchu inhalátorem byl 4,0 kPa (40,8 cm H<sub>2</sub>O). Inhalátor se sejme z náustkového adaptéru a beze změny polohy průtočného kontrolního ventilu se připojí průtokoměr ke vstupu vzorkovacího zařízení. Použije se průtokoměr kalibrovaný pro objemový průtok za měřidlem nebo počítající objemový průtok za měřidlem ( $Q_{out}$ ) za použití zákona pro ideální plyn. Pro měřidlo kalibrované pro vstupní objemový průtok ( $Q_{in}$ ) se použije následující vzorec:

$$Q_{out} = \frac{Q_{in} \cdot P_0}{P_0 - \Delta P},$$

v němž značí:

$P_0$  – atmosférický tlak;

$\Delta P$  – tlakový pokles v měřidle.

Je-li průtoková rychlost vyšší než 100 l/min, nastaví se průtočný kontrolní ventil k zajištění průtokové rychlosti

100 l/min ( $\pm 5$  %). Zaznamenaná se průtoková rychlost vzduchu opouštějícího měřidla a definuje se jako zkušební průtoková rychlost  $Q_{out}$  v litrech za minutu. Definuje se doba zkušební průtok  $T$  v sekundách tak, že objem 4 l vzduchu se nasaje z náustku inhalátoru při zkušební průtokové rychlosti  $Q_{out}$ .

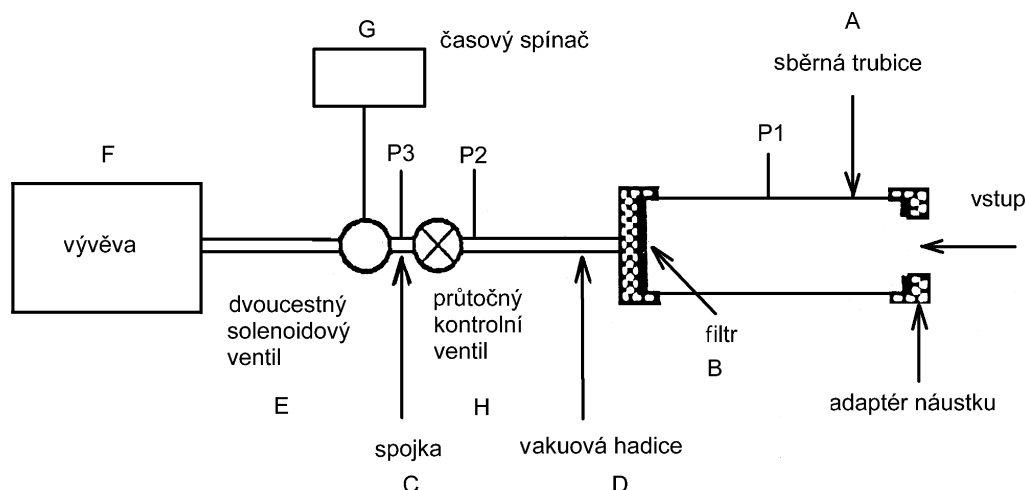
Kritický průtok přes průtočný kontrolní ventil se zajistí dále uvedeným způsobem: měří se absolutní hodnoty tlaku v místě na obou stranách průtočného kontrolního ventilu (odečítací body tlaku P2 a P3, viz obrázek 2) s inhalátorem se zkušební průtokovou rychlostí  $Q_{out}$ . Poměr P3/P2 menší nebo rovný 0,5 indikuje kritický průtok. Není-li dosaženo kritického průtoku, zvýší se výkon vývěvy a měření se opakuje.

**Předplněné systémy.** Inhalátor se napojí na sběrné zařízení pomocí dobře těsnícího adaptéru. Inhalátorem se nechá procházet vzduch podle výše stanovených podmínek. Celý postup se opakuje, až počet podání odpovídá minimální doporučené dávce. Kvantitativně se odeberou obsahy léčivé látky ze zařízení a stanoví se množství léčivé látky.

Postup se opakuje s dalšími devíti dávkami.

**Zásobníkové systémy.** Inhalátor se napojí na sběrné zařízení pomocí dobře těsnícího adaptéru. Inhalátorem se nechá procházet vzduch podle výše stanovených podmínek. Celý postup se opakuje, až počet podání odpovídá minimální doporučené dávce. Kvantitativně se odeberou obsahy léčivé látky ze zařízení a stanoví se množství léčivé látky.

Postup se opakuje s dalšími dvěma dávkami.



Obr. 2 Zařízení vhodné k měření stejnoměrnosti podané dávky inhalátory prášků

Přípravek se vyprazdňuje do odpadu, až v zásobníku zůstane  $(n/2) + 1$  dávek, kde  $n$  je počet dávek uvedených v označení na obalu. Je-li třeba, nechá se vybit elektrostatický náboj inhalátoru před dalším použitím. Výše popsaným postupem se stanoví obsahy čtyř dávek.

Přípravek se dále vyprazdňuje do odpadu, až v obalu zůstanou tři dávky. Je-li třeba, nechá se vybit elektrostatický náboj inhalátoru před dalším použitím. Výše popsaným postupem se stanoví obsahy těchto tří dávek.

U přípravků obsahujících více léčivých látek se provede zkouška stejnoměrnosti podané dávky pro každou léčivou látku.

**Hodnocení.** Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně devět z deseti výsledků je v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty a všechny výsledky jsou v rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty. Jestliže dva nebo tři výsledky jsou mimo rozmezí 75 % až 125 %, opakuje se zkouška s dalšími dvěma inhalátory. Nejvýše tři ze třiceti výsledků mohou být mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný výsledek není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty.

Ve zdůvodněných a schválených případech může být rozsah hodnot větší, ale žádný naměřený výsledek není vyšší než 150 % a není nižší než 50 % průměrné hodnoty.

**Dávka jemných částic.** Použije se zařízení a postup popsané v obecné stati 2.9.18 *Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic* (přístroj C, D nebo E) a vypočítá se dávka jemných částic.

**Počet dávkových jednotek v nádobce vícedávkového inhalátoru.** Dávky z inhalátoru se vyprazdňují vhodnou průtokovou rychlostí. Zaznamenaná se počet dávkových jednotek. Celkový počet dávkových jednotek není menší, než je uvedeno v označení na obalu (tuto zkoušku lze kombinovat se zkouškou na stejnoměrnost podaných dávek).

## INSERTA INTRARUMINALIA

6.0:1228

### Intraruminální inzerty

*Synonymum.* Praeparationes intraruminales

*Požadavky tohoto článku se nevztahují na přípravky (označené někdy jako bolusy), jakými jsou obvykle velké tablety, tobolky nebo tvarované lékové formy, ze kterých se léčivá látka (léčivé látky) uvolňuje ihned, nebo postupně. Na tyto přípravky se vztahují příslušné oddíly článků Tabulettae (0478) nebo Capsulae (0016).*

#### DEFINICE

Intraruminální inzerty jsou pevné přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k perorálnímu podání přezvýkavcům a jsou uzpůsobeny tak, aby se zadržely v batoru ke kontinuálnímu nebo pulznímu uvolňování léčivé látky (léčivých látek). Doba uvolňování může být různá, od několika dnů po několik týdnů, podle povahy formulace a/nebo dávkovacího zařízení.

Intraruminální inzerty se podávají pistolovým injektorem. Některé jsou určeny k tomu, aby se vznášely na hladině batorové tekutiny, zatímco jiné jsou určeny k setrvání na bázi batoru nebo čepce. Každý inzert má hustotu přiměřenou předpokládanému použití.

#### VÝROBA

Pro kontinuální uvolňování se intraruminální inzert konstruuje tak, aby se léčivá látka (léčivé látky) uvolňovala ve stanovené míře po stanovenou dobu. Toho se dosahuje erozí, korozí, difuzí, osmotickým tlakem nebo jinými vhodnými chemickými, fyzikálními nebo fyzikálně-chemickými způsoby.

Pro pulzní uvolňování se intraruminální inzert uzpůsobí k uvolňování určitého množství léčivé látky (léčivých látek) v jednom nebo v několika vymezených časových intervalech. Toho se dosahuje korozí kovových složek inzertu působením batorové tekutiny vedoucí k následnému uvolňování dílčích jednotek, které jsou obvykle ve formě tablet.

Při výrobě intraruminálních inzertů se berou v úvahu způsoby, kterými se zajišťuje přiměřené uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci intraruminálních inzertů se přijmou vhodná opatření k zabezpečení jejich mikrobiologické jakosti; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnomyernost dávkových jednotek.** Základní tabletové jednotky intraruminálních inzertů vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost** (2.9.6). Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, dílčí tabletové jednotky intraruminálních inzertů obsahující léčivé látky v množství menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti, vyhovují požadavkům zkoušky A na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Jestliže přípravek obsahuje více než jednu léčivou látku, vztahují se požadavky jen na léčivé látky odpovídající výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost** (2.9.5). Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, dílčí tabletové jednotky intraruminálních inzertů vyhovují požadavkům zkoušky na hmotnostní stejnoměrnost.

Pokud je zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny léčivé látky, zkouška na hmotnostní stejnoměrnost se nevyžaduje.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- u kontinuálně uvolňujících inzertů dávka uvolňovaná za jednotku času;
- u pulzně uvolňujících inzertů dávka uvolňovaná ve vymezených časových intervalech.

## LIQUIDA CUTANEA

6.0:0927

### Kožní tekutiny

*Synonymum.* Praeparationes liquidae ad usum dermicum

*Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahují se požadavky tohoto článku na přípravky určené pro systémový účinek a pro veterinární použití.*

#### DEFINICE

Jsou to tekuté přípravky různé viskozity určené k místnímu účinku nebo transdermálnímu přenosu léčivých látek. Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze, které obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou obsahovat vhodné protimikrobní látky, antioxidační látky a pomocné látky, jako jsou stabilizátory, emulgátory nebo látky zvyšující viskozitu.

V emulzích se mohou oddělovat fáze, které lze protřepáním znovu snadno zhomogenizovat. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo možné podání homogenního přípravku.

Obaly pro kožní tekutiny, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Pokud jsou kožní tekutiny dodávány v tlakových nádobách, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu* (0523).

Přípravky určené k podání na silně poškozenou kůži jsou sterilní.

Rozlišuje se několik druhů kožních tekutin, např.:

- šampony;
- kožní pěny.

#### VÝROBA

Při vývoji kožní tekutiny obsahující protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat nezbytnost použití a účinek této přísady. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah kožní tekutiny.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci kožních tekutin se využívají vhodné způsoby zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

Sterilní kožní tekutiny se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Při výrobě kožních tekutin obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Sterilita** (2.6.1). Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### SKLADOVÁNÍ

Je-li přípravek sterilní, skladuje se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název každé přidané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, že přípravek je sterilní.

**Saponata****Šampony****DEFINICE**

Jsou to tekuté nebo někdy polotuhé přípravky určené k použití na pokožku s vlasy a následnému opláchnutí vodou. Smíchané s vodou obvykle pění.

Šampony jsou emulze, suspenze nebo roztoky. Obsahují povrchově aktivní látky.

**Spumae cutanae****Kožní pěny****DEFINICE**

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Spumae medicatae (1105)*.

**LIQUIDA CUTANEA AD USUM VETERINARIUM****7.4:1808****Tekutiny pro kožní podání k veterinárnímu použití**

*Synonymum.* Praeparationes liquidae veterinariae ad usum dermicum

*Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, vyhovují veterinární tekuté přípravky pro kožní podání požadavkům článku *Liquida cutanea (0927)* a následujícím doplňujícím požadavkům.*

**DEFINICE**

Jsou to tekuté přípravky určené k podání na kůži k dosažení místního a/nebo systémového účinku. Jsou to roztoky, suspenze nebo emulze, které mohou obsahovat jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou to být koncentráty ve formě smáčivých prášků, past, roztoků nebo suspenzí, které se použijí k přípravě ředěných suspenzí nebo emulzí léčivých látek. Mohou obsahovat vhodné protimikrobní látky, antioxidantní látky a další pomocné látky, jako jsou stabilizátory, emulgátory nebo látky zvyšující viskozitu.

Rozlišuje se několik skupin veterinárních tekutých přípravků pro kožní podání:

- kožní pěny [viz *Liquida cutanea (0927)*];
- koupelové koncentráty;
- přípravky pro nalévání na hřbet – pour-on;
- šampony [viz *Liquida cutanea (0927)*];
- přípravky pro nakapání na kůži – spot-on;
- spreje;
- koupele pro namáčení struků;
- spreje na struky;
- omývadla na mléčnou žlázu.

**Concentrata pro balneo****Koupelové koncentráty****DEFINICE**

Jsou to přípravky, které obsahují jednu nebo více léčivých látek, obvykle ve formě smáčivých prášků, past, roztoků nebo suspenzí, které se používají k přípravě ředěných roztoků, suspenzí nebo emulzí léčivých látek. Zředěné přípravky se použijí ke koupeli zvířete.

**Infusiones dorsales (pour-on)****Přípravky pro nalévání na hřbet – pour-on****DEFINICE**

Obsahují jednu nebo více léčivých látek k prevenci a léčbě ektoparazitárního a/nebo endoparazitárního zamoření zvířat. Nalévají se po délce hřbetu zvířete v množství zpravidla větším než 5 ml.

**Praeparata cutanea (spot-on)****Přípravky pro nakapání na kůži – spot-on****DEFINICE**

Obsahují jednu nebo více léčivých látek k prevenci a léčbě ektoparazitárního a/nebo endoparazitárního zamoření zvířat. Podávají se v množství zpravidla menším než 10 ml na přiměřenou malou plochu na hlavě či na hřbetě zvířete.

**Aerodispersiones****Spreje****DEFINICE**

Obsahují jednu nebo více léčivých látek, které jsou určeny k zevnímu podání k léčebnému nebo profylaktickému účelu. Uvolňují se jako aerosol z nádoby vhodným ventilem či jiným odpovídajícím rozprašovacím zařízením, které je buď nedílnou součástí nádoby, nebo se dodává samostatně.

Pokud se spreje dodávají v tlakových nádobách, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu (0523)*. Takto dodávané spreje obsahují zpravidla jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu pod tlakem se vhodným hnacím plynem či směsí propelentů. Pokud jsou spreje dodány jinak, jsou plněny do dobře uzavřených obalů.

**VÝROBA**

Během vývoje a výroby spreje se dodržují opatření, která zajišťují, že hotový přípravek odpovídá definovaným vlastnostem spreje.



**Balnea maceratoria mammillara****Koupele pro namáčení struků**

## DEFINICE

Obsahují jednu nebo více léčivých látek s dezinfekčním účinkem, zpravidla ve formě roztoků, do kterých se struky zvířete namáčejí před dojením i po dojení, podle toho, co je vhodné, i za účelem omezení výskytu patogenních mikroorganismů na povrchu struků. Koupele pro namáčení struků se dodávají jako přípravky určené přímo k použití nebo se připravují zředěním koncentrátu. Složení koupelí pro namáčení struků pro použití před dojením a po něm se často liší. Koupele pro namáčení struků obsahují zpravidla změkčovadla ke zlepšení hydratace kůže, ke zjemnění kůže a umožňují hojení lézí, v nichž se jinak usazují bakterie.

**Aerodispersiones pro mammillis****Spreje na struky**

## DEFINICE

Obsahují jednu nebo více léčivých látek s dezinfekčním účinkem, zpravidla ve formě roztoků, které se nastříkají na struky před dojením i po dojení, podle toho, co je vhodné, za účelem omezení výskytu patogenních mikroorganismů na povrchu struků. Spreje na struky se dodávají jako přípravky určené přímo k použití nebo se připravují zředěním koncentrátu. Složení sprejů na struky pro použití před dojením a po něm se často liší. Spreje na struky obsahují zpravidla změkčovadla ke zlepšení hydratace kůže, ke zjemnění kůže a umožňují hojení lézí, v nichž se jinak usazují bakterie.

**Lotiones pro glandula mammaria****Omývadla na mléčnou žlázu**

## DEFINICE

Obsahují jednu nebo více léčivých látek s dezinfekčním účinkem, zpravidla ve formě roztoků, které se nastříkají na vemeno a struky zvířete k očištění od špíny a znečištění výkaly před koupelí pro namáčení struků nebo aplikací sprejů. Omývadla na mléčnou žlázu se zpravidla používají jako přípravky určené přímo k použití jako koupele pro namáčení struků nebo spreje na struky, nebo se připravují zředěním koncentrovaných přípravků.

**LIQUIDA PERORALIA**

6.0:0672

**Perorální tekutiny**

*Synonymum.* Praeparationes liquidae peroraliae

*Kde je to zdůvodněno a schváleno, požadavky tohoto článku se nevztahují na perorální tekutiny pro veterinární použití.*

## DEFINICE

Jsou to obvykle roztoky, emulze nebo suspenze obsahující jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu; některé perorální tekutiny mohou být jen samotné kapalné léčivé látky.

Některé přípravky určené k perorálnímu podání se připravují ředěním koncentrovaných tekutých přípravků, prášků nebo granulí, určených pro přípravu perorálních roztoků nebo suspenzí, perorálních kapek nebo sirupů s využitím vhodných pomocných látek.

Pomocné látky pro perorální tekutiny se vybírají s přihlédnutím k povaze léčivé látky (léčivých látek) a k dosažení organoleptických vlastností vhodných k použití přípravku.

Perorální tekutiny mohou obsahovat vhodné protimikrobní látky, antioxidanty a jiné pomocné látky, jako jsou dispergační přísady, stabilizátory suspenzí, látky zvyšující viskozitu, emulgátory, tlumivé přísady, smáčedla, solubilizátory, stabilizátory, aromatické přísady, sladidla a barviva schválená oprávněnou autoritou.

V emulzích se mohou oddělovat fáze, které lze protřepáním znovu snadno dispergovat. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Obaly pro perorální tekutiny, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*.

Rozlišuje se několik druhů perorálních tekutin:

- perorální roztoky, emulze a suspenze;
- prášky a granule pro perorální roztoky a suspenze;
- perorální kapky;
- prášky pro perorální kapky;
- sirupy;
- prášky a granule pro sirupy.

## VÝROBA

Při vývoji perorální tekutiny obsahující protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat nezbytnost použití a účinek této přísady. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek (5.1.3)*.

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah perorální tekutiny.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci perorálních tekutin se využívají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

Při výrobě perorálních tekutin obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

## ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Roztoky, suspenze a emulze v jednodávkových obalech vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost nebo na hmotnostní stejnóměrnost. Usta-

novení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové tekuté přípravky ve formě suspenze vyhovují následující zkoušce. Po protřepání se každý obal co nejvíce vyprázdní a stanoví se jednotlivé obsahy. Přípravek vyhovuje zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem.

**Hmotnostní stejnoměrnost.** Jednodávkové tekuté přípravky ve formě roztoku nebo emulze vyhovují následující zkoušce. Zváží se jednotlivé hmotnosti obsahu 20 obalů co nejvíce vyprázdněných a vypočítá se průměrná hmotnost. Nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti se odlišují od průměrné hmotnosti o více než 10 % a žádná se neliší o více než 20 %.

**Dávka a dávková stejnoměrnost perorálních kapek.** Do vhodného odměrného válce se pomocí kapacitního zařízení odkape obvykle předepisovaný počet kapek pro jednu dávku nebo se do odměrného válce vpraví pomocí odměrky obvykle předepisovaná dávka. Rychlost kapání nepřesahuje dvě kapky za sekundu. Tekutiny se zváží, nakapání se opakuje a opět se zváží. Celý postup se opakuje, až se stanoví jednotlivé hmotnosti deseti dávek. Vypočítá se průměrná hmotnost. Žádná z jednotlivých hmotností se neliší od průměrné hmotnosti o více než 10 %. Celková hmotnost deseti jednotlivých hmotností se neliší o více než 15 % od jmenovité hmotnosti deseti dávek. Je-li třeba, odměří se objem deseti dávek. Tento objem se neliší o více než 15 % od jmenovitě objemu deseti dávek.

**Hmotnostní stejnoměrnost jednotlivých dávek ve vícedávkových obalech (2.9.27).** Perorální tekutiny dodávané ve vícedávkových obalech vyhovují zkoušce. Perorální kapky nejsou předmětem této zkoušky.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede název každé přidané protimikrobiální látky.

### Solutiones, emulsiones et suspensiones perorales

Perorální roztoky, emulze a suspenze

#### DEFINICE

Perorální roztoky, emulze a suspenze se dodávají v jednodávkových nebo vícedávkových obalech. Každá dávka z vícedávkového obalu se podává pomocí zařízení vhodného k měření předepsaného objemu. Vhodným zařízením pro objem 5 ml nebo jeho násobky je obvykle lžička nebo pohárek, pro jiné objemy perorální stříkačka.

### Pulveres et granula pro solutione et suspensione perorali

Prášky a granule pro perorální roztoky a suspenze

*Synonymum.* Prášky a změněné prášky pro perorální roztoky a suspenze

#### DEFINICE

Jsou to přípravky pro perorální podání, které odpovídají definicím v člancích *Pulveres perorales (1165)* a *Granula (0499)*, podle toho, co je vhodné. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění dispergování nebo rozpuštění a k zabránění shlukování.

Roztoky nebo suspenze vyhovují po přípravě požadavkům na perorální roztoky nebo perorální suspenze podle toho, co je vhodné.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové prášky a jednodávkové granule vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedeně zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové prášky a jednodávkové granule s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Jednodávkové prášky a jednodávkové granule vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- způsob přípravy roztoku nebo suspenze;
- podmínky a doba skladování po rekonstituci.

### Guttae perorales

Perorální kapky

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze podávané v malých objemech, po kapkách, pomocí vhodného zařízení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu perorálních kapek, jejichž dávka se odměřuje kapkami, se uvádí údaj o počtu kapek na mililitr přípravku nebo gram přípravku.

## Pulveres pro guttis peroralibus

### Prášky pro perorální kapky

#### DEFINICE

Prášky pro perorální kapky odpovídají definicím v článku *Pulveres perorales (1165)*. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění nebo dispergace v předepsané kapalině nebo k zabránění shlukování.

Roztoky nebo suspenze po přípravě vyhovují požadavkům na perorální kapky.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové prášky pro perorální kapky vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové prášky pro perorální kapky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnóměrnost (2.9.5).** Jednodávkové prášky pro perorální kapky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnóměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnóměrnost.

## Sirupi

### Sirupy

#### DEFINICE

Jsou to přípravky obsahující vodu, charakterizované sladkou chutí a viskózní konzistencí. Mohou obsahovat sacharosu o koncentraci nejméně 45 %. Sladká chuť se může také dosáhnout použitím polyolů (vícesytných alkoholů) nebo umělých sladidel. Sirupy obsahují obvykle aromatické látky nebo jiná korigencia pachu a chuti. Každá dávka z vícedávkového obalu se podává pomocí zařízení vhodného k měření předepsaného objemu. Vhodným zařízením pro objem 5 ml a jeho násobky je obvykle lžička nebo pohárek.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede název a koncentrace použitého vícesytného alkoholu nebo umělého sladidla.

## Pulveres et granula pro sirupis

### Prášky a granule pro sirupy

*Synonymum.* Prášky a zrněné prášky pro sirupy

#### DEFINICE

Prášky a granule pro sirupy vyhovují článkům *Pulveres perorales (1165)* a *Granula (0499)*. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění.

Po rozpuštění vyhovují požadavkům odstavce Sirupi.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové prášky a granule pro sirupy vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové prášky a granule pro sirupy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnóměrnost (2.9.5).** Jednodávkové prášky a granule pro sirupy vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnóměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnóměrnost.

## NASALIA

6.0:0676

### Nosní přípravky

#### DEFINICE

Jsou to tekuté, polotuhé nebo pevné přípravky určené k podání do nosní dutiny k dosažení systémového nebo místního účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek. Nosní přípravky jsou pokud možno nedráždivé a bez nepříznivého vlivu na funkce nosní mukosy a cilií. Vodné nosní přípravky jsou obvykle izotonické a mohou obsahovat pomocné látky, např. pro úpravu viskozity přípravku nebo stabilizaci pH, pro zvýšení rozpustnosti léčivé látky nebo pro stabilizaci přípravku.

Nosní přípravky se dodávají ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech opatřených, pokud je to nutné, vhodným aplikačním zařízením zabezpečeným proti znečištění.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, vodné nosní přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní látky ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy přípravek má vlastní přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Obaly pro nosní přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*.

Rozlišuje se několik druhů nosních přípravků:

- nosní kapky a tekuté nosní spreje;
- nosní zásypy;
- polotuhé nosní přípravky;
- nosní výplachy;
- nosní tyčinky.

#### VÝROBA

Při vývoji nosního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat účinek této látky. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek (5.1.3)*.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci nosních přípravků se vhodnými způsoby zajišťuje jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

Sterilní nosní přípravky se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Metody přípravy sterilních výrobků (5.1.1)*.

Při výrobě nosních přípravků obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro dané použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Sterilita (2.6.1).** Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### SKLADOVÁNÍ

Je-li přípravek sterilní, skladuje se ve sterilních vzducho-  
těsných zabezpečených obalech.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název každé přidané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, že přípravek je sterilní.

## Rhinoguttae et liquida nasalía pro aerodispersione

### Nosní kapky a tekuté nosní spreje

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze určené ke vkápnutí nebo vstříknutí do nosní dutiny.

V emulzích se mohou oddělovat fáze, ale protřepáním se snadno znovu zhomogenizují. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztrpět; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky. Nosní kapky se obvykle dodávají ve vícedávkových obalech opatřených vhodným aplikátorem.

Tekuté nosní spreje se dodávají v obalech s rozprašovacími zařízeními nebo v tlakových obalech opatřených vhodným aplikátorem, s dávkovacím ventilem nebo bez něho. Vyho-

vují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu (0523)*.

Velikost částic spreje má být taková, aby jejich usazování bylo omezeno na nosní dutinu.

#### ZKOUŠENÍ

Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, nosní kapky v jednodávkových obalech a dávkované nosní spreje, obojí určené pro systémový účinek, vyhovují následujícím zkouškám.

#### NOSNÍ KAPKY V JEDNODÁVKOVÝCH OBALECH

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Nosní kapky v jednodávkových obalech vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost nebo obsahovou stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Hmotnostní stejnóměrnost.** *Nosní kapky ve formě roztoku vyhovují následující zkoušce.* Zváží se jednotlivě obsah deseti obalů co nejvíce vyprázdněných a vypočítá se průměrná hmotnost obsahu. Nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti se liší o více než 10 % od průměrné hmotnosti a žádná se neliší o více než 20 %.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** *Nosní kapky ve formě suspenzí nebo emulzí vyhovují následující zkoušce.* Stanoví se jednotlivé obsahy co nejvíce vyprázdněných obalů. Obsahy vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnóměrnost.

#### DÁVKOVANÉ NOSNÍ SPREJE

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Dávkované nosní spreje vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost nebo stejnóměrnost podané dávky. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

*V případě dávkovaných nosních sprejů ve formě roztoku je postup následující.* Odstříkne se jedna dávka do odpadu, čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a odstříkne se další dávka. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Zváží se hmotnost obalu, odstříkne se jedna dávka a obal se opět zváží. Vypočítá se rozdíl těchto dvou hmotností. Postup se opakuje s dalšími devíti obaly. Stanoví se hmotnostní proměnlivost (2.9.40).

*V případě dávkovaných nosních sprejů ve formě suspenzí nebo emulzí je postup následující.* Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit dávku z rozprašovacího zařízení. Obal se protřepává 5 s a jedna dávka se odstříkne do odpadu. Vyčká se nejméně 5 s, protřepává se opět 5 s a dávka se odstříkne. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po 2 s se vstříkne dávkovacím zařízením jedna dávka nosního spreje do sběrné nádoby. Pomocí následných výplachů se ze sběrné nádoby získá celá dávka a stanoví se obsah léčivé látky v jedné dávce. Tento postup se opakuje u dalších devíti obalů. Stanoví se obsahová stejnóměrnost (2.9.40).

**Hmotnostní stejnóměrnost.** *Dávkované nosní spreje ve formě roztoků vyhovují následující zkoušce.* Odstříkne se jednou do odpadu, čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a opět

se odstříkne do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Zváží se hmotnost obalu, odstříkne se jednou do odpadu a obal se opět zváží. Vypočítá se rozdíl těchto dvou hmotností. Postup se opakuje s dalšími devíti obaly.

Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti liší o více než 25 % od průměrné hmotnosti dávky a žádná se neliší o více než 35 %.

**Stejnóměrnost podané dávky.** *Dávkované nosní spreje ve formě suspenzí nebo emulzí vyhovují následující zkoušce.* Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit dávku z rozprašovacího zařízení. Obal se třepe 5 s a jednou se odstříkne do odpadu. Vyčká se nejméně 5 s, protřepává se 5 s a opět se odstříkne do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po 2 s se vstříkne rozprašovacím zařízením jedna dávka nosního spreje do sběrné nádoby. Pomocí následných výplachů se získá celá dávka ze sběrné nádoby a stanoví se obsah léčivé látky. Tento postup se opakuje u dalších devíti obalů.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden jednotlivý obsah je mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu a žádný jednotlivý obsah není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu.

Jsou-li dva nebo tři jednotlivé obsahy mimo rozmezí 75 % až 125 %, avšak jsou v mezích 65 % až 135 %, opakuje se zkouška s dalšími dvaceti obaly. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše tři jednotlivé obsahy ze třiceti jsou mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu.

## Pulveres adspersorii nasales

### Nosní zásypy

*Synonymum.* Pulveres nasales

#### DEFINICE

Jsou to přípravky určené k insulaci do nosní dutiny pomocí vhodného zařízení.

Nosní zásypy vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Pulveres adspersorii (1166)*.

Velikost částic je taková, aby jejich usazování bylo omezeno na nosní dutinu, a ověřuje se vhodnou metodou.

## Nasalia semisolida

### Polotuhé nosní přípravky

#### DEFINICE

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Praeparata semisolida ad usum cutaneum (0132)*.

Obaly jsou upraveny k podání přípravku na místo aplikace.

## Lotiones nasales

### Nosní výplachy

*Synonymum.* Nosní omývadla

#### DEFINICE

Jsou to obvykle vodné roztoky určené k čištění nosních dutin.

Přípravky určené pro aplikaci na poraněné části nebo před chirurgickým zákrokem jsou sterilní.

#### VÝROBA

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu nosního omývadla (nosního výplachu) dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý objem.

## Styli nasales

### Nosní tyčinky

#### DEFINICE

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Styli (1154)*.

## OCULARIA

6.0:1163

### Oční přípravky

*Synonymum.* Ophthalmica

#### DEFINICE

Jsou to sterilní tekuté, polotuhé nebo tuhé přípravky určené k podání na oční bulvu a/nebo spojivku, nebo ke vložení do spojivkového vaku.

Obaly pro oční přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*.

Rozlišuje se několik druhů očních přípravků:

- oční kapky;
- oční vody;
- prášky pro oční kapky a prášky pro oční vody;
- polotuhé oční přípravky;
- oční inzerty.

#### VÝROBA

Při vývoji očního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má prokázat nezbytnost použití a účinek této látky k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek (5.1.3)*.

Oční přípravky se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Metody přípravy sterilních výrobků (5.1.1)*. Při výrobě očních přípravků obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Při vývoji se musí prokázat, že z obalů tekutých a polotuhých očních přípravků dodávaných v jednodávkových obalech lze odebrat jmenovitý obsah.

#### ZKOUŠENÍ

**Sterilita (2.6.1).** Oční přípravky vyhovují zkoušce na sterilitu. Odděleně dodávané aplikátory rovněž vyhovují zkoušce na sterilitu. Aplikátor se vyjme za aseptických podmínek z jeho obalu, přenesení se do nádoby s živnou půdou a celý se ponoří. Inkubace a hodnocení jsou popsány ve zkoušce na sterilitu.

#### SKLADOVÁNÍ

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, skladuje se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvedou názvy všech přidaných protimikrobiálních látek.

### Oculoguttae

#### Oční kapky

#### DEFINICE

Jsou to sterilní vodné nebo olejové roztoky, emulze nebo suspenze obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny ke vkapávání do oka.

Oční kapky mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity, k úpravě nebo stabilizaci pH, ke zvýšení rozpustnosti léčivých látek nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě očekávaný léčebný účinek přípravku nebo nejsou v použitých koncentracích příčinou přílišné místní dráždivosti.

Vodné oční přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobiální látky ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy přípravek má vlastní přiměřené protimikrobiální vlastnosti. Použité protimikrobiální látky musí být kompatibilní se všemi dalšími složkami přípravku a musí být účinné po celou dobu použitelnosti očních kapek.

Jsou-li oční kapky předepsány bez protimikrobiálních látek, dodávají se v jednodávkových obalech, nebo ve vícedávkových obalech zabraňujících mikrobiální kontaminaci obsahu po otevření obalu. Oční kapky určené k použití při chirurgických výkonech jsou bez protimikrobiálních látek.

Oční kapky ve formě roztoku jsou při vizuální kontrole prakticky čiré a prakticky prosté částic.

Oční kapky ve formě suspenze mohou vykazovat sediment, který je snadno roztřepatelný; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Vícedávkové přípravky jsou dodávány v obalech umožňujících podání ve formě jednotlivých kapek. Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, lahvičky obsahují nejvýše 10 ml přípravku.

#### ZKOUŠENÍ

**Velikost částic.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, oční kapky ve formě suspenze vyhovují následující zkoušce. Vhodné množství suspenze se nanese do měřicí kvivety

nebo mikropipetou na podložní sklíčko a pod mikroskopem se prohlédne oblast odpovídající 10 µg pevné fáze. Z praktických důvodů se doporučuje nejdříve prohlédnout celý vzorek při menším zvětšení (např. 50×) a nalézt částice větší než 25 µm. Tyto částice se pak změní při větším zvětšení (např. 200× až 500×). Na každých 10 µg pevné léčivé látky je obsaženo nejvýše dvacet částic, jejichž největší rozměr přesahuje 25 µm a nejvýše dvě z těchto částic mají největší rozměr větší než 50 µm. Žádná částice nemá největší rozměr větší než 90 µm.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se pro vícedávkové obaly uvede doba od prvního otevření, po jejímž uplynutí se již přípravek nesmí používat. Tato doba nesmí být delší než 4 týdny, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

### Aquae ophthalmicae

#### Oční vody

#### DEFINICE

Jsou to sterilní vodné roztoky určené k oplachům nebo koupelím očí nebo k napuštění očních obkladů.

Oční vody mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity přípravku nebo k úpravě nebo stabilizaci pH. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě očekávaný účinek přípravku a v použitých koncentracích nejsou příčinou přílišné místní dráždivosti.

Oční vody dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobiální látky ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy přípravek má vlastní přiměřené protimikrobiální vlastnosti. Použité protimikrobiální látky jsou kompatibilní s dalšími složkami přípravku a jsou účinné po celou dobu jeho použitelnosti.

Jsou-li oční vody předepsány bez protimikrobiálních látek, dodávají se v jednodávkových obalech. Oční vody určené k použití při chirurgických výkonech nebo k ošetření formou první pomoci neobsahují protimikrobiální látky a dodávají se v jednodávkových obalech.

Oční vody jsou při vizuální kontrole prakticky čiré a prakticky prosté částic.

Obaly pro vícedávkové přípravky neobsahují více než 200 ml oční vody, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kde je to vhodné, že obsah je určen jen pro jedno podání;
- u vícedávkových přípravků doba od prvního otevření, po jejímž uplynutí se již nesmí přípravek používat. Tato doba nesmí být delší než 4 týdny, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

## Pulveres pro oculo guttis et aquis ophthalmicis

Prášky pro oční kapky a oční vody

### DEFINICE

Prášky pro přípravu očních kapek a očních vod se dodávají v suchém sterilním stavu tak, aby se mohly před podáním rozpustit nebo suspendovat ve vhodné tekutině. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění nebo dispergace, k zabránění shlukování, k úpravě osmotického tlaku, k úpravě nebo stabilizaci pH nebo ke stabilizaci přípravku.

Po rozpuštění nebo dispergování v předepsané tekutině vyhovují požadavkům na oční kapky nebo oční vody, podle toho, co je vhodné.

### ZKOUŠENÍ

**Stejněměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové prášky pro oční kapky a oční vody vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost, jak je uvedeno dále.

Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové prášky pro oční kapky a oční vody s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Jednodávkové prášky pro oční kapky a oční vody vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

## Ocularia semisolidia

Polotuhé oční přípravky

### DEFINICE

Jsou to sterilní oční masti, krémy nebo gely určené k podání na spojivku nebo na oční víčka. Obsahují jednu nebo více léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vhodném základu. Mají homogenní vzhled.

Polotuhé oční přípravky vyhovují požadavkům článku *Praeparata semisolidia ad usum cutaneum (0132)*. Základ nedráždí spojivku.

Polotuhé oční přípravky jsou baleny v malých sterilizovaných stlačitelných tubách, opatřených nebo doplněných sterilizovaným aplikačním nástavcem. Obsah přípravku není větší než 10 g, není-li zdůvodněno a schváleno jinak. Tuby musí být dobře uzavřeny, aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci. Polotuhé oční přípravky lze rovněž balit do vhodných jednodávkových obalů. Obaly nebo aplikační

nástavce jsou takového tvaru, který usnadňuje podání bez kontaminace.

### ZKOUŠENÍ

**Velikost částic.** Polotuhé oční přípravky obsahující dispergované pevné částice vyhovují následující zkoušce. Množství přípravku odpovídající nejméně 10 µg pevné léčivé látky se opatrně rozetře do tenké vrstvy a pod mikroskopem se pozoruje celá oblast vzorku. Z praktických důvodů se doporučuje nejdříve prohlédnout vzorek při menším zvětšení (např. 50×) a nalézt částice větší než 25 µm. Tyto částice se pak změní při větším zvětšení (např. 200× až 500×). Na každých 10 µg pevné léčivé látky je obsaženo nejvýše dvacet částic, jejichž největší rozměr přesahuje 25 µm a nejvýše dvě z těchto částic mají největší rozměr větší než 50 µm. Žádná částice nemá největší rozměr větší než 90 µm.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se pro vícedávkové obaly uvede doba od prvního otevření, po jejímž uplynutí se již přípravek nesmí používat. Tato doba nesmí být delší než 4 týdny, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

## Oculoinserta

Oční inzerty

### DEFINICE

Jsou to sterilní tuhé nebo polotuhé přípravky vhodných rozměrů a tvaru určené k podání do spojivkového vaku a mající účinek na oko. Obecně jsou tvořeny maticí s léčivou látkou nebo zásobníkem léčivé látky spojeným s membránou řídicí rychlost uvolňování. Léčivá látka, která je více nebo méně rozpustná v slzné tekutině (slzách), se uvolňuje po stanovenou dobu.

Oční inzerty se dodávají jednotlivě ve sterilních obalech.

### VÝROBA

Při výrobě očních inzertů se potřebnými prostředky zajišťují vhodné disoluční parametry.

### ZKOUŠENÍ

**Stejněměrnost dávkových jednotek (2.9.40).** Oční inzerty vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, zkoušce na obsahovou stejnoměrnost, jak je uvedeno dále. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Oční inzerty, kde je to vhodné, vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné:

- celkové množství léčivé látky v inzertu;
- dávka uvolněná za jednotku času.

## OROMUCOSALIA

7.4:1807

### Orální přípravky

*Synonyma.* Oromukosální přípravky, Praeparationes buccales

*Tento článek se nevztahuje na dentální přípravky nebo na přípravky typu žvýkacích tablet (0478), léčivých žvýkacích gum (1239), orálních lyofilizátů a na jiné pevné nebo polotuhé přípravky, které nejsou specificky uvedené v tomto článku. Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahuje se tento článek na veterinární přípravky.*

#### DEFINICE

Jsou to pevné, polotuhé nebo tekuté přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek, jsou určeny k podání do ústní dutiny a/nebo ústní části hltanu k dosažení místního nebo systémového účinku. Přípravky se zamýšleným místním účinkem mohou být určeny k podání na specifické místo v ústní dutině, jako jsou dásně (přípravky na dásně) nebo ústní části hltanu (orofaryngeální přípravky). Přípravky se zamýšleným systémovým účinkem jsou určeny k primární absorpci v jednom nebo více místech ústní dutiny (např. sublingvální přípravky). Mukoadhezivní přípravky se pomocí adheze zadržují v ústní dutině na slizničním epitelu a mohou v místě podání modifikovat absorpci systémově účinkujících léčiv. U mnoha orálních přípravků je pravděpodobné, že část léčivé látky se spolkne a může se absorbovat v zažívacím traktu.

Orální přípravky mohou obsahovat vhodné protimikrobní látky a jiné pomocné látky, jako jsou dispergační přísady, emulgátory, látky upravující viskozitu, látky upravující pH, zvlhčovadla, solubilizátory, stabilizátory, chuťové a aromatické přísady a sladidla. Pevné přípravky mohou navíc obsahovat kluzné látky, maziva a pomocné látky upravující uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Obaly pro orální přípravky vyhovují, kde je to vhodné, požadavkům statí *Materiály používané pro výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů orálních přípravků:

- kloktadla;
- roztoky pro ústní výplachy;
- roztoky na dásně;
- orální roztoky a orální suspenze;
- polotuhé orální přípravky (zahrnují např. gel na dásně, pastu na dásně, orální gel, orální pastu);
- orální kapky, orální spreje a sublingvální spreje (včetně orofaryngeálních sprejů);
- pastilky tvrdé a pastilky měkké;
- lisované pastilky;
- sublingvální tablety a bukalní tablety;
- orální tobolky;
- mukoadhezivní přípravky;
- filmy dispergovatelné v ústech.

#### VÝROBA

Při vývoji orálního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má prokázat účinek této látky k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro

posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci orálních přípravků se vhodným způsobem zajišťuje jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* (5.1.4).

Při výrobě polotuhých a tekutých orálních přípravků obsahujících dispergované částice se používají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic s přihlédnutím k zamýšlenému použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnomořnost dávkových jednotek.** Jednodávkové orální přípravky vyhovují zkoušce na stejnořnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnořnost a/nebo hmotnostní stejnořnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnořnost** (2.9.6). Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové přípravky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A (lisované a tvarově formované lékové formy) nebo zkoušce B (tobolky) na obsahovou stejnořnost jednodávkových přípravků. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnořnost** (2.9.5). Pevné jednodávkové orální přípravky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnořnost. Je-li zkouška na obsahovou stejnořnost předepsána nebo zdůvodněna a schválena pro všechny obsažené léčivé látky, zkouška na hmotnostní stejnořnost se neprovádí.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede název každé přidané protimikrobní látky.

### Gargarismata

#### Kloktadla

#### DEFINICE

Jsou to vodné roztoky určené k dosažení místního účinku při kloktání. Kloktadla se nepolykají. Dodávají se ve formě roztoků pro přímé použití nebo ve formě koncentrovaných roztoků určených ke zředění. Mohou se rovněž připravit z prášků nebo tablet, které se před použitím rozpustí ve vodě.

Kloktadla mohou obsahovat pomocné látky k úpravě pH, které má být pokud možno neutrální.



## Aquae gingivales

### Roztoky pro ústní výplachy

*Synonymum.* Ústní vody

#### DEFINICE

Jsou to vodné roztoky určené pro použití ve styku s povrchem sliznice ústní dutiny. Ústní vody se nepolykají. Dodávají se ve formě roztoků pro přímé použití nebo ve formě koncentrovaných roztoků určených ke zředění. Mohou se rovněž připravit z prášků nebo tablet, které se před použitím rozpustí ve vodě.

Ústní vody mohou obsahovat pomocné látky k úpravě pH, které má být, pokud možno, neutrální.

## Solutiones gingivales

### Roztoky na dásně

#### DEFINICE

Jsou určeny k nanášení na dásně pomocí vhodného aplikátoru.

## Solutiones oromucosales et suspensiones oromucosales

### Orální roztoky a orální suspenze

#### DEFINICE

Jsou to tekuté přípravky určené k podání do ústní dutiny pomocí vhodného aplikátoru.

Orální suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat. Takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

## Oromucosalia semisolidia

### Polotuhé orální přípravky

#### DEFINICE

Jsou to hydrofilní gely nebo pasty určené k podání do ústní dutiny nebo na specifické části ústní dutiny, jako jsou dásně (gel na dásně, pasta na dásně). Mohou být ve formě jednodávkových přípravků.

Polotuhé orální přípravky vyhovují požadavkům článku *Praeparata semisolidia ad usum cutaneum (0132)*.

## Guttae oromucosales, praeparata pro aerodispersione oromucosali et praeparata pro aerodispersione sublinguali

### Orální kapky, orální spreje a sublingvální spreje

#### DEFINICE

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze určené k místnímu nebo systémovému účinku. Podávají se nakapáním nebo vstříknutím do ústní dutiny nebo na specifické části ústní

dutiny, jako je vstříknutí pod jazyk (sublingvální sprej) nebo do ústní části hltanu (orofaryngeální sprej).

Emulze mohou vykazovat známky oddělování fází, ale jsou protřepáním snadno zhomogenizovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat. Takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Tekuté orální spreje se dodávají v obalech se zařízením pro tvorbu aerosolu nebo v tlakových nádobkách opatřených vhodným aplikátorem, s dávkovacím ventilem nebo bez něho. Vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu (0523)*.

Velikost částic spreje je taková, aby podle určení zůstávaly v ústní dutině nebo v ústní části hltanu.

#### ZKOUŠENÍ

Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, orální kapky dodávané v jednodávkových obalech, dávkované orální spreje a sublingvální spreje se systémovým účinkem vyhovují následujícím zkouškám.

#### ORÁLNÍ KAPKY V JEDNODÁVKOVÝCH OBALECH

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Orální kapky v jednodávkových obalech vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost nebo obsahovou stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Hmotnostní stejnóměrnost.** Orální kapky ve formě roztoku vyhovují následující zkoušce. Zváží se jednotlivé obsahy deseti co nejvíce vyprázdněných obalů a vypočítá se průměrná hmotnost. Nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti se liší od průměrné hmotnosti o více než 10 % a žádná se neliší o více než 20 %.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Orální kapky ve formě suspenzí nebo emulzí vyhovují následující zkoušce. Stanoví se jednotlivé obsahy co nejvíce vyprázdněných obalů. Přípravek vyhovuje zkoušce B na obsahovou stejnóměrnost.

#### DÁVKOVANÉ ORÁLNÍ SPREJE A SUBLINGVÁLNÍ SPREJE

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Dávkované orální spreje a sublingvální spreje vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost nebo stejnóměrnost podané dávky. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

*V případě dávkovaných orálních sprejů a sublingválních sprejů ve formě roztoků je postup následující.* Odstříkne se jednou do odpadu, čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a opět se odstříkne do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Obal se zváží, odstříkne se jednou do odpadu a obal se znovu zváží. Vypočítá se rozdíl mezi těmito dvěma hmotnostmi. Celý postup se opakuje s dalšími devíti obaly. Stanoví se hmotnostní stejnóměrnost (2.9.40).

*V případě dávkovaných orálních sprejů a sublingválních sprejů ve formě suspenzí nebo emulzí je postup následující.* Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit

dávku z rozprašovacího zařízení. Obal se protřepává 5 s a jedna dávka se odstříkne do odpadu. Čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a dávka se opět odstříkne. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po 2 s se vstříkne rozprašovacím zařízením jedna dávka dávkovaného spreje do sběrné nádoby. Pomocí následných výplachů se ze sběrné nádoby získá celá dávka a stanoví se obsah léčivé látky v jedné dávce. Tento postup se opakuje u dalších devíti obalů. Stanoví se obsahová stejnoměrnost (2.9.40).

**Hmotnostní stejnoměrnost.** *Dávkované orální spreje a sublingvální spreje ve formě roztoků vyhovují následující zkoušce.* Odstříkne se jedna dávka do odpadu, čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a opět se odstříkne do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Obal se zváží, odstříkne se jednou do odpadu a obal se znovu zváží. Vypočítá se rozdíl mezi těmito dvěma hmotnostmi. Celý postup se opakuje s dalšími devíti obaly.

Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti liší od průměrné hmotnosti o více než 25 % a žádná se neliší o více než 35 %.

**Stejnóměrnost podané dávky.** *Dávkované orální spreje a sublingvální spreje ve formě suspenzí nebo emulzí vyhovují následující zkoušce.* Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit dávku z rozprašovacího zařízení.

Obalem se třepe 5 s a jednou se odstříkne do odpadu. Čeká se nejméně 5 s, třepe se 5 s a opět se odstříkne do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po 2 s se vstříkne rozprašovacím zařízením jedna dávka dávkovaného spreje do sběrné nádoby. Pomocí následných výplachů se ze sběrné nádoby získá celá dávka a stanoví se obsah léčivé látky. Tento postup se opakuje u dalších devíti obalů.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden jednotlivý obsah je mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu.

Jestliže dva nebo tři jednotlivé obsahy jsou mimo rozmezí 75 % až 125 %, ale v rozmezí 65 % až 135 %, opakuje se zkouška s dalšími dvaceti obaly. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše tři jednotlivé obsahy ze třiceti jsou mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu.

## Pastilli duri et pastilli molles

### Pastilky tvrdé a pastilky měkké

#### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k cucání, obvykle k dosažení místního účinku v ústní dutině a v ústní části hltanu. Obsahují jednu nebo více léčivých látek, obvykle v aromatizovaném a oslazeném základu. Jsou určeny k pomalému rozpouštění nebo rozpadu při cucání v ústech. Tvrdé pastilky jsou mechanicky pevné přípravky připravené formováním. Měkké pastilky jsou pružné přípravky připravené tvarováním směsí obsahujících přírodní nebo syntetické polymery nebo gumy a sladidla.

## Pastilli compressi

### Lisované pastilky

#### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky k cucání určené k dosažení místního nebo systémového účinku. Připraví se lisováním a mají často kosočtvercový tvar.

Lisované pastilky odpovídají všeobecné definici tablet.

#### VÝROBA

Při výrobě lisovaných pastilek se přijmou opatření k zajištění vhodné mechanické pevnosti, aby se při zacházení s nimi zabránilo drolení nebo lámání. To se může prokázat zkouškami *Oděr neobalených tablet* (2.9.7) a *Pevnost tablet* (2.9.8).

#### ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** U lisovaných pastilek určených k systémovému účinku, se použije vhodná zkouška k prokázání přiměřeného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## Tablettae sublinguales et tablettae buccales

### Sublingvální tablety a bukalní tablety

#### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k podání pod jazyk nebo do lícní dutiny, případně k dosažení systémového účinku. Připravují se lisováním směsí prášků nebo granulátů do tablet vhodného tvaru pro dané použití.

Sublingvální tablety a bukalní tablety odpovídají všeobecné definici tablet.

#### VÝROBA

Při výrobě sublingválních tablet a bukalních tablet se přijmou opatření k zajištění vhodné mechanické pevnosti, aby se při zacházení s nimi zabránilo drolení nebo lámání. To se může prokázat zkouškami *Oděr neobalených tablet* (2.9.7) a *Pevnost tablet* (2.9.8).

#### ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, použije se vhodná zkouška k prokázání přiměřeného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## Capsulae oromucosales

### Orální tobolky

#### DEFINICE

Jsou to měkké tobolky určené ke žvýkání nebo cucání.

## Praeparata mucoadhaesiva

### Mukoadhezivní přípravky

#### DEFINICE

Tyto přípravky obsahují jednu nebo více léčivých látek určených k systémové absorpci sliznicí tváře v delším časovém období. Mohou se dodávat jako mukoadhezivní bukální tablety, jako bukální filmy nebo jako jiné pevné nebo polotuhé přípravky.

Obvykle obsahují hydrofilní polymery, které po zvlhčení slinami vytvoří hydrogel, jenž se přilepí na sliznici tváře; bukální filmy se navíc mohou rozpustit.

Mukoadhezivní bukální tablety se vyrábějí lisováním jako jednovrstvé nebo vícevrstvé tablety.

Bukální filmy jsou jednovrstvé nebo vícevrstvé plátky ze vhodného materiálu.

#### VÝROBA

Při výrobě mukoadhezivních bukálních tablet a bukálních filmů se přijmou opatření k zajištění vhodné mechanické pevnosti, aby se při zacházení s nimi zabránilo drobení nebo lámání. To se může pro mukoadhezivní bukální tablety prokázat zkouškami *Oděr neobalených tablet* (2.9.7) a *Pevnost tablet* (2.9.8).

#### ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, použije se vhodná zkouška k prokázání přiměřeného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## Lamina pro orodispersione

### Filmy dispergovatelné v ústech

#### DEFINICE

Jsou to jednovrstvé nebo vícevrstvé plátky ze vhodného materiálu určené k umístění do ústní dutiny, kde se rychle dispergují.

#### VÝROBA

Při výrobě filmů dispergovatelných v ústech se přijmou opatření k zajištění vhodné mechanické pevnosti, aby se při zacházení s nimi zabránilo jejich poškození.

#### ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, použije se vhodná zkouška k prokázání přiměřeného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## PARENTERALIA

7.5:0520

### Parenterální přípravky

*Požadavky tohoto článku se nevztahují nutně na přípravky vyrobené z lidské krve, imunologické přípravky nebo radiofarmaka. Zvláštní požadavky mohou být uváděny pro vete-*

*rinární přípravky, a to podle druhů zvířat, pro něž je přípravek určen.*

#### DEFINICE

Jsou to sterilní přípravky určené k podání do lidského nebo zvířecího těla injekcí, infuzí nebo implantací.

U parenterálních přípravků se mohou používat pomocné látky, např. k izotonizaci s krví, k úpravě pH, ke zvýšení rozpustnosti, ke konzervaci léčivých látek nebo k zajištění vhodných protimikrobních vlastností, ale bez nepříznivého ovlivnění požadovaného léčebného účinku nebo v použité koncentraci bez způsobení toxicity nebo nevhodné místní dráždivosti.

Obaly pro parenterální přípravky jsou vyrobeny, pokud možno, z materiálů dostatečně transparentních, aby byla možná vizuální kontrola obsahu, s výjimkou obalů pro implantáty a v jiných zdůvodněných a schválených případech.

Obaly pro parenterální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Parenterální přípravky se dodávají ve skleněných obalech (3.2.1) nebo jiných obalech, např. plastových (3.2.2, 3.2.2.1 a 3.2.9), a v předplněných injekčních stříkačkách. Těsnost obalů se zajišťuje vhodným způsobem. Uzávěry jsou těsné, zabraňující kontaminaci mikroorganismy nebo jiným znečištěním a dovolující obvykle odebrání části nebo celého obsahu bez odstranění uzávěry. Plastové materiály nebo elastomery (3.2.9) použité k výrobě uzávěrů jsou dostatečně pevné a pružné, aby dovolily průnik jehly při co nejmenším odlučování částic. Uzávěry vícedávkových obalů jsou dostatečně pružné, aby zajistily uzavření vpichu po vytažení jehly.

Rozlišuje se několik druhů parenterálních přípravků:

- injekce;
- infuze;
- koncentráty pro injekce nebo infuze;
- prášky pro injekce nebo infuze;
- gely pro injekce;
- implantáty.

#### VÝROBA

Při vývoji parenterálního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se prokazuje účinnost této látky k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v dané formulaci přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Parenterální přípravky se vyrábějí a připravují za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Voda použitá k výrobě parenterálních přípravků vyhovuje požadavkům vody na injekci nerozplněné v článku *Aqua pro iniectione* (0169).

## ZKOUŠENÍ

**Hodnocení kontaminace částicemi pod hranicí viditelnosti (2.9.19).** U přípravků pro použití u člověka vyhovují této zkoušce roztoky pro infuze nebo roztoky pro injekce.

U přípravků pro subkutánní nebo intramuskulární injekce mohou být přípustné vyšší limity. Radiofarmaka jsou vyjmuta z těchto ustanovení. U přípravků, u nichž je v označení na obalu uvedeno, že se použijí s koncovým filtrem, se tato zkouška nepožaduje; musí se prokázat, že zfiltrovaný roztok vyhovuje zkoušce.

U přípravků pro veterinární použití, které jsou dodávány v obalech se jmenovitým objemem větším než 100 ml a s obsahem odpovídajícím dávce větší než 1,4 ml/kg hmotnosti, vyhovují roztoky pro infuze nebo roztoky pro injekce zkoušce na kontaminaci částicemi pod hranicí viditelnosti.

**Sterilita (2.6.1).** Parenterální přípravky vyhovují zkoušce na sterilitu.

## SKLADOVÁNÍ

Ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název a koncentrace každé přidané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, že se roztok použije s koncovým filtrem;
- kde je to vhodné, že přípravek je prostý bakteriálních endotoxinů nebo pyrogenních látek.

## Iniectiones

### Injekce

#### DEFINICE

Jsou to sterilní roztoky, emulze nebo suspenze. Připravují se rozpouštěním, emulgováním nebo suspendováním léčivé látky (léčivých látek) a všech dalších přidávaných pomocných látek ve vodě, ve vhodné nevodné tekutině, která může být nesterilní, je-li to zdůvodněno, nebo ve směsi těchto pomocných látek.

Injekční roztoky zkoušené za vhodných podmínek viditelnosti jsou čiré a prakticky prosté částic.

Injekční emulze nevykazují oddělování fází. Injekční suspenze mohou obsahovat sediment, který je snadno roztřepatelný; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby se umožnilo odebrání správné dávky.

**Vícedávkové přípravky.** Vícedávkové vodné injekce obsahují vhodnou protimikrobní látku ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Je-li parenterální přípravek dodáván ve vícedávkovém obalu, vyžadují se opatření při jeho podávání a zvláště při skladování mezi jednotlivými odběry dávek.

**Protimikrobní látky.** Vodné přípravky, které jsou připravované za aseptických podmínek a které se nemohou sterilizovat v lahvičkách, mohou obsahovat vhodnou protimikrobní látku ve vhodné koncentraci.

Protimikrobní látka se nepřidává, jestliže:

- objem podávaný v jednotlivé dávce je vyšší než 15 ml, není-li zdůvodněno jinak;
- přípravek se podává způsobem, u kterých není z lékařských důvodů protimikrobní látka přijatelná, např. při intracisternálním, epidurálním, intratekálním podání nebo jinou cestou, při níž se injekce dostane do styku s mozkomíšním mokem, nebo při podání nitroočním nebo retrookulárním.

Tyto přípravky se dodávají v jednodávkových obalech.

#### VÝROBA

U injekcí obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic se zřetelem k určenému použití přípravku.

**Jednodávkové přípravky.** Skutečný objem injekční tekutiny v jednodávkovém obalu je dostatečný pro odebrání a podání jmenovité dávky běžnou technikou (2.9.17).

## ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové suspenze pro injekce vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové suspenze pro injekce s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových léčivých forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Bakteriální endotoxiny – pyrogenní látky.** Proveďte se zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, zkouška na pyrogenní látky (2.6.8). Doporučené limity pro bakteriální endotoxiny jsou uvedeny ve stati 5.1.10.

**Přípravky pro použití u člověka.** Přípravek vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny (2.6.14) nebo zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8).

**Přípravky pro veterinární použití.** Je-li podávaný objem jedné dávky 15 ml nebo větší a odpovídá dávce 0,2 ml nebo větší na kilogram hmotnosti, vyhovuje přípravek zkoušce na bakteriální endotoxiny (2.6.14) nebo zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8).

**Ostatní přípravky.** Je-li v označení na obalu uvedeno, že přípravek je prostý bakteriálních endotoxinů nebo pyrogenních látek, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny (2.6.14) nebo zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8).

## Infusiones

### Infuze

#### DEFINICE

Jsou to sterilní vodné roztoky nebo emulze s vodou jako kontinuální fází, obvykle jsou izotonické s krví. Jsou určeny hlavně k podávání ve velkých objemech. Infuze neobsahují žádné protimikrobní látky.

Infuzní roztoky zkoušené za vhodných podmínek viditelnosti jsou čiré a prakticky prosté částic.

Infuzní emulze nevykazují oddělování fází.

#### VÝROBA

U infuzí, jež obsahují dispergované částice, se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic se zřetelem k určenému použití přípravku.

Skutečný objem infuzní tekutiny v obalu je dostatečný pro odebrání a podání jmenovité dávky běžnou technikou (2.9.17).

#### ZKOUŠENÍ

**Bakteriální endotoxiny – pyrogenní látky.** Přípravky vyhovují zkoušce na bakteriální endotoxiny (2.6.14) nebo, je-li zdůvodněno a schváleno, zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8). U zkoušky na pyrogenní látky se podá 10 ml tekutiny na kilogram hmotnosti králíka, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

### Concentrata pro iniectionibus aut infusionibus

#### Koncentrované roztoky pro injekce nebo infuze

#### DEFINICE

Jsou to sterilní roztoky určené k ředění pro injekce nebo pro infuze. Před podáním se ředí předepsaným objemem předepsané kapaliny. Po zředění vyhovují požadavkům na injekce nebo infuze.

#### ZKOUŠENÍ

**Bakteriální endotoxiny – pyrogenní látky.** Přípravky po zředění na příslušný objem vyhovují požadavkům předepsaným pro injekce nebo infuze.

### Pulveres pro iniectionibus aut infusionibus

#### Prášky pro injekce nebo infuze

#### DEFINICE

Jsou to pevné sterilní látky dodávané v konečných obalech, v nichž se po protřepání s předepsaným objemem předepsané sterilní tekutiny rychle vytvoří buď čiré roztoky prakticky prosté částic, nebo homogenní suspenze. Po rozpuštění nebo dispergování vyhovují požadavkům na injekce nebo infuze.

Parenterální lyofilizáty se považují za prášky pro injekce nebo infuze.

## VÝROBA

Obsahová stejnoměrnost a hmotnostní stejnoměrnost lyofilizátů po parenterální podání se zajišťuje mezioperační kontrolou množství roztoku před lyofilizací.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnoměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové prášky pro injekce nebo pro infuze vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, prášky pro injekce nebo infuze s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti nebo s celkovou jednotkovou hmotností rovnou nebo menší než 40 mg vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových léčivých forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Prášky pro injekce nebo infuze vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových léčivých forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny léčivé látky v přípravku, zkouška na hmotnostní stejnoměrnost se nevyžaduje.

**Bakteriální endotoxiny – pyrogenní látky.** Přípravky po rozpuštění nebo dispergaci v příslušném objemu tekutiny vyhovují požadavkům předepsaným pro injekce nebo infuze.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede návod na přípravu injekcí a infuzí.

### Gelata pro iniectionibus

#### Gely pro injekce

#### DEFINICE

Jsou to sterilní gely s viskozitou zajišťující řízené uvolňování léčivé látky (léčivých látek) v místě podání.

### Implantata

#### Implantáty

#### DEFINICE

Jsou to sterilní pevné přípravky velikosti a tvaru vhodného pro parenterální implantaci umožňující dlouhodobé uvolňování léčivé látky (léčivých látek). Jsou dodávány výhradně jednotlivě ve sterilních obalech.

## PRAEADMIXTA AD ALIMENTA MEDICATA AD USUM VETERINARIUM

6.8:1037

### Premixy pro medikaci krmiva pro veterinární použití

#### DEFINICE

Jsou to směsi jedné nebo více léčivých látek, obvykle ve vhodném vehikulu, připravované k usnadnění podávání léčivých látek zvířatům zkrmováním. Používají se výhradně k přípravě medikovaných krmiv.

Premixy se vyskytují v granulované, práškové, polotuhé nebo tekuté formě. Práškové nebo granulované premixy jsou sypké a homogenní, případně shluky se rozpadají při běžném zacházení. Tekuté premixy jsou homogenní suspenze nebo roztoky, které se mohou získat z thixotropních gelů nebo strukturovaných tekutin. Velikost částic a další vlastnosti premixu jsou takové, aby zajistily rovnoměrné rozptýlení léčivé látky (látek) v podávaném krmivu. Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, návody k použití stanoví, že koncentrace premixu v granulované nebo práškové formě je nejméně 0,5 % v medikovaném krmivu.

#### VÝROBA

**Léčivá látka.** Pokud již nebylo pro stávající premixy zdůvodněno a schváleno jinak, léčivé látky určené pro zapracování do premixů:

- vyhovují požadavkům příslušného článku lékopisu;
- fermentační produkty, které nejsou předmětem článku lékopisu vyhovují obecnému článku *Producta fermentatio-nis* (1468), zejména odstavci Následující výrobní postupy.

#### ZKOUŠENÍ

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 15,0 % pro premixy vyskytující se v granulované nebo práškové formě, není-li zdůvodněno a schváleno jinak. 3,000 g se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- druh a kategorie zvířat, pro které je premix určen;
- návody na přípravu medikovaných krmiv z premixu a základního krmiva;
- kde je to vhodné, doba, která musí uplynout od ukončení příjmu medikovaného krmiva zvířetem do sběru materiálu určeného k výživě člověka (ochranná lhůta).

## PRAEPARATA AD IRRIGATIONEM

6.0:1116

### Přípravky pro výplach

*Synonymum.* Praeparationes ad irrigationem

#### DEFINICE

Jsou to sterilní vodné velkoobjemové přípravky určené pro výplach tělních dutin, otevřených ran a povrchů těla, např. při chirurgických zákrocích.

Připravují se rozpuštěním jedné nebo více léčivých látek, elektrolytů nebo osmoticky aktivních látek ve vodě, která vyhovuje požadavkům článku *Aqua pro iniectione* (0169), nebo se jedná pouze o vodu uvedené jakosti. Ve druhém případě se tyto přípravky označují jako voda pro výplach. Roztoky pro výplach se obvykle upravují, aby vznikly přípravky izotonické s krví. Zkouší-li se za vhodných podmínek viditelnosti, jsou čiré a prakticky prosté částic.

Přípravky pro výplach se dodávají v jednodávkových obalech. Obaly a uzávěry vyhovují požadavkům na obaly pro parenterální přípravky (3.2.1 a 3.2.2), musí však mít tvarem odlišnou koncovku pro připojení k aplikačnímu zařízení, aby nemohlo dojít k podání přípravku pro výplach parenterální cestou.

#### VÝROBA

Přípravky pro výplach se připravují za použití materiálů a metod vedoucích k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu lze odebrat jmenovitý objem.

#### ZKOUŠENÍ

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovují zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Nejvýše 0,5 m. j./ml.

**Pyrogenní látky** (2.6.8). Přípravky, u nichž nelze použít validovanou zkoušku na bakteriální endotoxiny, vyhovují zkoušce na pyrogenní látky, při níž se podá 10 ml přípravku na kilogram hmotnosti králíka, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že přípravek není určen k injekčnímu podání;
- že přípravek je určen jen k jednorázovému použití a nepotřebovaná část přípravku se má odstranit.

## PRAEPARATA INTRAMAMMARIA AD USUM VETERINARIUM

6.0:0945

### Intramamární přípravky pro veterinární použití

*Synonymum.* Praeparationes intramammariae ad usum veterinarium

#### DEFINICE

Jsou to sterilní přípravky určené k zavedení do mléčné žlázy strukovými kanálky. Dělí se na dva hlavní druhy:

- přípravky k léčbě a prevenci infekcí zvířat v laktaci;
- přípravky k léčbě a prevenci infekcí zvířat na konci laktace nebo mimo laktaci.

Intramamární přípravky pro veterinární použití jsou roztoky, emulze, suspenze nebo polotuhé přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou obsahovat pomocné látky, jako jsou stabilizátory, emulgátory, látky napomáhající tvorbě suspenze a látky zvyšující viskozitu. Suspenze mohou obsahovat sediment,

kteřý lze snadno roztřepat. V emulzích se mohou oddělovat fáze, dají se však protřepáním snadno znovu homogenizovat.

Není-li předepsáno a schváleno jinak, jsou intramamární přípravky pro veterinární použití plněny do jednodávkových obalů upravených k zavedení do jednoho strukového kanálku zvířete.

Jsou-li dodávány ve vícedávkových obalech, obsahují vodné přípravky vhodnou protimikrobní látku ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Pro podávání a pro skladování přípravku mezi podáními se musí stanovit bezpečnostní opatření.

Obaly pro intramamární přípravky k veterinárnímu použití, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

#### VÝROBA

Při vývoji intramamárního přípravku pro veterinární použití obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat účinnost této látky. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení protimikrobních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Intramamární přípravky pro veterinární použití se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Při výrobě intramamárních přípravků pro veterinární použití obsahujících dispergované částice se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určité použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Využitelná hmotnost nebo objem.** Podle pokynů v označení na obalu se co nejvíce vytlačí obsah z deseti obalů. Průměrná hmotnost nebo objem se neliší o více než 10 % od hmotnosti nebo objemu uvedeného v označení na obalu.

**Sterilita** (2.6.1). Intramamární přípravky pro veterinární použití vyhovují zkoušce na sterilitu. Použije se metoda membránové filtrace nebo, je-li předepsáno a schváleno, přímé očkování živné půdy. Obsah deseti obalů se vytlačí a pečlivě smíchá. Pro každou živnou půdu se použije 0,5 g až 1,0 g (nebo 0,5 ml až 1,0 ml) homogenizovaného vzorku.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název léčivé látky (léčivých látek) a její hmotnost nebo počet mezinárodních jednotek, které lze normálním způsobem získat z obalu;
- údaj, zda je přípravek určen pro použití u zvířat v laktaci nebo u zvířat mimo laktaci;
- v případě vícedávkových obalů názvy všech přidaných protimikrobních látek.

## PRAEPARATA INTRAUTERINAE AD USUM VETERINARIUM

6.3:1806

### Intrauterinní přípravky pro veterinární použití

*Synonyma.* Praeparationes intra-uterinae ad usum veterinarium, Nitroděložní přípravky pro veterinární použití

#### DEFINICE

Jsou to tekuté, polotuhé nebo pevné přípravky k přímému podání do krčku, dutiny, dna dělohy (fundus), zpravidla k dosažení místního účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném základu.

Obaly pro intrauterinní přípravky pro veterinární použití vyhovují, kde je to vhodné, požadavkům statí *Materiály používané pro výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů intrauterinních přípravků pro veterinární použití:

- intrauterinní tablety;
- intrauterinní tobolky;
- intrauterinní roztoky, emulze a suspenze, koncentráty pro intrauterinní roztoky;
- tablety pro přípravu intrauterinních roztoků a suspenzí;
- polotuhé intrauterinní přípravky;
- intrauterinní pěny;
- intrauterinní tyčinky.

#### VÝROBA

Při vývoji intrauterinního přípravku pro veterinární použití obsahujícího protimikrobní látku se má prokázat účinek této látky k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v dané formulaci přípravku je popsána ve stati *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci intrauterinních přípravků pro veterinární použití se vhodným způsobem zajišťuje jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* (5.1.4), viz tabulku 5.1.4-1, *Kožní podání*.

K přípravě sterilních intrauterinních přípravků pro veterinární použití se používají materiály a metody zajišťující sterilitu a zabraňující kontaminaci a růstu mikroorganismů; příslušná doporučení jsou uvedena v obecné stati *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Při vývoji tekutých a polotuhých intrauterinních přípravků pro veterinární použití v jednodávkových obalech se musí prokázat, že z obalu přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejněměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové intrauterinní přípravky pro veterinární použití vyhovují zkoušce na dávkovou stejněměrnost (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejněměrnost a/nebo hmotnostní stejněměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a léčivé přípravky z rostlinných drog v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové přípravky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují Zkoušce A (intrauterinní tablety) nebo zkoušce B (intrauterinní tobolky) na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových přípravků. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, vztahují se požadavky zkoušky jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Pevné jednodávkové intrauterinní přípravky pro veterinární použití vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových přípravků. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána nebo zdůvodněna a schválena pro všechny obsažené léčivé látky, zkouška na hmotnostní stejnoměrnost se nevyžaduje.

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z pevných jednodávkových intrauterinních přípravků pro veterinární použití, např. jedna ze zkoušek popsanych ve stati *Zkouška disoluce pevných lékových forem (2.9.3)*.

Je-li předepsána zkouška disoluce, zkouška rozpadavosti se nevyžaduje.

**Sterilita (2.6.1).** Sterilní intrauterinní přípravky pro veterinární použití vyhovují zkoušce na sterilitu. Odděleně dodávané aplikátory rovněž vyhovují zkoušce na sterilitu. Aplikátor se vyjme za aseptických podmínek z obalu, přenesse se do nádoby s živnou půdou a celý se ponoří. Inkubace a hodnocení jsou popsány ve zkoušce na sterilitu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název každé přidané protimikrobní látky;
- kde je to vhodné, že přípravek je sterilní.

### Tabulettae intrauterinae

#### Intrauterinní tablety

*Synonymum.* Nitroděložní tablety

#### DEFINICE

Jsou to pevné přípravky s obsahem jedné dávky jedné nebo více léčivých látek v jedné tabletě. Obecně odpovídají definici uvedené v obecném článku *Tabulettae (0478)*.

Pro podání do dělohy se může použít vhodný aplikátor.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Nejsou-li určeny pro prodloužené lokální působení, vyhovují zkoušce na rozpadavost rektálních a vaginálních přípravků (2.9.2). Stav tablet se hodnotí po 30 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

### Capsulae intrauterinae

#### Intrauterinní tobolky

*Synonymum.* Nitroděložní tobolky

#### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky. Obecně odpovídají měkkým tobolkám, liší se pouze tvarem a velikostí. Intrauterinní tobolky mají různý tvar, zpravidla jsou vejčité. Jsou hladké a mají jednotný vzhled.

Pro podání do dělohy se může použít vhodný aplikátor.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Nejsou-li určeny pro prodloužené lokální působení, vyhovují zkoušce na rozpadavost rektálních a vaginálních přípravků (2.9.2). Stav tobolek se hodnotí po 30 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

### Solutiones, emulsiones et suspensiones intrauterinae

#### Concentrata pro solutionibus intrauterinis

#### Intrauterinní roztoky, suspenze a emulze

#### Koncentráty pro intrauterinní roztoky

*Synonyma.* Nitroděložní roztoky, suspenze a emulze; Koncentráty pro nitroděložní roztoky

#### DEFINICE

Intrauterinní roztoky, suspenze a emulze jsou tekuté přípravky. Koncentráty pro intrauterinní roztoky se podávají po naředění.

Mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě viskozity přípravku, k úpravě nebo stabilizaci pH, ke zvýšení rozpustnosti léčivé látky (léčivých látek) nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek přípravku nebo nejsou v použitých koncentracích příčinou přílišné místní dráždivosti.

V intrauterinních emulzích se mohou oddělovat fáze, které jsou protřepáním znovu snadno dispergovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno rozřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby se umožnilo podání správné dávky.

Mohou se dodávat v jednodávkových obalech. Obal je upraven pro podání přípravku do dělohy nebo se může použít vhodný aplikátor.

#### VÝROBA

Při výrobě intrauterinních suspenzí se využívají opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.



## Tabulettae pro intrauterinis solutionibus et suspensionibus

Tablety pro intrauterinní roztoky a suspenze

*Synonymum.* Tablety pro nitroděložní roztoky a suspenze

### DEFINICE

Jsou to jednodávkové přípravky, které se před podáním rozpustí nebo dispergují ve vodě. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění dispergování nebo rozpuštění a k zabránění shlukování.

Obecně odpovídají definici uvedené v obecném článku *Tabulettae (0478)*.

Po rozpuštění nebo dispergaci vyhovují požadavkům na intrauterinní roztoky nebo intrauterinní suspenze, podle toho, co je vhodné.

### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Tablety pro intrauterinní roztoky a suspenze se rozpadnou do 3 min, pokud jsou zkoušené podle stati Rozpadavost tablet a tobolek (2.9.1), ale za použití vody R při teplotě 15 °C až 25 °C.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- způsob přípravy intrauterinního roztoku nebo suspenze;
- podmínky a doba uchovávání roztoku nebo suspenze po rekonstituci.

## Praeparata semisolidia intrauterina

Polotuhé intrauterinní přípravky

*Synonymum.* Polotuhé nitroděložní přípravky

### DEFINICE

Jsou to masti, krémy nebo gely, které vyhovují požadavkům článku *Praeparata semisolidia ad usum cutaneum (0132)*.

Polotuhé intrauterinní přípravky se často dodávají v jednodávkových obalech, které jsou upraveny pro podání přípravku do dělohy, nebo se může použít vhodný aplikátor.

## Spumae intrauterinae

Intrauterinní pěny

*Synonymum.* Nitroděložní pěny

### DEFINICE

Vyhovují požadavkům článku *Spumae medicatae (1105)*. Dodávají se ve vícedávkových obalech, které jsou upraveny pro podání přípravku do dělohy nebo se může použít vhodný aplikátor.

## Styli intrauterini

Intrauterinní tyčinky

*Synonymum.* Nitroděložní tyčinky

### DEFINICE

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Styli (1154)*. Při styku s fyziologickými tekutinami často vytvářejí pěnu.

## PRAEPARATA PHARMACEUTICA IN VASIS CUM PRESSU

6.0:0523

Léčivé přípravky v tlakovém obalu

*Synonyma.* Praeparationes pharmaceuticae in vasis cum pressu, Léčivé spreje

*Doplňující požadavky na přípravky v tlakovém obalu lze nalézt, kde je to vhodné, v dalších člancích, např. Inhalanda (0671), Liquida ad usum dermicum (0927), Pulveres adspersorii (1166), Nasalia (0676) a Auricularia (0652).*

### DEFINICE

Dodávají se ve speciálních nádobách pod tlakem plynu a obsahují jednu nebo více léčivých látek. Přípravky se uvolňují z nádoby vhodným ventilem ve formě aerosolu (disperze pevných nebo kapalných částic v plynu, přičemž velikost těchto částic je přizpůsobená zamýšlenému použití) nebo jako tekutý nebo polotuhý proud, jako je pěna. Potřebný tlak se vytváří vhodnými hnacími plyny (propelenty). Přípravky jsou tvořeny roztokem, emulzí nebo suspenzí a jsou určeny k místnímu podání na kůži nebo sliznice tělních dutin nebo k inhalaci. Jako vhodné pomocné látky se mohou použít např. rozpouštědla, solubilizátory, emulgátory, suspenzní činidla a lubrikanty pro ventily jako prevence proti ucpaní.

*Propelenty.* Jsou to buď tlakem zkapalněné nebo stlačené plyny, nebo kapaliny s nízkou teplotou varu. Zkapalněné plyny jsou např. fluorované uhlovodíky a uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností (např. propan a butan). Stlačené plyny jsou např. oxid uhličitý, dusík a oxid dusný.

Aby se dosáhlo optimálních vlastností roztoku a požadovaného tlaku, dávkování a sprejových charakteristik, lze použít směsi propelentů.

*Obaly.* Používají se obaly těsné a odolné vůči vnitřnímu přetlaku a vyrobené z materiálů kompatibilních s jejich obsahem. Materiály jsou kov, sklo, plasty nebo jejich kombinace. Skleněné obaly jsou chráněné potažením plastem.

*Rozprašovací zařízení.* Ventil, pokud se právě nepoužívá, udržuje nádobu dobře uzavřenou, při použití reguluje dávkování obsahu. Sprejové charakteristiky jsou dané typem rozprašovacího zařízení, zvláště rozměry, počtem a umístěním výstupních otvorů. Některé ventily umožňují kontinuální podávání, jiné (dávkovací ventily) uvolňují definované množství přípravku při každém stisknutí rozprašovače.

Různé materiály ventilu, které jsou ve styku s obsahem nádoby, jsou s ním kompatibilní.

**Požadavky na léčivé přípravky v tlakových obalech.** Tyto přípravky jsou opatřeny aplikačním zařízením vhodným pro zamýšlené podání.

Zvláštní požadavky mohou být nezbytné pro výběr propeletů, velikost částic a jednotlivou dávku uvolněnou dávkovacími ventily.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- návod k použití;
- všechna bezpečnostní opatření, která se musí dodržovat;
- u nádoby s dávkovacím ventilem množství léčivé látky v jednom vystříknutí.

## PRAEPARATA SEMISOLIDA AD USUM CUTANEUM

6.7:0132

### Polotuhé přípravky pro kožní použití

*Synonymum.* Praeparationes molles ad usum dermicum

*Požadavky tohoto článku platí pro všechny polotuhé přípravky pro kožní použití. Kde je to vhodné, jsou u polotuhých přípravků určených k podání na specifické povrchy kůže nebo sliznice uvedeny doplňující požadavky v příslušných článcích, např. Auricularia (0652), Ocularia (1163), Nasalia (0676), Rectalia (1145) a Vaginalia (1164).*

#### DEFINICE

Jsou to polotuhé přípravky určené k místnímu účinku, k transdermálnímu přenosu léčivých látek nebo mají změkčovací, popřípadě ochranný účinek. Mají homogenní vzhled.

Polotuhé přípravky pro kožní použití jsou tvořeny jednoduchým nebo složeným základem, v němž je zpravidla rozpuštěná nebo dispergovaná jedna nebo více léčivých látek. Složením základu lze ovlivňovat účinnost přípravku.

Základy mohou obsahovat přírodní nebo syntetické látky; mohou to být jednofázové nebo vícefázové systémy. Podle povahy základu mají přípravky hydrofilní nebo hydrofobní (lipofilní) vlastnosti; mohou obsahovat vhodné pomocné látky, jako jsou protimikrobní látky, antioxidanty, stabilizátory, emulgátory, látky zvyšující viskozitu a urychlovače penetrace.

Polotuhé přípravky určené k podání na silně poškozenou kůži jsou sterilní.

Obaly pro polotuhé přípravky pro kožní použití vyhovují, kde je to vhodné, požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů polotuhých přípravků k použití na kůži:

- masti;
- krémy;
- gely;
- pasty;
- kataplazmata;
- náplasti s léčivými;
- kožní náplasti.

Masti, krémy a gely obecně vykazují podle své struktury viskoelastické vlastnosti a jsou newtonovského charakteru, tj. plastického, pseudoplastického nebo tixotropního typu toku při vysoké stříhové rychlosti (vysokém smykovém namáhání). Pasty často vykazují roztažnost.

#### VÝROBA

Při vývoji polotuhého přípravku pro kožní použití obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat nezbytnost použití a účinek této látky. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je uvedena ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3). Při výrobě, balení, skladování a distribuci polotuhých přípravků pro kožní použití se využívají vhodné způsoby zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* (5.1.4). Sterilní polotuhé přípravky k podání na kůži se připravují za použití materiálů a metod zajišťujících sterilitu a zabraňujících kontaminaci a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Metody přípravy sterilních výrobků* (5.1.1).

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah polotuhého přípravku pro kožní použití.

Při výrobě polotuhých přípravků pro kožní použití obsahujících dispergované částice se vhodnými opatřeními zajišťují definované rheologické vlastnosti. Kde je to vhodné, mohou se provést následující nepovinné zkoušky, např. penetrometrické měření konzistence (2.9.9), měření viskozity (zdánlivé viskozity) (2.2.10) a vhodné zkoušky k prokázání očekávaného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Při výrobě polotuhých přípravků pro kožní použití obsahujících léčivou látku (léčivé látky), která není rozpuštěná v základu (např. emulze nebo suspenze), se použijí opatření k zajištění vhodné homogenity dodávaného přípravku.

Při výrobě polotuhých přípravků pro kožní použití obsahujících dispergované částice se vhodným opatřením zajišťuje vhodná a kontrolovaná velikost částic s ohledem na zamýšlené použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejneměrnost dávkových jednotek.** Polotuhé přípravky pro kožní použití, které jsou dodávány buď v jednodávkových obalech, které představují jednu dávku léčivého přípravku, nebo ve vícedávkových obalech s dávkovacím zařízením, a které jsou určeny pro transdermální podání léčivé látky (léčivých látek) pro celkový účinek, vyhovují zkoušce na stejneměrnost dávkových jednotek (2.9.40). Polotuhé přípravky, ve kterých je léčivá látka (léčivé látky) rozpuštěná, vyhovují zkoušce na hmotnostní stejneměrnost; polotuhé přípravky, ve kterých je léčivá látka (léčivé látky) suspendovaná, vyhovují zkoušce na obsahovou stejneměrnost. Postupuje se podle postupu popsaného pro tekuté lékové formy. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a léčivé přípravky z rostlinných drog v dávkové formě.

Polotuhé přípravky dodávané ve vícedávkových obalech s dávkovacím zařízením, ve kterých je léčivá látka (léčivé

látky) rozpuštěná, vyhovují následující zkoušce. Jedna dávka se vyprázdní do odpadu, počká se nejméně 5 s, je-li třeba, protřepává se 5 s a dávka se opět vyprázdní do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Obal se zvaží, jedna dávka se vyprázdní do odpadu a opět se zvaží. Vypočítá se rozdíl mezi těmito dvěma hmotnostmi. Tento postup se opakuje s devíti dalšími obaly. Určí se hmotnostní proměnlivost (2.9.40).

Polotuhé přípravky dodávané ve vicedávkových obalech s dávkovacím zařízením, ve kterých je léčivá látka (léčivé látky) suspendovaná, vyhovují následující zkoušce. Použije se zařízení schopné kvantitativního zachytu dávky opouštějící obal s dávkovacím zařízením. Obal se 5 s protřepává, je-li třeba, a dávka se vyprázdní do odpadu, počká se nejméně 5 s, je-li třeba, 5 s se protřepává a dávka se opět vyprázdní do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po uplynutí 2 s se vstříkne jedna dávka z obalu s dávkovacím zařízením do sběrné nádoby. Postupnými výplachy se získá obsah sběrné nádoby. Ze spojených výplachů se stanoví obsah léčivé látky. Tento postup se opakuje s dalšími devíti obaly. Určí se obsahová stejnoměrnost (2.9.40).

**Sterilita** (2.6.1). Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### SKLADOVÁNÍ

Jestliže přípravek obsahuje vodu nebo jiné těkavé látky, skladuje se ve vzduchotěsných obalech. Je-li přípravek sterilní, skladuje se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- název každé pomocné látky;
- kde je to vhodné, že přípravek je sterilní.

## Unguenta

### Masti

#### DEFINICE

Jsou tvořené jednofázovým základem, v němž mohou být dispergované pevné nebo kapalné látky.

#### *Hydrofobní masti*

Hydrofobní (lipofilní) masti mohou absorbovat pouze malé množství vody. Typické použité základy jsou tvrdý, tekutý nebo lehký tekutý parafin, rostlinné oleje, živočišné tuky, syntetické acylglyceroly, vosky a tekuté polyalkylsiloxany.

#### *Masti emulgující vodu*

Vodu emulgující masti mohou absorbovat větší množství vody a tím po homogenizaci vytvářet emulze typu voda v oleji nebo olej ve vodě v závislosti na charakteru emulgátorů. Jejich základem jsou takové hydrofobní masti, v nichž jsou přítomny emulgátory typu voda v oleji (v/o), jako jsou alkoholy tuku z ovčí vlny, estery sorbitanu, monoacylglyceroly a mastné alkoholy nebo emulgátory typu olej ve vodě (o/v), jako jsou sulfátované mastné alkoholy, polysorbáty, ethery cetostearamakrogolu nebo estery mastných kyselin s makrogoly.

#### *Hydrofilní masti*

Hydrofilní masti jsou přípravky se základem mísitelným s vodou. Základ je obvykle tvořený směsí tekutých a tuhých makrogolů (polyethylenglykolů). Mohou obsahovat přiměřené množství vody.

## Cremores

### Krémy

#### DEFINICE

Krémy jsou vícefázové přípravky obsahující lipofilní a vodnou fázi.

#### *Hydrofobní krémy*

Hydrofobní (lipofilní) krémy mají jako kontinuální (vnější) fázi lipofilní fázi. Obvykle obsahují emulgátory typu voda v oleji (v/o), jako jsou alkoholy tuku z ovčí vlny, estery sorbitanu a monoacylglyceroly.

#### *Hydrofilní krémy*

Hydrofilní krémy mají jako kontinuální (vnější) fázi vodnou fázi. Obsahují emulgátory typu olej ve vodě (o/v), jako jsou sodná nebo trolaminová mýdla, sulfátované mastné alkoholy, polysorbáty a kombinace polyoxylovaných mastných kyselin a esterů mastných alkoholů, je-li třeba, kombinované s emulgátory typu voda v oleji (v/o).

## Gelata

### Gely

#### DEFINICE

Gely jsou tvořeny tekutinami, které gelovají za přítomnosti vhodných gelotvorných látek.

#### *Hydrofobní gely*

Hydrofobní (lipofilní) gely (oleogely) jsou přípravky, jejichž základ obvykle sestává z tekutého parafinu s polyethylenem nebo mastnými oleji tvořícími gel s koloidním oxidem křemičitým nebo s oxidem hlinitým nebo zinečnatým mýdlem.

#### *Hydrofilní gely*

Hydrofilní gely (hydrogely) jsou přípravky, jejichž základ obvykle sestává z vody, glycerolu nebo propylenglykolu tvořícími gel se vhodnou gelotvornou látkou, jako jsou poloxamery, škrob, deriváty celulosy, karbomery a křemičitano-hlinité.

## Pastae

### Pasty

#### DEFINICE

Pasty jsou polotuhé přípravky pro kožní použití obsahující vysoký podíl pevné látky jemně dispergované v základu.

**Cataplasmata****Kataplazmata**

## DEFINICE

Kataplazmata jsou tvořena hydrofilním základem zadržujícím teplo, ve kterém jsou dispergované pevné nebo tekuté léčivé látky. Obvykle se roztírají v silné vrstvě na vhodnou tkaninu a před aplikací se zahřívají.

**Emplastra medicata****Náplasti s léčivy**

## DEFINICE

Jsou to pružné přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k podání na kůži. Zajišťují udržení léčivé látky (léčivých látek) v těsném kontaktu s kůží tak, že se může pomalu vstřebávat nebo může mít ochranný nebo keratolytický účinek.

Náplasti s léčivy jsou tvořené přilnavým základem, který může být zbarven a může obsahovat jednu nebo více léčivých látek, rozetřeným ve stejnoměrné vrstvě na vhodném přírodním nebo syntetickém nosiči. Nepůsobí dráždivě ani nezvyšují citlivost kůže. Přilnavá vrstva je krytá vhodným ochranným obalem, který se před použitím odstraňuje. Při odstranění této ochranné vrstvy nedojde k odtržení přípravku od vnějšího nosiče.

Náplasti s léčivy se dodávají v různých velikostech ve vztahu k jejich použití nebo se mohou před použitím odstříhnout z větších částí. Náplasti s léčivy se jemně přitlačí na kůži a mohou se odstranit bez poškození kůže nebo odtržení přípravků od vnějšího nosiče.

## ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** K prokázání vhodného uvolňování léčivé látky se použijí vhodné zkoušky, např. popsané ve stati *Zkouška disoluce transdermálních náplastí (2.9.4)*.

**Emplastra cutanea****Kožní náplasti**

## DEFINICE

Jsou to pružné přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k podání na kůži. Zajišťují udržení léčivé látky (léčivých látek) v těsném kontaktu s kůží tak, aby mohly působit lokálně.

Kožní náplasti jsou tvořené přilnavým základem, který může být zbarven a může obsahovat jednu nebo více léčivých látek, rozetřeným ve stejnoměrné vrstvě na vhodném přírodním nebo syntetickém podkladu. Přilnavý základ nepůsobí dráždivě ani nezvyšují citlivost kůže. Přilnavá vrstva je krytá vhodným ochranným obalem, který se před použitím náplasti odstraňuje. Při odstranění této ochranné vrstvy nedojde k odtržení přípravku od vnějšího podkladu.

Kožní náplasti se dodávají v různých velikostech ve vztahu k jejich použití. Náplasti s léčivy pevně ulpí na kůži, když

se k ní jemně přitlačí a mohou být odstraněny bez poškození kůže nebo odtržení přípravků od vnějšího podkladu.

## ZKOUŠENÍ

**Disoluce.** K prokázání vhodného uvolňování léčivé látky se použijí vhodné zkoušky, např. popsané ve stati *Zkouška disoluce transdermálních náplastí (2.9.4)*.

**PULVERES ADSPERSORII****6.3:1166****Zásypy**

*Synonymum.* Pulveres ad usum dermicum

*Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahují se požadavky tohoto článku na zásypy určené pro veterinární použití.*

## DEFINICE

Jsou to přípravky tvořené pevnými sypkými suchými částicemi různého stupně rozdrobnění. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich a, je-li třeba, barviva schválená oprávněnou autoritou.

Zásypy jsou jednodávkové (dělené) nebo vícedávkové (nedělené) přípravky. Jsou bez větších shluků částic. Zásypy určené na otevřené rány nebo na silně poškozenou kůži jsou sterilní.

Vícedávkové zásypy se mohou dodávat v obalech se sypcím víčkem, obalech s mechanickým rozprašovačem nebo v tlakových obalech.

Zásypy balené v tlakových obalech vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu (0523)*.

Obaly pro zásypy vyhovují, kde je to vhodné, požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*.

## VÝROBA

Při výrobě zásypů se přijmou opatření k zajištění vhodné velikosti částic se zřetelem k určenému použití.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci zásypů se používají vhodné prostředky k zajištění jejich mikrobiální jakosti; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití (5.1.4)*.

Sterilní zásypy se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a k zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků (5.1.1)*.

## ZKOUŠENÍ

**Jemnost.** Kde je to předepsáno, stanoví se jemnost zásypu pomocí síť (2.9.35) nebo jinou vhodnou metodou.

**Stejneměrnost dávkových jednotek.** Jednodávkové zásypy vyhovují zkoušce na stejneměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedeným zkouškám na obsahovou stejneměrnost a/nebo hmotnostní stejneměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se

nevztahují na rostlinné drogy a léčivé přípravky z rostlinných drog v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové zásypy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Jednodávkové zásypy vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových přípravků. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Sterilita (2.6.1).** Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že je přípravek určen pro zevní použití;
- kde je to vhodné, že je přípravek sterilní.

## PULVERES PERORALES

6.0:1165

### Perorální prášky

*Požadavky na prášky používané k přípravě perorálních roztoků nebo suspenzí jsou uvedeny v článku Liquida peroralia (0672). Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahují se požadavky tohoto článku na perorální prášky určené pro veterinární použití.*

#### DEFINICE

Jsou to přípravky tvořené pevnými sypkými suchými částicemi různého stupně rozdrobnění. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich a, je-li třeba, barviva schválená oprávněnou autoritou a aromatické přísady. Perorální prášky se zpravidla podávají rozpuštěné nebo dispergované ve vodě nebo jiné vhodné tekutině. Mohou se také polykat přímo. Jsou to jednodávkové nebo vícedávkové přípravky.

Obaly pro perorální prášky vyhovují, kde je to vhodné, požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*. Vícedávkové perorální prášky jsou opatřeny odměrkou umožňující podání předepsané dávky. Každá dávka jednodávkového prášku je v samostatném obalu, např. v sáčku nebo v lahvičce.

#### VÝROBA

Při výrobě perorálních prášků se přijmou opatření k zajištění vhodné velikosti částic se zřetelem k určenému použití.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci perorálních prášků se používají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální jakosti; příslušná doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Dělené jednodávkové perorální prášky vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, jednodávkové perorální prášky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více než jednu léčivou látku, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Jednodávkové perorální prášky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Hmotnostní stejnoměrnost jednotlivých dávek ve vícedávkových obalech (2.9.27).** Perorální prášky dodávané ve vícedávkových obalech vyhovují zkoušce.

#### SKLADOVÁNÍ

Obsahuje-li přípravek těkavé látky nebo musí-li být obsah obalů dobře chráněné, skladuje se ve vzduchotěsných obalech.

## Pulveres effervescentes

### Šumivé prášky

*Synonymum.* Šumivé práškové směsi

#### DEFINICE

Jsou to jednodávkové nebo vícedávkové přípravky obsahující obvykle kyselé látky a uhlíčitany nebo hydrogenuhličitan, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpuštění nebo dispergování ve vodě před podáním.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## RECTALIA

6.0:1145

### Rektální přípravky

#### DEFINICE

Jsou to přípravky určené k rektálnímu podání s místním nebo systémovým účinkem, nebo podávané k diagnostickým účelům.

Obaly pro rektální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů* (3.1 a příslušné části) a *Obaly* (3.2 a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů rektálních přípravků:

- čípky;
- rektální tobolky;
- rektální roztoky, emulze a suspenze;
- prášky a tablety pro rektální roztoky a suspenze;
- polotuhé rektální přípravky;
- rektální pěny;
- rektální tampony s léčivý.

#### VÝROBA

Při vývoji rektálního přípravku obsahujícího protimikrobní látku se má k uspokojení oprávněné autority prokázat nezbytnost použití a účinek této látky. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v dané formulaci přípravku je popsána ve statí *Účinnost protimikrobních konzervačních látek* (5.1.3).

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu tekutého a polotuhého rektálního přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci rektálních přípravků se vhodnými způsoby zajišťuje jejich mikrobiální jakost; odpovídající doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků* (5.1.4).

Při výrobě polotuhých a tekutých rektálních přípravků obsahujících dispergované částice se přijmou opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro dané použití.

#### ZKOUŠENÍ

**Stejněměrnost dávkových jednotek.** Tekuté a polotuhé jednodávkové přípravky vyhovují zkoušce. Pevné/tuhé jednodávkové přípravky vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost** (2.9.6). Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, pevné/tuhé jednodávkové lékové formy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A (tablety) nebo zkoušce B (čípky, rektální tobolky) na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových přípravků. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, vztahuje se požadavek zkoušky jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnoměrnost** (2.9.5). Pevné/tuhé jednodávkové lékové formy vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost. Je-li předepsána pro všechny léčivé látky zkouška na obsahovou stejnoměrnost, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z tuhých jednodávkových přípravků, např. *Zkouška disoluce tuhých lipofilních lékových forem* (2.9.42).

Provádí-li se zkouška Disoluce, nevyžaduje se zkouška Rozpadavost.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede název každé přidané protimikrobní látky.

## Suppositoria

### Čípky

#### DEFINICE

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky. Tvarem, velikostí a konzistencí jsou vhodné pro rektální podání.

Čípky obsahují jednu nebo více léčivých látek dispergovaných nebo rozpuštěných ve vhodném čípkovém základu, který může být rozpustný nebo dispergovatelný ve vodě nebo může tát při teplotě těla. Je-li třeba, mohou se přidat pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, látky s adsorpčními vlastnostmi, povrchově aktivní látky, kluzné látky, protimikrobní látky a barviva schválená oprávněnou autoritou.

#### VÝROBA

Čípky se připravují lisováním nebo litím. Je-li třeba, léčivá látka (léčivé látky) se předem rozdrobní a nechá se projít vhodným sítem. Jsou-li čípky připravované litím, lije se dostatečně teplem roztavená hmota s léčivými látkami do vhodných forem. Následným ochlazením čípky ztuhnou. Pro tento způsob přípravy jsou vhodné různé pomocné látky, jako např. tvrdý tuk, makrogoly, kakaový olej a různé gelotvorné směsi tvořené např. želatinou, vodou a glycerolem. Stanoví se doba deformace lipofilních čípků (2.9.22).

Z přípravků s řízeným uvolňováním nebo s prodlouženým místním účinkem se použije vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Při výrobě čípků, obsahujících dispergovanou léčivou látku (léčivé látky) se přijmou opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.2). Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce. Čípky s lipofilním základem se kontrolují po 30 min a čípky se základem rozpustným ve vodě se kontrolují po 60 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

## Capsulae rectales

### Rektální tobolky

*Synonymum.* Rektální kapsle

#### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky obecně podobné měkkým tobolkám popsaným v článku *Capsules* (0016), od nichž se liší možností použití kluzných látek k potažení. Jsou protáhlého tvaru, hladké a mají jednotný vzhled.

#### VÝROBA

Z přípravku s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem se použije vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.2). Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce. Rektální tobolky se hodnotí po 30 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

**Solutiones, emulsiones et suspensiones rectales**

Rektální roztoky, emulze a suspenze

*Synonymum.* Klyzmata

## DEFINICE

Jsou to tekuté přípravky určené k rektálnímu podání s celkovým nebo místním účinkem nebo k diagnostickým účelům.

Jsou dodávány v jednodávkových obalech a obsahují jednu nebo více léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vodě, glycerolu, makrogolech nebo v jiných vhodných rozpouštědlech. V emulzích se mohou oddělovat fáze, které jsou protřepáním znovu snadno homogenizovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který se snadno roztřepe; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby se umožnilo podání správné dávky.

Rektální roztoky, emulze a suspenze mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě viskozity přípravku, úpravě a stabilizaci pH, zvýšení rozpustnosti léčivé látky (léčivých látek) nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek nebo nejsou v použitých koncentracích příčinou přílišné místní dráždivosti.

Rektální roztoky, emulze a suspenze se dodávají v obalech o obsahu 2,5 ml až 2000 ml. Obal je upraven k rektálnímu podání přípravku, nebo je přiložen vhodný aplikátor.

**Pulveres et tabulettae rectales pro solutionibus et suspensionibus**

Prášky a tablety pro rektální roztoky a suspenze

## DEFINICE

Jsou to jednodávkové přípravky, které se rozpouštějí nebo dispergují ve vodě nebo jiném vhodném rozpouštědle těsně před podáním. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění nebo dispergování nebo k zabránění shlukování částic.

Po rozpouštění nebo dispergování vyhovují požadavkům na rektální roztoky nebo rektální suspenze, podle toho, co je vhodné.

## ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). Tablety pro rektální roztoky nebo suspenze vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek za použití *vody R* při teplotě 15 °C až 25 °C. Při zkoušce se použije šest tablet, stav tablet se hodnotí po 3 min. Tablety vyhovují zkoušce, když se všech šest tablet rozpadne.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

– způsob přípravy rektálního roztoku nebo suspenze;

– podmínky a doba skladování roztoku nebo suspenze po přípravě.

**Rectalia semisolidia**

Polotuhé rektální přípravky

## DEFINICE

Jsou to masti, krémy nebo gely. Jsou často dodávány jako jednodávkové přípravky v obalech se vhodným aplikátorem.

Polotuhé rektální přípravky vyhovují požadavkům článku *Praeparata semisolidia ad usum cutaneum* (0132).

**Spumae rectales**

Rektální pěny

## DEFINICE

Rektální pěny vyhovují požadavkům článku *Spumae medicatae* (1105).

**Tampona rectalia**

Rektální tampony

## DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k zavedení do dolní části konečníku na určenou dobu.

Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata* (1155).

**SPUMAE MEDICATAE**

6.0:1105

Léčivé pěny

*Synonyma.* Musci medicati, Pěny s léčivý

*Doplňující požadavky pro léčivé pěny různých typů uvádějí další obecné články, např. Rectalia (1145), Vaginalia (1164) a Liquida ad usum dermicum (0927).*

## DEFINICE

Jsou to přípravky tvořené velkým objemem plynu dispergovaného v tekutině. Obsahují zpravidla jednu nebo několik léčivých látek, povrchově aktivní látku umožňující tvorbu pěny a různé další pomocné látky. Léčivé pěny jsou zpravidla určeny k aplikaci na kůži nebo sliznice.

Léčivé pěny se obvykle tvoří při aplikaci tekutých přípravků z tlakového obalu. Tlakový obal je vybavený ventilem a rozprašovačem zajišťujícím vznik pěny.

Léčivé pěny určené k použití na silně poškozenou kůži a na velké otevřené rány jsou sterilní.

Léčivé pěny dodávané v tlakovém obalu vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu* (0523).

## VÝROBA

Sterilní léčivé pěny se vyrábějí za použití materiálů a metod zajišťujících sterilitu a zabráňujících kontaminaci a množení mikroorganismů; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků (5.1.1)*.

## ZKOUŠENÍ

**Relativní hustota pěny.** Tlakový obal se udržuje nejméně 24 h při teplotě asi 25 °C. Při manipulaci je třeba přípravek chránit před zahřátím. K výstupu tlačítka ventilu rozprašovače na pěnu se připojí pevná trubička délky 70 mm až 100 mm a vnitřního průměru asi 1 mm. Obalem se zatřepe, aby se zajistila homogenita tekuté fáze, a 5 ml až 10 ml pěny se odstříkne do odpadu. Odváží se miska s plochým dnem o objemu asi 60 ml a výšky asi 35 mm a konec trubičky připojené k výstupu tlačítka ventilu se přiloží ke dnu misky a za krouživého pohybu se po stlačení ventilu miska rovnoměrně naplní pěnou. Jakmile pění ustane, zároveň se povrch pěny vhodnou stěrkou a přebytek pěny se odstraní. Vážením se potom určí hmotnost pěny a hmotnost stejného objemu vody *R* naplněné do misky.

Relativní hustota pěny je dána vzorcem:

$$\frac{m}{e},$$

v němž značí:

*m* – hmotnost pěny zkoušeného přípravku v gramech;

*e* – hmotnost stejného objemu vody *R* v gramech.

Zkouška se provede třikrát. Žádný z výsledků se neliší od průměrné hodnoty o více než 20 %.

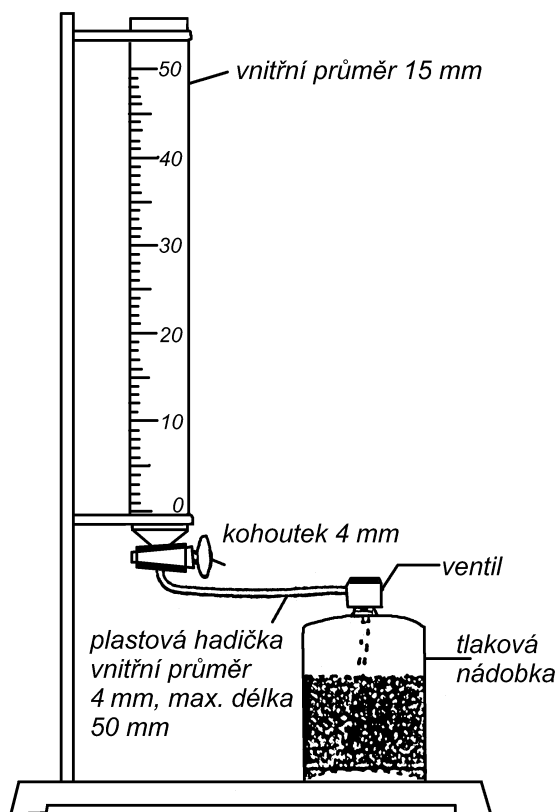
**Doba napěnění.** Zařízení (viz obrázek 1) tvoří byreta na 50 ml o vnitřním průměru 15 mm s dělením po 0,1 ml uzavřená jednocestným kohoutem s otvorem 4 mm. Vyznačení objemu odpovídajícímu 30 ml je nejméně 210 mm nad osou kohoutu. Dolní část byrety se spojí s výstupem rozprašovače na pěnu pomocí plastové hadičky dlouhé nejvýše 50 mm o vnitřním průměru 4 mm. Tlakový obal se před měřením udržuje nejméně 24 h při teplotě asi 25 °C. Nesmí se ohřát na vyšší teplotu. S obalem se zatřepe, aby se tekutá fáze zhomogenizovala, a 5 ml až 10 ml pěny se odstříkne do odpadu. Po připojení výstupu z rozprašovače k výpusti byrety se jedním stlačení ventilu vystříkne asi 30 ml pěny. Kohout se uzavře a současně se začne odečítat čas. Sledují se změny objemu pěny v byretě. Každých 10 s se zaznamená zvětšující se objem až do největšího objemu.

Zkouška se provede třikrát. Žádný z časů potřebných k dosažení největšího objemu není delší než 5 min.

**Sterilita (2.6.1).** Přípravek označený jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné, že přípravek je sterilní.



Obr. 1 Zařízení pro stanovení doby napěnění

## STYLI

6.0:1154

## Tyčinky

*Doplňující požadavky pro tyčinky různých typů lze nalézt v dalších obecných člancích, např. Nasalia (0676).*

## DEFINICE

Jsou to pevné přípravky k místnímu podání. Jsou válcovitého nebo kónického tvaru a obsahují jednu nebo více léčivých látek. Léčivé látky mohou být rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném základu, který se rozpustí nebo taje při teplotě těla.

Uretrální tyčinky a tyčinky určené ke vložení do ran jsou sterilní.

## VÝROBA

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tyčinek se využívají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty. Příslušná doporučení jsou provedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

Uretrální a jiné sterilní tyčinky se vyrábějí pomocí materiálů a metod zajišťujících sterilitu a zabráňujících kontaminaci a množení mikroorganismů. Příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Metody přípravy sterilních výrobků (5.1.1)*. Při výrobě tyčinek se využívají způsoby zajišťující, aby přípravek vyhověl zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost nebo, kde je to vhodné, zkoušce na obsahovou stejnoměrnost.



## ZKOUŠENÍ

**Sterilita (2.6.1).** Uretrální tyčinky a tyčinky určené ke vložení do ran vyhovují zkoušce na sterilitu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- množství léčivé látky (léčivých látek) v jedné tyčince;
- u uretrálních tyčinek a tyčinek určených ke vložení do ran, že přípravek je sterilní.

## TABULETTAE

6.0:0478

## Tablety

*Synonymum.* Compressi

*Požadavky tohoto článku se nevztahují nutně na přípravky, které jsou označeny jako tablety, ale jsou podávány jinak než perorálně. Požadavky na tyto přípravky lze, kde je to vhodné, nalézt v jiných obecných člancích, např. Rectalia (1145), Vaginalia (1164) a Oromucosalia (1807). Požadavky tohoto článku se nevztahují na pastilky, perorální pasty a perorální gumy. Kde je to zdůvodněno a schváleno, nevztahují se požadavky tohoto článku na tablety pro veterinární použití.*

## DEFINICE

Jsou to pevné přípravky s obsahem jedné dávky jedné nebo více léčivých látek v jedné tabletě. Získávají se slisováním stejných objemů částic nebo jiným vhodným výrobním postupem, jako je vytlačování (extruze), formování nebo lyofilizace. Jsou určeny k perorálnímu podání. Některé tablety se polykají celé, některé po rozžvýkání, některé se před podáním rozpouštějí nebo dispergují ve vodě a některé se ponechají v ústech, kde se z nich uvolňuje léčivá látka.

Částice jsou tvořeny jednou nebo více léčivými látkami s pomocnými látkami nebo bez nich. Pomocnými látkami jsou plniva, pojiva, zvlhčovačla, rozvolňovačla, látky ovlivňující tokové vlastnosti, kluzné látky, látky modifikující chování přípravku v trávicím traktu, barviva schválená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady.

Tablety jsou obvykle válcovitého tvaru, ploché nebo čokovitě, hrany mohou být zkosené. Mohou mít rýhy k usnadnění jejich rozdělení a mohou být označeny nápisem nebo značkami. Tablety mohou být obalené.

Obaly pro tablety, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1)* a příslušné části) a *Obaly (3.2)* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů tablet pro perorální podání:

- neobalené tablety;
- obalené tablety;
- šumivé tablety;
- tablety pro přípravu roztoku;
- dispergovatelné tablety;
- perorální tablety dispergovatelné v ústech;
- enterosolventní tablety;
- tablety s řízeným uvolňováním;
- tablety pro použití v ústech;

– perorální lyofilizáty.

## VÝROBA

Tablety se obvykle vyrábějí lisováním stejných objemů částic nebo shluků částic vyrobených granulačními metodami. Při výrobě tablet se přijmou opatření k zajištění vhodné mechanické pevnosti, aby se při zacházení s nimi zabránilo jejich drobení nebo lámání. To se může prokázat zkouškami *Oděr neobalených tablet (2.9.7)* a *Pevnost tablet (2.9.8)*. Žvýkací tablety se vyrábějí tak, aby se dosáhlo jejich vhodných vlastností pro tento způsob podání.

*Dělení tablet.* Tablety mohou mít jednu nebo více dělicích rýh k rozdělení do částí, které umožní snadnější podání léčivého přípravku nebo soulad s daným dávkováním.

Ve druhém případě musí být dělení tablet zhodnoceno a schváleno oprávněnou autoritou. Schopnost dělicí rýhy (rýh) zajistit, že pacient obdrží určenou dávku, se musí vyhodnotit v průběhu vývoje přípravku ve vztahu k hmotnostní stejnoměrnosti rozdělených částí. Každá schválená dávka přípravku se musí ověřit následující zkouškou.

Namátkově se odebere 30 tablet, které se ručně rozdělí podél dělicích rýh. Z každé tablety se odebere ke zkoušce jedna oddělená část, druhá část nebo ostatní části dané tablety se vyřadí. Jednotlivě se zváží každá ze 30 odebraných částí a vypočítá se průměrná hmotnost. Tablety vyhovují zkoušce, pokud nejvýše jedna jednotlivá hmotnost je mimo limit 85 % až 115 % průměrné hmotnosti. Tablety nevyhovují zkoušce, pokud je více než jedna jednotlivá hmotnost mimo tento limit, nebo pokud je jedna jednotlivá hmotnost mimo limit 75 % až 125 % průměrné hmotnosti.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tablet se používají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou uvedena ve statí *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

## ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek.** Tablety vyhovují zkoušce na stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnoměrnost a/nebo hmotnostní stejnoměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnoměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, vyhovují tablety s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti zkoušce A. Obsahuje-li přípravek více než jednu léčivou látku, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, obalené tablety, jiné než filmem potažené tablety, vyhovují zkoušce A bez ohledu na to, kolik obsahují léčivé látky (léčivých látek).

**Hmotnostní stejnoměrnost (2.9.5).** Neobalené tablety a, není-li zdůvodněno a schváleno jinak, filmem potažené tablety vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána nebo zdůvodněna a schválena pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

**Disoluce.** Vhodnou zkouškou se prokáže příslušné uvolňování léčivé látky (léčivých látek), např. jednou ze zkoušek popsaných ve stati *Zkouška disoluce pevných lékových forem* (2.9.3).

V případě, že je předepsána zkouška disoluce, nevyžaduje se zkouška rozpadavosti.

## Tablettaa non obductaa

### Neobalené tablety

#### DEFINICE

Jsou to jednovrstevné tablety vzniklé prostým lisováním částic a vícevrstevné tablety skládající se ze soustředných nebo souběžných vrstev získaných postupným lisováním částic různého složení. Použité pomocné látky nejsou výslovně určeny k řízení uvolňování léčivé látky v trávicích tekutinách.

Neobalené tablety odpovídají obecné definici tablet. Na lomu pozorovaném pod lupou je patrná buď poměrně stejnoměrná struktura (jednovrstevné tablety), nebo vrstevnatá struktura (vícevrstevné tablety), ale nejsou patrné žádné známky obalování.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). Neobalené tablety vyhovují zkoušce za použití *vody R* jako média. Do každé trubice se přidá disk. Pístroj se uvede do chodu na 15 min, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, a potom se kontroluje stav tablet. Pokud tablety nevyhovují zkoušce, protože se přilepily na disky, jsou výsledky neplatné. Zkouška se opakuje s dalšími šesti tabletami bez disků.

*U žvýkacích tablet se tato zkouška nevyžaduje.*

## Tablettaa obductaa

### Obalené tablety

*Synonyma.* Obalované tablety, Dražé, Potahované tablety

#### DEFINICE

Obalené tablety jsou tvořené jádry pokrytými jednou nebo více vrstvami směsí různých látek, jako jsou přírodní nebo syntetické pryskyřice, gumy, želatina, neaktivní a nerozpustná plniva, cukry, změkčovadla, polyoly, vosky, oprávněnou autoritou schválená barviva, někdy chuťové a aromatické přísady a léčivé látky. Látky určené k obalování jsou obvykle nanášeny ve formě roztoků nebo suspenzí za podmínek umožňujících odpaření rozpouštědla. Je-li obalovou vrstvou velmi tenká vrstva polymeru, jedná se o filmem potažené tablety.

Obalené tablety mají hladký povrch, který je často zbarven a může být leštěný. Na lomu pozorovaném pod lupou je patrné jádro obklopené jednou nebo více souvislými vrstvami rozdílné struktury.

#### VÝROBA

Kde je to zdůvodněno, může být hmotnostní stejnoměrnost nebo obsahová stejnoměrnost obalených tablet, jiných než

filmem potažených tablet, stanovena kontrolou jejich jader před obalením.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Obalené tablety, jiné než filmem potažené, vyhovují následující zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (2.9.1) za použití *vody R* jako média. Do každé trubice se přidá disk. Pístroj se uvede do chodu na 60 min, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, a potom se kontroluje stav tablet. Pokud se některá tableta nerozpadla, opakuje se zkouška s dalšími šesti tabletami a místo *vody R* se použije *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS*.

Filmem potažené tablety vyhovují výše uvedené zkoušce s tím rozdílem, že pístroj se uvede do chodu na 30 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

Pokud obalené nebo filmem potažené tablety nevyhovují zkoušce, protože se přilepily na disky, jsou výsledky neplatné. Zkouška se opakuje s dalšími šesti tabletami bez disků.

*U obalených žvýkacích tablet se tato zkouška nevyžaduje.*

## Tablettaa effervescentes

### Šumivé tablety

#### DEFINICE

Jsou to neobalené tablety, zpravidla obsahující kyselé látky a uhličitany nebo hydrogenuhličitany, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpuštění nebo dispergaci ve vodě před podáním.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Jedna tableta se umístí do nádoby s 200 ml *vody R* při 15 °C až 25 °C a sleduje se vznik bublinek. Když se zastaví uvolňování plynu z tablety nebo jejích částí, tableta je rozpadlá, a to buď rozpuštěná, nebo dispergovaná ve vodě tak, že nezbyly žádné shluky částic. Zkouška se opakuje s dalšími pěti tabletami. Tablety vyhovují zkoušce, když se každá ze šesti tablet rozpadla za popsaných podmínek do 5 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

## Tablettaa pro solutione

### Tablety pro přípravu roztoku

*Synonymum.* Rozpustné tablety

#### DEFINICE

Jsou to neobalené nebo filmem potažené tablety, které jsou určeny k rozpuštění ve vodě před podáním. Vzniklý roztok může slabě opalizovat v závislosti na vlastnostech pomocných látek použitých při výrobě tablet.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). Tablety pro přípravu roztoku se rozpadají do 3 min za použití *vody R* při teplotě 15 °C až 25 °C.

## Tablettaa pro dispersione

### Dispergovatelné tablety

*Synonymum.* Tablety pro přípravu disperze

#### DEFINICE

Jsou to neobalené nebo filmem potažené tablety určené před podáním k dispergaci ve vodě za vzniku homogenní disperze.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). Tablety pro přípravu disperze se rozpadají do 3 min za použití vody R při teplotě 15 °C až 25 °C.

**Jemnost disperze.** Do 100 ml vody R se vloží dvě tablety a míchá se, dokud nejsou zcela dispergované. Vznikne rovnoměrná disperze, která projde sítím (710 µm).

## Tablettaa perorales pro dispersione

### Perorální tablety dispergovatelné v ústech

#### DEFINICE

Jsou to neobalené tablety, které se po vložení do úst rychle dispergují ještě před jejich spolknutím.

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). Perorální tablety dispergovatelné v ústech se rozpadají do 3 min.

## Tablettaa cum liberatione modificata

### Tablety s řízeným uvolňováním

#### DEFINICE

Jsou to obalené nebo neobalené tablety připravené pomocí vybraných pomocných látek nebo vybraných postupů, nebo kombinací obou tak, aby se dosáhlo vhodné rychlosti, místa nebo času uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

Tablety s řízeným uvolňováním zahrnují tablety s prodlouženým uvolňováním, tablety se zpožděným uvolňováním a tablety s pulzním uvolňováním.

#### VÝROBA

Použijí se vhodné zkoušky k prokázání požadovaného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

## Tablettaa enterosolventes

### Enterosolventní tablety

*Synonymum.* Acidorezistentní tablety

#### DEFINICE

Jsou to tablety se zpožděným uvolňováním, odolné vůči žaludeční tekutině a uvolňující léčivou látku (léčivé látky) ve střevní tekutině. Obvykle se připravují z granulí nebo částic již potažených enterosolventním obalem, nebo v určitých

případech potahem tablet enterosolventním obalem (enterosolventně obalené tablety).

Tablety s enterosolventním obalem odpovídají definici obalených tablet.

#### VÝROBA

U tablet připravených z granulí nebo částic s enterosolventním obalem se použije vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek).

#### ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost** (2.9.1). U tablet s enterosolventním obalem se zkouška provede s následujícími úpravami. Jako médium se použije kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS. Přístroj bez disků se uvede do chodu na 2 h nebo na jinou zdůvodněnou a schválenou dobu a potom se zkontroluje stav tablet. Doba rezistence vůči kyselému prostředí se mění podle složení zkoušených tablet. Obvykle jsou to 2 h až 3 h, ale ani při schválení odchylky není doba menší než 1 h. Žádná tableta nevykazuje známky buď rozpadu (kromě úlomků obalu), nebo praskliny, které by umožnily únik obsahu. Pak se kyselina nahradí tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,8 a do každé trubice se přidá disk. Přístroj se uvede do chodu na 60 min a potom se zkontroluje stav tablet. Pokud tablety nevyhovují zkoušce, protože se přilepily na disky, jsou výsledky neplatné. Zkouška se opakuje s dalšími šesti tabletami bez disků.

**Disoluce.** K určení příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z tablet, které byly vyrobeny z granulí nebo částic s enterosolventním obalem, se použije vhodná zkouška, např. popsaná ve stati *Zkouška disoluce pevných léčivých forem* (2.9.3).

## Tablettaa orales

### Orální tablety

*Synonymum.* Tablety působící v dutině ústní

#### DEFINICE

Jsou to obvykle neobalené tablety. Jejich složení napomáhá k pomalému uvolňování a místnímu účinku léčivé látky (léčivých látek) nebo k uvolňování a vstřebávání léčivé látky (léčivých látek) v definované části úst. Vyhovují požadavkům článku *Oromucosalia* (1807).

## Lyophilisata peroralia

### Perorální lyofilizáty

#### DEFINICE

Jsou to pevné přípravky určené buď pro podání do úst, nebo k dispergování (nebo k rozpuštění) ve vodě před podáním.

#### VÝROBA

Perorální lyofilizáty se získávají obvykle z vodných, tekutých nebo polotuhých přípravků vymrazováním (lyofilizací). Postup zahrnuje rozdělení do jednotlivých dávek, zmrazení, sublimaci a sušení.

## ZKOUŠENÍ

**Rozpadavost.** Jeden perorální lyofilizát se umístí do nádoby se 200 ml vody R při 15 °C až 25 °C. Lyofilizát se rozpadne do 3 min. Zkouška se opakuje s dalšími pěti perorálními lyofilizáty. Perorální lyofilizáty vyhovují zkoušce, jestliže se všech šest rozpadlo do 3 min.

**Voda (2.5.12).** Perorální lyofilizáty vyhovují zkoušce; limity schvaluje oprávněná autorita.

## TAMPONA MEDICATA

6.0:1155

## Tampony s léčivý

*Synonymum.* Léčivé tampony

*Doplňující požadavky na tampony s léčivý různých typů jsou uvedeny v dalších obecných člancích, např. Rectalia (1145), Vaginalia (1164) a Auricularia (0652).*

## DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené ke vložení do tělních dutin na omezenou dobu. Jsou tvořené vhodným materiálem, jako je celulóza, kolagen nebo silikon, impregnovaným jednou nebo více léčivými látkami.

## VÝROBA

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tamponů s léčivý se využívá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede množství léčivé látky (léčivých látek) v jednom tamponu.

## VAGINALIA

6.0:1164

## Vaginální přípravky

## DEFINICE

Jsou to tekuté, polotuhé nebo pevné/tuhé přípravky určené k podání do pochvy, zpravidla k místnímu účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném základu.

Obaly pro vaginální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí *Materiály používané na výrobu obalů (3.1 a příslušné části)* a *Obaly (3.2 a příslušné části)*.

Rozlišuje se několik druhů vaginálních přípravků:

- vaginální kuličky;
- vaginální tablety;
- vaginální tobolky;
- vaginální roztoky, emulze a suspenze;
- tablety pro přípravu vaginálních roztoků a suspenzí;
- polotuhé vaginální přípravky;
- vaginální pěny;
- vaginální tampony s léčivý.

## VÝROBA

Při vývoji se musí prokázat, že z obalu tekutého a polotuhého vaginálního přípravku dodávaného v jednodávkovém obalu lze odebrat jmenovitý obsah.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci vaginálních přípravků se používají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (5.1.4)*.

## ZKOUŠENÍ

**Stejnóměrnost dávkových jednotek (2.9.40).** Tekuté a polotuhé jednodávkové vaginální přípravky vyhovují zkoušce. Pevné/tuhé jednodávkové přípravky vyhovují zkoušce na stejnóměrnost dávkových jednotek nebo, kde je to zdůvodněno a schváleno, dále uvedené zkoušce na obsahovou stejnóměrnost a/nebo hmotnostní stejnóměrnost. Ustanovení tohoto odstavce se nevztahují na rostlinné drogy a rostlinné léčivé přípravky v dávkové formě.

**Obsahová stejnóměrnost (2.9.6).** Není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak, pevné/tuhé jednodávkové přípravky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A (vaginální tablety) nebo zkoušce B (vaginální kuličky, vaginální tobolky) na obsahovou stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

**Hmotnostní stejnóměrnost (2.9.5).** Pevné/tuhé jednodávkové přípravky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnóměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnóměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, nevyžaduje se zkouška na hmotnostní stejnóměrnost.

**Disoluce.** Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) z pevných/tuhých jednodávkových přípravků, např. jedna ze zkoušek uvedených ve statích *Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem (2.9.3)* nebo *Zkouška disoluce tuhých lipofilních lékových forem (2.9.42)*.

Provádí-li se zkouška Disoluce, nevyžaduje se zkouška Rozpadavost.

## Globuli vaginales

## Vaginální kuličky

*Synonyma.* Globuli, Suppositoria vaginalia, Poševní kuličky

## DEFINICE

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky různého tvaru, obvykle vejčitého. Mají objem a konzistenci vhodné k podání do pochvy. Obsahují jednu nebo více léčivých látek, které jsou dispergované nebo rozpuštěné ve vhodném základu, který může být rozpustný nebo dispergovatelný ve vodě nebo tající při teplotě těla. Kde je to nutné, mohou se přidat pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, adsorbenty, povrchové aktivní látky, kluzné látky, protimikrobní látky a barviva schválená oprávněnou autoritou.

**VÝROBA**

Vaginální kuličky se obvykle vyrábějí litím do formy. Kde je to vhodné, přijmou se opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic léčivé látky (léčivých látek). Je-li třeba, nechá se léčivá látka (léčivé látky) předem projít vhodným sítem.

Jsou-li vaginální kuličky připravovány litím, lije se dostatečně teplem roztavená hmota s léčivými látkami do vhodných forem. Ochlazením vaginální kuličky ztuhnou. Pro tento způsob přípravy je vhodné použít různé pomocné látky, jako je tvrdý tuk, makrogoly, kakaový olej a různé gely tvorné směsi tvořené např. želatinou, vodou a glycerolem. Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) u přípravků s prodlouženým místním účinkem.

**ZKOUŠENÍ**

**Zkouška rozpadavosti (2.9.2).** Pokud se nejedná o přípravky s prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků. Hodnotí se stav vaginálních kuliček po 60 min, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

**Tablettae vaginales****Vaginální tablety****DEFINICE**

Jsou to pevné jednodávkové přípravky. Obvykle odpovídají definici neobalených nebo potahovaných tablet uvedené v článku *Tablettae (0478)*.

**VÝROBA**

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) u přípravků s prodlouženým místním účinkem.

**ZKOUŠENÍ**

**Rozpadavost (2.9.2).** Pokud se nejedná o přípravky s prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků (speciální metodě pro vaginální tablety). Hodnotí se stav vaginálních tablet po 30 min, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

**Capsulae vaginales****Vaginální tobolky**

*Synonymum.* Vaginální kapsle

**DEFINICE**

Jsou to pevné jednodávkové přípravky. Jsou podobné měkkým tobolkám obecně definovaným v článku *Capsulae (0016)*, od nichž se liší velikostí a tvarem. Vaginální tobolky mají různý tvar, nejčastěji vejčitý, jsou hladké a mají jednotný vzhled.

**VÝROBA**

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (léčivých látek) u přípravků s prodlouženým místním účinkem.

**ZKOUŠENÍ**

**Rozpadavost (2.9.2).** Pokud se nejedná o přípravky s prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků. Hodnotí se stav vaginálních tobolek po 30 min, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

**Solutiones, emulsiones et suspensiones vaginales****Vaginální roztoky, emulze a suspenze****DEFINICE**

Jsou to tekuté přípravky určené k podání do pochvy k místnímu účinku, k výplachům nebo k diagnostickým účelům. Mohou obsahovat vhodné pomocné látky, např. látky k úpravě viskozity přípravku, úpravě a stabilizaci pH, látky zvyšující rozpustnost léčivé látky (léčivých látek) nebo látky zvyšující stabilitu přípravku. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek přípravku nebo nejsou v použitých koncentracích příčinou přílišné místní dráždivosti.

Vaginální emulze mohou vykazovat oddělování fází, protřepáním jsou znovu snadno homogenizovatelné. Vaginální suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztrpět; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo možno podat homogenní přípravek.

Vaginální roztoky, emulze a suspenze se dodávají v jednodávkových obalech. Obal je upraven k podání přípravku do pochvy, nebo je přiložen vhodný aplikátor.

**VÝROBA**

**Při výrobě vaginálních suspenzí** se přijmou opatření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic s ohledem na daný způsob použití.

**Tablettae pro solutione aut suspensione vaginali****Tablety pro přípravu vaginálních roztoků a suspenzí****DEFINICE**

Jsou to jednodávkové přípravky, které se před podáním rozpouštějí nebo dispergují ve vodě. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění nebo dispergace a k zabránění shlukování.

S výjimkou zkoušky na rozpadavost vyhovují tablety pro přípravu vaginálních roztoků a suspenzí článku *Tablettae (0478)*.

Po přípravě rozpuštěním nebo dispergací vyhovují, podle toho, co je vhodné, požadavkům na vaginální roztoky nebo vaginální suspenze.

**ZKOUŠENÍ**

**Rozpadavost (2.9.1).** Tablety pro přípravu vaginálních roztoků nebo suspenzí vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek za použití vody R při teplotě 15 °C až 25 °C. Při

zkoušce se použije šest tablet, tablety se hodnotí po 3 min. Tablety vyhovují zkoušce, když se všech šest rozpadlo.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- způsob přípravy vaginálních roztoků nebo suspenzí;
- podmínky a doba skladování vaginálních roztoků nebo suspenzí po přípravě.

### **Vaginalia semisolida**

#### Polotuhé vaginální přípravky

##### DEFINICE

Jsou to masti, krémy nebo gely. Jsou často dodávány jako jednodávkové přípravky. Obaly jsou opatřené vhodným aplikátorem.

Polotuhé vaginální přípravky vyhovují požadavkům článku *Praeparata semisolida ad usum cutaneum (0132)*.

### **Spumae vaginales**

#### Vaginální pěny

##### DEFINICE

Vyhovují požadavkům článku *Spumae medicatae (1105)*.

### **Tampona vaginalia**

#### Vaginální tampony

##### DEFINICE

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k zavedení do pochvy na určenou dobu.

Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata (1155)*.

**Články**  
**(monografie)**

# VAKCÍNY PRO HUMÁNNÍ POUŽITÍ

## BCG AD IMMUNOCURATIONEM

6.3:1929

### BCG pro imunoterapii

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující živé bakterie získané z kultury bacila Calmettova a Guérinova (*Mycobacterium bovis* BCG), jehož terapeutická schopnost byla prokázána.

Přípravek vyhovuje požadavkům článku *Vaccinae ad usum humanum* (0153).

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Přípravek vyrábí pracovní skupina složená ze zdravých osob, které nepracují s jiným infekčním agens; především nemají pracovat s virulentními kmeny *Mycobacterium tuberculosis* ani nemají být vystaveni známému riziku nákazy tuberkulózou a jsou pravidelně vyšetřováni na tuberkulózu. Přípravek je citlivý na sluneční světlo a postupy jeho výroby jsou uspořádány tak, aby všechny výrobky byly při všech stupních výroby, zkoušení a skladování chráněny před přímým slunečním světlem a ultrafialovým zářením.

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup má prokazatelně zajišťovat výrobu shodného přípravku, který se může použít pro léčbu povrchové formy rakoviny močového měchýře a je bezpečný. Vyrábí se z kultur, které pocházejí z matečného inokula při co nejmenším možném počtu subkultur, v každém případě nejvýše z osmi. Během těchto subkultur se přípravek lyofilizuje nejvýše jedenkrát.

Použije-li se bioluminiscenční zkouška nebo jiná biochemická metoda místo stanovení počtu životaschopných zárodků, metoda se validuje proti metodě stanovení počtu životaschopných zárodků pro každý výrobní stupeň, ve kterém se použije.

##### INOKULA

Kmen pro matečné inokulum se vybere a udržuje tak, aby se zachovaly jeho charakteristiky, jeho schopnost předcházet a léčit povrchovou formu rakoviny močového měchýře a také, aby byl relativně nepatogenní pro člověka a laboratorní zvířata. Kmen se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jeho původu a následném zacházení s ním.

Z primární pracovní kultury se připraví vhodná šarže, která se uchovává jako porovnávací přípravek. Je-li připraveno nové pracovní inokulum, provedou se u šarže z něho připravené vhodné zkoušky na pozdní přecitlivělost na morčatech; šarže se prokazatelně neliší ve své účinnosti od porovnávacího přípravku. Provede se také zkouška citlivosti na protimikrobní látky.

Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se použije pro pomnožení.

**Totožnost.** Pomocí mikrobiologických metod, které mohou být doplněny metodami molekulární biologie (např. technikou amplifikace nukleových kyselin a polymorfie délky restrikčních fragmentů) se prokáže, že bakterie v pracovním inokulu jsou bakterie *Mycobacteri bovis* BCG.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml. Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce na sterilitu, kromě přítomnosti mykobakterií.

**Virulentní mykobakterie.** Pracovní inokulum se zkouší postupem uvedeným v odstavci Zkoušky na čistotu; použije se deset morčat.

##### POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZENĚ

Bakterie se pomnoží ve vhodné živné půdě nejdéle 21 dnů v povrchové nebo hloubkové kultuře. Živná půda neobsahuje složky, o nichž je známo, že u člověka způsobují toxickou nebo alergickou reakci nebo že způsobují přeměnu bakterií na kmen virulentní pro morčata. Kultura se sklídí a suspenduje se ve sterilní živné půdě, která chrání životnost kultury, což se určí vhodnou metodou stanovení počtu životaschopných zárodků.

##### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka se připraví z jedné sklizně nebo spojením jednotlivých sklizní. Může se přidat stabilizátor. Jestliže stabilizátor ruší stanovení koncentrace bakterií v konečné várce, provede se toto stanovení ještě před přidáním stabilizátoru.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml. Konečná várka vyhovuje zkoušce na sterilitu, kromě přítomnosti mykobakterií.

**Počet životaschopných zárodků.** Stanovení počtu životaschopných zárodků v mililitru se provede na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušený přípravek nebo vhodnou biochemickou metodou. Současně se provede toto stanovení s referenčním přípravkem stejného kmene.

**Koncentrace bakterií.** Celková koncentrace bakterií se stanoví vhodnou metodou buď přímo stanovením bakteriální hmoty, nebo nepřímo zákalovou metodou kalibrovanou podle množství mikroorganismů. Je-li bakteriální koncentrace stanovena před přidáním stabilizátoru, stanoví se koncentrace v konečné várce přepočtem. Celková koncentrace bakterií je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

Poměr počtu životaschopných zárodků k celkové koncentraci bakterií není nižší než poměr schválený pro daný přípravek.

##### ŠARŽE

Konečná várka se rozplní do sterilních obalů a lyofilizuje se tak, aby zbytková vlhkost byla vhodná pro stabilitu přípravku. Obaly se uzavřou buď ve vakuu, nebo v atmosféře inertního plynu.



Doba použitelnosti může být nejvýše 4 roky od data sklizně, kromě případu, kdy se naplněné a uzavřené obaly skladují při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší.

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedeným požadavkům na počet životaschopných zárodků a jednotlivým požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Počet životaschopných zárodků, se může uvolnit k použití. Jestliže zkouška Virulentní mykobakterie byla u konečné várky provedena s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vynechat.

**Počet životaschopných zárodků.** Počet životaschopných zárodků v mililitru rekonstituovaného přípravku se stanoví na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušený přípravek nebo vhodnou biochemickou metodou. Poměr počtu životaschopných zárodků před a po lyofilizaci není nižší než hodnota schválená pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost zkoušeného přípravku se prokáže mikroskopickým vyšetřením na přítomnost acidorezistentních bacilů v obarvených nátěrech a kultivaci na pevných půdách růstem kolonií charakteristického vzhledu. Alternativně se mohou použít metody molekulární biologie (např. amplifikace nukleových kyselin).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Virulentní mykobakterie.** Každému ze šesti morčat o hmotnosti 250 g až 400 g, jimž nebyla podána látka, která by mohla ovlivnit tuto zkoušku, se subkutánně nebo intramuskulárně podá množství přípravku odpovídající 1/25 jedné lidské dávky. Zvířata se pozorují nejméně 42 dnů. Po uplynutí této doby se morčata šetrně usmrtí a při pitvě se hledají známky infekce tuberkulózou. Menší reakce v místě vpichu se nehodnotí. Zvířata, která uhynou během doby pozorování, se také vyšetřují na tuberkulózu. Přípravek vyhovuje zkoušce, pokud žádné ze zvířat nevykazuje známky infekce tuberkulózou a pokud během sledovaného období neuhyne víc než jedno morče. Jestliže během sledovaného období uhynou dvě morčata a pitvou se neprokáže tuberkulóza, zkouška se opakuje na dalších šesti morčatech. Přípravek vyhovuje, jestliže během 42 dnů po podání neuhyne více než jedno morče a pitva neprokáže žádné známky tuberkulózy.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1), kromě přítomnosti mykobakterií.

**Voda.** Nejvýše limit schválený pro daný přípravek; stanoví se vhodnou metodou.

#### STANOVENÍ POČTU ŽIVOTASCHOPNÝCH ZÁRODKŮ

Počet životaschopných zárodků v rekonstituovaném přípravku se stanoví na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušený přípravek nebo vhodnou validovanou biochemickou metodou. Počet je v rozmezí uvedeném v označení na obalu. Současně se stanoví počet životaschopných zárodků v porovnávacím přípravku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální a maximální počet životaschopných zárodků v jedné lidské dávce rekonstituovaného přípravku;
- že přípravek se musí chránit před přímým slunečním světlem.

### VACCINUM ANTHRACIS ADSORBATUM AB COLATO CULTURARUM AD USUM HUMANUM

6.0:2188

Vakcína proti sněti slezinné adsorbovaná  
připravená z filtrátů kultur pro humánní použití

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antigeny *Bacillus anthracis* vystražené síranem draselno-hlinitým. Antigeny se připravují ze sterilních filtrátů kultur neopouzdřeného kmene *B. anthracis*, buď nevirulentního nebo atenuovaného.

Hlavními virulentními složkami *B. anthracis* jsou pouzdra z kyseliny polyglutamové a dva binární (dvousložkové) anthraxové toxiny, jmenovitě letální toxin a edémový (edemogenní) toxin, které vznikají vzájemnou kombinací letálního faktoru (LF) a edémového faktoru (EF) s protektivním antigenem (PA).

Letální faktor je na zinku dependentní endopeptidasa a edémový faktor je účinný kalmodulin a na vápníku dependentní adenylátcyklasa. Bezbuněčné kultury *B. anthracis* obsahují protektivní antigen a protože exprese genů pro tři toxinové složky je vzájemně regulována, je přítomen také letální faktor a edémový faktor. Kromě toho obsahuje vakcína pravděpodobně mnoho dalších antigenů *B. anthracis*, včetně membránových bílkovin, vyprodukovaných bílkovin, cytoplazmatických bílkovin, peptidoglykanů, nukleových kyselin a cukrů.

#### VÝROBA

##### OBEČNÁ USTANOVENÍ

Kultury jsou řízeny v systému jednotné inokulace. Vakcinační kmen je toxigenní, ale chybí plazmid s geny nezbytnými pro syntézu pouzdra, hlavního faktoru virulence.

Výrobní metoda musí prokazatelně poskytovat stejnorodou a účinnou vakcínu, která vyhovuje požadavkům na bezpečnost a účinek, který je přiměřený, nebo stejný jako u předchozích šarží. Vakcína musí prokázat úroveň ochrany proti virulentnímu kmeni *B. anthracis* na vhodném zvířecím modelu infekce, která je stejná nebo větší než úroveň ochrany referenční vakcíny. Vakcína nesmí vykazovat vyšší toxicitu než referenční vakcína.

Výrobní postup a stabilita šarže a důležitých meziproductů se hodnotí za použití jedné nebo více indikátorových zkoušek. Tyto zkoušky zahrnují účinnost a specifickou toxicitu a mohou se podpořit zkouškami potvrzujícími přítomnost významných antigenů a skupinových bílkovin. Propouštění a určení doby použitelnosti se zakládá na výsledcích stabilitních zkoušek, aby se zaručila uspokojivá jakost výrobku v průběhu schválené doby použitelnosti.

## INOKULA

Použitý atenuovaný neopouzdržený kmen *B. anthracis* se identifikuje vývojovými záznamy, včetně informací o jeho původu, následném zacházení s ním a zkouškách použitých pro charakteristiku kmene. Tyto informace zahrnují morfolo- gické, kultivační, biochemické a genetické vlastnosti kmene. Pouze matečné inokulum nebo, kde je to vhodné, pracovní inokula vyhovující následujícím zkouškám, se mohou použít.

**Totožnost.** V každém inokulu se prokáže přítomnost *Bacillus anthracis*.

**Fenotypové ukazatele.** U každého inokula musí být známý biochemický a enzymatický profil a vývojové záznamy dokládající nepřítomnost rezistence na antibiotika.

**Mikrobiální čistota.** Každé inokulum vyhovuje požadav- kům na nepřítomnost kontaminujících mikroorganismů. Čistota bakteriálních kultur se ověřuje metodami vhodné citlivosti.

**Zkouška virulence.** U každého inokula se prokáže nepřítomnost bakteriálního pouzdra barvením podle McFadyena a zkouškou Specifická neškodnost (edémová zkouška).

## REFERENČNÍ PŘÍPRAVKY

Účinnost a neškodnost várky vakcíny se ověří za použití referenčních standardů, které jsou odvozeny z reprezentativ- ních šarží vakcín. Tyto šarže jsou široce charakterizovány z hlediska jejich zamýšleného použití a skladují se ve vhod- ných dávkách za podmínek zajišťujících jejich stabilitu.

## POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZEŇ

Atenuovaný kmen se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se ověřuje čistota kultury. Kulti- vační živná půda se oddělí od bakteriální hmoty filtrací. Hodnota pH filtrátu se stanoví po zředění roztokem *chlori- du sodného R* (0,9 g/l), pohybuje se v limitech vhodných pro stabilitu. Vhodnou zkouškou se prokáže nepřítomnost živého *B. anthracis*, včetně spor. V tomto stupni se může přidat síran draselno-hlinitý nebo jiné alternativní adjuvans. K suspenzi vytvářející purifikovanou sklizeň se může přidat protimikrobní látka.

Pouze purifikovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Imunologická totožnost.** Přítomnost protektivního antige- nu *B. anthracis* se ověří vhodnou imunochemickou meto- dou (2.7.1).

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množ- ství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou me- todou.

## KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví aseptickým zředěním purifikované sklizeň sterilním roztokem chloridu sodného. Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se použije k výrobě šarže.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

## ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených skleněných ampulek, které se zataví tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhoví všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Stanovení účinnosti, Specifická neškodnost (edémová zkouška) a zkouška Protimikrobní látka provede- ny u purifikované sklizeň s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přítomnost protektivního antigenu *B. anthracis* se ověří vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zkouška na neškodnost.** Každé z nejméně deseti zdravých myši o hmotnosti 70 g až 22 g se podá intraperitoneálně nejvýše čtyřnásobek lidské dávky a zvířata se 7 dnů pozorují. Vakcína vyhovuje, jestliže žádné ze zvířat neprojevuje známky onemocnění.

**Specifická neškodnost (edémová zkouška).** Použijí se nejméně dva králíci na jednu zkoušku. Připraví se sériová dvojnásobná ředění vakcíny v roztoku chloridu sodného odpovídající násobkům jedné lidské dávky: 4, 2, 1, 0,5, 0,25. Intradermálně se podá 0,1 ml každého ředění zkouše- né a referenční vakcíny do oholených boků obou králíků. Každé zvíře dostane deset předem připravených injekcí (pět ředění zkoušené vakcíny a pět ředění referenční vakcíny). Jednomu z králíků se podají zvyšující se koncentrace od předu dozadu, druhému naopak. Zvířata se pozorují 24 h, zda se v místě vpichu objeví edematická reakce. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže edematická reakce na zkoušenou vakcínu není větší než reakce na referenční vakcínu. Alter- nativně se po provedené validaci může použít specifické *in vitro* stanovení letálního faktoru a stanovení aktivity adeny- látkytklasy.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účin- né množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v ozna- čení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou che- mickou metodou.

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Stanovení účinnosti vakcíny proti sněti slezinné se provádí porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat proti intra- dermální čelenži virulentním kmenem *B. anthracis* s dáv- kou vhodného referenčního přípravku, který poskytuje stej- nou ochranu. Použije se devět skupin po nejméně 16 sa- micích morčat vážících 250 g až 350 g. Připraví se čtyři ředění vakcíny a referenčního přípravku obsahující po 1,5, 0,5, 0,17 a 0,05 násobku lidské dávky v 0,5 ml. Každé sku- pině se přidělí jedno ředění a každému zvířeti ze skupiny se podá subkutánně 0,5 ml příslušného ředění. Zbývající sku- pině zvířat, která je určena k ověření čelenžní dávky, se podá 0,5 ml roztoku chloridu sodného. Injekce se znovu opakují po jednom týdnu. Sedm dnů po druhé injekci se každému morčeti podá intradermálně 2000 spor virulentní-

ho kmene *B. anthracis* (Vollum) v 0,1 ml. Zvířata se pozorují 10 dnů a zaznamená se počet úmrtí ve skupině. Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna zvířata v kontrolní skupině uhynou během 5 dnů po čelenži. Účinnost vakcíny, vztažená k referenčnímu přípravku, se vypočítá pomocí obvyklých statistických metod (5.3) za použití poměru přeživších zvířat v každé vakcinované skupině.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- relativní stanovená účinnost přesáhne hodnotu 1,0 nebo
- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) relativní stanovené účinnosti zahrnuje hodnotu 1,0 a dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 50 % stanovené účinnosti.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, že vakcína nesmí zmrznout.

## VACCINUM CHOLERAЕ

6.0:0154

### Vakcína proti choleře

#### DEFINICE

Je to přípravek tvořený homogenní suspenzí vhodného kmene nebo kmenů *Vibrio cholerae* obsahující nejméně  $8 \times 10^9$  bakterií v lidské dávce. Lidská dávka nepřevyšuje 1,0 ml.

#### VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Vakcína obsahuje směs stejných částí připravených z kmenů v S-fázi růstu dvou hlavních sérologických typů Inaba a Ogawa. Oba typy mohou být klasického biotypu buď s biotypem El-Tor, nebo bez něho. Přípravek může obsahovat jeden kmen nebo více kmenů každého typu. Všechny kmeny musí obsahovat kromě svých O-antigenů také termostabilní O-antigen společný typům Inaba a Ogawa. Jestliže se použije více kmenů než po jednom kmenu od typů Inaba a Ogawa, mohou se vybrat tak, aby obsahovaly jiné O-antigeny navíc. Světová zdravotnická organizace doporučuje nové kmeny, které se mohou, je-li třeba, použít v souladu s platnými předpisy signatářských států Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu. V souladu s požadavky očkovacích certifikátů pro mezinárodní cestování musí vakcína obsahovat nejméně  $8 \times 10^9$  organismů klasického biotypu.

Každý kmen se pomnožuje odděleně. Bakterie se inaktivují buď zahříváním suspenze (např. 1 h při 56 °C), nebo působením formaldehydu nebo fenolu, či kombinací fyzikálních a chemických metod.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9): podá se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost se prokazuje specifickými aglutinačními zkouškami.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Fenol** (2.5.15). Nejvýše 5 g/l; zkouší se u přípravků, u nichž se fenol použil při výrobě.

**Tvorba protilátek.** Zkouší se schopnost vyvolat tvorbu protilátek (např. aglutinačních, vibriocidních nebo hemaglutinačních) u morčat, králíků nebo myši. Zkoušený přípravek se podá skupině nejméně šesti zvířat. Na konci období, které je pro maximální tvorbu protilátek třeba, stanoveného při předběžných zkouškách se zvířatům odebere sérum a jednotlivě se vhodnými metodami titrují příslušné protilátky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže každý sérotyp vyvolal významnou protilátkovou odpověď.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- použitá metoda inaktivace bakterií;
- počet bakterií v jedné lidské dávce.

## VACCINUM CHOLERAЕ CRYODESICCATUM

6.0:0155

### Vakcína proti choleře lyofilizovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen nebo kmeny *Vibrio cholerae*. Rekonstituován podle návodu v označení na obalu tvoří stejnorodou suspenzi obsahující nejméně  $8 \times 10^9$  bakterií v lidské dávce. Lidská dávka nepřevyšuje 1,0 ml rekonstituované vakcíny.

#### VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Vakcína obsahuje směs stejných částí připravených z kmenů dvou hlavních sérologických typů Inaba a Ogawa v S-fázi růstu. Oba typy mohou být klasického biotypu buď s biotypem El-Tor, nebo bez něho. Přípravek může obsahovat jeden kmen nebo více kmenů každého typu. Všechny kmeny musí obsahovat kromě svých O-antigenů také termostabilní O-antigen společný typům Inaba a Ogawa. Jestliže se použije více kmenů než po jednom kmenu od typů Inaba a Ogawa, mohou se vybrat tak, aby obsahovaly jiné O-antigeny navíc. Světová zdravotnická organizace doporučuje nové kmeny, jež se mohou, je-li třeba, použít v souladu s platnými předpisy signatářských států Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu. V souladu s požadavky očkovacích certifikátů pro mezinárodní cestování musí vakcína obsahovat nejméně  $8 \times 10^9$  organismů klasického biotypu. Každý kmen se pomnožuje odděleně. Bakterie se inaktivují buď zahříváním suspenze (např. 1 h při 56 °C), nebo působením formaldehydu, nebo kombinací fyzikálních a chemických metod. Fenol se při výrobě nepoužívá. Vakcína se plní do sterilních nádobek a lyofilizuje se, až obsah vlhkosti dosáhne hodnoty příznivé pro stabilitu vakcíny. Nádobky se pak uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškod-

nost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9): podá se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přípravek se rekonstruuje podle návodu uvedeného v označení na obalu a jeho totožnost se prokáže specifickými aglutinačními zkouškami.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Fenol** (2.5.15). Nejvýše 5 g/l; zkouší se u přípravků, u nichž se fenol použil při výrobě.

**Tvorba protilátek.** Zkouší se schopnost vyvolat tvorbu protilátek (např. aglutinačních, vibriocidních nebo hemaglutinačních) u morčat, králíků nebo myší. Rekonstituovaný zkoušený přípravek se podá skupině nejméně šesti zvířat. Na konci období, které je zapotřebí pro maximální tvorbu protilátek, stanoveného při předběžných zkouškách, se zvířatům odebere sérum a příslušné protilátky se jednotlivě titrují vhodnými metodami. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže každý sérotyp vyvolal významnou protilátkovou odpověď.

**Sterilita** (2.6.1). Rekonstituovaný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- metoda použitá k inaktivaci bakterií;
- počet bakterií v lidské dávce.

## VACCINUM CHOLERAE PERORALE INACTIVATUM

6.0:2327

### Vakcína proti choleře perorální inaktivovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující homogenní suspenzi inaktivovaných vhodných kmenů *Vibrio cholerae*, antigenní skupiny O1 reprezentující sérotypy a biotypy epidemických kmenů. Vakcína může obsahovat podjednotku B cholerového toxinu (CTB). Těsně před použitím se jedna dávka suspenze vakcíny promíchá s vhodným tlumivým roztokem, jak je uvedeno v označení na obalu.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní metoda se musí validovat, aby výtěžnost vakcín byla srovnatelná s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Výrobní postup se musí validovat, aby se prokázalo, že v přípravku nejsou klinicky významná množství aktivního toxinu.

##### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Vakcína je tvořena směsí epidemických kmenů *V. cholerae* inaktivovaných vhodnou metodou, např. působením tepla nebo působením formaldehydu. Všechny kmeny tvoří lipopolysacharid (LPS) v S-fázi růstu. B cholerový toxin se připravuje rekombinantní DNA technologií v kmenech, kte-

ré nemají gen pro produkci podjednotky A cholerového toxinu (*ctxA*). Vybrané kmeny *V. cholerae* produkují cholerový toxin o nízké toxicitě.

Světová zdravotnická organizace může doporučit kmeny nebo antigeny, které se mohou, je-li třeba, použít v souladu s platnými předpisy signatářských států Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu.

#### INOKULA

Použité kmeny *V. cholerae* se mají identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu kmenů a následném zacházení s nimi. Charakterizace a udržování rekombinantních kmenů a plazmidů používaných ve výrobě rekombinantních podjednotek B cholerového toxinu (rCTB) a původ genů podjednotky B cholerového toxinu (*ctxB*) se dokumentují. Potvrdí se stabilita plazmidu rekombinantní podjednotky B cholerového toxinu v rekombinantním kmenu v průběhu skladování a také počty pasáží použitých ve výrobě.

Provedou se charakterizace rekombinantní podjednotky B cholerového toxinu za použití různých zkušebních metod, včetně určení velikosti molekuly, náboje a složení aminokyselin. Metody vhodné k těmto účelům zahrnují elektroforesu v polyakrylamidovém gelu za použití natrium-dodecyl-sulfátu (SDS-PAGE) nebo různé typy kapalinové chromatografie. Totožnost se potvrdí přinejmenším částečným N- nebo C-koncovým sekvenováním.

Matečná inokula se pomnožují na agarových půdách, které mohou obsahovat vhodná antibiotika. Kolonie použité k produkci pracovního inokula jsou prosté antibiotik. Kultury odvozené z pracovního inokula musí mít stejné charakteristiky jako kultury kmenů, ze kterých pochází matečné inokulum.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě monovalentní buněčné sklizně.

**Totožnost.** Matečná inokula se identifikují vyšetřením morfologie kolonie a biochemickými charakteristikami za použití vhodných molekulárních stanovení nebo imunostanovení. Pracovní inokula se identifikují vyšetřením morfologie kolonie a vhodnými molekulárními stanoveními nebo imunostanoveními.

**Čistota.** Čistota matečného a pracovního inokula se ověří metodami o vhodné citlivosti.

#### POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZEŇ

Každý kmen se pomnožuje odděleně z matečného inokula.

Kultury se kontrolují v různých stádiích fermentace (subkultur a základní kultury) na čistotu, totožnost, buněčnou opacitu, hodnotu pH a biochemické charakteristiky. Nevyhovující kultury se musí odstranit.

Produkce kultur má prokázat shodnost ve vztahu k rychlosti růstu, hodnotě pH a výtěžnosti buněk nebo buněčných produktů.

#### MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ BUNĚK

Může se použít pouze monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Hodnota pH** (2.2.3). Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost.** Vhodnými imunologickými nebo biochemickými stanoveními se ověří významné antigenní charakteristiky.

**Čistota.** Vzorky kultur se hodnotí mikroskopicky barvením podle Grama, očkovaním na vhodné pomnožovací půdy nebo jiným vhodným způsobem.

**Opacita.** Absorbance (2.2.25) měřená při 600 nm je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### INAKTIVOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ BUNĚK

Inaktivace se zahájí co nejdříve po přípravě, aby se omezila možnost kontaminace. Bakterie se inaktivují po promytí buď působením formaldehydu, nebo teplem za podmínek, které inaktivaci zajistí.

Pouze inaktivovaná monovalentní sklizeň buněk, která vyhovuje zavedeným specifikacím pro následující zkoušky se může použít k přípravě konečné várky.

**Hodnota pH** (2.2.3). Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost.** Ověří se aglutinací na sklech.

**Inaktivace.** Kompletní (plná) inaktivace se ověří vhodnou pomnožovací metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Opacita.** Inaktivační proces může ovlivnit přesnost měření opacity.

**Čistota.** Vzorky kultur se hodnotí mikroskopicky barvením podle Grama, očkovaním na vhodné pomnožovací půdy nebo jiným vhodným způsobem.

**Obsah S-lipopolysacharidu.** Ověří se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Zbytkový choleroxyn toxin.** Nepřítomnost zbytkového choleroxyn toxinu se ověří vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo biochemickým stanovením účinnosti.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Pokud se formaldehyd použil k inaktivaci, stanoví se jeho obsah.

#### PURIFIKOVANÝ REKOMBINANTNÍ B CHOLEROVÝ TOXIN

Produkce rekombinantního B choleroxyn toxinu se řídí směnicemi pro zajištění jakosti farmaceutických a biologických výrobků připravovaných rekombinantní technologií a vyhovuje požadavkům článku *Producta ab ADN recombinante* (0784). Před sklizní se bakteriální buňky kontrolují na čistotu a opacitu. Rekombinantní B choleroxyn toxin se sklídí vhodnou filtrací, koncentruje se diafiltrací, chromatograficky se purifikuje, sterilně se filtruje a uchovává se za vhodných podmínek. Hodnota pH spojeného eluátu se upraví před promícháním s vhodným tlumivým roztokem.

Pouze rekombinantní B choleroxyn toxin, který vyhovuje zavedeným specifikacím pro následující zkoušky se může použít k přípravě konečné várky.

**Hodnota pH** (2.2.3). Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Čistota.** Ověří se elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (2.2.31) za použití natrium-dodecyl-sulfátu (SDS-PAGE) nebo kapalinovou chromatografií (2.2.29).

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Rekombinantní B choleroxyn toxin.** Určí se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví asepticky promícháním monovalentních sklizní buněk s vhodným tlumivým roztokem. Může se přidat vhodné množství rekombinantního B choleroxyn toxinu, pokud se používá. V tomto stupni se mohou přidat protimikrobní látky.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se promíchá, aby byla homogenní, a plní se asepticky do vhodných obalů.

Pouze šarže, která vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek a každému požadavku uvedenému v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Sérotypy se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo molekulární metodou. Rekombinantní B choleroxyn toxin se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Stanovení účinnosti antigenních látek může být také současně zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Účinnost antigenních látek.** Množství S-lipopolysacharidu a kde je to vhodné, množství rekombinantního B choleroxyn toxinu jsou v rozmezí schváleném pro daný přípravek; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- způsob inaktivace;
- antigenní skupina, sérotypy a biotypy kmenů použitých pro výrobu vakcíny;
- počet bakterií v jedné lidské dávce;
- množství rekombinantního B choleroxyn toxinu.

## VACCINUM DIPHtherIAE ADSORBATUM

6.0:0443

Vakcína proti záškrtu adsorbovaná

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující difterický toxoid adsorbovaný na minerální adsorbent. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury mikroba *Corynebacterium diphtheriae*.

### VÝROBA

#### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

**Specifická neškodnost.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje. Pokud uhynie z nespécifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

#### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO TOXOIDU

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxoin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a, kde je třeba, obnovuje ji novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a následného zacházení se pěstuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci pomnožování se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxoin od bakteriální hmoty. Pro sledování shodnosti výroby se kontroluje (2.7.27) obsah toxinu (Lf v mililitru). Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky purifikovaného toxinu spojit. Toxoin se purifikuje, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce. Purifikovaný toxoin se detoxikuje formaldehydem metodou, která zabrání poškození imunogenity toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxoin, zvláště působením tepla. Purifikaci lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky přípravku se může použít pouze várka purifikovaného toxoidu, který vyhovuje dále uvedeným požadavkům.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### Nepřítomnost difterického toxinu a nevratnost toxoidu.

Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez adsorbentu, se připraví roztok purifikovaného toxoidu o obsahu 100 Lf/ml. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, jedna část se udržuje při  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  a druhá část při  $37^\circ\text{C}$  po dobu šesti týdnů. U obou vzorků se provede zkouška na přítomnost aktivního difterického toxinu na Vero buňkách (v množství 50  $\mu\text{l}$  na jamku). Vzorek nemá obsahovat protimikrobní látky a koncentrace de-

toxikačních látek by měla být nižší než toxická koncentrace pro Vero buňky. Nespécifická toxicita se odstraní dialýzou. Použijí se čerstvě trypsinizované Vero buňky vhodné koncentrace, např.  $2,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  a referenční difterický toxoin naředěný na koncentraci 100 Lf/ml difterického toxoidu. Vhodný referenční difterický toxoin obsahuje buď nejméně 100 LD<sub>50</sub>/ml, nebo 67 až 133 Ir/100 v 1 Lf a 25 000 až 50 000 minimálních dávek reagujících na kůži morčete v 1 Lf jednotce (jako referenční toxoin je vhodné použít *difterický toxoin BRP*). Toxoin o obsahu 100 Lf/ml difterického toxoidu se naředí na vhodnou koncentraci, např.  $2 \times 10^{-4}$  Lf/ml. Připraví se dvojmo sériová ředění ředěného difterického toxinu a zkoušený vzorek bez ředění (50  $\mu\text{l}$  na jamku) a ta se nakapou do jamek sterilní destičky pro tkáňové kultury s obsahem živné půdy vhodné pro pomnožování Vero buněk. Paralelně se připraví ředění toxinu neutralizovaného vhodnou koncentrací difterického antitoxinu, např. 100 m. j./ml. K prokázání normálního růstu buněk se na každou destičku zařadí kontrolní jamky bez toxoidu nebo toxinu a netoxický toxoid o obsahu 100 Lf/ml. Do každé jamky se přidá suspenze buněk, destičky se uzavřou a inkubují 5 až 6 dnů při  $37^\circ\text{C}$ . Cytotoxický efekt se hodnotí jako úplná metabolická inhibice Vero buněk signalizovaná indikátorem změny hodnoty pH živné půdy. Cytopatický efekt se potvrdí mikroskopicky nebo vhodným barvením, jako je např. MTT. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže referenční toxoin v množství  $5 \times 10^{-5}$  Lf/ml ve 100 Lf/ml toxoidu nevyvolá cytopatický efekt na Vero buňkách nebo jestliže toto množství toxinu není neutralizováno difterickým antitoxinem. Várka purifikovaného toxoidu vyhovuje, jestliže ani v jednom vzorku není zjištěna toxicita neutralizovatelná antitoxinem.

**Antigenní čistota (2.7.27).** Nejméně 1500 Lf v miligramu bílkovinného dusíku.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství purifikovaného toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možné přidat vhodné protimikrobní látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní účinnost a nesmějí se tedy použít.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaného toxoidu nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace roztoku byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

## VACCINUM DIPHtherIAE, CUM CONTENTO REDUCTO ANTIGENI, ADSORBATUM

6.0:0646

Vakcína proti záškrtu, se sníženým obsahem antigenu, adsorbovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, antigeniis minutum, adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující difterický toxoid adsorbovaný na minerální adsorbent. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury mikroba *Corynebacterium diphtheriae*. Oprávněné autoritě se má doložit, že použité množství difterického toxoidu nepůsobí nežádoucí účinky u jedinců těch věkových skupin, pro které je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

**Specifická neškodnost.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla před tím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinasobek jedné lidské dávky uvedený v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespecifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

##### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO TOXOIDU

Várka purifikovaného toxoidu se připraví tak, jak je popsáno v článku *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)* a vyhovuje jeho požadavkům.

##### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství purifikovaného toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možné přidat vhodné protimikrobní látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu a nesmějí se tedy použít.

K výrobě konečné šarže přípravku se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** Obsah je v rozmezí 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

##### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití se může uvolnit pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaného toxoidu nebo u konečné várky a bylo prokázáno, že obsah formaldehydu u šarže není vyšší než 0,2 g/l, může se u konečné šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Provede se zkouška totožnosti vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý nedává uspokojivý výsledek, provede se tato zkouška: 15 ml zkoušeného přípravku se odstředí, sediment se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *dínatrum-edetátu R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (90 g/l) (1 + 49). Udrží se nejméně 6 h při 37 °C a potom se odstředí. Čirá supernatantní tekutina reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se jedna z předepsaných metod stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM DIPHtherIAE ET TETANI ADSORBATUM

6.0:0444

### Vakcína proti záškrtu a tetanu adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs difterického a tetanického toxoidu adsorbovanou na minerální adsorbent. Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinasobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespecifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

##### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO DIFTERICKÉHO A TETANICKÉHO TOXOIDU

Várky purifikovaných toxoidů difterie a tetanu se připraví tak, jak je popsáno v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443) a *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452) a vyhovují jejich požadavkům.

##### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství purifikovaného difterického toxoidu a tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možné přidat vhodné protimikrobní látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu a nesmějí se tedy použít.

K výrobě šarže se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

##### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.



Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných toxoidů nebo u konečné várky a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek každé složky v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se před použitím musí roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM DIPHtherIAE ET TETANI, CUM CONTENTO REDUCTO ANTIGENI(ORUM), ADSORBATUM

6.0:0647

Vakcína proti záškrtu a tetanu, se sníženým obsahem antigenu(ů), adsorbovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae et tetani, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs difterického a tetanického toxoidu adsorbovanou na minerální adsorbent. Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*. Oprávněné autoritě se má doložit, že použité množství difterického toxoidu nepůsobí nežádoucí účinky u jedinců těch věkových skupin, pro které je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla před tím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinašobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespecifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

##### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO DIFTERICKÉHO A TETANICKÉHO TOXOIDU

Várka purifikovaných toxoidů difterie a tetanu se připraví tak, jak je popsáno v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)* a *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)* a vyhovuje jejich požadavkům.

##### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství purifikovaného difterického toxoidu a tetanického toxoidu na minerální nosič, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možné přidat vhodné protimikrobní látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu a nesmějí se tedy použít. K výrobě šarže přípravku se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** Obsah je v rozmezí 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**ŠARŽE**

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití se může uvolnit pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkoušky Protimikrobní látky a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaného toxoidu nebo u konečné várky a bylo prokázáno, že obsah formaldehydu u šarže není vyšší než 0,2 g/l, může se u šarže vypustit.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý nedává uspokojivý výsledek, provede se tato zkouška: 15 ml zkoušeného přípravku se odstředí, sediment se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *dinitriam-edetátu R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (90 g/l) (1 + 49). Udrží se nejméně 6 h při 37 °C a potom se odstředí. Čirá supernatantní tekutina reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelné účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**STANOVENÍ ÚČINNOSTI**

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 20 m. j. v jedné lidské dávce.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek pro každou složku v jedné lidské dávce;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

**VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI ET HEPATITIDIS B (ADNr) ADSORBATUM****6.0:2062****Vakcína proti záškrtu, tetanu a hepatidě B (rDNA) adsorbovaná****DEFINICE**

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, povrchového antigenu viru hepatitidy B a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Povrchový antigen viru hepatitidy B je složka bílkoviny viru hepatitidy B. Tento antigen se získává rekombinantní DNA technologií.

**VÝROBA****VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ**

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várce purifikovaného difterického toxoidu a purifikovaného tetanického toxoidu, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený pro danou vakcínu a v každém případě je jejich společný obsah takový, aby vakcína obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby se přísně dodržel výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinasobek lidské dávky

uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespécifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)*, *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)* a *Vaccinum hepatitis B (ADNr) (1056)*.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství konečné várky purifikovaného difterického toxoidu a tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přidáním povrchového antigenu viru hepatitidy B. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické a tetanické složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo Stanovení účinnosti složky hepatitidy B *in vivo* provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Difertický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se

16 h při teplotě 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**C.** Stanovení účinnosti nebo, kde je to vhodné, elektroforetický profil se použije jako zkouška totožnosti složky hepatitidy B vakcíny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se každému králíkovi podá ekvivalent jedné lidské dávky.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difertická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Složka hepatitidy B.** Vakcína vyhovuje stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě B (2.7.15).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- množství povrchového antigenu viru hepatitidy B v jedné lidské dávce;
- typ buněk použitých k výrobě složky hepatitidy B;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpurné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI ET PERTUSSIS EX CELLULIS INTEGRIS ADSORBATUM

7.5:0445

Vakcína proti záškrtu, tetanu a dávivému kašli  
(celobuněčná) adsorbovaná

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, minerálního adsorbentu a suspenze inaktivovaných mikrobů *Bordetella pertussis*.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

### VÝROBA

#### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla předtím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinašobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

#### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO DIFTERICKÉHO A TETANICKÉHO TOXOIDU A INAKTIVOVANÉ SUSPENZE BORDETELLA PERTUSSIS

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člácích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis ex cellulis integris adsorbatum* (0161).

#### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várek purifikovaného difterického toxoidu a purifikovaného tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, a přidáním vhodného množství suspenze inaktivovaných mikrobů *B. pertussis*; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Koncentrace mikrobů *B. pertussis* v konečné várce vakcíny nepřesahuje koncentraci odpovídající opacitě 20 m. j. na jednu lidskou dávku. Pokud se použijí dva nebo více kmenů *B. pertussis*, je složení po sobě jdoucích šarží vycházejících z konečné várky vakcíny shodné, pokud jde o zastoupení každého kmene, vyjádřené v jednotkách opacity. K várce vakcíny je možno přidat vhodné protimikrobní látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu a nesmějí se tedy použít.

K výrobě konečné šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit pro použití.

Pokud byly zkoušky Specifická neškodnost pertusové složky, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská bakteriální precipitát. Je možno použít i jiné vhodné metody oddělení bakterií od adsorbentu. Totožnost pertusové složky se prokáže aglutinací bakterií v resuspendovaném precipitátu specifickým antisérem proti *B. pertussis* nebo zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Specifická neškodnost pertusové složky.** Použijí se dvě skupiny po nejméně pěti zdravých myších o hmotnosti 14 g až 16 g. Myši jsou stejného pohlaví nebo jsou ve skupinách obě pohlaví rovnoměrně zastoupena. Zvířata mají mít přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml obsahující množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího, pokud možno, stejné množství protimikrobní látky, které bylo podáno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dnů po podání. Vakcína

vyhovuje zkoušce jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny vakcinovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti vakcinovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší kontrolních a c) během zkoušky uhynie nejvýše 5 % vakcinovaných myší. Zkouška se může opakovat a výsledky zkoušek se sloučí.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Provádí-li se zkouška na morčatech, je dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce, u zkoušky na myších je nejméně 60 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (celobuněčné) (2.7.7).

Stanovená účinnost je nejméně 4,0 m. j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2,0 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce pro každou složku;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI ET PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ADSORBATUM

7.5:1931

Vakcína proti záškrtu, tetanu a dávivému kašli (bezbuňččná) adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze jednotlivě purifikované antigenní složky *Bordetella pertusis* a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětně přeměně na toxin. Vakcína může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespecifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várc purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu a pertusových složkách, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený pro danou vakcínu a v každém případě je jejich obsah takový, aby vakcína obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje stanovení účinnosti.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)*, *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)* a *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum (1356)*.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várek purifikovaného difterického toxoidu, tetanického toxoidu a pertusových složek na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Diftherický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**C.** Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu.

*Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací.* Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina minimálně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš čelenuje intraperitoneálně 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhne po podání histaminu jedna nebo více myší. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhne po čelení histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhne jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myší a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhne po čelení histaminem více než 5 % z celkového počtu myší.

Používaný kmen myší se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myší je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myší, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenujovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxín BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxín.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelné účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Diftherická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti není menší než nejnižší účinnost uvedená v označení na obalu.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je účinnost uvedená v označení na obalu nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek obsažených v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

### VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI ET POLIomyELITIDIS (INACTIVATUM), CUM CONTENTO REDUCTO ANTIGENI(ORUM), ADSORBATUM

6.0:2328

Vakcína proti záškrtu, tetanu a poliomyelitidě (inaktivovaná), se sníženým obsahem antigenu(ů), adsorbovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani et poliomyelitidis inactivatum, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a inaktivovaných validovanou metodou a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Množství difterického toxoidu v jedné lidské dávce je sníženo v porovnání s vakcínami obvykle používanými při

primární vakcinaci; množství tetanického toxoidu může být také sníženo.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který byl použit při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž je prokázáno, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla předtím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje; jestliže v opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví v konečné várce purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu a inaktivovaných monovalentních sklizních poliomyelitického viru, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů v konečné šarži vakcíny. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený pro danou vakcínu a v každém případě je jejich společný obsah takový, aby vakcína obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

##### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452) a *Vaccinum poliomyelitidis inactivatum* (0214).

##### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství purifikovaného difterického toxoidu a purifikovaného tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, jednotlivě nebo společně a přimícháním vhodných množství purifikovaných monovalentních sklizní lidských poliomyelitických virů typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství

trivalentní směsi těchto purifikovaných monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) u poliomyelitických složek po sklizni viru před přidáním adsorbentu. Množství bovinního sérumalbuminu je takové, že jeho obsah v šarži je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje zkoušce Osmolalita a požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické a tetanické složky provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se u konečné šarže vypustit.

Pokud není možné provést stanovení obsahu D-antigenu u šarže, provede se během přípravy konečné várky vakcíny před přidáním adsorbentu.

Pokud bylo stanovení *in vivo* poliomyelitické složky provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ poliomyelitického viru prokáže, že kritéria pro přijetí stanovení D-antigenu poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vynechat. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu výroby antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská či-

rá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý nedává uspokojivý výsledek, provede se tato zkouška: 15 ml zkoušené vakcíny se odstředí a zbytek se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *dinatrium-edetátu R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (90 g/l) (1 + 49). Udrží se nejméně 6 h při 37 °C a pak se odstředí. Čirá supernatantní tekutina reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**C.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunobentové stanovení (ELISA) D-antigenu, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 20 m. j. v jedné lidské dávce.

#### Poliomyelitická složka

**Obsah D-antigenu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Používá se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP** je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a určena pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

**Zkouška *in vivo*.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě (*in vivo*) (2.7.20).



## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- typy poliomyelitického viru obsažené ve vakcíně;
- jmenovité množství poliomyelitického viru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, které je obsaženo v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k přípravě poliomyelitické složky;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

**VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI,  
PERTUSSIS EX CELLULIS INTEGRIS ET  
POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM  
ADSORBATUM**

7.5:2061

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli  
(celobuněčná) a poliomyelitidě inaktivovaná  
adsorbovaná

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze inaktivovaných mikrobů *Bordetella pertusis*, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a validovanou metodou inaktivovaných, a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

## VÝROBA

## VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Referenční vakcína (vakcíny).** Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým

nebyla předtím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu nebo na ně zvíře uhne, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespécifických příčin uhne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

## VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis ex cellulis integris adsorbatum* (0161) a *Vaccinum poliomyelitidis inactivatum* (0214).

## KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várek purifikovaného difterického toxoidu a purifikovaného tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přimícháním vhodných množství suspenze inaktivovaných mikrobů *B. pertussis* a purifikovaných monovalentních sklizní lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství trivalentní směsi těchto purifikovaných monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečné várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se u poliomyelitických složek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) při přípravě konečné várky vakcíny před přidáním adsorbentu. Množství bovinního sérumalbuminu je takové, že jeho obsah v šarži je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

## ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce Osmolalita a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Specifická neškodnost pertusové složky, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit. Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů, u suspenze inaktivované kultury *Bordetella pertussis* a u purifikovaných monovalentních sklizní nebo u trivalentní směsi poliomyelitických virů nebo u konečné várce a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo stanovení účinnosti *in vivo* poliomyelitické složky provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ poliomyelitického viru prokáže, že kritéria pro přijetí při stanovení D-antigeny poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vypustit. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- C.** Může se použít zbytek po odstředění ze zkoušky A. Je možno použít i jiné vhodné metody oddělení bakterií od adsorbentu. Zkouška totožnosti pertusové složky se provede aglutinací bakterií specifickým antiserem proti *B. pertussis* v resuspendovaném precipitátu získaném po odstředění nebo zkouškou popsanou ve stati Stanovení účinnosti pertusové složky.
- D.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA) D-antigeny, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Specifická neškodnost pertusové složky.** Použijí se dvě skupiny nejméně po pěti zdravých myších o hmotnosti 14 g až 16 g. Myši jsou stejného pohlaví nebo jsou obě pohlaví ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Zvířata mají přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml obsahující množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), obsahujícího, pokud možno, stejné množství protimikrobní látky, které bylo podáno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dnů po podání. Vakcína vyhovuje zkoušce jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost

skupiny vakcinovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti vakcinovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší kontrolních a c) během zkoušky uhne nejvýše 5 % vakcinovaných myší. Zkouška se může opakovat a výsledky zkoušek se sloučí.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Provádí-li se zkouška na morčatech, je dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce, u zkoušky na myších je dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti nejméně 60 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (celobuněčné) (2.7.7). Stanovená účinnost je nejméně 4,0 m. j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2,0 m. j. v jedné lidské dávce.

### Poliomyelitická složka

**Obsah D-antigeny.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpce stanoví obsah D-antigeny pro lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigeny uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP** je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a je určena pro použití při stanovení obsahu D-antigeny. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

**Zkouška *in vivo*.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě *in vivo* (2.7.20).

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- minimální množství mezinárodních jednotek pertusové složky v jedné lidské dávce;
- jmenovité množství každého typu (1, 2 a 3) poliomyelitického viru, vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen v jedné lidské dávce;

- typ buněčného substrátu použitého k přípravě poliomyelitické složky;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

**VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI,  
PERTUSSIS EX CELLULIS INTEGRIS,  
POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM  
ADSORBATUM ET HAEMOPHILI  
STIRPE b CONIUGATUM**

7.5:2066

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (celobuněčná), poliomyelitidě inaktivovaná adsorbovaná a hemofilu typu b konjugovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis ex cellulis integris, poliomyelitis inactivatum et haemophili stirpe b coniugatum adsorbatum

**DEFINICE**

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze inaktivovaných mikrobů *Bordetella pertusis*, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a vhodnou metodou inaktivovaných, minerální adsorbent, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý a polyribosylribitol-fosfát (PRP) kovalentně vázaný na bílkovinný nosič. Hemofilová složka se dodává v samostatném obalu, jehož obsah se smíchá s dalšími složkami vakcíny těsně před použitím.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

PRP je lineární kopolymer složený z opakujících se jednotek 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-fosfátu [(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>P)<sub>n</sub>] s definovanou velikostí molekul odvozený ze vhodného kmeně *Haemophilus influenzae* typu b. Bílkovinný nosič, je-li konjugován s PRP, je schopen navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid.

**VÝROBA****VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ**

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Během vývojových studií a kdykoliv je nutná nová validace, se zkouškami na zvířatech prokáže, že vakcína má schopnost navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na PRP.

Při ověřování shodnosti výroby se zkoušky difterické, tetanické, pertusové a poliomyelitické složky provádějí u vhodného počtu šarží vakcíny, rekonstituovaných stejným způsobem jako pro použití. Pro následující běžnou kontrolu se

stanovení účinnosti těchto složek provádějí bez smíchání s hemofilovou složkou.

Výrobní postup pro hemofilovou složku se validuje, aby se prokázalo, že bude-li hemofilová složka zkoušena, vyhoví zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8) prováděné následujícím způsobem. Na 1 kg hmotnosti králíka se podá množství vakcíny odpovídající: 1 μg PRP v případě vakcíny s difterickým toxoidem nebo CRM 197 difterickou bílkovinou jako nosičem; 0,1 μg PRP v případě vakcíny s tetanickým toxoidem jako nosičem; 0,025 μg PRP v případě vakcíny s OMP (komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B) jako nosičem.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo tetanu nebo na ně zvíře uhne, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhne více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

**VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK**

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)*, *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)*, *Vaccinum pertussis ex cellulis integris adsorbatum (0161)*, *Vaccinum poliomyelitis inactivatum (0214)* a *Vaccinum haemophili stirpe b coniugatum (1219)*.

**KONEČNÁ VÁRKA**

Konečná várka difterických, tetanických, pertusových a poliomyelitických složek vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várky purifikovaného difterického toxoidu a várky purifikovaného tetanického toxoidu na minerální nosič, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, jednotlivě nebo společně a přimícháním vhodných množství suspenze inaktivovaných mikrobů *B. pertussis* a vhodných množství purifikovaných monovalentních sklizní lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství trivalentní směsi těchto monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

Konečná várka hemofilové složky se připraví naředěním várky konjugátu na konečnou koncentraci ředicím roztokem. Může se přidat stabilizátor.

K výrobě šarže se použijí pouze konečné várky vakcíny, které vyhovují následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se u poliomyelitických složek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) při přípravě konečné várky vakcíny před přidáním adsorbentu. Množství bovinního sérumalbuminu je takové, že jeho obsah v šarži je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Konečná várka hemofilové složky je lyofilizovaná.

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce Osmolalita a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Specifická neškodnost pertusové složky, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů, suspenze inaktivované kultury *Bordetella pertussis* a u purifikovaných monovalentních sklzní poliomyelitických virů nebo jejich trivalentní směsi, nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo Stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo* provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ poliomyelitického viru prokáže, že kritéria pro přijetí při stanovení D-antigeny poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vypustit. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

**Osmolalita** (2.2.35). Osmolalita vakcíny, kde je to vhodné, rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Volný PRP.** Nenavázaný PRP se u hemofilové složky stanoví po odstranění konjugátu, např. iontoměničovou kapalinovou chromatografií, vylučovací chromatografií nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinou validovanou metodou. Množství volného PRP není vyšší než hodnota schválená pro daný přípravek.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Zkoušky totožnosti A, B, C a D se provádějí u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou a poliomyelitickou složku a zkouška E u lahvičky obsahující hemofilovou složku.

- Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušené vakcíně se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- Může se použít zbytek po odstředění ze zkoušky A. Je možno použít i jiné vhodné metody oddělení bakterií od adsorbentu. Pertusové složky se prokáží aglutinací bakterií specifickým antisérem proti *B. pertussis* v resuspendovaném precipitátu nebo zkouškou popsanou ve stati Stanovení účinnosti pertusové složky.
- Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigeny, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3.
- Hemofilová složka se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) pro PRP.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Zkoušky Specifická neškodnost, Hliník, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Sterilita se provádějí u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou a poliomyelitickou složku; zkoušky Obsah PRP, Voda, Sterilita a Bakteriální endotoxiny se provádějí u lahvičky s hemofilovou složkou.

Některé zkoušky hemofilové složky je vhodnější provádět u lyofilizovaného přípravku než u várky konjugátu, protože proces lyofilizace může ovlivnit zkoušenou složku.

**Specifická neškodnost pertusové složky.** Použijí se dvě skupiny nejméně po pěti zdravých myších o hmotnosti 14 g až 16 g. Myši jsou stejného pohlaví nebo jsou obě pohlaví ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Zvířata mají přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml obsahující množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se podá 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího, pokud možno, stejné množství protimikrobní látky, které bylo podáno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dnů po podání. Vakcína vyhovuje zkoušce jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny vakcinovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti vakcinovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší

kontrolních a c) během zkoušky uhynie nejvýše 5 % vakcinovaných myší. Zkouška se může opakovat a výsledky zkoušek se sloučí.

**Obsah PRP.** Nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu. Stanoví se buď jako obsah ribosy (2.5.31), nebo fosforu (2.5.18) vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií (2.2.29) s pulzní ampérometrickou detekcí.

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Voda**, semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 % v hemofilové složce je obsah vody.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Obsah je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou pro hemofilovou složku daného produktu. Pokud některá ze složek vakcíny brání stanovení endotoxinů, provede se zkouška na pyrogenní látky popsaná v odstavci Všeobecná ustanovení.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Provádí-li se zkouška na morčatech, je dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce, u zkoušky na myších je dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti nejméně 60 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (celobuněčné) (2.7.7).

Stanovená účinnost je nejméně 4,0 m. j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2,0 m. j. v jedné lidské dávce.

#### Poliomyelitická složka

**Obsah D-antigenu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP** je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a je určená pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

**Zkouška in vivo.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě in vivo (2.7.20).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- minimální množství mezinárodních jednotek pertusové složky v jedné lidské dávce;
- jmenovité množství poliomyelitického viru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k přípravě poliomyelitické složky;
- počet mikrogramů PRP v jedné lidské dávce;
- typ a jmenovité množství bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpurné dávky nebo pro podání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se před použitím musí roztřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

### VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI, PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ADSORBATUM ET HAEMOPHILI STIRPE b CONIUGATUM

7.5:1932

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bezbuněčná) adsorbovaná a hemofilu typu b konjugovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum et haemophili stirpe b coniugatum adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze jednotlivě purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertusis*, minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý a polyribosylribitol-fosfátu (PRP) kovalentně vázaného na bílkovinný nosič. Složka hemofilu se může dodávat v samostatném obalu, jehož obsah se smíchá s dalšími složkami vakcíny těsně před použitím.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin. Bezbuněčná pertusová složka může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina

zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

PRP je lineární kopolymer složený z opakujících se jednotek 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-fosfátu [(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>P)<sub>n</sub>] s definovanou velikostí molekul, odvozený ze vhodného kmene *Haemophilus influenzae* typu b. Bílkovinný nosič, je-li konjugován s PRP, je schopen navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid.

## VÝROBA

### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatné lahvičce, provádějí se jako součást studií shodnosti výroby zkoušky účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky u vhodného počtu šarží vakcíny rekonstituovaných stejným způsobem jako pro použití. Pro další běžné kontroly se mohou zkoušky účinnosti provádět u těchto složek bez smíchání s hemofilovou složkou.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla před tím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinasobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespecifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várce purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu, pertusových složek a PRP konjugátu, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený pro danou vakcínu a má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, jsou obsahy difterického, tetanického a pertusového antigenu ve všech případech takové, aby konečný obal obsahoval těchto složek méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Během vývojových studií a kdykoliv je nutná nová validace, prokáže se zkouškami na zvířatech, že vakcína má schopnost navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na PRP.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, výrobní postup pro hemofilovou složku se validuje, aby se

prokázalo, že bude-li hemofilová složka zkoušena, vyhoví zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8) prováděné následujícím způsobem. Na 1 kg hmotnosti králíka se podá množství vakcíny odpovídající: 1 μg PRP v případě vakcíny s difterickým toxoidem nebo CRM 197 difterickou bílkovinou jako nosičem; 0,1 μg PRP v případě vakcíny s tetanickým toxoidem jako nosičem; 0,025 μg PRP v případě vakcíny s OMP (komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B) jako nosičem.

**Referenční vakcína (vakcíny).** Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum* (1356) a *Vaccinum haemophili stirpe b coniugatum* (1219).

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Mohou se použít různé metody přípravy. Konečná várka vakcíny se může připravit adsorpcí vhodných množství várek purifikovaného difterického toxoidu, tetanického toxoidu, bezbuněčných pertusových složek a PRP konjugátu na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně; nebo se připraví a plní odděleně dvě samostatné várky vakcíny, jedna obsahující difterickou, tetanickou a pertusovou složku a druhá složku hemofilovou, která může být lyofilizovaná. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje zkoušce na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny

a bylo prokázáno, že jeho obsah u hotové šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

**Osmolalita (2.2.35).** Osmolalita vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Hodnota pH (2.2.3).** pH vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Volný PRP.** Nenavázaný PRP se stanoví po odstranění konjugátu, např. iontoměničovou kapalinovou chromatografií, vylučovací chromatografií nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinou validovanou metodou. Množství volného PRP není vyšší než hodnota schválená pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, provádějí se zkoušky totožnosti A, B a C u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou a pertusovou složku a zkouška D u lahvičky obsahující hemofilovou složku.*

- A. Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při teplotě 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- B. Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- C. Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.
- D. Hemofilová složka se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) pro PRP.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, provádějí se zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Hliník, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Sterilita u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou a pertusovou složku. Zkoušky Obsah PRP, Voda (kde je to vhodné), Sterilita a Bakteriální endotoxiny se provádějí u lahvičky s hemofilovou složkou. Je-li hemofilová složka lyofilizovaná, je vhodnější některé zkoušky provádět u lyofilizovaného přípravku než u várky konjugátu, protože proces lyofilizace může ovlivnit zkoušenou složku.*

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myší citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až

8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš intraperitoneálně čelňuje 2 mg báze histaminu v celkovém objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhne po podání histaminu jedna nebo více myší. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhne po čelení histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhne jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myší a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhne po čelení histaminem více než 5 % z celkového počtu myší.

Používaný kmen myší se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelňuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myší je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myší, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelňovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Obsah PRP.** Nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu. Stanoví se buď jako obsah ribosy (2.5.31), nebo fosforu (2.5.18) vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií (2.2.29) s pulzní ampérometrickou detekcí.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše 3,0 % pro lyofilizovanou hemofilovou složku.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Obsah je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou pro hemofilovou složku daného produktu. Pokud některá ze složek vakcíny brání stanovení endotoxinů, provede se zkouška na pyrogenní látky popsána v odstavci Všeobecná ustanovení.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti není menší než minimální účinnost uvedená v označení na obalu. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je účinnost uvedená v označení na obalu nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- počet mikrogramů PRP v jedné lidské dávce;
- typ a jmenovité množství bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpurné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

## VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI, PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ET HEPATITIDIS B (ADNr) ADSORBATUM

7.5:1933

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bezbuněčná) a hepatitidě B (rDNA) adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze jednotlivě purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertusis*, povrchového antigenu viru hepatitidy B a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin. Vakcína může také obsahovat filamentózní hemagglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny

a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

Povrchový antigen viru hepatitidy B je bílkovinná složka viru hepatitidy B. Tento antigen se získává rekombinantní DNA technologií.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinasobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várcce purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu a pertusových složek, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů u každé složky je nižší než limit schválený pro danou vakcínu.

**Referenční vakcína (vakcíny).** Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

##### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek splňuje požadavky uvedené v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum* (1356) a *Vaccinum hepatitidis B (ADNr)* (1056).

##### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várek purifikovaného difterického toxoidu, tetanického toxoidu, bezbuněčných pertusových složek a povrchového antigenu hepatitidy B na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hli-



nitý, jednotlivě nebo společně. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo Stanovení účinnosti *in vivo* složky hepatitidy B provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se toto stanovení u šarže vypustit.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- B. Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- C. Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.
- D. Stanovení účinnosti nebo, kde je to vhodné, elektroforetický profil se použije jako zkouška totožnosti složky hepatitidy B vakcíny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá

dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C.

Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš čelenuje intraperitoneálně 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhynie po podání histaminu jedna nebo více myší. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhynie po čelení histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhynie jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myší a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhynie po čelení histaminem více než 5 % z celkového počtu myší.

Používaný kmen myši se ve vhodných intervalech zkouší na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myší je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myší, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenujovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Každému králíkovi se podá množství odpovídající jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti není menší než minimální účinnost uvedená v označení na obalu. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je účinnost uvedená v označení na obalu nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému

pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

**Složka hepatitidy B.** Vyhovuje zkoušce účinnosti vakcíny proti hepatitidě B (2.7.15).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- množství povrchového antigenu viru hepatitidy B v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k výrobě složky hepatitidy B;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpurné dávky nebo pro podávání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

### VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI, PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ET POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM ADSORBATUM

7.5:1934

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bezbuněčná) a poliomyelitidě inaktivovaná adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze individuálně purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertusis*, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a validovanou metodou inaktivovaných, a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin. Vakcína může také obsahovat filamentózní hemagglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se

mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u té cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud ze specifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várcce purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu, pertusových složkách a purifikovaných inaktivovaných monovalentních sklizních poliomyelitického viru, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů u každé složky je nižší než limit schválený pro danou vakcínu a v každém případě je jejich společný obsah takový, aby vakcína obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek splňuje požadavky uvedené v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum* (1356) a *Vaccinum poliomyelitidis inactivatum* (0214).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství várky purifikovaného difterického toxoidu, tetanického toxoidu, bezbuněčných pertusových složek na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přimícháním vhodných množství purifikovaných monovalentních sklizních lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3

nebo vhodného množství trivalentní směsi těchto purifikovaných monovalentních sklizní.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se u poliomyelitických složek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) po sklizni viru a před přidáním adsorbentu při přípravě konečné várky vakcíny. Množství bovinního sérumalbuminu je takové, že jeho obsah v šarži je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka, Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo stanovení obsahu D-antigenu provedeno u konečné várky vakcíny před přidáním adsorbentu s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Pokud bylo stanovení účinnosti *in vivo* poliomyelitické složky provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ poliomyelitického viru prokáže, že kritéria pro přijetí při stanovení D-antigeny poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vynechat. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, provedou se zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

**Osmolalita (2.2.35).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Difrický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská

čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difrickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**C.** Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.

**D.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigeny, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací.

Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš intraperitoneálně čelenuje 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhynie po podání histaminu jedna nebo více myší. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhynie po podání histaminu žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhynie jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myší a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhynie po čelení histaminem, více než 5 % z celkového počtu myší.

Používaný kmen myši se ve vhodných intervalech zkouší na vnímavost k histaminu následujícím postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myší je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myší, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenujovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti není menší než minimální účinnost uvedená v označení na obalu.

Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, je účinnost uvedená v označení na obalu nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

#### Poliomyelitická složka

**Obsah D-antigenu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP** je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a určená pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

**Zkouška in vivo.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě *in vivo* (2.7.20).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- typy poliomyelitického viru obsažené ve vakcíně;
- jmenovité množství poliomyelitického viru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, které je obsaženo v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k přípravě poliomyelitické složky;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím rozřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

## VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI, PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ET POLIOMYELITIDIS (INACTIVATUM), CUM CONTENTO REDUCTO ANTIGENI (ANTIGENORUM), ADSORBATUM

7.5:2329

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bezbuněčná) a poliomyelitidě (inaktivovaná), se sníženým obsahem antigenu (antigenů), adsorbovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis et poliomyelitidis inactivatum, antigeni-o(-is) minutum, adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze individuálně purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertussis*, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a validovanou metodou inaktivovaných, a minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Množství difterického toxoidu v jedné lidské dávce je sníženo ve srovnání s vakcínami obvykle používanými pro primární vakcinaci; množství tetanického toxoidu a pertusových složek může být rovněž sníženo.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobný protein prostý toxických vlastností, produkováný geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin. Vakcína může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Referenční vakcína (vakcíny).** Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se použít monokomponentní referenční vakcíny ke zkoušení složené vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě repre-

zentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž je prokázáno, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhynie více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví v konečné várce purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu, pertusových složkách a inaktivovaných monovalentních sklizních poliomyelitického viru, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů v konečné šarži vakcíny. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený pro danou vakcínu, a v každém případě jejich společný obsah je takový, aby šarže vakcíny obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek splňuje požadavky uvedené v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443), *Vaccinum tetani adsorbatum* (0452), *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum* (1356) a *Vaccinum poliomyelitis inactivatum* (0214).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství konečné várky purifikovaného difterického toxoidu, tetanického toxoidu na minerální adsorbent, jako např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přidáním bezbuněčných pertusových složek a směsi vhodných množství purifikovaných monovalentních sklizní lidských poliomyelitických virů typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství trivalentní směsi těchto purifikovaných monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce. Stanoví se u poliomyelitických složek po sklizni viru a před vazbou na adsorbent během přípravy konečné várky vakcíny vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům zkoušky Osmolalita a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka, Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u purifikovaných antigenů nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u šarže není vyšší než 0,2 g/l, může se u konečné šarže vypustit.

Pokud není možné provést stanovení obsahu D-antigenu u šarže, provede se během přípravy konečné várky vakcíny před vazbou na adsorbent.

Pokud bylo stanovení *in vivo* na poliomyelitické složky provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ polioviru prokáže, že kritéria pro přijetí při stanovení D-antigenu poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vypustit. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu výroby antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

**Osmolalita** (2.2.35). Je v rozmezí schválením pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Difertický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý neposkytuje uspokojivý výsledek, provede se tato zkouška. 15 ml zkoušené vakcíny se odstředí a zbytek se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *dinatrium-edetátu R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (90 g/l) (1 + 49). Udrží se nejméně 6 h při 37 °C a pak se odstředí. Čirá supernatantní tekutina reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

**B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní

tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

- C. Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce totožnosti A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.
- D. Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigenu, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš intraperitoneálně čelenuje 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhne po podání histaminu jedna nebo více myši. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhne po čelení histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhne jedna myš, zkouška se opakuje se stejným nebo vyšším počtem myši a výsledky platných zkoušek se sloučí; přípravek vyhovuje, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína po podání histaminu, neuhne více než 5 % z celkového počtu myši.

Používaný kmen myši se ve vhodných intervalech zkouší na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenuje se histaminem výše uvedenou metodou; kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myši je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myši, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenujovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnížší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 20 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávkovému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

## Poliomyelitická složka

**Obsah D-antigenu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Používá se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedeného v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

*Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP* je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a určená pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

*Zkouška in vivo.* Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě (*in vivo*) (2.7.20).

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.
- typy polioviru obsažené ve vakcíně;
- jmenovité množství polioviru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, které je obsaženo v jedné lidské dávce;
- buněčný substrát použitý k přípravě poliomyelitické složky;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

**VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI,  
PERTUSSIS SINE CELLULIS EX  
ELEMENTIS PRAEPARATUM,  
HEPATITIDIS B (ADNr),  
POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM  
ADSORBATUM ET HAEMOPHILI  
STIRPE b CONIUGATUM**

7.5:2067

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bez buněčná), hepatitidě B (rDNA), poliomyelitidě inaktivovaná adsorbovaná a hemofilu typu b konjugovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum, hepatitis B (ADNr), poliomyelitis inactivatum et haemophili stirpe b coniugatum adsorbatum

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze jednotlivě purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertusis*, povrchového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg), suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a vhodnou metodou inaktivovaných, a polyribosylribitol-fosfátu (PRP) kovalentně vázaného na bílkovinný nosič.

Antigeny ve vakcíně mohou být adsorbované na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Složka hemofilu se může dodávat v samostatném obalu, jehož obsah se smíchá s dalšími složkami vakcíny těsně před nebo při použití.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídajících imunogenních vlastností a zabrání zpětné přeměně na toxin. Pertusová složka může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

Povrchový antigen viru hepatitidy B je bílkovinná složka viru hepatitidy B. Tento antigen se získává rekombinantní DNA technologií.

PRP je lineární kopolymer složený z opakujících se jednotek 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-fosfátu [(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>P)<sub>n</sub>] s definovanou velikostí molekul, odvozený ze vhodného kmene *Haemophilus influenzae* typu b. Bílkovinný nosič, je-li konjugován s PRP, je schopen navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid.

## VÝROBA

## VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatné lahvičce, provádějí se jako součást studií shodnosti výroby zkoušky účinnosti difterické, tetanické, pertusové, poliomyelitické složky a složky hepatitidy B u vhodného počtu šarží vakcíny rekonstituovaných stejným způsobem jako pro použití. Pro následující běžnou kontrolu se mohou zkoušky účinnosti těchto složek provádět bez smíchání s hemofilovou složkou.

**Specifická neškodnost difterické a tetanické složky.** Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla před tím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxémie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhynie, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud uhynie z nespécifických příčin více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhynie více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví ve várci purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu, purifikovaných pertusových složek, v povrchovém antigenu viru hepatitidy B, v purifikovaných inaktivovaných monovalentních sklizních poliomyelitického viru a várci PRP konjugátu, aby se sledovaly purifikační postupy a limitovalo se množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než schválený limit.

Během vývojových studií a kdykoliv je nutná nová validace, provede se zkouška na pyrogenní látky na králících (2.6.8) podáním vhodné dávky šarže. Prokáže se, že vakcína vyhovuje z hlediska nepřítomnosti pyrogenního účinku. Během vývojových studií a kdykoliv je nutná nová validace, prokáže se zkouškami na zvířatech, že vakcína má schopnost navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na PRP.

Stabilita šarže a odpovídajících meziproductů se hodnotí jednou nebo více vybranými zkouškami. Tyto zkoušky mohou pro hemofilovou složku zahrnovat stanovení velikosti molekul, stanovení volného PRP v konjugátu a kinetiku depolymerace. Na základě výsledků stabilitních zkoušek se určí pro tyto zkoušky požadavky na propuštění, aby se zajistilo, že vakcína bude na konci doby použitelnosti ještě vyhovující.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil

při výrobě klinicky ověřené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek vyhovuje požadavkům uvedeným v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)*, *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)*, *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum (1356)*, *Vaccinum hepatitis B (ADNr) (1056)*, *Vaccinum poliomyelitis inactivatum (0214)* a *Vaccinum haemophili stirpe b coniugatum (1219)*.

#### KONEČNÉ VÁRKY

*Vakcína obsahující všechny složky v jednom obalu.* Konečná várka se připraví adsorpcí vhodných množství várky purifikovaného difterického toxoidu, várky purifikovaného tetanického toxoidu, várky purifikovaných bezbuněčných pertusových složek a várky purifikovaného povrchového antigenu hepatitidy B na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přimícháním vhodného množství purifikovaného PRP konjugátu a vhodných množství purifikovaných a inaktivovaných monovalentních sklizní lidského polioviru typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství směsi těchto monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

*Vakcína s hemofilovou složkou v samostatném obalu.* Konečná várka difterické, tetanické, pertusové, poliomyelitické složky a složky hepatitidy B se připraví adsorpcí vhodných množství várky purifikovaného difterického toxoidu, várky purifikovaného tetanického toxoidu, várky purifikovaných bezbuněčných pertusových složek a várky purifikovaného povrchového antigenu hepatitidy B na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, jednotlivě nebo společně, a přimícháním vhodných množství purifikovaných a inaktivovaných monovalentních sklizní lidského polioviru typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství směsi těchto monovalentních sklizní. Konečná várka se rozplní samostatně. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky. Konečná várka hemofilové složky se připraví naředěním várky konjugátu na konečnou koncentraci vhodným ředícím roztokem. Může se přidat stabilizátor.

K výrobě šarže se použijí pouze konečné várky, které vyhovují následujícím požadavkům.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se u poliomyelitických složek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) po purifikaci sklizně a při přípravě konečné várky vakcíny, před přidáním adsorbentu. Množství bovinního sérumalbuminu je takové, že jeho obsah v konečné vakcíně je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** Obsah je v rozmezí 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pokud je hemofilová složka v samostatném obalu, konečná várka hemofilové složky se lyofilizuje. Pouze šarže, která vy-

hovuje dále uvedené zkoušce na osmolalitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Osmolalita, Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátnost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti difterické, tetanické a pertusové složky provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů a purifikovaných monovalentních sklizní nebo u trivalentní směsi poliovirů nebo u konečné várky a bylo prokázáno, že obsah formaldehydu u šarže není vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena u trivalentní směsi inaktivovaných monovalentních sklizní poliovirů nebo u konečné várky vakcíny s vyhovujícími výsledky, může se u šarže vypustit.

Pokud bylo *in vivo* Stanovení účinnosti složky hepatitidy B provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Pokud bylo Stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo* provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ polioviru prokáže, že kritéria pro přijetí při stanovení D-antigenů přináší stejné výsledky jako stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* pro přijetí nebo vyřazení šarže vynechat. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenní aktivity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a považují se revalidaci.

**Volný PRP.** U vakcín obsahujících všechny složky v jednom obalu se obsah volného PRP stanoví u nenávané frakce. Nenávaný PRP se u hemofilové složky stanoví po odstranění konjugátu, např. výměnou aniontů, vylučovací chromatografií nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinou validovanou metodou. Množství volného PRP není vyšší než hodnota schválená pro daný přípravek.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než limit schválený pro jednotlivý přípravek.

**Osmolalita (2.2.35).** Osmolalita vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, provádějí se zkoušky totožnosti A, B, C, D a E u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou a poliomyelitickou složku a složku hepatitidy B; zkouška F se provádí u lahvičky obsahující hemofilovou složku.*

**A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda je uvedena jako příklad. Ve zkoušené vakcíně se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace roztoku byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při teplotě 37 °C a pak se odstředuje, dokud se nezíská čirá supernatantní



tekutina, která reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

- B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- C.** Pertusové složky se prokáží vhodnými imunochemickými metodami (2.7.1). Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.
- D.** Složka hepatitidy B se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), např. Stanovením účinnosti *in vitro* nebo vhodnou elektroforetickou metodou (2.2.31).
- E.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigenu, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3.
- F.** PRP a bílkovinný nosič se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, provádějí se zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Hliník, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Sterilita u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou, poliomyelitickou složku a složku hepatitidy B; zkoušky Obsah PRP, Voda, Protimikrobní látka, Hliník (kde je to vhodné) a Sterilita se provádějí u lahvičky s hemofilovou složkou.*

*Některé zkoušky hemofilové složky je vhodnější provádět u lyofilizovaného přípravku než u várky konjugátu, protože proces lyofilizace může ovlivnit zkoušenou složku.*

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků vyrobených genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se podá intraperitoneálně ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš čelenžuje intraperitoneálně 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhne po podání histaminu jedna nebo více myší. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhne po čelenži histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhne jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myší a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhne po čelenži histaminem více než 5 % z celkového počtu myší.

Používaný kmen myší se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu následujícím postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chlořidem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenžuje se histaminem, jak je uvedeno výše. Kmen je vhodný, jestliže

více než 50 % myší je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myší, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenžovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Obsah PRP.** Nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu u vakcíny, kde je hemofilová složka v samostatném obalu.

U vakcíny obsahující všechny složky v jednom obalu není obsah PRP u nenavázané frakce menší než hodnota schválená pro daný přípravek.

Stanoví se buď jako obsah ribosy (2.5.31), nebo fosforu (2.5.18) vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií (2.2.29) s pulzní ampérometrickou detekcí.

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 % v lyofilizované hemofilové složce.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti není menší než minimální účinnost uvedená v označení na obalu. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je účinnost uvedená v označení na obalu nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Proveďte se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávkovému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

**Složka hepatitidy B.** Vyhovuje stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě B (2.7.15).

#### Poliomyelitická složka

*Obsah D-antigenu.* Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotlivých pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

Vakcína proti poliomyelitidě inaktivovaná BRP je kalibrována v jednotkách Evropského lékopisu a je určena pro použití při stanovení obsahu D-antigenů. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

Zkouška *in vivo*. Vakcína vyhovuje stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě (*in vivo*) (2.7.20).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- množství povrchového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg) v jedné lidské dávce;
- jmenovité množství polioviru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, které je obsaženo v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k přípravě poliomyelitické složky a složky hepatitidy B;
- počet mikrogramů PRP v jedné lidské dávce;
- typ a jmenovité množství bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

### VACCINUM DIPHtherIAE, TETANI, PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM, POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM ADSORBATUM ET HAEMOPHILI STIRPE b CONIUGATUM

7.5:2065

Vakcína proti záškrtu, tetanu, dávivému kašli (bezbuňččná), poliomyelitidě inaktivovaná adsorbovaná a hemofilu typu b konjugovaná

*Synonymum.* Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum, poliomyelitidis inactivatum et haemophili stirpe b coniugatum adsorbatum

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs složenou z difterického toxoidu, tetanického toxoidu, suspenze jednotlivě purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertussis*, suspenze vhodných kmenů lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a vhodnou metodou inaktivovaných; polyribosyl-ribitol-fosfátu (PRP) kovalentně vázaného na bílkovinný nosič; minerálního adsorbentu, jako je např. hydroxid hliníkový nebo hydratovaný fosforečnan hliníkový. Vakcína může

být buď ve formě pentavalentního tekutého přípravku ve stejném obalu, nebo jako tetravalentní tekutý přípravek s lyofilizovanou hemofilovou složkou dodávanou v samostatném obalu, jehož obsah se smíchá s dalšími složkami vakcíny těsně před použitím.

Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobu *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxoidu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin. Bezbuňččná pertusová složka může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou společně purifikovat. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

PRP je lineární kopolymer složený z opakujících se jednotek 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-fosfátu [(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>P)<sub>n</sub>] s definovanou velikostí molekul, odvozený ze vhodného kmene *Haemophilus influenzae* typu b. Bílkovinný nosič, je-li konjugován s PRP, je schopen navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

##### Specifická neškodnost difterického a tetanického složky.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví následující zkoušce. Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla předtím podána žádná látka, která by mohla ovlivnit zkoušku, se subkutánně podá pětinašobek lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterického toxemie nebo tetanu, nebo na ně zvíře uhne, přípravek nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhne více než jedno zvíře, zkouška se jednou opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje zkoušce.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Stanoví se ve várci purifikovaného difterického toxoidu, purifikovaného tetanického toxoidu, v purifikovaných pertusových složkách, purifikovaných inaktivovaných monovalentních sklizních poliomyelitického viru a ve várci PRP konjugátu, aby se sledovaly purifikační postupy a snížilo množství endotoxinů ve vakcíně. Obsah bakteriálních endotoxinů pro každou složku je nižší než limit schválený oprávněnou autoritou pro danou vakcínu.

**Vývojové studie a ověřování shodnosti výroby.** Během vývojových studií a kdykoliv je nutná nová validace, se zkouškami na zvířatech prokáže, že vakcína má schopnost

navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na PRP.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, zkoušky difterické, tetanické a poliomyelitické složky se provádějí při ověřování shodnosti výroby u vhodného počtu šarží vakcíny, rekonstituovaných stejným způsobem jako pro použití. Pro následující běžné kontroly se stanovení účinnosti těchto složek provádějí bez smíchání s hemofilovou složkou.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, výrobní postup pro hemofilovou složku se validuje, aby se prokázalo, že bude-li hemofilová složka zkoušena, vyhoví zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8) prováděné následujícím způsobem. Na 1 kg hmotnosti králíka se podá množství vakcíny odpovídající: 1 µg PRP v případě vakcíny s difterickým toxoidem nebo CRM 197 difterickou bílkovinou jako nosičem; 0,1 µg PRP v případě vakcíny s tetanickým toxoidem jako nosičem; 0,025 µg PRP v případě vakcíny s OMP (komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B) jako nosičem.

*Referenční vakcína (vakcíny).* Za předpokladu, že jsou zkoušky účinnosti validovány, mohou se ke zkoušení složené vakcíny použít monokomponentní referenční vakcíny. Není-li to možné z důvodu interakce jednotlivých složek složené vakcíny nebo rozdílného složení mezi referenční monokomponentní vakcínou a zkoušenou vakcínou, použije se jako referenční vakcína šarže složené vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se může stabilizovat metodou, u níž se prokázalo, že neovlivňuje postup stanovení účinnosti.

#### VÝROBA JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK

Výroba složek splňuje požadavky uvedené v člancích *Vaccinum diphtheriae adsorbatum (0443)*, *Vaccinum tetani adsorbatum (0452)*, *Vaccinum pertussis sine cellulis ex elementis praeparatum adsorbatum (1356)*, *Vaccinum poliomyelitis inactivatum (0214)* a *Vaccinum haemophilii stirpe b coniugatum (1219)*.

#### KONEČNÉ VÁRKY

Konečná tetravalentní várka difterických, tetanických, pertusových a poliomyelitických složek se připraví adsorpcí vhodných množství várky purifikovaného difterického toxoidu, várky purifikovaného tetanického toxoidu a várky purifikovaných bezbuněčných pertusových složek, jednotlivě nebo společně, na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý a přimícháním vhodných množství purifikovaných monovalentních sklizní lidských poliomyelitických virů typu 1, typu 2 a typu 3 nebo vhodného množství trivalentní směsi těchto monovalentních sklizní. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky.

Má-li vakcína všech pět složek v jednom obalu, připraví se konečná várka přidáním vhodného množství várky hemofilového konjugátu k tetravalentní várce. Pokud je hemofilová složka v samostatném obalu, připraví se její konečná várka zředěním ředicím roztokem vhodným pro lyofilizaci. Může se přidat stabilizátor.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se použije k výrobě šarže přípravku.

**Bovinní sérumalbumin.** Stanoví se u poliomyelitických složek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) při přípravě konečné várky vakcíny před přidáním adsorbentu. Množství BSA je takové, že jeho obsah v šarži je nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, konečná várka hemofilové složky se lyofilizuje.

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedené zkoušce Osmolalita a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaných antigenů a purifikovaných monovalentních sklizní nebo trivalentní směsi poliovirů u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že obsah formaldehydu u hotové šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

Pokud bylo Stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo* provedeno u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vypustit.

Jakmile se pro daný přípravek a každý typ polioviru prokáže, že kritéria pro přijetí nebo vyřazení šarže při stanovení D-antigeny poskytují stejné výsledky jako zkouška stanovení účinnosti poliomyelitické složky *in vivo*, může se zkouška *in vivo* vypustit. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, musí se posoudit vliv na zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a uvážit, zda je nutná revalidace.

**Osmolalita (2.2.35).** Osmolalita vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Volný PRP.** Pokud je hemofilová složka v tekuté formě, může přítomnost ostatních složek ovlivnit tuto zkoušku a může být nemožné oddělit PRP od adjuvans. Přítomnost volného PRP se může určit ve várce konjugátu před přidáním ostatních složek nebo v neadsorbované frakci konečné kombinace.

Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, k oddělení nenavázaného PRP z konjugátu se použije řada metod, jako jsou srážecí metody, gelová filtrace, vylučovací chromatografie, iontoměničová kapalinová chromatografie a hydrofobní chromatografie, ultrafiltrace a ultracentrifuga-

ce. Množství volného PRP se může určit řadou metod, včetně vysoce účinné iontoměničové chromatografie s pulzní ampérometrickou detekcí (HPAEC-PAD) a imunostanovením s PRP protilátkami. Množství volného PRP není vyšší než hodnota schválená pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

*Zkoušky totožnosti A, B, C a D se provádějí u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou a poliomyelitickou složku a zkouška E se buď provádí u lahvičky obsahující všech pět složek, nebo u lahvičky obsahující samostatnou hemofilovou složku.*

- A.** Difterický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při teplotě 37 °C a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- B.** Tetanický toxoid se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.
- C.** Pertusové složky se prokáží vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Čirá supernatantní tekutina získaná ve zkoušce A reaguje se specifickými antiséry proti pertusovým složkám vakcíny.
- D.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je např. enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigenu, se prokáže, že vakcína obsahuje lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3.
- E.** Hemofilová složka se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) pro PRP.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu, Hliník, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Sterilita se provádějí u lahvičky obsahující difterickou, tetanickou, pertusovou a poliomyelitickou složku; zkoušky Obsah PRP, Voda, Sterilita a Bakteriální endotoxiny se provádějí u lahvičky s hemofilovou složkou.*

*Má-li vakcína hemofilovou složku v samostatném obalu, je vhodnější provádět některé zkoušky hemofilové složky s lyofilizovaným přípravkem než s várkou konjugátu, protože proces lyofilizace může ovlivnit zkoušenou složku.*

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevratnost pertusového toxoidu.** Zkouška se neprovádí u přípravků získaných genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina nejméně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po

pěti dnech se každá myš intraperitoneálně čelenžuje 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhne po podání histaminu jedna nebo více myši. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhne po čelenži histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině, nebo obou skupinách uhne jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myši a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhne po čelenži histaminem více než 5 % z celkového počtu myši.

Používaný kmen myši se ve vhodných intervalech zkouší na vnímavost k histaminu následujícím postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenžuje se histaminem, výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myši je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myši, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenžovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

**Obsah PRP.** Nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu. Stanoví se buď jako obsah ribosy (2.5.31), nebo fosforu (2.5.18) vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií (2.2.29) s pulzní ampérometrickou detekcí.

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Voda**, semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 % v lyofilizované hemofilové složce.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Obsah je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou pro hemofilovou složku daného produktu. Pokud některá ze složek vakcíny brání stanovení endotoxinů, provede se zkouška na pyrogenní látky popsaná v odstavci Všeobecná ustanovení.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Difterická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (2.7.6). Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 30 m. j. v jedné lidské dávce.

**Tetanická složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8). Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

#### **Poliomyelitická složka**

*Obsah D-antigenu.* Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se po desorpci stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliovirus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

*Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP* je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a je určena pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

*Zkouška in vivo.* Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě *in vivo* (2.7.20).

#### **OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek difterického a tetanického toxoidu v jedné lidské dávce;
- názvy a množství pertusových složek v jedné lidské dávce;
- jmenovité množství polioviru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, v jedné lidské dávce;
- buněčný substrát použitý k přípravě poliomyelitické složky;
- počet mikrogramů PRP v jedné lidské dávce;
- typ a jmenovité množství bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce;
- kde je to vhodné, že vakcína je určena pro první vakcinaci dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podání dospělým;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu, která byla vyrobena genetickou modifikací.

## **VACCINUM ENCEPHALITIDIS IXODIBUS ADVECTAE INACTIVATUM**

**6.0:1375**

Vakcína proti klíšťové encefalitidě inaktivovaná

#### **DEFINICE**

Je to tekutý přípravek připravený z vhodného kmene viru klíšťové encefalidity, kultivovaného v kulturách buněk kuřecích embryí nebo v jiných vhodných buněčných kulturách a inaktivovaného vhodnou validovanou metodou.

#### **VÝROBA**

##### *OBEČNÁ USTANOVENÍ*

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprošel od matečného inokula více pasážemi, několik se jich použilo k přípravě vakcíny, jejíž bezpečnost a účinnost byly prokázány v klinické studii. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

##### *SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU*

Virus se kultivuje v kuřecích embryonálních buňkách připravených z vajec pocházejících z chovu kuřat prostého specifikovaných patogenů (5.2.2) nebo v jiných vhodných buněčných kulturách (5.2.3).

##### *VIROVÁ INOKULA*

Použitý kmen viru se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jeho původu a následném zacházení s ním. Virová inokula se uchovávají při teplotě  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé inokulum se identifikuje jako virus klíšťové encefalidity vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), přednostně za použití monoklonálních protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se v každém inokulu stanoví titrací na vhodné buněčné kultuře koncentrace viru.

**Cizí agens** (2.6.16). Každé inokulum vyhovuje požadavkům na cizí agens ve virových vakcínách pro humánní použití. K neutralizaci vakcinačního viru se přednostně použijí monoklonální protilátky.

##### *KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU*

Pokud se virus v průběhu přípravy matečného inokula pasážoval v mozku myši, projde před inokulací do výrobní buněčné kultury nejméně dvěma pasážemi v buněčné kultuře.

Všechny práce s buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde se nepracuje s jinými buňkami. Sérum a trypsin použité při přípravě buněčných suspenzí a médií musí být prokazatelně prosty cizích agens. Média pro buněčné kultury mohou obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá neinfikovaných (kontrolní buňky).

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu inaktivované sklizně.

**Totožnost.** U každé sklizně se prokáže, že obsahuje virus klíšťové encefalidity vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), přednostně za použití monoklonálních protilátek nebo neutralizací viru v buněčných kulturách.

**Bakteriální a houbová kontaminace (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na mykoplazmata; na každou živnou půdu se použije 1 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky vyhovují zkouškám Cizí agens (2.6.16). Vyrábí-li se vakcína za použití systému buněčné banky, vyhovují kontrolní buňky zkoušce Totožnost.

**Koncentrace viru.** K zajištění shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru titrací na vhodných buněčných kulturách.

#### INAKTIVACE

Aby se zabránilo interferenci, virové agregáty se, kde je to nutné, odstraní bezprostředně před inaktivačním procesem filtrací. Virová suspenze se inaktivuje validovanou metodou; metoda je prokazatelně schopná shodně inaktivovat virus klíšťové encefalitidy bez zničení antigenní a imunogenní aktivity. Součástí validační studie je inaktivační křivka reprezentující koncentraci zbytkového živého viru, měřenou nejméně třikrát. Použije-li se k inaktivaci formaldehyd, ověří se přítomnost zbytků volného formaldehydu na konci inaktivačního postupu.

Pouze inaktivovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Zbytkový infekční virus.** Množství inaktivované sklizně, odpovídající nejméně deseti lidským dávkám vakcíny, se inokuluje na kultury primárních kuřecích fibroblastů nebo na jiné buňky prokazatelně nejméně stejně citlivé k viru klíšťové encefalitidy, a to nejméně na plochu 3 cm<sup>2</sup> buněčné kultury na 1 ml inokula. Inkubuje se 14 dnů při (37 ± 1) °C. Na konci inkubačního období není detekovatelný cytopatický efekt. Odebere se kultivační tekutina a vyšetří se na přítomnost viru klíšťové encefalitidy následující zkouškou na myších nebo validovanou *in vitro* metodou. Nejméně deseti myším starým asi 4 týdny se intracerebrálně inokuluje po 0,03 ml. Myši se pozorují 14 dnů. Neprojeví se u nich známky infekce virem klíšťové encefalitidy.

#### PURIFIKACE

Několik inaktivovaných jednotlivých sklizní se spojí před koncentrací a purifikací vhodnými metodami, nejlépe kontinuálním průtokovým odstředováním v sacharosovém gradientu.

Několik purifikovaných inaktivovaných sklizní se může spojit.

Pouze purifikovaná inaktivovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Specifická účinnost.** Obsah antigenu v purifikované inaktivované sklizni se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Vhodnou metodou se stanoví celkový obsah bílkovin. Specifická účinnost, počítaná jako obsah antigenu

v jednotce hmotnosti bílkovin, je v rozmezí schváleném pro daný výrobek.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více purifikovaných inaktivovaných sklizní.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k výrobě šarže.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Jestliže zkoušky Volný formaldehyd, Bovinní sérumalbumin (kde je to vhodné), Pyrogenní látky a Stanovení účinnosti byly provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek se prokáže, že vakcína obsahuje antigen viru klíšťové encefalitidy. Zkouška Stanovení účinnosti je zároveň zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; použije-li se jako adsorbent hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,1 g/l.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce, použije-li se při přípravě vakcíny bovine sérumalbumin; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Vakcína vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka podá jedná lidská dávka.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Účinnost se stanoví porovnáním dávky nezbytné k ochraně myši před působením letální dávky viru klíšťové encefalitidy podané intraperitoneálně s množstvím referenčního přípravku vakcíny proti klíšťové encefalitidě poskytujícím stejnou ochranu. Pro toto porovnání je nutné použít schválený referenční přípravek a pro čelenž vhodný schválený kmen viru klíšťové encefalitidy.

*Následující postup se uvádí jako příklad metody vhodné pro danou vakcínu.*

*Výběr a rozdělení zkušebních zvířat.* Použijí se zdravé myši o hmotnosti 11 g až 17 g pocházející z jednoho chovu. Pro zajištění validity zkoušky se myši rozdělí nejméně do šesti skupin o vhodném počtu; pro titrací čelenžní suspenze se použijí nejméně čtyři skupiny po deseti myších. Použijí se myši stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

*Stanovení účinnosti vakcíny.* Připraví se nejméně tři vhodná ředění zkoušené vakcíny a referenčního přípravku; pro splnění validačních požadavků jsou obvykle nezbytná čtyři až

pět ředění. Ředění se připraví tak, aby nejvíce koncentrovaná suspenze ochránila více než 50 % zvířat a nejméně koncentrovaná suspenze méně než 50 %. Jednotlivá ředění se přiřadí skupinám myši a každému ze zvířat ve skupině se subkutánně podá 0,2 ml příslušného ředění. Po sedmi dnech se injekce opakují za použití stejné řady ředění. Čtrnáct dnů po druhé injekci se připraví suspenze čelenžního viru obsahující dávku nejméně 100 LD<sub>50</sub> v 0,2 ml. Každé vakcinované myši se intraperitoneálně podá 0,2 ml virové suspenze. Pro ověření čelenžní dávky se připraví čelenžní suspenze viru jako série nejméně tří ředění s nejméně stonásobným intervalem. Čelenžní suspenze a každé ředění se přiřadí skupinám po deseti myších a každé myši se intraperitoneálně podá 0,2 ml čelenžní suspenze nebo příslušného ředění. Myši se pozorují 21 dnů po čelenži a zaznamenává se počet myši uhynulých mezi 7. a 21. dnem po čelenži. Zvířata se mohou šetrně utratit, aby se zabránilo jejich zbytečnému utrpení po virulentní čelenži.

*Výpočty.* Výsledky se počítají obvyklými statistickými metodami pro kvantální odpověď (např. 5.3).

*Validační kritéria.* Zkoušku lze hodnotit, jestliže:

- koncentrace čelenžního viru je nejméně 100 LD<sub>50</sub>;
- pro zkoušenou i referenční vakcínu je ochranná dávka (PD<sub>50</sub>) mezi nejvyšší a nejnižší podanou dávkou;
- statistická analýza nevykazuje významnou odchylku od linearitity nebo rovnoběžnosti křivky dávka-odpověď;
- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je 33 % až 300 % stanovené účinnosti.

*Požadavky na účinnost.* K výpočtu průměrné účinnosti se použijí výsledky všech platných zkoušek a jejich intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ). Při výpočtu váženého průměru se použije převrácená hodnota druhé mocniny směrodatné odchylky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže stanovená účinnost není menší než účinnost schválená oprávněnou autoritou na základě údajů o účinnosti při klinických zkouškách.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitého v přípravku;
- typ buněk použitých pro výrobu vakcíny.

## VACCINUM FEBRIS FLAVAE VIVUM

7.5:0537

### Vakcína proti žluté zimnici živá

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující virus žluté zimnice odvozený od kmene 17D kultivovaný na kuřecích embryích. Vakcína se těsně před použitím rekonstituuje na čirou tekutinu způsobem uvedeným v označení na obalu.

#### VÝROBA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní metoda má prokazatelně poskytovat shodnou živou vakcínu proti žluté zimnici s přijatelnou imunogenitou a bezpečností pro člověka.

Výrobní metoda se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér

a vakcín pro humánní použití (2.6.9) s následující úpravou zkoušky na morčatech: každému morčeti se na dvě různá místa podá deset lidských dávek a pozoruje se 21 dnů.

*Referenční přípravek.* Ve zkoušce Neurotropismus se použije jako referenční přípravek taková šarže vakcíny, která byla s uspokojivými výsledky použita u člověka.

Referenční přípravek kalibrovaný v mezinárodních jednotkách na ampuli se používá k ověření titru virového inokula ve zkoušce na virémii (viscerotropismus) a imunogenitu a k titraci šarže vakcíny při stanovení obsahu.

Mezinárodní jednotka je aktivita obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus pro přípravu matečného a pracovního inokula a všech šarží vakcíny se kultivuje ve tkáních kuřecích embryí z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2).

#### INOKULA

Kmen 17D se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informaci o původu kmene a následném zacházení s ním. Virová inokula se připraví ve velkých množstvích a uchovávají se při teplotě nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Matečné a pracovní inokulum neobsahuje žádnou lidskou bílkovinu, přidané sérum nebo antibiotika.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, je virus ve vakcíně na úrovni 204. až 239. pasáže z původně izolovaného kmene 17D. Pracovní inokulum má být pouze jedinou pasáží z matečného inokula. Pracovní inokulum se má použít bez zprostředkující pasáže jako inokulum pro infikování tkání použitých k výrobě šarže vakcíny, aby se zajistilo, že vakcína byla vyrobena pouze jedinou pasáží z matečného inokula, které vyhovělo všem zkouškám na bezpečnost.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít ke kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako virus žluté zimnice sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek, nebo zkouškami molekulární identity (např. techniky amplifikace nukleových kyselin, sekvenování).

**Cizí agens (2.6.16).** Každé matečné inokulum vyhovuje následujícím zkouškám:

- bakteriální a houbová kontaminace (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus);
- mykoplazmata (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus)
- mykobakterie (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus).

**Viry ptačí leukózy (2.6.24).** Každé matečné inokulum vyhovuje zkoušce na viry ptačí leukózy.

**Cizí agens (2.6.16).** Každé pracovní inokulum vyhovuje následujícím zkouškám:

- zkouška na dospělých myších (pouze intraperitoneální podání) (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum);
- zkouška na morčatech (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum);

- bakteriální a houbová kontaminace (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus);
- mykoplazmata (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus);
- mykobakterie (jak je popsáno ve stati 2.6.16 v odstavci Virové inokulum a sklizený virus);
- zkouška na jiná cizí agens ve tkáňových kulturách: neutralizovaný vzorek 5 ml pracovního inokula, které odpovídá nejméně 500 000 (5,7 log) mezinárodních jednotek, se zkouší na přítomnost cizích agens inokulací do kultur buněk kontinuální linie opičí ledviny a lidských buněk, stejně jako do primárních buněk fibroblastů kuřecích embryí; tyto buňky se inkubují při (36 ± 1) °C a pozorují se 14 dnů; pracovní inokulum vyhovuje, jestliže žádná z buněčných kultur nevykazuje známky přítomnosti jakéhokoliv cizího agens; zkoušku lze hodnotit, jestliže nejméně 80 % buněčných kultur zůstává životaschopných;
- ptačí viry: neutralizovaný vzorek 1 ml pracovního inokula, které odpovídá nejméně 100 000 (5,0 log) mezinárodních jednotek, se zkouší na přítomnost cizích agens inokulací skupiny nejméně dvaceti fertilizovaných vajec z SPF chovů (5.2.2) 9 až 11 dnů starých alantoidní cestou a inokulací druhé skupiny nejméně dvaceti fertilizovaných vajec z SPF chovů (5.2.2) 5 až 7 dnů starých, do žloutkového vaku; inkubuje se 7 dnů; pracovní inokulum vyhovuje, jestliže alantoidní tekutiny ani tekutiny žloutkového vaku nevykazují známky přítomnosti hemaglutinujících agens a jestliže všechna embrya a chorioalantoidní membrány makroskopicky vyšetřené, jsou normální; zkoušku lze hodnotit, jestliže nejméně 80 % embryí přežije 7 dnů pozorovacího období.

**Viry ptačí leukózy (2.6.24).** Každé pracovní inokulum vyhovuje zkoušce na viry ptačí leukózy.

**Zkouška na opicích.** Každé matečné a pracovní inokulum vyhovuje následujícím zkouškám na virémii (viscerotropismus), imunogenitu a neurotropismus na opicích.

Používají se opice rodu *Macaca* citlivé na virus žluté zimnice, které v době podání virové kultury nejsou prokazatelně imunní vůči žluté zimnici. Mají být zdravé a nebyly dříve intracerebrálně nebo intraspinalně inokulovány.

Mimo to nebyly inokulovány jinými způsoby neurotropními viry nebo antigeny příbuznými viru žluté zimnice. Pro každou zkoušku se použije nejméně deset opic.

Použije se zkušební dávka 0,25 ml obsahující množství odpovídající nejméně 5000 (3,7 log) mezinárodních jednotek a nejvýše 50 000 (4,7 log) mezinárodních jednotek, stanovená *in vitro* titrací infekčního viru v buněčné kultuře. Zkušební dávka se v anestezii podá každé opici do jednoho frontálního laloku a opice se pozorují nejméně 30 dnů.

**Virémie (Viscerotropismus).** Viscerotropismus je určen množstvím viru obsaženém v séru. Druhý, čtvrtý a šestý den po inokulaci se každé zkoušené opici odebere krev a z každého vzorku se připraví sérum. Z každého séra se připraví ředění 1 : 10, 1 : 100 a 1 : 1000 a každé ředění se inokuluje do nejméně šesti nádob s buněčnou kulturou používanou ke stanovení virové koncentrace. Inokulum vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sérum neobsahuje více než ekvivalent 500 (2,7 log) mezinárodních jednotek v 0,03 ml

a nejvýše jedno sérum obsahuje více než ekvivalent 100 (2,0 log) mezinárodních jednotek v 0,03 ml.

**Imunogenita.** Za 30 dnů od podání zkušební dávky se každé opici odebere krev a z každého vzorku se připraví sérum. Inokulum vyhovuje zkoušce, jestliže se nejméně 90 % zkoušených opic projeví jako imunní, což se stanoví vyšetřením jejich séra v dále popsané zkoušce na neutralizaci viru žluté zimnice.

Ukázalo se, že malé ředění séra (např. 1 : 10) může obsahovat nespecifické inhibitory, které ovlivňují tuto zkoušku; takové sérum se upraví, aby se inhibitory odstranily. Alespoň ředění séra 1 : 10, 1 : 40 a 1 : 160 od každé opice se smíchají se stejným objemem kultury vakcinačního viru 17D na ředění, které poskytne nejvhodnější počet plaků při použité titrační metodě. Směsi séra s virem se 1 h inkubují ve vodní lázni při 37 °C a pak se ochladí ve vodě s ledem; po 0,2 ml směsi séra s virem se převede na čtyři miskky s buněčnou kulturou a postupuje se jako při stanovení koncentrace viru. Podobně se inokuluje deset misek stejným množstvím virové kultury smíchané se stejným objemem séra zředěného 1 : 10, o němž je známo, že neobsahuje žádné neutralizující protilátky proti viru žluté zimnice. Na konci pozorovacího období se porovná průměrný počet plaků na miskách obsahujících virovou kulturu a neimunní sérum s průměrným počtem plaků na miskách obsahujících virovou kulturu a jednotlivá ředění každého opičího séra. Nejvýše 10 % zkoušených opic má sérum, které při ředění 1 : 10 nestačí snížit počet plaků o 50 %.

**Neurotropismus.** Neurotropismus se stanoví z klinického pozorování encefalidity, z výskytu klinických manifestací a histologických lézí při porovnání s deseti zvířaty inokulovanými referenčním přípravkem. Virové inokulum nevyhovuje, jestliže počet a trvání febrilních reakcí nebo klinických známek encefalidity a patologické nálezy svědčí o změnách vlastností viru.

#### *Klinické hodnocení*

Opice se po 30 dnů denně vyšetřují personálem dobře obeznámeným s klinickými příznaky encefalidity u primátů (je-li třeba, opice se vyjmou z klecí a vyšetří se na příznaky motorické slabosti nebo křečí). Virové inokulum nevyhovuje, jestliže opice po inokulaci vykazují známky encefalidity, jako je paralýza nebo neschopnost stát po stimulaci, nebo je-li mortalita vyšší než u referenčního přípravku. Tyto a jiné příznaky encefalidity, jako jsou parézy, porucha koordinace, letargie, třes nebo křeče, jsou převedeny do číselných hodnot, aby se síla příznaků mohla vyjádřit postupnou řadou. Každý den se každá opice ohodnotí počtem bodů na základě stupnice:

- stupeň 1: zhrublá srst, nechut' k jídlu;
- stupeň 2: vysoko položený hlas, neaktivní, pomalý pohyb;
- stupeň 3: nejisté pohyby, třes, porucha koordinace, únava končetin;
- stupeň 4: neschopnost vstát, paralýza končetin nebo smrt (mrtvé opice se denně ohodnotí čtyřmi body ode dne úmrtí až do 30. dne).

Klinické hodnocení jednotlivé opice odpovídá průměru denního bodování: klinické hodnocení skupiny je aritmetickým součtem bodů jednotlivých opic. Inokulum nevyhovuje, jestliže průměr klinického hodnocení u skupin opic



inokulovaných tímto inokulem je signifikantně vyšší ( $P = 0,95$ ) než u skupiny opic inokulovaných referenčním přípravkem. Při posuzování přijatelnosti inokula se přihlíží i k jednotlivým zvířatům s neobvykle prudkými příznaky.

#### Histologické hodnocení

Vyšetřuje se těchto pět oblastí mozku:

- blok I: corpus striatum v překřížení zrakových nervů;
- blok II: thalamus v úrovni corpora mamillaria;
- blok III: mesencephalon v oblasti colliculus superior;
- blok IV: most a mozeček v oblasti oliva superior;
- blok V: prodloužená mícha a mozeček v oblasti nucleus olivaris acc. medialis.

Každé krční a bederní ztlustění páteřní míchy se rozdělí do šesti bloků; 15 $\mu$ m řezy z tkáně zalité v parafinu se barví gallocyaninem. Numerické hodnocení každého řezu míchy a struktur v každém řezu mozku je uvedeno dále. Léze se bodově hodnotí takto:

- stupeň 1 – minimální: jedno až tři malé ohniskové zánětlivé infiltráty; degenerace nebo ztráta několika neuronů;
- stupeň 2 – střední: čtyři nebo více ohniskových zánětlivých infiltrátů; degenerace nebo ztráta neuronů postihující nejvýše jednu třetinu buněk;
- stupeň 3 – těžký: střední ohniska nebo difuzní zánětlivé infiltráty; degenerace nebo ztráta 33 % až 90 % neuronů.
- stupeň 4 – záplava: různé, ale často prudké zánětlivé reakce; degenerace nebo ztráta více než 90 % neuronů.

Bylo zjištěno, že inokulace vakcíny proti žluté zimnici do opičího mozku způsobuje léze v různých anatomických útvech centrální nervové soustavy o různé frekvenci a síle (I. S. Levenbook et al., *Journal of Biological Standardization*, 1987, 15, 305–313). Na základě těchto dvou indikátorů se anatomické struktury mohou podle histologického hodnocení zařadit do tří skupin: cílová, chráněná a výběrová. Cílové zóny vykazují silné specifické léze u většiny opic bez ohledu na stupeň neurovirulence inokula. Chráněné zóny vykazují minimální specifické léze u menšiny zvířat. Výběrové zóny vykazují velmi signifikantní nárůst výskytu výrazných specifických lézí v závislosti na stupni neurovirulence inokula. Výběrové a cílové zóny pro opice *Macaca cynomolgus* a *Macaca rhesus* jsou uvedeny v tabulce.

Druh opice	Výběrová zóna	Cílová zóna
<i>Macaca cynomolgus</i>	globus pallidus putamen nuclei medioventrales nuclei laterales	substantia nigra
<i>Macaca thesis</i>	nucleus caudatus globus pallidus putamen nuclei medioventrales nuclei laterales krční ztlustění bederní ztlustění	substantia nigra krční ztlustění bederní ztlustění

Bodové hodnocení výběrové a cílové zóny se použije pro konečné hodnocení inokula. Pro hodnocení jednotlivých

opic se sečtou bodová hodnocení reakcí v cílové zóně v každém řezu odděleně podle počtu zkoumaných oblastí. Podobně se vypočítá samostatné hodnocení pro výběrové zóny.

Průměr bodů pro zkoušenou skupinu se vypočítá dvěma způsoby: 1) dělením celkového počtu výběrových zón počtem opic; 2) dělením celkového počtu cílových a výběrových zón počtem opic. Tato dvě hodnocení se mohou použít při rozhodování o vhodnosti inokula. Inokulum nevyhovuje, jestliže počet lézí je signifikantně vyšší ( $P = 0,95$ ) než u skupiny opic inokulovaných referenčním přípravkem.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Všechny práce s fertilizovanými vejci se provádějí za Oseptických podmínek v prostředí, kde se ve stejnou dobu nepracuje s jiným infekčním agens ani s jinými buňkami. Dvě procenta, ale nejméně dvacet a nejvýše osmdesát vajec, se ponechá jako neinfikovaná kontrola. Po inokulaci a inkubaci v kontrolované teplotě se sklízí jen živá a typická kuřecí embrya. V době sklizně se kontrolní vejce zpracují stejným způsobem jako inokulovaná vejce, aby se získala kontrolní embryonální dřev. Stáří embryí v době sklizně viru se odvodí z původního vložení vajec do inkubátoru a mělo by být nejvýše 12 dnů. Po homogenizaci a vyčeření odstředěním se výtah z embryonální dřevě zkouší, jak je popsáno dále, a do dalšího zpracování se uchovává při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$  nebo nižší. Virové sklizně se mohou spojit. K virové suspenzi se v žádném stupni výroby nepřidává žádná lidská bílkovina. Pokud se přidávají stabilizátory, musí se prokázat, že nepůsobí na člověka žádnými antigenními ani senzibilizujícími účinky.

Pouze jednotlivá sklizeň nebo spojené jednotlivé sklizně (kde je to vhodné), které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako virus žluté zimnice sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek, nebo zkouškami molekulární identity (např. techniky amplifikace nukleových kyselin, sekvenování).

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Jednotlivá sklizeň nebo spojené jednotlivé sklizně vyhovují zkoušce na mykoplazmata; použije se 10 ml.

**Mykobakterie** (2.6.2). 5 ml vzorku z jednotlivé sklizně nebo ze spojených jednotlivých sklizní se zkouší na přítomnost *Mycobacterium spp.* kultivačními metodami citlivými na tyto mikroorganismy.

**Embryonální dřev z kontrolních vajec.** Nepřítomnost cizích agens v extraktu kontrolních vajec se prokáže dále popsánými zkouškami.

**Důkaz ostatních cizích agens zkouškou na buněčné kultuře.** 5 ml embryonální dřevě kontrolních embryí se inokuluje do kontinuální buněčné kultury buněk opičích ledvin, lidských buněk a primárních kuřecích embryonálních fibroblastů. Buňky se inkubují při  $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  a pozorují se po dobu

14 dnů. Embryonální dřeň z kontrolních vajec vyhovuje, jestliže není patrná přítomnost žádných cizích agens. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije 80 % buněk kultury.

**Ptačí viry.** Použije se 0,1 ml embryonální dřeneš na jedno vejce a inokuluje se do alantoidní tekutiny každého ze skupiny deseti fertilizovaných vajec z SPF chovů (5.2.2) (9 až 11 dnů starých) a do žloutkového vaku každého z deseti fertilizovaných vajec z SPF chovů (5.2.2) (5 až 7 dnů starých); inkubuje se sedm dnů. Šarže embryonální dřeneš z kontrolních vajec vyhovuje, jestliže alantoidní tekutina ani tekutina žloutkového vaku nevykazuje přítomnost hemaglutinujících agens a jestliže embrya a chorioalantoidní membrány nevykazují typické makroskopicky patrné patologické změny. Zkoušku lze hodnotit, jestliže 80 % inokulovaných vajec přežije pozorovací dobu 7 dnů.

**Koncentrace viru.** Aby se mohlo vypočítat ředění pro konečnou várku vakcíny, zkouší se každá jednotlivá sklizeň způsobem popsaným v odstavci Stanovení účinnosti.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Jednotlivé sklizně nebo spojené jednotlivé sklizně, které vyhověly výše předepsaným zkouškám, se spojí a znovu vyčechí. Provede se stanovení bílkovinného dusíku. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se vhodně zředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živou půdu se použije 10 ml.

**Obsah bílkovinného dusíku.** Před přidáním stabilizátoru je nejvýše 0,25 mg v lidské dávce.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje tepelné stabilitě a všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Ovalbumin provedena s uspokojivými výsledky v konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři obaly šarže lyofilizované vakcíny se udržují v suchém stavu 14 dnů při  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Stanoví se koncentrace viru, jak je uvedeno ve odstavci Stanovení účinnosti, souběžně ve vakcíně skladované při doporučené teplotě a v zahřívané vakcíně. Koncentrace viru v zahřívané vakcíně je nejvýše o 1,0 log nižší než v nezahřívané vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

U vakcíny rekonstituované podle návodu uvedeného na obalu a smíchané se specifickými protilátkami proti viru žluté zimnice dojde k významnému snížení její schopnos-

ti infikovat vnímavé buněčné kultury. Alternativně se vakcína rekonstituovaná podle návodu uvedeného na obalu obsahující virus, který je identifikován jako virus žluté zimnice, zkouší zkouškami molekulární identity (např. techniky amplifikace nukleových kyselin, sekvenování).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ovalbumin.** Nejvýše 5  $\mu\text{g}$  ovalbuminu v lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 %.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 5 m. j. v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny v buněčných kulturách se provádí za použití nejméně tří obalů vakcíny. K validaci každého stanovení se použije trojmo jeden obal vhodného referenčního přípravku. Koncentrace viru referenčního přípravku se monitoruje za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě vývojových záznamů každé laboratoře. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každém obalu vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku, stejně jako pro odpovídající koncentrace spojených virů. Koncentrace spojených virů pro tři obaly vakcíny se porovnají s výsledky souběžně stanoveného referenčního přípravku, aby se získaly výsledky v mezinárodních jednotkách. Koncentrace spojených virů pro tři obaly vakcíny je nejméně 3,0 log mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce a nepřesahuje horní limit schválený oprávněnou autoritou pro daný výrobek.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log mezinárodních jednotek,
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log mezinárodních jednotek od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace spojených virů vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log mezinárodních jednotek; pouze výsledky získané z platných stanovení se sloučí a obvyklými statistickými metodami (např. 5.3) se vypočítá virová koncentrace vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace spojených virů není větší než  $\pm 0,3$  log mezinárodních jednotek. Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- že vakcína byla připravena na kuřecích embryích;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

**VACCINUM FEBRIS TYPHOIDIS****6.0:0156**

## Vakcína proti tyfu

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní suspenzi inaktivovaných mikrobů *Salmonella typhi* obsahující nejméně  $5 \times 10^8$  a nejvýše  $1 \times 10^9$  bakterií (*S. typhi*) v lidské dávce. Lidská dávka nepřevyšuje 1,0 ml.

## VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace z vhodného kmene *S. typhi*, jako např. Ty 2<sup>1</sup>. Hotový přípravek představuje nejvýše tři subkultury kmene, u kterého byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující jeho vhodnost. Bakterie se inaktivují acetonem, formaldehydem, fenolem nebo teplem, případně kombinací posledních dvou metod.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9): podá se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost se prokazuje specifickou aglutinací.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Fenol** (2.5.15). Nejvýše 5 g/l; zkouší se u přípravků, u nichž se fenol použil při výrobě.

**Antigenní schopnost.** Je-li vakcína podána vnímavým laboratorním zvířatům, vyvolá vznik anti-O, anti-H a v menší míře i anti-Vi aglutininů.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- metoda použitá k inaktivaci bakterií;
- počet bakterií v lidské dávce.

**VACCINUM FEBRIS TYPHOIDIS  
CRYODESICCATUM****6.0:0157**

## Vakcína proti tyfu lyofilizovaná

## DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující inaktivované mikroby *Salmonella typhi*. Rekonstruuje se předepsaným způsobem tak, aby vznikla stejnorodá suspenze obsahující nejméně  $5 \times 10^8$  a nejvýše  $1 \times 10^9$  bakterií (*S. typhi*) v lidské dávce. Lidská dávka nepřevyšuje 1,0 ml rekonstituované vakcíny.

## VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace z vhodného kmene *S. typhi*, jako např. Ty 2<sup>1</sup>. Hotový přípravek

představuje nejvýše tři subkultury kmene, u kterého byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující jeho vhodnost. Bakterie se inaktivují buď acetonem nebo formaldehydem, nebo teplem; fenol se v přípravku nepoužívá. Plní se do sterilních obalů a lyofilizuje se do dosažení obsahu vlhkosti vhodného pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9): podá se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost přípravku rekonstituovaného podle návodu uvedeného v označení na obalu se prokazuje specifickou aglutinací.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Rekonstituovaný přípravek vyhovuje těmto zkouškám:

**Fenol** (2.5.15). Nejvýše 5 g/l; zkouší se u přípravků, u nichž se fenol použil při výrobě.

**Antigenní schopnost.** Je-li vakcína podána vnímavým laboratorním zvířatům, vyvolá vznik anti-O, anti-H a v menší míře i anti-Vi aglutininů.

**Sterilita** (2.6.1). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- metoda použitá k inaktivaci bakterií;
- počet bakterií v jedné lidské dávce;
- že se vakcína použije do 8 h po rekonstituci.

**VACCINUM FEBRIS TYPHOIDIS  
POLYSACCHARIDICUM****6.0:1160**

## Vakcína proti tyfu polysacharidová

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující purifikovaný Vi kapsulární polysacharid *Salmonella typhi* kmene Ty2 nebo jiného vhodného kmene, který má schopnost vytvářet Vi polysacharid. Kapsulární Vi polysacharid se sestává z částečně 3-O-acetylovaných opakujících se jednotek 2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranuronové kyseliny s  $\alpha$ -(1→4) vazbami.

## VÝROBA

Výroba Vi polysacharidu je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné tyfové polysacharidové vakcíny s přiměřenou imunitou a bezpečností pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že přípravek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

<sup>1</sup> Tento kmen je poskytován Střediskem pro spolupráci při standardizaci a výzkumu bakteriálních vakcín Světové zdravotnické organizace, Ústav lidských sér a očkovacích látek, Szallas Utea 5, H – 1107, Budapešť, Maďarsko.

**BAKTERIÁLNÍ INOKULA**

Kmen *S. typhi* použitý jako matečné inokulum se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jeho původu a biochemických a sérologických charakteristikách. Kultury pracovního inokula mají vykazovat tytéž charakteristiky jako kmen, který se použil k přípravě matečného inokula.

Pouze kmen, který má následující charakteristiky, se může použít pro přípravu vakcíny: a) barvené nátěry z kultury jsou typické pro enterobakterie; b) kultury zužitkovávají glukosu bez tvorby plynu; c) kolonie na agaru jsou oxidasa-negativní; d) suspenze z kultur se specificky aglutinují se vhodným Vi antisérem nebo na agarové půdě obsahující vhodné Vi antisérum tvoří kolonie prstence.

Čistota bakteriálního kmene použitého jako inokulum se ověřuje metodami vhodné citlivosti. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama, aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

**POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZEŇ**

Pracovní inokulum se pomnožuje na pevné půdě, která může obsahovat složky krevních skupin, nebo v tekuté půdě; získané inokulum se převede do tekuté živné půdy, která se použije k inokulaci konečné živné půdy. Použitá tekutá půda a konečná živná půda jsou semisyntetické a prosté látek, které se srážejí cetrimonium-bromidem a neobsahují složky krevních skupin ani vysokomolekulární polysacharidy, není-li jejich odstranění prokázáno purifikačním procesem.

Bakteriální čistota kultury se ověřuje metodami vhodné citlivosti. Ty mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

Kultura se pak na počátku stacionární fáze inaktivuje přidáním formaldehydu. Bakteriální buňky se odstraní odstředěním; polysacharid se z média vysráží přidáním hexadecyltrimethylamonium-bromidu (cetrimonium-bromidu). Sraženina se sklídí a může se před purifikací uchovávat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**PURIFIKOVANÝ VI POLYSACHARID**

Po rozštěpení polysacharid/cetrimonium-bromidového komplexu se polysacharid purifikuje za použití vhodných postupů k odstranění zbylých nukleových kyselin, bílkovin a lipopolysacharidů. Polysacharidy se vysrážejí ethanolovým srážením jako vápenatá sůl a suší se při  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; získaný prášek tvoří purifikovaný Vi polysacharid. Ztráta sušením se stanoví termogravimetricky (2.2.34) a získaná hodnota se použije k přepočítání výsledků dále uvedených chemických zkoušek na vysušenou látku.

Pouze purifikovaný Vi polysacharid, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Bílkovina** (2.5.16). Nejvýše 10 mg v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

**Nukleové kyseliny** (2.5.17). Nejvýše 20 mg v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

**O-Acetyl skupiny** (2.5.19). Nejméně 2 mmol v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

**Velikost molekul.** Provede se vylučovací chromatografie (2.2.30) za použití *agarosy síťované pro chromatografii R*. Použije se kolona délky 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nastříkne asi 5 mg polysacharidu v objemu 1 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce po asi 2,5 ml. Stanoví se bod odpovídající  $K_0 = 0,25$  a vytvoří se dvě směsi sestávající se z frakcí eluovaných před a za tímto bodem. Stanoví se O-acetyl skupiny v těchto dvou směsích (2.5.19). Ve směsi obsahující frakce eluované před bodem  $K_0 = 0,25$  je nejméně 50 % polysacharidu.

**Totožnost.** Provede se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Bakteriální endotoxiny.** Obsah bakteriálních endotoxinů stanovený vhodnou metodou (2.6.14) je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY**

Jedna nebo více šarží purifikovaného Vi polysacharidu se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, které může obsahovat protimikrobní látku tak, aby objem odpovídající jedné dávce obsahoval 25  $\mu\text{g}$  polysacharidu a roztok byl izotonický s krví (250 mosmol/kg až 350 mosmol/kg).

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím zkouškám, se může použít pro výrobu šarže.

**Sterilita** (2.6.1). Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou fyzikálně-chemickou metodou.

**ŠARŽE**

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů, které se potom uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům předepsaným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Volný formaldehyd a Protimikrobní látka provedeny v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

**Bakteriální endotoxiny.** Obsah bakteriálních endotoxinů stanovený vhodnou metodou (2.6.14) je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**VLASTNOSTI**

Čirá bezbarvá tekutina, prostá viditelných částic.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Provede se zkouška totožnosti za použití vhodné imunochemické metody (2.7.1).

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,5 až 7,5.

**O-Acetyl skupiny.** 0,085  $\mu\text{mol}$  ( $\pm 25\%$ ) na dávku (25  $\mu\text{g}$  polysacharidu).

**Zkoušený roztok.** Do každé ze tří zkumavek se převede po 3 ml vakcíny (dva reakční roztoky a jeden korekční roztok).

**Porovnávací roztoky.** 0,150 g *acetylcholin-chloridu R* se rozpustí v 10 ml *vody R* (základní roztok obsahující 15 g/l *acetylcholin-chloridu*). Těsně před použitím se 0,5 ml základního roztoku zředí *vodou R* na 50 ml (pracovní ředění obsahující 150  $\mu\text{g/ml}$  *acetylcholin-chloridu*). Do deseti zkumavek (reakční a korekční roztoky) se dvojmo rozplní 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml a 1,5 ml pracovního ředění.

Připraví se kontrolní roztok za použití 3 ml *vody R*.

Objem v každé zkumavce se doplní *vodou R* na 3 ml. Do každé korekční zkumavky a ke kontrolnímu roztoku se přidá 0,5 ml směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* (1 + 2). Do každé zkumavky se přidá 1,0 ml *hydroxylaminhydrochloridu alkalického RS*.

Reakce se nechá probíhat přesně 2 min a do každé z reakčních zkumavek se přidá 0,5 ml směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* (1 + 2). Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,2 mol/l RS*, zkumavky se uzavřou a silně se protřepou, aby se odstranily bubliny.

Měří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm proti kontrolnímu roztoku. Pro každý reakční roztok se odečte absorbance příslušného korekčního roztoku. Sestrojí se kalibrační křivka z korigovaných absorbancí pěti porovnávacích roztoků a odpovídajících obsahů *acetylcholin-chloridu*. Z křivky se odečte obsah *acetylcholin-chloridu* ve zkoušených roztocích pro každý zkoušený objem. Vypočítá se průměr ze dvou hodnot.

1 mol *acetylcholin-chloridu* (181,7 g) odpovídá 1 mol *O-acetylu* (43,05 g).

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Pokud se při přípravě použil fenol, nepřesahuje jeho množství 2,5 g/l (2.5.15).

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Vi polysacharid se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití referenčního purifikovaného polysacharidu. Stanovené množství polysacharidu v dávce je 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanoveného obsahu je v rozmezí 80 % až 120 %.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mikrogramů polysacharidu v lidské dávce (25  $\mu\text{g}$ );
- celkové množství polysacharidu v obalu.

## VACCINUM FEBRIS TYPHOIDIS VIVUM PERORALE (STIRPE Ty 21a)

6.4:1055

Vakcína proti tyfu živá perorální (kmen Ty 21a)

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující živé mikroby *Salmonella typhi* kmene Ty 21a, pomnožené ve vhodné živné půdě. Pokud je vakcína podávána v tobolkách, vyhovuje požadavkům článku *Capsulae* (0016).

#### VÝROBA

##### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Hlavní charakteristikou kmene je nedostatek enzymu uridin-difosfát-galaktosa-4-epimerasy. Aktivita galaktopermeasy, galaktokinasy a galaktosa-1-fosfát-uridylyl-transferasy jsou sníženy o 50 % až 90 %. Kmen neobsahuje Vi antigen, bez ohledu na růstové podmínky. Sérum anti-O:9 aglutinuje kmen pouze tehdy, pomnoží-li se na půdě s obsahem galaktosy. Obsahuje bičíkový H:d antigen a netvoří sirovodík na Kliglerově agaru s obsahem železa. Kmen není virulentní pro myši. Buňky kmene Ty 21a lyzují, pokud se pomnoží v přítomnosti 1% galaktosy.

##### BAKTERIÁLNÍ INOKULA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše první subkulturou matečného inokula. Konečná vakcína představuje nejvýše čtvrtou subkulturou původní vakcíny, se kterou byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující vhodnost kmene.

Pouze matečné inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu pracovního inokula.

**Galaktosový metabolismus.** Stanoví se spektrofotometricky; v cytoplazmě kmene Ty 21a v porovnání s kmenem Ty 2 není zjištěna žádná aktivita enzymu uridin-difosfát-galaktosa-4-epimerasy.

**Biosyntéza lipopolysacharidů.** Lipopolysacharidy se extrahují metodou fenol-voda za tepla a zkoušejí se vylučovací chromatografií. Kmen Ty 21a pomnožený na půdě bez galaktosy vykazuje pouze přítomnost (R) typu lipopolysacharidu.

**Sérologické charakteristiky.** Kmen Ty 21a pomnožený na syntetické půdě bez galaktosy se neaglutinuje specifickým anti-O:9 sérem. Vi antisérem se kmen Ty 21a neaglutinuje nikdy, bez ohledu na růstové podmínky. Kmen Ty 21a se H:d bičíkovým antisérem aglutinuje.

**Biochemické markery.** Kmen Ty 21a netvoří na Kliglerově agaru s obsahem železa sirovodík. Tato vlastnost slouží k jeho odlišení od ostatních galaktosa-epimerasa-negativních kmenů *S. typhi*.

**Buněčný růst.** Kmen Ty 21a lyzuje, když roste v přítomnosti 1% galaktosy.

##### POMNOŽOVÁNÍ BAKTERIÍ A SKLIZEŇ

Bakterie z pracovního inokula se pomnoží v prekuře, připraví se jedna subkultura a pak se při 30 °C pomnoží 13 h až 15 h ve vhodné půdě obsahující 0,001 % galaktosy.

Při sklizni nesmí dojít ke kontaminaci jinými mikroorganismy.

Pouze sklizně, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít k přípravě lyofilizované sklizně.

**Hodnota pH.** 6,8 až 7,5; měří se pH kultury.

**Optická hustota.** 6,5 až 11,0; měří se při 546 nm. Před měřením se kultura naředí tak, aby se naměřená hodnota pohybovala mezi 0,1 a 0,5 a podle ředění se pak vypočítá skutečná hustota.

**Totožnost.** Bakterie se pomnožují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosu a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré konkávní a vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

#### LYOFILIZOVANÁ SKLIZEŇ

Sklizeň se smíchá s vhodným stabilizátorem a lyofilizuje se postupem zaručujícím přežití nejméně 10 % bakterií na takový obsah vody, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu vakcíny. K vakcíně se nepřidává žádná protimikrobní látka. Pouze lyofilizovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Bakterie se pomnožují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosu a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré konkávní a vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

**Počet živých bakterií.** Nejméně  $1 \times 10^{11}$  živých mikrobů *S. typhi* kmene Ty 21a v gramu.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). 1,5 % až 4,0 %.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví smícháním jedné nebo více lyofilizovaných sklizní se vhodným vehikulem za vhodných podmínek.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít k přípravě šarže.

**Počet živých bakterií.** Nejméně  $40 \times 10^9$  živých mikrobů *S. typhi* kmene Ty 21a v gramu.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se za vhodných podmínek rozplní do tobolek s enterosolventním obalem nebo do jiných vhodných obalů.

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Počet živých bakterií, se může uvolnit k použití. Výjimkou je požadovaná hodnota počtu živých bakterií v dávkové jednotce, která musí být nejméně  $4 \times 10^9$  živých bakterií.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Bakterie ze zkoušeného přípravku se pomnožují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosu a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré konkávní a vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Kontaminující mikroorganismy** (2.6.12, 2.6.13). Zkouška se provede na vhodných selektivních půdách. Metodou počítání na pevných půdách se stanoví celkový počet životaschopných mikroorganismů. Počet cizích mikroorganismů v jedné dávkové jednotce není větší než  $10^2$  bakterií a 20 hub. Není nalezen žádný patogenní mikroorganismus, zejména *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ani *Salmonella* jiného kmene než Ty 21a.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). 1,5 % až 4,0 %; stanoví se z obsahu jedné tobolky nebo obalu.

#### STANOVENÍ POČTU ŽIVÝCH BAKTERIÍ

Ke zkoušce se použije nejméně pět dávkových jednotek. Obsah jednotlivých dávek se v chladném prostředí zhomogenizuje při 4 °C v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) za použití mixéru a tolika skleněných kuliček, aby vyčnívaly z tekutiny. Ihned po homogenizaci se připraví vhodné ředění suspenze ve vychlazeném rozpouštědle a inokuluje se na agar s přísadou mozkosrdcového výtažku. Inkubuje se 20 h až 36 h při  $(36 \pm 1)$  °C. Zkoušený přípravek obsahuje v jedné dávkové jednotce nejméně  $2 \times 10^9$  živých mikrobů *S. typhi* Ty 21a.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství živých bakterií v jedné dávce;
- že vakcína je pouze pro perorální použití.

## VACCINUM HAEMOPHILI STIRPE b CONIUGATUM

7.5:1219

### Vakcína proti hemofilu typu b konjugovaná

#### DEFINICE

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující polysacharid získaný ze vhodného kmene *Haemophilus influenzae* typ b, kovalentně vázaný na bílkovinný nosič. Polysacharid polyribosylribitolfosfát, označovaný jako PRP, je lineární kopolymer složený z opakujících se jednotek 3-β-D-ribofuranosyl-(1→1)-ribitol-5-fosfátu  $[(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n]$  s definovanou molekulovou hmotností. Bílkovinný nosič, je-li konjugován s PRP, je schopen navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné konjugované vakcíny proti hemofilu typu b s dostatečnou imunitou a bezpečností pro člověka. Výroba PRP a nosiče je založena na systému jednotné inokulace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9) a také zkoušce na pyrogenní látky (2.6.8) prováděné následujícím způsobem. Na 1 kg hmotnosti králíka se podá množství vakcíny odpo-

vídající: 1 µg PRP v případě vakcíny s difterickým toxoidem nebo CRM 197 difterickou bílkovinou jako nosičem; 0,1 µg PRP v případě vakcíny s tetanickým toxoidem jako nosičem; 0,025 µg PRP v případě vakcíny s OMP (komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B) jako nosičem.

V průběhu vývojových studií a kdykoliv je nutná revalidace, se má zkouškami na zvířatech prokázat, že vakcína shodně indukuje na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk.

Stabilita šarže a příslušných meziproduktů se hodnotí jednou nebo více vybranými zkouškami. Tyto zkoušky mohou zahrnovat stanovení velikosti molekul, stanovení volného PRP v konjugátu a zkoušku imunogenity u myši. Na základě výsledků stabilitních zkoušek se určí pro tyto zkoušky požadavky na uvolnění, aby se zajistilo, že vakcína bude na konci doby použitelnosti ještě vyhovující.

#### BAKTERIÁLNÍ INOKULA

Metodami vhodné citlivosti se prokáže, že matečná inokula *H. influenzae* typu b neobsahují kontaminující látky. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

V tekutinách použitých pro udržení životaschopnosti kmene se nepoužijí komplexní produkty živočišného původu, a to ani pro lyofilizaci nebo pro uchovávání zmrazením.

Doporučuje se PRP připravený jednoduchou inokulací charakterizovat za použití nukleární magnetické rezonanční spektrometrie (2.2.33).

#### POLYSACHARID *H. INFLUENZAE* TYPU B (PRP)

*H. influenzae* typu b se pomnoží v tekuté půdě, která neobsahuje vysokomolekulární polysacharidy; jestliže některá složka půdy obsahuje složky krevních skupin, postup se má validovat, aby se prokázalo, že po purifikačních krocích nejsou tyto látky dále detekovatelné. Čistota bakteriální kultury se ověří vhodnými metodami. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultur vhodným specifickým antisérem. Kultura se může inaktivovat. PRP se oddělí z tekuté kultury a purifikuje se vhodnou metodou. Těkavé látky, včetně vody, se v purifikovaném polysacharidu stanoví vhodnou metodou. Zjištěná hodnota se použije k přepočítání výsledků určitých zkoušek na vysušenou látku, jak je předepsáno dále.

Pouze PRP, který vyhoví následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konjugátu.

**Totožnost.** PRP se prokáže imunochemickou metodou (2.7.1) nebo jinou vhodnou metodou, např. <sup>1</sup>H nukleární magnetickou rezonanční spektrometrií (2.2.33).

**Distribuce velikosti molekul.** Procento PRP eluované před danou hodnotou  $K_0$  nebo v rozsahu hodnot  $K_0$  se stanoví vylučovací chromatografií (2.2.30). Pro jednotlivé přípravky se stanoví přijatelná hodnota a každá šarže PRP musí prokazatelně vyhovovat těmto limitům. V tabulce 1 jsou pro informaci uvedeny limity pro schvalované výrobky za použití uvedených stacionárních fází. Kde je to vhodné,

distribuce velikosti molekul se stanoví také po chemické modifikaci polysacharidu.

Pro stanovení distribuce velikosti molekul se může použít také kapalinová chromatografie (2.2.29) s detektorem na bázi víceúhlového rozptylu laserového světla.

Validované stanovení stupně polymerace nebo poměrného zastoupení molekulové hmotnosti a rozptylu molekulových hmotností se mohou použít místo stanovení distribuce velikosti molekul.

**Ribosa** (2.5.31). V rozmezí schváleném pro daný přípravek oprávněnou autoritou; počítáno na vysušenou látku.

**Fosfor** (2.5.18). V rozmezí schváleném pro daný přípravek oprávněnou autoritou; počítáno na vysušenou látku.

**Bílkovina** (2.5.16). Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku. K detekci bílkovin o koncentraci 1% nebo vyšší se použije dostatečné množství PRP.

**Nukleová kyselina** (2.5.17). Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 10 m. j. v mikrogramu PRP.

**Zbytkové látky.** Kde je to vhodné, provádějí se zkoušky na stanovení zbytkových látek použitých při inaktivaci a purifikaci. Stanoví se přijatelná hodnota pro každou látku pro daný přípravek a každá šarže PRP musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu. Jestliže validační studie prokázaly odstranění zbytkových látek, zkouška u PRP se může vypustit.

#### BÍLKOVINNÝ NOSIČ

Bílkovinný nosič se vybere tak, aby po konjugaci s PRP byl schopen indukovat na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk. Povolené bílkovinné nosiče a konjugační metody jsou uvedeny pro informaci v tabulce 1. Bílkovinný nosič je produkován kulturou vhodných mikroorganismů ověřenou na bakteriální čistotu. Kultura může být inaktivovaná; bílkovinný nosič se vhodnou metodou purifikuje. Pouze bílkovinný nosič, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k výrobě konjugátu.

**Totožnost.** Bílkovinný nosič se identifikuje vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo ekvivalent 100 dávek, podle toho, co je méně.

**Difterický toxoid.** Difterický toxoid se vyrábí tak, jak je popsáno v článku *Vaccinum diphtheriae adsorbatum* (0443) a vyhovuje požadavkům předepsaným pro várku purifikovaného toxoidu.

**Tetanický toxoid.** Tetanický toxoid se vyrábí tak, jak je popsáno v článku *Vaccinum tetanicum adsorbatum* (0452) a vyhovuje požadavkům předepsaným pro várku purifikovaného toxoidu, kromě antigenní čistoty (2.7.27), která je nejméně 1500 Lf na miligram bílkovinného dusíku.

**Difterická bílkovina CRM 197.** Obsahuje nejméně 90 % difterické CRM 197 bílkoviny, stanovené vhodnou metodou. Provádějí se vhodné zkoušky pro validaci nebo běžně, aby se prokázalo, že přípravek není toxický.

**Tab. 1** Charakteristiky přípravku a specifikace pro PRP a bílkovinný nosič u běžně schválených přípravků

Typ	Nosič		Hemofilový polysacharid		Konjugace	
	Čistota	Jmenovité množství na dávku	Typ PRP	Jmenovité množství na dávku	Metoda vazby	Postup
difterický toxoid	> 1500 Lf na miligram dusíku	18 µg	PRP redukované velikosti $K_0$ : 0,6–0,7; použije se agarosa síťovaná pro chromatografii R	25 µg	aktivace PRP bromkyanem	aktivovaný difterický toxoid (D-AH <sup>+</sup> ), bromkyanem aktivovaný PRP
tetanický toxoid	> 1500 Lf na miligram dusíku	20 µg	PRP ≥ 50 % ≤ $K_0$ : 0,30; použije se agarosa síťovaná pro chromatografii R	10 µg	zprostředkovaně karbodiimidem	ADH-aktivovaný PRP (PRP-cov.-AH) + tetanický toxoid + EDAC
CRM 197 difterická bílkovina	> 90 % difterické bílkoviny	25 µg	PRP redukované velikosti Dp = 15–35 nebo 10–35	10 µg	reduktivní aminace (jednostupňová metoda) nebo N-hydroxysukcinimidová aktivace	přímé navázání PRP na CRM 197 (aktivované kyantrihydroborátem)
komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B (OMP)	bílkoviny vnější membrány ≤ 8 % lipopolysacharidu	125 µg nebo 250 µg	PRP redukované velikosti $K_0$ < 0,6; použije se agarosa síťovaná pro chromatografii R nebo $M_w$ > 50 × 10 <sup>3</sup>	7,5 µg nebo 15 µg	thioetherová vazba	PRP aktivovaný CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + thioaktivovaný OMP
ADH = dihydrazid kyseliny adipové		BrAc = bromacetylchlorid				
BuA2 = butan-1,4-diamid		CDI = karbonyldiimidazol				
Dp = stupeň polymerace		EDAC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid				
IM = imidazolium		$M_w$ = vážený průměr molekulové hmotnosti				

Vakcíny pro  
humánní  
použití

**OMP (komplex bílkovin vnější membrány meningokoka skupiny B).** OMP vyhovuje následujícím požadavkům pro lipopolysacharidy a pyrogenní látky.

*Lipopolysacharidy.* Nejvýše 8 % lipopolysacharidů; stanoví se vhodnou metodou.

*Pyrogenní látky (2.6.8).* Na 1 kg hmotnosti králíka se podá 0,25 µg OMP.

#### VÁRKA PRP KONJUGÁTU

PRP se chemicky modifikuje, aby se umožnila konjugace; obvykle se před nebo během tohoto postupu částečně depolymeruje. Před konjugací se mohou do bílkovinného nosiče nebo PRP zavést reaktivní funkční skupiny nebo vazebné můstky (spacers). Aby se zkontrolovala správnost postupu, určí se stupeň derivatizace. Konjugát se získá kovalentní vazbou PRP a bílkovinného nosiče. Kde je to vhodné, blokují se nezreagované funkční skupiny schopné potenciálně reagovat se vhodnými krycími činidly; konjugát se purifikuje, aby se tyto látky odstranily.

Pouze várka konjugátu, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny. Pro každou zkoušku a každý jednotlivý přípravek se stanoví

limity pro přijetí a každá šarže konjugátu musí prokazatelně těmto limitům vyhovovat. Limity těchto zkoušek, vztahující se na běžně schválené přípravky, jsou uvedeny v tabulce 2. Pro lyofilizovanou vakcínu se mohou některé ze zkoušek provést spíše u šarže než ve várce konjugátu, neboť lyofilizační postup může ovlivnit zkoušenou složku.

**PRP.** Obsah PRP se určí stanovením fosforu (2.5.18), nebo stanovením ribosy (2.5.31) či vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Bílkovina.** Obsah bílkoviny se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (např. 2.5.16).

**Poměr PRP k bílkovinám.** Poměr se stanoví výpočtem.

**Distribuce velikosti molekul.** Distribuce velikosti molekul se stanoví vylučovací chromatografií (2.2.30).

**Volný PRP.** K oddělení nenavázaného PRP z konjugátu se použije řada metod, jako jsou srážecí metody, gelová filtrace, vylučovací chromatografie, iontoměničová kapalinová chromatografie a hydrofobní chromatografie, ultrafiltrace a ultracentrifugace. Množství volného PRP se může určit řadou metod, včetně vysoce výkonné iontoměničové chromatografie



**Tab. 2** Požadavky na várku konjugátu pro běžně schválené přípravky

Zkouška	Bílkovinný nosič			
	Difterický toxoid	Tetanický toxoid	CRM 197	OMP
volný PRP	< 37 %	< 20 %	< 25 %	< 15 %
volná bílkovina	< 4 %	< 1 %, kde je to vhodné	< 1 % nebo < 2 %, závisí na použité metodě spojení	neprovádí se
poměr PRP k bílkovinám	1,25–1,8	0,30–0,55	0,3–0,7	0,05–0,1
molekulová velikost ( $K_0$ )				
agarosa síťovaná pro chromatografii R	95 % < 0,75	60 % < 0,2	50 % 0,3–0,6	85 % < 0,3
agarosa síťovaná pro chromatografii R1	0,6–0,7	85 % < 0,5		

s pulzní ampérometrickou detekcí (HPAEC-PAD) a imunostanovením s PRP protilátkami.

**Volný bílkovinný nosič.** Stanoví se vhodnou metodou buď přímo, nebo odvozením obsahu výpočtem z výsledků ostatních zkoušek. Množství je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Nezreagované funkční skupiny.** Nezreagované funkční skupiny se ve várce konjugátu nedetekují, pokud se validačním postupem prokáže, že nezreagované funkční skupiny detekovatelné v tomto stadiu se odstraní při následujících výrobních krocích (např. vzhledem ke krátkému poločas).

**Zbytkové látky.** Odstranění zbytků látek, jako jsou kyanid, EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid] a fenol, se prokáže vhodnými zkouškami nebo validací výrobního postupu.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo ekvivalent 100 dávek, podle toho, co je méně.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

K várce konjugátu se před ředěním na konečnou koncentraci vhodným rozpouštědlem může přidat adjuvans, protimikrobní látka a stabilizátor.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství; kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která odpovídá všem dále uvedeným požadavkům a požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu se může uvolnit pro použití. Pokud byla zkouška Protimikrobní látky provedena u konečné várky vakcíny, může se u šarže vynechat.

**Hodnota pH (2.2.3).** Hodnota pH vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Volný PRP.** K oddělení nenavázaného PRP z konjugátu se použije řada metod, jako jsou srážecí metody, gelová filtrace, vylučovací chromatografie, iontoměničová kapalinová chromatografie a hydrofobní chromatografie, ultrafiltrace a ultracentrifugace. Množství volného PRP se může určit řadou metod, včetně vysoce výkonné iontoměničové chromatografie s pulzní ampérometrickou detekcí (HPAEC-PAD) a imunostanovením s PRP protilátkami. Množství volného PRP není vyšší než hodnota schválená pro daný přípravek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost vakcíny se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) pro PRP.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Obsah PRP.** Nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu. Stanoví se buď jako obsah ribosy (2.5.31), nebo fosforu (2.5.18), imunochemickou metodou (2.7.1) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií s pulzní ampérometrickou detekcí (2.2.29).

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použil hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). U lyofilizovaných vakcín je obsah vody nejvýše 3,0 %.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Obsah je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou pro daný produkt. Pokud některá ze složek vakcíny brání stanovení endotoxinů, provede se zkouška na pyrogenní látky popsána v odstavci Všeobecná ustanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mikrogramů PRP v lidské dávce;
- typ a jmenovité množství bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce.

## VACCINUM HEPATITIDIS A INACTIVATUM ADSORBATUM

6.6:1107

### Vakcína proti hepatitidě A inaktivovaná adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi vhodného kmene viru hepatitidy A kultivovaného v buněčných kulturách, inaktivovaného validovanou metodou a adsorbovaného na minerální nosič.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a na systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodnou vakcínu, která vyhovuje požadavkům na imunogenitu, neškodnost a stabilitu.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že přípravek bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Není-li předepsáno a schváleno jinak, neprojde virus v konečném přípravku více pasážemi z matečného inokula než virus použitý k přípravě vakcíny, která vyhověla v klinických studiích z hlediska bezpečnosti a účinku.

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek se použije část reprezentativní šarže vakcíny, která byla ve zkoušce na zvířatech prokazatelně nejméně stejně imunogenní jako šarže, která v klinické studii na mladých zdravých dospělých jedincích vykazala nejméně 95% sérokonverzi odpovídající hladině neutralizačních protilátek považované za ochrannou hladinu po úplné primární imunizaci. Jako ochranná hladina protilátek se uznává 0,02 m. j./ml, stanoveno enzymově imunisorbentovým stanovením.

##### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v linii lidských diploidních buněk (5.2.3) nebo v kontinuální buněčné linii schválené oprávněnou autoritou.

##### INOKULA

Kmen viru hepatitidy A, který se používá k přípravě matečného inokula, se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu kmene a následném zacházení s ním.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé matečné a pracovní inokulum viru se identifikuje jako virus hepatitidy A za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se v každém matečném a pracovním inokulu stanoví koncentrace viru.

**Cizí agens.** Pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula pro virové vakcíny (2.6.16). Jestliže byla pro izolaci virového kmene použita kultura primárních opičích buněk, provedou se navíc opatření, aby se zajistilo, že kmen není

kontaminován opičím viry, jako je virus opičí imunodeficiency a filoviry.

##### KULTIVACE VIRU A SKLIZEŇ

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě médií pro kultivaci buněk se může použít zvířecí sérum (nikoli lidské sérum). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červená fenolová a antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). Několikanásobné sklizeň z téže buněčné produkční kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň.

Pouze jednotlivá sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít k přípravě vakcíny.

Jestliže se stanovení poměru virové koncentrace k obsahu antigenu provedlo na vhodném počtu jednotlivých sklizní, aby se prokázala shodnost výroby, může se toto stanovení následně při běžné kontrole vypustit.

**Totožnost.** Zkouška na obsah antigenu je zároveň zkouška totožnosti jednotlivé sklizeň.

**Bakteriální a houbová kontaminace (2.6.1).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na mykoplazmata; na každou živnou půdu se použije 1 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z kultury produkčních buněk vyhovují zkoušce Totožnosti a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

**Obsah antigenu.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví obsah antigenu hepatitidy A vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1); obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Poměr koncentrace viru k obsahu antigenu.** Shodnost poměru koncentrace infekčního viru k obsahu antigenu stanoveného vhodnou metodou na buněčné kultuře je potvrzena validací na vhodném počtu jednotlivých sklizní.

##### PURIFIKACE A PURIFIKOVANÁ SKLIZEŇ

Sklizeň, která může být spojením několika jednotlivých sklizní, se purifikuje validovanými metodami. Jsou-li pro kultivaci viru použity kontinuální buněčné linie, purifikační proces prokazatelně snižuje hladinu DNA hostitelských buněk.

Pouze purifikovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě inaktivované sklizeň.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a jako počáteční bod pro sledování inaktivační křivky se v purifikované sklizni stanoví vhodnou metodou na tkáňové kultuře koncentrace infekčního viru.

**Poměr antigenu k celkové bílkovině.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah antigenu viru hepatitidy A. Obsah celkové bílkoviny se stanoví validovanou metodou. Poměr obsahu antigenu viru hepatitidy A k obsahu celkové bílkoviny je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v ekvivalentu jedné lidské dávky; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Jestliže to výrobní proces umožní, lze použít jiné vhodné bílkovinné markery k prokázání účinné purifikace.

**Zbytková DNA hostitelských buněk.** Je-li pro kultivaci viru použita kontinuální buněčná linie, je obsah zbytkové DNA hostitelských buněk stanovený vhodnou imunochemickou metodou nejvýše 100 pg v jedné lidské dávce.

**Zbytkové chemické látky.** Použijí-li se při purifikačních postupech chemické látky a pokud validace postupu neprokáže jejich úplné odstranění, provedou se na purifikované sklizni (nebo na inaktivované sklizni) zkoušky na tyto látky. Koncentrace nesmí přesáhnout limity schválené pro daný přípravek.

#### INAKTIVACE A INAKTIVOVANÁ SKLIZEŇ

Několik purifikovaných sklizní se před inaktivací může spojit. K zamezení interference v inaktivačním procesu se musí předcházet vzniku virových agregátů nebo se agregáty musí odstranit těsně před a/nebo během inaktivačního procesu. Virová suspenze se inaktivuje validovanou metodou, která je prokazatelně schopná shodně inaktivovat virus hepatitidy A bez poškození jeho antigenní a imunogenní aktivity; pro každý inaktivační postup se sestojí inaktivační křivka reprezentující koncentraci zbytkového živého viru, měřenou nejméně třikrát (např. ve dni 0, 1 a 2 inaktivačního postupu). Použije-li se k inaktivaci formaldehyd, na konci inaktivačního postupu se stanoví zbytky volného formaldehydu.

Pouze inaktivovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Inaktivace.** Proveďte se kultivační zkouška na přítomnost zbytků infekčního viru hepatitidy A inokulací určitého množství inaktivované sklizně. Toto množství odpovídá 5 % šarže nebo, jestliže sklizeň obsahuje 30 000 dávek nebo více, nejméně 1500 dávkám. Inokuluje se do buněčných kultur téhož typu, jaký se použil pro přípravu vakcíny; inkubuje se nejméně 70 dnů a během této doby se provede nejméně jedna buněčná pasáž. Na konci inkubačního období se provede zkouška vhodné citlivosti na přítomnost zbytkového infekčního viru. Ve vzorcích odebraných na konci inaktivace se nenaleznou známky kultivace viru hepatitidy A. Jako pozitivní kontrola se souběžně použije infekční virus k prokázání vnímavosti buněk a nepřítomnosti interference. Inkubuje se celkem nejméně 70 dnů, ve kterých se provede nejméně jedna pasáž buněk.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 2 m. j. endotoxinu v jedné lidské dávce.

**Obsah antigenu.** Obsah antigenu viru hepatitidy A se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Zbytkové chemické látky.** Viz odstavec Purifikace a purifikovaná sklizeň.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více inaktivovaných sklizní. Mohou se přidat schválená adjuvans, stabilizátory a protimikrobní látky.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů. Obaly se potom uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkoušky Volný formaldehyd (kde je to vhodné) a Protimikrobní látka (kde je to vhodné) byly provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, lze je u šarže vypustit. Jestliže bylo provedeno Stanovení účinnosti na myších nebo jiných zvířatech v konečné várce vakcíny s vyhovujícím výsledkem, lze u šarže tuto zkoušku vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigen viru hepatitidy A se ve vakcíně prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek nebo zkouškou *in vivo* (2.7.14).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, jestliže byl použit jako adsorbent hydratovaný fosforečnan hliníkový nebo hydroxid hliníkový.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Vakcína vyhovuje zkoušce Stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě A (2.7.14).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede biologický původ buněk použitých pro přípravu vakcíny.

## VACCINUM HEPATITIDIS A INACTIVATUM ET HEPATITIDIS B (ADNr) ADSORBATUM

6.0:1526

Vakcína proti hepatitidě A (inaktivovaná)  
a hepatitidě B (rDNA) adsorbovaná

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi vhodného kmene viru hepatitidy A, kultivovaného v buněčných kulturách a inaktivovaného validovanou metodou, a povrchového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg), složky bílkoviny viru hepatitidy B, získaného rekombinantní DNA technologií; tyto antigeny jsou adsorbovány na minerální adsorbent, jako je hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

### VÝROBA

#### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Obě složky se připravují, jak je popsáno v člancích *Vaccinum hepatitis A inactivatum adsorbatum (1107)* a *Vaccinum hepatitis B (ADNr)(1056)* a vyhovují požadavkům v nich uvedených.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek se použije část reprezentativní šarže vakcíny, která byla ve zkoušce na zvířatech prokazatelně nejméně stejně imunogenní jako šarže, která v klinické studii na mladých zdravých dospělých jedincích vykazala nejméně 95% sérokonverzi odpovídající hladině neutralizačních protilátek považované za ochrannou hladinu po úplné primární imunizaci. Pro hepatitidu A se jako ochranná hladina protilátek uznává nejméně 0,02 m. j./ml, stanoveno enzymově imunisorbentovým stanovením. Pro hepatitidu B se jako ochranná hladina uznává nejméně 0,01 m. j./ml protilátek proti HBsAg.

#### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více inaktivovaných sklizní viru hepatitidy A a jedné nebo více šarží purifikovaného antigenu.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkoušky Volný formaldehyd (je-li to vhodné) a Protimikrobní látka (je-li to vhodné) byly provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, lze je u šarže vypustit. Jestliže Stanovení účinnosti složek hepatitidy A

a/nebo hepatitidy B bylo v konečné várce vakcíny provedeno *in vivo* s vyhovujícími výsledky, lze je u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vakcína prokazatelně obsahuje antigen viru hepatitidy A a povrchový antigen viru hepatitidy B. Prokazuje se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek nebo zkouškou imunogenity na myších popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; jestliže byl jako adsorbent použit hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 2 m. j. endotoxinu v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Složka hepatitidy A.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě A (2.7.14).

**Složka hepatitidy B.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě B (rDNA) (2.7.15).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- množství antigenu viru hepatitidy A a povrchového antigenu viru hepatitidy B v obalu;
- typ buněk použitých pro přípravu vakcíny;
- název a množství použitého adsorbentu;
- že vakcína se před použitím musí protřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM HEPATITIDIS A INACTIVATUM ADSORBATUM ET FEBRIS TYPHOIDIS POLYSACCHARIDICUM

7.3:2597

Vakcína proti hepatitidě A (inaktivovaná)  
adsorbovaná a proti tyfu polysacharidová

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi vhodného kmene viru hepatitidy A, kultivovaného v buněčných kulturách a inaktivovaného validovanou metodou, a purifikovaného Vi kapsulárního polysacharidu získaného ze *Salmonella typhi* kmene Ty2 nebo jiného vhodného kmene, který má schopnost vytvářet Vi polysacharid.

Antigen viru hepatitidy A je adsorbován na minerální adsorbent, jako je hydroxid hlinitý. Vi kapsulární polysacharid sestává z částečně 3-O-acetylovaných opakujících se

jednotek 2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranuronové kyseliny s  $\alpha$ -(1→4) vazbami.

Vakcína je tvořena buď tekutou směsí obsahující složky hepatitidy A a Vi polysacharidu proti tyfu, nebo dvěma oddělenými tekutinami, z nichž jedna obsahuje složku hepatitidy A a druhá obsahuje Vi polysacharid proti tyfu; tyto tekutiny se smíchají těsně před použitím.

## VÝROBA

### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Obě složky se připravují, jak je popsáno v člancích *Vaccinum hepatitis A inactivatum adsorbatum* (1107) a *Vaccinum febris typhoidis polysaccharidicum* (1160) a vyhovují požadavkům v nich uvedených.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoserá a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek pro složku hepatitidy A se použije část reprezentativní šarže vakcíny, která byla ve zkoušce na zvířatech prokazatelně nejméně stejně imunogenní jako šarže, která v klinické studii na mladých zdravých dospělých jedincích vykazala nejméně 95% sérokonverzi odpovídající hladině neutralizačních protilátek považované za ochrannou hladinu po úplné primární imunizaci. Pro hepatitidu A se jako ochranná hladina protilátek uznává nejméně 0,02 m. j./ml, stanoveno enzymově imunisorbentovým stanovením.

### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka složky hepatitidy A se připraví z jedné nebo více inaktivovaných sklizní viru hepatitidy A. Mohou se přidat schválená adjuvancia, stabilizátory a protimikrobní látky.

Konečná várka složky purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu se připraví rozpuštěním jedné nebo více šarží purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu ve vhodném rozpouštědle, které může obsahovat protimikrobní látku tak, aby objem odpovídající jedné dávce obsahoval 25  $\mu$ g Vi polysacharidu proti tyfu a roztok byl izotonický s krví (250 mosmol/kg až 350 mosmol/kg).

Jestliže je vakcína tvořena tekutou směsí obou složek, připraví se konečná várka přidáním vhodného množství várky purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu k várce hepatitidy A.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Konečná várka se asepticky rozplní do sterilních obalů, které se uzavřou, aby se zabránilo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkoušky Volný formaldehyd (je-li to vhodné),

Protimikrobní látka (je-li to vhodné) a Bakteriální endotoxiny byly provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit. Jestliže stanovení účinnosti *in vivo* složky hepatitidy A bylo provedeno v konečné várce s vyhovujícími výsledky, lze je u šarže vypustit.

## VLASTNOSTI

*Jestliže je vakcína tvořena dvěma oddělenými tekutinami, provede se zkouška A se složkou hepatitidy A a zkouška B se složkou purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu. Zkouška C se provede, jestliže je vakcína tvořena tekutou směsí obou složek nebo, pokud je vakcína tvořena dvěma oddělenými tekutinami, ihned po smíchání obou tekutin.*

A. Bělavá zakalená suspenze.

B. Čirá bezbarvá tekutina, prostá viditelných částic.

C. Zakalená tekutina s malým podílem bílé usazeniny.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

*Jestliže je vakcína tvořena dvěma oddělenými tekutinami, provede se zkouška A se složkou hepatitidy A a zkouška B se složkou purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu. Jestliže je vakcína tvořena tekutou směsí obou složek, provedou se zkoušky A i B.*

A. Antigen viru hepatitidy A se prokazuje vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek nebo zkouškou stanovení účinnosti *in vivo* (2.7.14).

B. Vi polysacharid proti tyfu se prokazuje vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Jestliže je vakcína tvořena dvěma oddělenými tekutinami, provedou se zkoušky Hodnota pH, Protimikrobní látka a Bakteriální endotoxiny u obou složek; pro složku hepatitidy A se provede zkouška Hlinik a pro složku purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu se provede zkouška O-Acetyl skupiny; zkoušky Hodnota pH, Volný formaldehyd, Osmolalita a Sterilita se provedou ihned po smíchání obou tekutin. Jestliže je vakcína tvořena tekutou směsí obou složek, provede se zkouška O-Acetyl skupiny ještě před smícháním obou složek.*

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,8 až 7,8 pro složku hepatitidy A; 6,5 až 7,5 pro složku purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu; 6,6 až 7,6 pro vakcínu tvořenou tekutou směsí obou složek nebo, pokud je vakcína tvořena dvěma oddělenými tekutinami, ihned po smíchání obou tekutin.

**Hlinik** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; jestliže byl jako adsorbent použit hydroxid hlinitý.

**Volný formaldehyd** (2.4.18). Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Osmolalita** (2.2.35). Kde je to vhodné, je osmolalita v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Obsah bakteriálních endotoxinů je pro složku hepatitidy A méně než 2 m. j. endotoxinu v jedné lidské dávce a pro složku purifikovaného Vi polysacharidu proti tyfu je ve schváleném rozmezí. Jestliže je vakcína tvořena tekutou směsí obou složek, obsah bakteriálních endotoxinů je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**O-Acetyl skupiny** (2.5.19). 0,085  $\mu\text{mol}$  ( $\pm 25\%$ ) na dávku (25  $\mu\text{g}$  polysacharidu).

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Složka hepatitidy A.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě A (2.7.14).

**Složka Vi polysacharidu proti tyfu.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti Vi polysacharidu proti tyfu, který se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití referenčního purifikovaného polysacharidu. Stanovené množství Vi polysacharidu proti tyfu v dávce je 80 % až 120 % množství uvedeného v označení na obalu. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanoveného obsahu je v rozmezí 80 % až 120 %.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- množství antigenu viru hepatitidy A v lidské dávce;
- počet mikrogramů polysacharidu v lidské dávce (25  $\mu\text{g}$ );
- celkové množství polysacharidu v obalu;
- typ buněk použitých pro přípravu vakcíny;
- název a množství použitého adsorbentu;
- že vakcína se před použitím musí protřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

## VACCINUM HEPATITIDIS A INACTIVATUM VIROSOMALE

6.6:1935

### Vakcína proti hepatitidě A virosomová inaktivovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi z vhodného kmene viru hepatitidy A kultivovaného v buněčných kulturách a inaktivovaného validovanou metodou. Jako adjuvans jsou použity virosomy složené z bílkovin kmene chřipky schváleného pro jednotlivý přípravek a fosfolipidy.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat vakcíny shodné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost byly klinicky ověřeny na člověku.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

**Referenční přípravek.** Referenční přípravek inaktivovaného antigenu hepatitidy A se kalibruje proti šarži vakcíny proti

hepatitidě A (inaktivované, virosomové), která v klinických studiích na mladých zdravých dospělých jedincích vykazala nejméně 95% sérokonverzi, odpovídající hladině neutralizačních protilátek považované za ochrannou hladinu po úplné primární imunizaci. Jako ochranná hladina protilátek se uznává 0,02 m. j./ml, stanoveno enzymově imunisorbentovým stanovením (ELISA).

#### PŘÍPRAVA ANTIGENU VIRU HEPATITIDY A

Příprava antigenu viru hepatitidy A je založena na systému jednotné inokulace a systému buněčných bank. Výrobní metoda má prokazatelně poskytovat shodnou vakcínu, která vyhovuje požadavkům na imunogenitu, neškodnost a stabilitu.

Pokud není předepsáno a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprojde více pasážemi z matečného inokula než virus použitý k přípravě vakcíny, která vyhověla v klinických studiích z hlediska bezpečnosti a účinku.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU HEPATITIDY A

Virus se kultivuje v linii lidských diploidních buněk (5.2.3).

#### INOKULA VIRU HEPATITIDY A

Kmen viru hepatitidy A, který se používá k přípravě matečného inokula, se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu kmene a následném zacházení s ním.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé matečné a pracovní inokulum se identifikuje jako virus hepatitidy A za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se v každém matečném a pracovním inokulu stanoví koncentrace viru.

**Cizí agens.** Pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula pro virové vakcíny (2.6.16).

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU HEPATITIDY A

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě médií pro kultivaci buněk se může použít zvířecí sérum (nikoli lidské sérum). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). Několikanásobné sklizeň z téže buněčné produkční kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň.

Pouze jednotlivá sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít k přípravě vakcíny. Jestliže se stanovení poměru virové koncentrace k obsahu antigenu provedlo na vhodném počtu jednotlivých sklizní, aby se prokázala shodnost výroby, může se toto stanovení následně při běžné kontrole vypustit.

**Totožnost.** Zkouška Obsah antigenu je zároveň zkouškou totožnosti jednotlivé sklizeň.

**Bakteriální a houbová kontaminace (2.6.1).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z kultury produkčních buněk vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

**Obsah antigenu.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví se obsah antigenu hepatitidy A vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1); obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Poměr koncentrace viru k obsahu antigenu.** Shodnost poměru koncentrace infekčního viru k obsahu antigenu stanoveného vhodnou metodou na buněčné kultuře je potvrzena validací na vhodném počtu jednotlivých sklizní.

#### *PURIFIKACE A PURIFIKOVANÁ SKLIZEŇ VIRU HEPATITIDY A*

Sklizeň, která může být spojením několika jednotlivých sklizní, se purifikuje validovanými metodami. Jsou-li pro kultivaci viru použity kontinuální buněčné linie, purifikační proces prokazatelně snižuje hladinu DNA hostitelských buněk.

Pouze purifikovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě inaktivované sklizně.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a jako počáteční bod pro sledování inaktivační křivky se v purifikované sklizni stanoví vhodnou metodou na tkáňové kultuře koncentrace infekčního viru.

**Poměr antigenu k celkové bílkovině.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah antigenu viru hepatitidy A. Obsah celkové bílkoviny se stanoví validovanou metodou. Poměr obsahu antigenu viru hepatitidy A k obsahu celkové bílkoviny je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Bovinní sérumalbumin.** Při použití fetálního bovinního séra je obsah nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce, stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Jestliže to výrobní proces umožní, lze použít jiné vhodné bílkovinné markery k prokázání účinné purifikace.

**Zbytkové chemické látky.** Použijí-li se při purifikačních postupech chemické látky, a pokud validace postupu neprokáže jejich úplné odstranění, provedou se na purifikované sklizni (nebo na inaktivované sklizni) zkoušky na tyto látky. Koncentrace nesmí přesahovat limity schválené pro daný přípravek.

#### *INAKTIVACE A INAKTIVOVANÁ SKLIZEŇ VIRU HEPATITIDY A*

Několik purifikovaných sklizní se před inaktivací může spojit. K zamezení interference v inaktivačním procesu se musí předcházet vzniku virových agregátů nebo se agregáty musí odstranit těsně před a/nebo během inaktivačního procesu. Virová suspenze se inaktivuje validovanou metodou, která je prokazatelně schopná shodně inaktivovat virus hepatitidy A bez poškození jeho antigenní a imunogenní

aktivity; pro každý inaktivační postup se sestrojí inaktivační křivka reprezentující koncentraci zbytkového živého viru, měřenou nejméně třikrát (např. ve dni 0, 1 a 2 inaktivačního postupu). Použije-li se k inaktivaci formaldehyd, na konci inaktivačního postupu se stanoví zbytky volného formaldehydu.

Pouze inaktivovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Inaktivace.** Provede se kultivační zkouška na přítomnost zbytků infekčního viru hepatitidy A inokulací určitého množství inaktivované sklizně. Toto množství odpovídá 5 % šarže nebo, jestliže sklizeň obsahuje 30 000 dávek nebo více, nejméně 1500 dávkám. Inokuluje se do buněčných kultur téhož typu, jaký se použil pro přípravu vakcíny; inkubuje se nejméně 70 dnů a během této doby se provede nejméně jedna buněčná pasáž. Na konci inkubačního období se provede zkouška vhodné citlivosti na přítomnost zbytkového infekčního viru. Ve vzorcích odebraných na konci inaktivace se neprokáží známky kultivace viru hepatitidy A. Jako pozitivní kontrola se souběžně použijí inokula infekčního viru, aby se prokázala vnímavost buněk a nepřítomnost interference.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 2 m. j. endotoxinu v jedné lidské dávce.

**Obsah antigenu.** Obsah antigenu viru hepatitidy A se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Zbytkové chemické látky.** Viz odstavec Purifikace a purifikovaná sklizeň viru hepatitidy A.

#### *PŘÍPRAVA INAKTIVOVANÉHO CHŘÍPKOVÉHO VIRU*

Výroba viru chřipky je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného virového izolátu. Konečnou výrobu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Použitý kmen chřipkového viru je schválen oprávněnou autoritou.

#### *SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ CHŘÍPKOVÉHO VIRU*

Inokulum chřipkového viru použitého pro přípravu vakcíny se kultivuje v kuřecích embryích z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2) nebo na vhodných buněčných kulturách (5.2.4), např. embryonálních kuřecích fibroblastech nebo buňkách kuřecích ledvin získaných z chovů kuřat prostých specifikovaných patogenů (5.2.2). Pro výrobu se používá virus kultivovaný v alantoidní dutině oplozených slepičích vajec ze zdravého chovu.

#### *INOKULA CHŘÍPKOVÉHO VIRU*

Vhodnými metodami se prokáže, že antigeny hemaglutininu a neuraminidasy každého inokula pocházejí ze správného kmene.

Pouze pracovní inokulum vyhovující následujícím požadavkům se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ CHŘIPKOVÉHO VIRU

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci při kontrolované teplotě se odeberou alantoidní tekutiny a spojí se do monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat i v době odběru. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin nebo streptomycin.

#### SPOJENÁ SKLIZEŇ CHŘIPKOVÉHO VIRU

K omezení možnosti kontaminace se inaktivace zahájí co nejdříve po přípravě. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem na třech po sobě jdoucích šaržích prokázána stejná účinnost. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez poškození antigenity hemagglutininu. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus ptáčí leukózy a mykoplazmata. Jestliže se monovalentní spojená sklizeň uchovává po inaktivaci, použije se teplota  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Jestliže se použije formaldehydový roztok, koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne  $0,2 \text{ g/l CH}_2\text{O}$ ; jestliže se použije betapropiolakton, jeho koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne  $0,1 \%$  (*V/V*).

Pouze spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě virosomů.

**Hemagglutininový antigen.** Obsah hemagglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1) porovnáním s referenčním antigenem nebo s antigenem kalibrovaným proti referenčnímu antigenu. Zkouška se provede při  $20^\circ\text{C}$  až  $25^\circ\text{C}$ .

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Virová inaktivace.**  $0,2 \text{ ml}$  spojené sklizně se inokuluje do alantoidní dutiny každého z deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při  $33^\circ\text{C}$  až  $37^\circ\text{C}$ . Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere  $0,5 \text{ ml}$  alantoidní tekutiny a tekutiny se spojí.  $0,2 \text{ ml}$  spojeného vzorku se inokuluje dalším deseti fertilizovaným vejcem a inkubuje se 3 dny při  $33^\circ\text{C}$  až  $37^\circ\text{C}$ . Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere  $0,1 \text{ ml}$  alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemagglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemagglutinační reakce, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemagglutinační; nezjistí se žádná hemagglutinační reakce.

**Ovalbumin.** Nejvýše  $1 \mu\text{g}$  ovalbuminu v jedné lidské dávce, stanoví se vhodnou metodou za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Protimikrobní látka.**  $85 \%$  až  $115 \%$  zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Zbytkové chemické látky.** Zkoušky na chemické látky použité k purifikaci se provedou s monovalentní spojenou sklizní; koncentrace je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou.

#### PŘÍPRAVA VIROSOMŮ

Inaktivované viriony chřipky se vhodným detergentem převedou do roztoku a purifikují se vysokootáčkovým odstředováním, aby získané supernatanty obsahovaly převážně chřipkové antigeny. Po přidání vhodných fosfolipidů se vytvoří virosomy odstraněním detergentu adsorpční chromatografií nebo jinou vhodnou metodou.

Pouze virosomy, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Obsah hemagglutininu.** Obsah hemagglutinového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním hemagglutinovým antigenem nebo s antigenem kalibrovaným proti referenčnímu antigenu.

**Fosfolipidy.** Obsah a totožnost fosfolipidů se stanoví vhodnou imunochemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Poměr fosfolipidů k hemagglutininu.** Poměr obsahu fosfolipidů k obsahu hemagglutininu je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Zbytkové chemické látky.** Provedou se zkoušky na chemické látky použité ve výrobě. Koncentrace každé zbytkové chemické látky je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví přidáním virosomů k inaktivovanému viru hepatitidy A ve schváleném poměru antigenu hepatitidy A k hemagglutininu. Může se spojit několik várek a mohou se přidat schválené stabilizátory a protimikrobní látky.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Obsah bílkoviny.** Množství bílkoviny se stanoví vhodnou metodou a je v rozmezí schváleném oprávněnou autoritou.

**Fosfolipidy.** Obsah a totožnost fosfolipidů se stanoví vhodnou imunochemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou a je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Obsah hemagglutininu.** Obsah hemagglutinového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1); množství hemagglutininu nesmí překročit limity schválené pro daný přípravek.

**Obsah antigenu viru hepatitidy A.** Stanoví se obsah antigenu viru hepatitidy A vhodnou imunochemickou metodou; množství antigenu nesmí překročit limity schválené pro daný přípravek.

**Poměr antigenu viru hepatitidy A k hemagglutininu.** Poměr obsahu antigenu viru hepatitidy A k obsahu hemagglutininu je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Ovalbumin.** Nejvýše  $1 \mu\text{g}$  ovalbuminu v jedné lidské dávce, stanoví se vhodnou metodou za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Velikost virosomu.** Rozdělení velikosti částic ve směsi virosom-virus hepatitidy A je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.



**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Zbytkové chemické látky.** Pokud se při výrobním postupu použily chemické látky, provedou se na tyto látky zkoušky; limity schvaluje oprávněnou autoritou.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti se může uvolnit k použití. Provede-li se zkouška Volný formaldehyd (kde je to vhodné) a Protimikrobní látka (kde je to vhodné) v konečné várce s vyhovujícími výsledky, mohou se tyto zkoušky u šarže vypustit. Zkouška Stanovení účinnosti šarže se může vypustit, jestliže byla provedena zkouška Stanovení účinnosti *in vivo* s vyhovujícím výsledkem v konečné várce.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigen viru hepatitidy A se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických protilátek.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Nejméně minimální prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství.

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 2 m. j. v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Obsah antigenu ve vakcíně se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) porovnáním s referenčním přípravkem. Kritéria pro přijetí daného referenčního přípravku jsou schválena oprávněnou autoritou.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- biologický původ buněk použitých pro přípravu vakcíny;
- že nosič obsahující bílkoviny chřipky byl připraven na vejcích;
- že vakcína nesmí zmraznout;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat.

## VACCINUM HEPATITIDIS B (ADNr)

7.2:1056

### Vakcína proti hepatitidě B (rDNA)

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg), složku bílkoviny viru hepatitidy B; antigen se může adsorbovat na minerální adsorbent, jako je hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Vakcína také může jako adjuvans obsahovat 3-*O*-deacyl-4'-monofos-

foryllipid A. Antigen se získává rekombinantní DNA technologií.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Vakcína má u člověka prokazatelně podporovat tvorbu specifických ochranných protilátek. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny vyhovující požadavkům na imunogenitu a neškodnost.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Přípravek se vyrábí expresí virového genu kódujícího povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg) v kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*) nebo v savčích buňkách (buňky ovaria čínského křečka (CHO) nebo jiné vhodné buněčné linie), purifikací výsledného HBsAg a převedením tohoto antigenu do imunogenního přípravku. Vhodnost a bezpečnost buněk schvaluje oprávněná autorita.

Přípravek může obsahovat produkt S genu (hlavní bílkovina), kombinaci S genového a pre-S2 genového produktu (střední bílkovina) nebo kombinaci S genového, pre-S2 genového a pre-S1 genového produktu (velká bílkovina).

**Referenční přípravek.** Jako referenční přípravek se používá část reprezentativní šarže vakcíny, která byla ve zkoušce na zvířatech prokazatelně nejméně stejně imunogenní jako šarže, která v klinické studii na mladých zdravých dospělých jedincích vykazala nejméně 95% sérokonverzi odpovídající hladině HBsAg neutralizujících protilátek považované za ochrannou hladinu po úplné primární imunizaci. Jako ochranná hladina se uznává nejméně 0,01 m. j./ml.

#### CHARAKTERISTIKA LÁTKY

Antigen se charakterizuje vývojovými studii, ve kterých se určí jeho úplná bílkovinná, lipidová a sacharidová struktura. Morfologické charakteristiky antigenních částic se stanoví elektronovou mikroskopií. Průměrná vztlková hustota antigenních částic se stanoví fyzikálně-chemickými metodami, např. gradientovým odstředováním. Charakterizují se antigenní epitopy. Bílkovinná frakce antigenu se charakterizuje primární strukturou (např. stanovením složení aminokyselin, částečnou analýzou sekvence aminokyselin a mapováním peptidů).

#### KULTURA A SKLIZENĚ

Totožnost, mikrobiologická čistota, plazmidová retence a konzistence sklizně jsou určeny vhodným výrobním uspořádáním. Jestliže byly použity savčí buňky, provedou se zkoušky na cizí agens a mykoplazmata podle stati *Důkaz cizích agens v humánních virových vakcínách* (2.6.16), ale ve Zkoušce na jiná cizí agens na tkáňových kulturách se použije 200 ml sklizně.

#### PURIFIKOVANÝ ANTIGEN

Pouze purifikovaný antigen, který odpovídá následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky.

**Celková bílkovina.** Stanoví se validovanou metodou. Obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost a obsah antigenu.** Množství a specifita HBsAg se stanoví porovnáním s mezinárodním standardem HBsAg subtypu *ad* nebo s národním referenčním přípravkem vhod-

nou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je radioimunoanalýza (RIA), enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA), imunoblot (přednostně se užívají monoklonální protilátky přímo proti protektivnímu epitopu) nebo jednoduchou radiální difúzí. Poměr antigenu k bílkovině je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

Molekulová hmotnost v hlavním pásu zjištěná elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s natrium-dodecyl-sulfátem (SDS-PAGE) provedenou v redukcujících podmínkách, odpovídá očekávané hodnotě ze známých nukleových kyselin, polypeptidových sekvencí a možné glykosylace.

**Čistota antigenu.** Stanoví se porovnáním s referenčním přípravkem za použití kapalínové chromatografie nebo jiné vhodné metody, jako je SDS-PAGE s barvením modří kyselou 92 a stříbrem. Vhodná metoda je dostatečně citlivá k detekci možné kontaminace v koncentraci 1 % celkové bílkoviny. Nejméně 95 % celkové bílkoviny tvoří povrchový antigen hepatitidy B.

**Složení.** Stanoví se obsah bílkovin, lipidů, nukleových kyselin a sacharidů.

**DNA hostitelských buněk a z vektoru odvozená DNA.** Jestliže se k výrobě použily savčí buňky, je v množství purifikovaného antigenu, které odpovídá jedné lidské dávce vakcíny, nejvýše 10 pg DNA.

**Cesium.** Jestliže se při výrobě použily cesiové soli, provede se v purifikovaném antigenu stanovení zbytků cesia. Obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

U purifikovaného antigenu se mohou v závislosti na použitém výrobním postupu požadovat další zkoušky: např. stanovení zbytků živočišného séra, jestliže se pro výrobu použily savčí buňky, nebo zkoušky na zbytkové chemikálie použité při extrakci a purifikaci.

#### NEROZPLNĚNÝ ADSORBOVANÝ 3-O-DEACYL-4'-MONOFOSFORYLLIPID A

Pokud vakcína obsahuje 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A, vyhovuje článku 3-O-Desacyl-4'-monophosphoryllipidum A (2537). Je-li nerozplněný 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid v tekuté formě adsorbován před zařazením do vakcíny, vyhovuje následujícím požadavkům.

**Stupeň adsorpce 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A.** Obsah neadsorbovaného 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A v adsorbovaném nerozplněném 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A se stanoví vhodnou metodou, např. kvantifikací mastných kyselin 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A (2537) v supernatantní tekutině, po odstředění odpařené do sucha, plynovou chromatografií.

**Hodnota pH (2.2.3).** V rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny může obsahovat protimikrobní látku a minerální adsorbent, jako je hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý, a jako adjuvans 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A.

Pouze várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Jestliže zkoušky Volný formaldehyd (kde je to vhodné) a Protimikrobní látka (kde je to vhodné) byly provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou se tyto zkoušky u šarže vypustit. Je-li Stanovení účinnosti *in vivo* provedeno s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u konečné šarže vypustit.

**Stupeň adsorpce.** Stanoví se pro antigen a, kde je to vhodné, pro 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost přípravku se prokáže stanovením účinnosti nebo, kde je to vhodné, elektroforetickým profilem. Navíc, kde je to vhodné, zkouškou na 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A. Stanovení obsahu 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A je současně zkouškou totožnosti u vakcín, které jej obsahují.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; jestliže se použil hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý jako adsorbent.

**3-O-Deacyl-4'-monofosforyllipid A.** 80 % až 120 % předpokládaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou metodou, např. plynovou chromatografií (2.2.28).

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně prokazatelně nejnižší účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se každému králíkovi podá ekvivalent jedné lidské dávky nebo, pokud vakcína obsahuje 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A, podá se každému králíkovi množství vakcíny obsahující 2,5 µg 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Vakcína vyhovuje zkoušce Stanovení účinnosti vakcíny proti hepatitidě B (*rDNA*) (2.7.15).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- obsah HBsAg v obalu;
- typ buněk použitých k výrobě vakcíny;
- název a množství použitého adjuvans a/nebo adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM EX CELLULIS CORTICISQUE ANTIGENIIS PRAEPARATUM

6.4:2149

Vakcína proti chřipce (povrchový antigen, inaktivovaná, připravená na buněčných kulturách)

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní vodnou suspenzi kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně na buněčných kulturách, inaktivují a ošetří se tak, aby se přípravek přednostně skládal z hemaglutininových a neuraminidasových antigenů při zachování vhodných antigenních vlastností těchto antigenů.

Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsažené ve vakcíně je 15 µg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je čirá nebo slabě opalizující tekutina, může obsahovat adjuvans.

Tento článek se vztahuje na vakcíny připravené na diploidních nebo kontinuálních buněčných liniích savčího původu.

### VÝROBA

#### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace viru a buněčné baňky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny, které vyhovují požadavkům na imunogenitu, bezpečnost a stabilitu.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo vhodné snížení zbytkové hostitelské buněčné bílkoviny. Na základě validačních studií a se souhlasem oprávněné autority se může u jednotlivých přípravků rutinní zkoušení na zbytkovou hostitelskou buněčnou bílkovinu vynechat.

Pokyny k zásadám takové validační studie jsou uvedeny např. v obecném článku *Producta ab ADN recombinante (0784)*, zvláště v částech „Validace výrobního postupu – Extrakce a čištění“ a „Shodnost výroby – Bílkoviny hostitelské buňky“.

#### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a, je-li třeba, doporučuje nové kmeny, které odpovídají této epidemiologické situaci.

Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Úmluvy o přípravě Evropského lékopisu.

Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokula chřipkového viru pro výrobu vakcíny se kultivují ve fertilizovaných slepičích vejcích z chovů prostých specifických patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.3), např. v kuřecích embryonál-

ních fibroblastech nebo v buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2) nebo na diploidní nebo kontinuální buněčné linii. Konečná pasáž pro ustavení pracovního inokula se provede na buněčné linii, která se použije při běžné výrobě. Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje na diploidní nebo kontinuální buněčné linii (5.2.3).

#### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Každý z použitých kmenů chřipkového viru se má identifikovat vývojovými záznamy, včetně informace o původu kmene a následném zacházení s ním.

Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Vakcínu představuje jedna pasáž od pracovního inokula.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Vhodnou metodou se prokáže u každého matečného a pracovního inokula, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru.

**Koncentrace viru.** Stanoví se koncentrace viru v každém pracovním inokulu. Kde je to vhodné, stanoví se koncentrace viru v matečném inokulu.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula. Je známo, že v důsledku sezonních změn v jednom nebo více vakcinačních kmenech, může být málo času na provedení zkoušek virového inokula na cizí agens podle obecné stati 2.6.16 (např. délka trvání *in vivo* zkoušky, časová dostupnost specifického antiséra). Se souhlasem oprávněné autority a na základě posouzení rizik se po validování mohou použít rychlé metody (např. několikanásobná polymerasová řetězová reakce (PCR)) jako alternativa k obecné stati 2.6.16. Toto posouzení rizik a validace zahrnují další obecné úvahy o potenciálních kontaminantech virových izolátů, vnímavosti buněk k těmto virům a schopnosti výrobního postupu odstranit nebo inaktivovat virus; validace také zahrnuje porovnávání údajů ze zkoušení inokul podle obecné stati 2.6.16 a navrhovaných rychlých metod stanovení. Pro každé použití zkoušky polymerasové řetězové reakce amplifikací nukleových kyselin (PCR/NAT) (2.6.21) se musí prokázat vhodnost tohoto zamýšleného použití odpovídající analytickou validací. Posouzení rizika se zhodnotí, když se získá nová dostupná informace o potenciálních virových kontaminantech a nastavení vybraného PCR panelu zkoušených cizích agens se aktualizuje oprávněnou autoritou v rozmezí jednoho roku. Tato aktualizace také zahrnuje specifické aspekty vakcinačního kmene, jako jsou výsledky PCR inhibice.

Pokud se prokáže cizí agens v inokulu a savčí buňky, které se používají pro výrobu, jsou k němu citlivé, inokulum se pro výrobu vakcíny nepoužije.

Pokud se prokáže cizí agens v inokulu a savčí buňky k němu nejsou citlivé, provede se validace výrobního postupu, aby se prokázala inaktivace nebo odstranění tohoto agens. Pokud nelze odstranění nebo inaktivaci prokázat, zkouší se inaktivovaná monovalentní sklizeň na prokázání nepřítomnosti každého cizího agens, které bylo nalezeno v inokulu.

### KULTIVACE A JEDNOTLIVÁ SKLIZEŇ

Všechny činnosti spojené s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami probíhají za aseptických podmínek v prostoru, kde se současně nepracuje s jinými buňkami. Do médií pro buněčné kultury se může použít schválené zvířecí sérum (avšak ne lidské sérum). Sérum a trypsin použité pro přípravu buněčných suspenzí nebo médií jsou prokazatelně prosté cizích agens. Média pro buněčné kultury mohou obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červeň, a antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfixované buněčné kultury (kontrolní buňky).

Pouze jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu vakcíny.

**Totožnost.** Zkouška na obsah antigenu je zároveň zkouškou totožnosti jednotlivé sklizně.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Provede se zkouška na mykoplazmata; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

**Hemaglutininový antigen.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah hemaglutininového antigenu.

### INAKTIVOVANÁ A PURIFIKOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ

Sklizeň, která může být spojením několika jednotlivých sklizní téhož kmene, se inaktivuje a purifikuje validovanými metodami. Před nebo po inaktivaci se monovalentní sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním při vysoké rychlosti nebo jinou vhodnou metodou. Virus chřipky se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána shodná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Inaktivací postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; postup se navrhuje tak, aby co nejméně změnil hemaglutininový a neuraminidasový antigen. Virové částice se rozštěpí schváleným postupem na subjednotkové složky, které se dále purifikují tak, že monovalentní várka sestává převážně z hemaglutininového a neuraminidasového antigenu.

Pokud se pro výrobu použijí kontinuální buněčné linie, purifikační postup se validuje, aby se dosáhlo shodného poklesu hostitelské buněčné DNA na přiměřenou úroveň. Pouze inaktivovaná purifikovaná monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům se může použít pro výrobu konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah hemaglutininového antigenu.

**Poměr antigenu a celkové bílkoviny.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví vhodnou imunodifúzní zkouškou. Obsah celkové bílkoviny se stanoví validovanou metodou. Poměr obsahu hemaglutininového antigenu k obsahu celkové bílkoviny je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

**Čistota.** Čistota monovalentní sklizně se zjišťuje polyakrylamidovou gelovou elektroforézou nebo jinou schválenou metodou. Prokáže se převážně hemaglutininový a neuraminidasový antigen.

**Chemické látky použité ke štěpení virionu a k purifikaci.** V monovalentní sklizni se provedou zkoušky na chemické látky použité ke štěpení a purifikaci, není-li validací postupu prokázána úplná čistota. Koncentrace nesmí překročit limity schválené oprávněnou autoritou pro daný přípravek.

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Příslušná množství inaktivovaných purifikovaných monovalentních spojených sklizní se spojí, aby se vytvořila konečná várka vakcíny. Může se přidat adjuvans.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se použije k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytková DNA hostitelských buněk.** Jestliže se pro kultivaci viru použije kontinuální buněčná linie, stanoví se vhodnou metodou obsah zbytkové DNA hostitelských buněk, který není vyšší než 10 ng v ekvivalentu jedné lidské dávky.

### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že byla zkouška Zbytkový infekční virus provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní inaktivované a purifikované sklizně a že zkoušky Volný formaldehyd, Bovinní sérumalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vynechat.

Pokud vakcína obsahuje adjuvans, prokáže se jeho přítomnost vhodnými zkouškami totožnosti a jinými odpovídajícími kritérii jakosti v šarži. Tyto zkoušky mohou zahrnovat fyzikální a chemické analýzy, stanovení velikosti částic a stanovení počtu částic v jednotce objemu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** Provede se zkouška kultivací zbytkového infekčního viru. Na buněčné kultury stejného typu, jaký byl použit pro výrobu vakcíny, se inokuluje nejméně 0,2 ml vakcíny. Inkubuje se nejméně 4 dny při teplotě 37 °C. Na nové ještě nesplývající nekonfluentní kultury buněk se inokuluje nejméně 0,2 ml média sklizeného z buněčné kultury a inkubuje se stejným způsobem. Na konci inkubačního období se provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na buněčné kultuře a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Celková bílkovina.** Nejvýše 40 µg bílkoviny jiné než hemaglutinin na virový kmen v jedné lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 25 m. j. v jedné lidské dávce.

## STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem hemaglutininového antigenu<sup>1</sup> nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- biologický původ buněk použitých pro přípravu vakcíny;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použité k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininového antigenu v mikrogramech na virový kmen a na dávku;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně;
- kde je to vhodné, název a množství použitého adjuvans.

VACCINUM INFLUENZAE  
INACTIVATUM EX CELLULIS VIRISQUE  
INTEGRIS PRAEPARATUM

6.7:2308

Vakcína proti chřipce (celý virion, inaktivovaná, připravená na buněčných kulturách)

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní vodnou suspenzi kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B, nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně na buněčných kulturách, inaktivují se tak, aby jejich antigenní vlastnosti zůstaly zachovány. Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsaženého ve vakcíně je 15 µg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství. Vakcína je slabě opalizující nebo opalizující tekutina, může obsahovat adjuvans.

Tento článek se vztahuje na vakcíny připravené na diploidních nebo kontinuálních buněčných liniích savčího původu.

## VÝROBA

## VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace viru a buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny, které vyhovují požadavkům na imunogenitu, bezpečnost a stabilitu.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo vhodné snížení zbytkové hostitelské buněčné bílkoviny. Na základě validačních studií a se souhlasem oprávněné autority se může u jednotlivých přípravků vynechat rutinní zkoušení na zbytkovou hostitelskou buněčnou bílkovinu.

Pokyny k zásadám takové validační studie jsou uvedeny, např. v obecném článku *Producta ab ADN recombinante (0784)*, zvláště v částech „Validace výrobního postupu – Extrakce a čištění“ a „Shodnost výroby“ – Bílkoviny hostitelské buňky“.

## VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a, je-li třeba, doporučuje nové kmeny odpovídající této epidemiologické situaci.

Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Úmluvy o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

## SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokula chřipkového viru pro výrobu vakcíny se kultivují ve fertilizovaných slepičích vejcích z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.3), např. v kuřecích embryonálních

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

ních fibroblastech nebo v buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2) nebo na diploidní nebo kontinuální buněčné linii. Konečná pasáž pro ustavení pracovního inokula se provede na buněčné linii, která se použije při běžné výrobě. Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje na diploidní nebo kontinuální buněčné linii (5.2.3).

#### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Každý z použitých kmenů chřipkového viru se má charakterizovat vývojovými záznamy, včetně informace o původu kmene a následném zacházení s ním.

Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Vhodnou metodou se prokáže u každého matečného a pracovního inokula, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru.

**Koncentrace viru.** Stanoví se koncentrace viru v každém pracovním inokulu. Kde je to vhodné, stanoví se koncentrace viru v matečném inokulu.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula. Je známo, že v důsledku sezonních změn v jednom nebo více vakcinačních kmenech, může být málo času na provedení zkoušek virového inokula na cizí agens podle obecné stati 2.6.16 (např. délka trvání *in vivo* zkoušky, časová dostupnost specifického antiséra). Se souhlasem oprávněné autority a na základě posouzení rizik se po zvalidování mohou použít rychlé metody (např. několikanásobná polymerasová řetězová reakce (PCR)) jako alternativa k obecné stati 2.6.16. Toto posouzení rizik a validace zahrnují další obecné úvahy o potenciálních kontaminantech virových izolátů, vnímavosti buněk k těmto virům a schopnosti výrobního postupu odstranit nebo inaktivovat virus; validace také zahrnuje porovnávání údajů ze zkoušení inokul podle obecné stati 2.6.16 a navrhovaných rychlých metod stanovení. Pro každé použití zkoušky polymerasové řetězové reakce amplifikací nukleových kyselin (PCR/NAT) (2.6.21) se musí prokázat vhodnost tohoto zamýšleného použití odpovídající analytickou validací. Posouzení rizika se zhodnotí, když se získá nová dostupná informace o potenciálních virových kontaminantech a nastavení vybraného PCR panelu zkoušených cizích agens se aktualizuje oprávněnou autoritou v rozmezí jednoho roku. Tato aktualizace také zahrnuje specifické aspekty vakcinačního kmene, jako jsou výsledky PCR inhibice.

Pokud se prokáže cizí agens v inokulu a savčí buňky, které se používají pro výrobu, jsou k němu citlivé, inokulum se pro výrobu vakcíny nepoužije.

Pokud se prokáže cizí agens v inokulu a savčí buňky k němu nejsou citlivé, provede se validace výrobního postupu, aby se prokázala inaktivace nebo odstranění tohoto agens. Pokud nelze odstranění nebo inaktivaci prokázat, zkouší se inaktivovaná monovalentní sklizeň na prokázání nepřítomnosti každého cizího agens, které bylo nalezeno v inokulu.

#### KULTIVACE A JEDNOTLIVÁ SKLIZEŇ

Všechny činnosti spojené s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami probíhají za aseptických podmínek v prostoru, kde se současně nepracuje s jinými buňkami. Do médií pro buněčné kultury se může použít schválené zvířecí sérum (nikoli lidské sérum). Sérum a trypsin použité pro přípravu buněčných suspenzí nebo média jsou prokazatelně prosté cizích agens. Média pro buněčné kultury mohou obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červen, a antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Dostatečné množství buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky).

Pouze jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu vakcíny.

**Totožnost.** Zkouška na obsah antigenu je zároveň zkouškou totožnosti jednotlivé sklizně.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Provede se zkouška na mykoplazmata; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens v humánních virových vakcínách (2.6.16).

**Hemaglutininový antigen.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah hemaglutininového antigenu.

#### INAKTIVOVANÁ A PURIFIKOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ

Sklizeň, která může být spojením několika jednotlivých sklizní téhož kmene, se inaktivuje a purifikuje validovanými metodami. Před nebo po inaktivaci se monovalentní sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním při vysoké rychlosti nebo jinou vhodnou metodou. Virus chřipky se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána shodná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Inaktivací postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; postup se navrhuje tak, aby co nejméně měnil hemaglutininový a neuraminidasový antigen.

Pokud se pro výrobu použijí kontinuální buněčné linie, purifikační postup se validuje, aby se dosáhlo shodného poklesu hostitelské buněčné DNA na přiměřenou úroveň.

Pouze inaktivovaná purifikovaná monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro výrobu konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah hemaglutininového antigenu.

**Poměr antigenu a celkové bílkoviny.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví vhodnou imunodifúzní zkouškou. Obsah celkové bílkoviny se stanoví validovanou metodou. Poměr obsahu hemaglutininového antigenu k obsahu celkové bílkoviny je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Příslušná množství inaktivovaných purifikovaných monovalentních spojených sklizní se spojí, aby se vytvořila konečná várka vakcíny. Může se přidat adjuvans.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se použije k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytková DNA hostitelských buněk.** Jestliže se pro kultivaci viru použije kontinuální buněčná linie, stanoví se vhodnou metodou obsah zbytkové DNA hostitelských buněk, který není vyšší než 10 ng v ekvivalentu jedné lidské dávky.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že byla zkouška Zbytkový infekční virus provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní inaktivované purifikované sklizně a že zkoušky Volný formaldehyd, Bovinní sérumalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vynechat. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, prokáže se jeho přítomnost vhodnými zkouškami totožnosti a jinými odpovídajícími kritérii jakosti v šarži. Tyto zkoušky mohou zahrnovat fyzikální a chemické analýzy, stanovení velikosti částic a počtu částic v jednotce objemu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** Provede se zkouška kultivací zbytkového infekčního viru. Na buněčné kultury stejného typu, jaký byl použit pro výrobu vakcíny, se inokuluje nejméně 0,2 ml vakcíny. Inkubuje se nejméně 7 dnů při teplotě  $(32 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Na nové polotekuté buněčné kultury se inokuluje nejméně 10 ml média sklizeného z buněčné kultury a inkubuje se stejným způsobem. Na konci inkubačního období se provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na buněčné kultuře a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejméně 115 % množství uvedeného v označení na obalu.

Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejméně 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejméně 50 ng v jedné lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Celková bílkovina.** Nejméně šestinásobek celkového obsahu hemaglutininu zjištěného ve Stanovení obsahu, ale nejméně 100  $\mu\text{g}$  bílkoviny na virový kmen v jedné lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 25 m. j. v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1) porovnáním s referenčním přípravkem hemaglutininového antigenu<sup>1</sup>, nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě  $20 ^\circ\text{C}$  až  $25 ^\circ\text{C}$ . Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- biologický původ buněk použitých pro přípravu vakcíny;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použitých k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininového antigenu v mikrogramech na virový kmen a na dávku;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně;
- kde je to vhodné, název a množství použitého adjuvans.

## VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM EX CORTICIS ANTIGENIIS PRAEPARATUM

6.0:0869

### Vakcína proti chřipce (povrchový antigen) inaktivovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní suspenzi kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně ve fertilizovaných slepičích vejcích, inaktivují a ošetří se tak, aby se přípravek přednostně skládal z hemaglutininových a neuraminidasových antigenů bez snížení antigenních vlastností těchto antigenů.

Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsažené ve vakcíně je 15  $\mu\text{g}$  v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství. Vakcína může obsahovat adjuvans.

## VÝROBA

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a je-li třeba, doporučuje kmeny odpovídající této epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Úmluvy o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výťažky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokulum chřipkového viru pro výrobu vakcíny se kultivuje ve fertilizovaných slepičích vejcích z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), např. v kuřecích embryonálních fibroblastech nebo v buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2). Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje v alantoidní dutině embryonovaných slepičích vajec ze zdravých chovů.

### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Konečnou vakcínu představuje jedna pasáž od pracovního inokula. Vhodnou metodou se u každého inokula prokáže, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru.

K přípravě monovalentní spojené sklizně se může použít jen pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci za kontrolované teploty se odeberou alantoidní tekutiny a spojí se k vytvoření monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat v době sklizně. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin nebo streptomycin.

### MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ

Inaktivace se zahájí co nejdříve po přípravě, aby se omezila možnost kontaminace. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána shodná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Prokáže se schopnost inaktivačního procesu inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; hemaglutininový a neuraminidasový antigen by se měl měnit co nejméně. Prokáže se také schopnost inaktivačního procesu inaktivovat viry ptačí leukózy a mykoplazmata. Pokud se monovalentní spojená sklizeň po inaktivaci sklá-

duje, udržuje se při teplotě ( $5 \pm 3$ ) °C. Jestliže se použije formaldehydový roztok, koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne 0,2 g CH<sub>2</sub>O/l; při použití betapropiolaktonu, nepřesáhne jeho koncentrace během inaktivace nikdy 0,1 % (V/V).

Před nebo po inaktivačním procesu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním při vysoké rychlosti nebo jinou vhodnou metodou. Virové částice se rozštěpí schváleným postupem na subjednotkové složky, které se následně purifikují, takže monovalentní várka sestává převážně z hemaglutininového a neuraminidasového antigenu.

Pouze monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

**Čistota.** Čistota monovalentní spojené sklizně se zjišťuje polyakrylamidovou gelovou elektroforézou nebo jinou schválenou metodou. Má být přítomný převážně hemaglutininový a neuraminidasový antigen.

**Chemické látky použité ke štěpení a purifikaci.** V monovalentní spojené sklizni se provedou zkoušky na chemické látky použité ke štěpení a purifikaci, limity schvaluje oprávněná autorita.

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Odpovídající množství monovalentních spojených sklizní se smíchá, aby se vytvořila konečná várka vakcíny. Může se přidat adjuvans.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.



může uvolnit k použití.

Za předpokladu, že zkouška Zbytkový infekční virus byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky Volný formaldehyd, Ovalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže tyto zkoušky vynechat.

Pokud se nemohou zkoušky Ovalbumin a Volný formaldehyd provést u šarže pro interferenci s adjuvans, provedou se u monovalentní spojené sklizně. Limit pro přijetí se stanoví tak, aby nepřesáhl limit stanovený pro šarži.

Pokud vakcína obsahuje adjuvans, provedou se u šarže vhodné zkoušky totožnosti a dalších odpovídajících kritérií jakosti. Tyto zkoušky mohou zahrnovat chemické a fyzikální analýzy, stanovení velikosti částic a stanovení počtu částic na jednotku objemu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** 0,2 ml zkoušeného přípravku se inokuluje do alantoidní dutiny každého z deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se spojí. 0,2 ml spojené tekutiny se inokuluje do dalších deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Ovalbumin.** Nejvýše množství uvedené v označení na obalu a v žádném případě ne více než 1 µg v jedné lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Celková bílkovina.** Nejvýše 40 µg bílkoviny jiné než hemaglutinin na virový kmen v jedné lidské dávce a nejvýše celkem 120 µg bílkoviny jiné než hemaglutinin v jedné lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu hemaglutininového antigenu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použité k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně;
- maximální množství ovalbuminu;
- kde je to vhodné, název a množství použitého adjuvans.

### VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM EX CORTICIS ANTIGENIIS PRAEPARATUM VIROSOMALE

6.0:2053

Vakcína proti chřipce (povrchový antigen)  
inaktivovaná virosomová

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní vodnou suspenzi kmenů nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B, nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně ve fertilizovaných slepičích vejcích, inaktivují a ošetří se tak, aby se přípravek přednostně skládal z hemaglutininových a neuraminidasových antigenů rekonstituovaných na virosomy bez snížení antigenních vlastností těchto antigenů.

Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsažené ve vakcíně je 15 µg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je slabě opalizující tekutina.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

##### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a, je-li třeba, doporučuje kmeny, které odpovídají této epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatář-

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

ských států Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokulum chřipkového viru pro výrobu vakcíny se kultivuje ve fertilizovaných slepičích vejcích z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.3), např. v kuřecích embryonálních fibroblastech nebo v buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2). Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje v alantoidní dutině fertilizovaných slepičích vajec ze zdravých chovů.

#### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula.

Vhodnou metodou se prokáže u každého inokula, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru.

Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci za kontrolované teploty se odeberou alantoidní tekutiny a smíchají se, aby se vytvořila monovalentní spojená sklizeň. Protimikrobní látka se může přidat v době sklizně

#### MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ

Inaktivace se zahájí co nejdříve po přípravě, aby se omezila možnost kontaminace. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána shodná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Má se prokázat schopnost inaktivačního procesu inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; hemaglutininový a neuraminidasový antigen by se měl měnit co nejméně. Prokáže se také schopnost inaktivačního procesu inaktivovat viry ptačí leukózy a mykoplazmata. Pokud se monovalentní spojená sklizeň po inaktivaci skladuje, udržuje se při teplotě (5 ± 3) °C. Jestliže se použije formaldehydový roztok, koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne 0,2 g CH<sub>2</sub>O/l; při použití betapropiolaktonu, nepřesáhne jeho koncentrace během inaktivace nikdy 0,1 % (V/V).

Před nebo po inaktivačním procesu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním při vysoké rychlosti nebo jinou vhodnou metodou.

Pouze monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě virosomů.

Za předpokladu, že zkoušky na hemaglutininový antigen, neuraminidasový antigen a zbytkový infekční virus byly provedeny s vyhovujícími výsledky při přípravě monovalentních virosomů, mohou se u monovalentní spojené sklizně vypustit, jestliže byl postup výroby mezi monovalentní spojenou sklizní a přípravou monovalentních ribosomů kontinuální.

**Hemaglutininový antigen.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

#### PŘÍPRAVA MONOVALENTNÍCH VIROSOMŮ

Virové částice se rozštěpí na složky subjednotek schválenými postupy. Po následné purifikaci se monovalentní várka skládá převážně z hemaglutininového a neuraminidasového antigenu. Mohou se přidat vhodné fosfolipidy a virosomy se mohou vytvořit odstraněním detergentu buď adsorpční chromatografií, nebo jinou vhodnou metodou. Několik monovalentních virosomových přípravků je možné spojit.

Pouze monovalentní virosomový přípravek, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem hemaglutinačního antigenu<sup>1</sup> nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu. Za předpokladu, že byla tato zkouška provedena s vyhovujícím výsledkem u monovalentní spojené sklizně, může se u přípravy monovalentních virosomů vynechat.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Čistota.** Čistota monovalentního virosomového přípravku se zjišťuje polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (2.2.31) nebo jinou vhodnou metodou. Prokáže se zejména hemaglutininový a neuraminidasový antigen.

**Chemické látky použité ke štěpení a purifikaci.** Provedou se zkoušky na chemické látky použité ke štěpení a purifikaci monovalentního virosomového přípravku. Limity schvaluje oprávněná autorita.

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

**Fosfolipidy.** Obsah a totožnost fosfolipidů se stanoví vhodnou imunochemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Poměr hemaglutininu k fosfolipidu.** Poměr obsahu hemaglutininu k obsahu fosfolipidu je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Velikost virosomů.** Vypočítaný průměr virosomů, stanovený vhodnou metodou, např. spektroskopii vztaženou k fotonům, je v rozmezí 100 nm až 300 nm. Polydisperzní index je nejvýše 0,4.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Vhodné množství monovalentních virosomových přípravků se spojí, aby se vytvořila konečná várka vakcíny. Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že byla zkouška Zbytkový infekční virus provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně nebo, kde je to vhodné, u monovalentních virosomových přípravků a že zkoušky Fosfolipidy, Poměr hemaglutininu k fosfolipidu, Volný formaldehyd, Ovalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vynechat.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** 0,2 ml zkoušeného přípravku se inokuluje do alantoidní dutiny každého z deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se smíchají. 0,2 ml směsného vzorku se inokuluje do dalších deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Hodnota pH (2.2.3).** 6,5 až 7,8.

**Fosfolipidy.** Obsah a totožnost fosfolipidů se stanoví vhodnou imunochemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Poměr hemaglutininu k fosfolipidu.** Poměr obsahu hemaglutininu k obsahu fosfolipidu je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Ovalbumin.** Nejvýše množství uvedené v označení na obalu a v žádném případě ne více než 1 µg v lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Celková bílkovina.** Nejvýše 40 µg bílkoviny jiné než hemaglutinin na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 120 µg bílkoviny jiné než hemaglutinin v lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Velikost virosomů.** Vypočítaný průměr virosomů, stanovený vhodnou metodou, např. spektroskopii vztaženou k fotonům, je v rozmezí 100 nm až 300 nm. Polydisperzní index je nejvýše 0,4.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 100 m. j. v lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu hemaglutininového antigenu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použité k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen a na dávku;
- maximální množství ovalbuminu;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně.

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

## VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM EX VIRIS INTEGRIS PRAEPARATUM

6.0:0159

Vakcína proti chřipce (celý virion) inaktivovaná

### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní vodnou suspenzi kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B, nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně ve fertilizovaných slepičích vejcích a inaktivují se tak, aby jejich antigenní vlastnosti zůstaly zachovány. Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsaženého ve vakcíně je 15 µg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je slabě opalizující tekutina.

### VÝROBA

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a, je-li třeba, doporučuje kmeny odpovídající této epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Úmluvy o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokulum pro výrobu vakcíny se kultivuje ve fertilizovaných vejcích z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.3), např. v kuřecích embryonálních fibroblastech nebo v buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2). Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje v alantoidní dutině fertilizovaných slepičích vajec ze zdravého chovu.

### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založená na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Vhodnou metodou se prokáže u každého inokula, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru. Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizeň.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7).** Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci

za kontrované teploty se odeberou alantoidní tekutiny a spojí, aby se vytvořila monovalentní spojená sklizeň. Protimikrobní látka se může přidat v době sklizeň. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin ani streptomycin.

### MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ

Inaktivace se zahájí co nejdříve po přípravě, aby se omezila možnost kontaminace. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána stejná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Prokáže se schopnost inaktivačního procesu inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; hemaglutininový a neuraminidasový antigen by se měl měnit co nejméně. Prokáže se také schopnost inaktivačního procesu inaktivovat viry ptačí leukózy a mykoplazmata. Pokud se monovalentní spojená sklizeň po inaktivaci skladuje, udržuje se při teplotě (5 ± 3) °C. Jestliže se použije formaldehydový roztok, koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne 0,2 g CH<sub>2</sub>O/l; při použití betapropiolaktonu, nepřesáhne jeho koncentrace během inaktivace nikdy 0,1 % (V/V).

Před nebo po inaktivačním procesu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním vysokou rychlostí nebo jinou vhodnou metodou.

Pouze monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Vhodné množství monovalentních spojených sklizní se spojí, aby se vytvořila konečná várka vakcíny.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Vakcíny pro  
humánní  
použití

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkouška Zbytkový infekční virus byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky Volný formaldehyd, Ovalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže tyto zkoušky vynechat.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** 0,2 ml zkoušeného přípravku se inokuluje do alantoidní dutiny každého z deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se spojí. 0,2 ml směsného vzorku se inokuluje do dalších deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Ovalbumin.** Nejvýše množství uvedené v označení na obalu a v žádném případě ne více než 1 µg v lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Celková bílkovina.** Nejvýše šestinásobek celkového obsahu hemaglutininu zjištěného ve Stanovení obsahu, ale nejvýše 100 µg bílkoviny na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 300 µg bílkoviny v lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 100 m. j. v lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku<sup>1</sup>. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu hemaglutininového antigenu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použitých k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku;
- maximální množství ovalbuminu;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně.

### VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM EX VIRORUM FRAGMENTIS PRAEPARATUM

6.0:0158

#### Vakcína proti chřipce (štěpený virion) inaktivovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní vodnou suspenzi kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B, nebo směsi kmenů obou typů. Virové kmeny se kultivují odděleně ve fertilizovaných slepičích vejcích, inaktivují se a ošetří se tak, že se virové částice rozštěpí bez snížení antigenních vlastností hemaglutininového a neuraminidasového antigenu. Deklarované množství hemaglutininového antigenu každého kmene obsaženého ve vakcíně je 15 µg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je slabě opalizující tekutina.

#### VÝROBA

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace a, je-li třeba, doporučuje kmeny odpovídající této epidemiologické situaci.

Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Úmluvy o přípravě Evropského lékopisu.

Nyní je obecnou praxí používat vybrané kmeny s vysokými výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Inokulum chřipkového viru pro výrobu vakcíny se kultivuje ve fertilizovaných slepičích vejcích z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), např. kuřecích embryonálních fibroblastech nebo buňkách kuřecích ledvin získaných z SPF chovů (5.2.2). Pro výrobu se virus každého kmene kultivuje v alantoidní dutině embryonovaných slepičích vajec ze zdravých chovů.

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

### VIROVÉ INOKULUM

Výroba vakcíny je založená na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného izolátu viru. Vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Vhodnými metodami se prokáže u každého inokula, že hemaglutininový a neuraminidasový antigen pocházejí ze správného kmene chřipkového viru.

Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci za kontrolované teploty se odeberou alantoidní tekutiny a spojí se k vytvoření monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat v době sklizně. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin nebo streptomycin.

### MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ

Inaktivace se zahájí co nejdříve po přípravě, aby se omezila možnost kontaminace. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem prokázána stejná účinnost na třech po sobě jdoucích šaržích. Prokáže se schopnost inaktivačního procesu inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; hemaglutininový a neuraminidasový antigen by se měl měnit co nejméně. Prokáže se také schopnost inaktivačního procesu inaktivovat viry ptačí leukózy a mykoplazmata. Pokud se monovalentní spojená sklizeň po inaktivaci skladuje, udržuje se při teplotě (5 ± 3) °C. Jestliže se použije formaldehydový roztok, koncentrace během inaktivace nikdy nepřesáhne 0,2 g CH<sub>2</sub>O/l; při použití betapropiolaktonu nepřesáhne jeho koncentrace během inaktivace nikdy 0,1 % (V/V).

Před nebo po inaktivačním procesu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje odstředěním při vysoké rychlosti nebo jinou vhodnou metodou a virové částice se rozštěpí schváleným postupem na subjednotkové složky. Pro každý nový kmen se provede validační zkouška, aby se prokázalo, že monovalentní várka sestává převážně z rozštěpených virových částic.

Pouze monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Hemaglutininový antigen.** Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C.

U některých vakcín nedovoluje fyzikální forma částic hemaglutininu provést kvantitativní stanovení imunodifuzí po inaktivaci viru. U těchto vakcín se provede stanovení hemaglutininového antigenu v monovalentní spojené sklizni před

inaktivací. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo vhodné zachování hemaglutininového antigenu, a pro stanovení se použije vhodné označení, např. obsah bílkoviny.

**Neuraminidasový antigen.** Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Zbytkový infekční virus.** Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

**Chemické látky použité ke štěpení.** V monovalentní spojené sklizni se provádějí zkoušky na chemické látky použité ke štěpení. Limity schvaluje oprávněná autorita.

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Vhodné množství monovalentních spojených sklizní se spojí, aby se vytvořila konečná várka vakcíny.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkouška Zbytkový infekční virus byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky Volný formaldehyd, Ovalbumin a Celková bílkovina byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se tyto zkoušky u šarže vynechat.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Antigenní specifita vakcíny se prokáže stanovením obsahu hemaglutininového antigenu.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** 0,2 ml zkoušeného přípravku se inokuluje do alantoidní dutiny každého z deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se spojí. 0,2 ml směsného vzorku se inokuluje do dalších deseti fertilizovaných vajec a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru. Jestliže je v některé te-

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

kutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Ovalbumin.** Nejvýše množství uvedené v označení na obalu a v žádném případě ne více než 1 µg v lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

**Celková bílkovina.** Nejvýše šestinásobek celkového obsahu hemaglutininu zjištěného ve Stanovení obsahu, ale nejvýše 100 µg bílkoviny na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 300 µg bílkoviny v lidské dávce.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 100 m. j. v lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah hemaglutininového antigenu se stanoví imunodifuzí (2.7.1), porovnáním s referenčním přípravkem<sup>1</sup> hemaglutininového antigenu nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního přípravku. Zkouška se provede při teplotě 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 80 % až 125 % stanoveného obsahu hemaglutininového antigenu. Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je nejméně 80 % množství uvedeného v označení na obalu pro každý kmen.

U některých vakcín není možné kvantitativní stanovení hemaglutininového antigenu vzhledem k nedostupným referenčním přípravkům. Místo toho se provede vhodnými metodami imunologický důkaz hemaglutininového antigenu a jeho semikvantitativní stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích;
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použité k přípravě vakcíny;
- metoda inaktivace;
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku;
- maximální množství ovalbuminu;
- období, v němž je vakcína určena k ochraně.

## VACCINUM MENINGOCOCCALE CLASSIS C CONIUGATUM

6.0:2112

### Vakcína proti meningokokům skupiny C konjugovaná

#### DEFINICE

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek purifikovaného kapsulárního polysacharidu získaného z vhodného kmene *Neisseria meningitidis* skupiny C, kovalentně vázaného na bílkovinný nosič. Polysacharid meningokoků skupiny C tvoří opakující se jednotky částečně *O*-acetylované nebo *O*-deacetylované kyseliny sialové spojené 2α→9 glykosidickými vazbami. Bílkovinný nosič ve spojení s polysacharidem meningokoků skupiny C je schopný navodit na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk na tento polysacharid. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné konjugované vakcíny proti meningokokům skupiny C s dostatečnou imunogenitou a bezpečností pro člověka. Výroba polysacharidu meningokoků skupiny C i bílkovinného nosiče je založena na systému jednotné inokulace.

V průběhu vývojových studií a kdykoliv je nutná revalidace, provede se zkouška na pyrogenní látky (2.6.8) na králícih, při které se podá vhodná dávka šarže. Má se prokázat, že je přijatelná vzhledem k pyrogenní aktivitě.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že vakcína, bude-li zkoušena, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití. (2.6.9).

V průběhu vývojových studií a kdykoliv je nutná revalidace výrobního postupu se zkouškami na zvířatech má prokázat, že vakcína shodně navozuje na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk.

Stabilita šarže a příslušných meziproductů se hodnotí jednou nebo více zkouškami. Tyto zkoušky mohou zahrnovat stanovení velikosti molekul, stanovení obsahu volných sacharidů v konjugátu nebo zkoušku imunogenity na zvířatech.

##### BAKTERIÁLNÍ INOKULA

Bakteriální kmeny použité pro matečná inokula se mají identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jejich původu a zkouškách použitých k charakterizaci kmene. Kultury z pracovního inokula mají mít stejné charakteristiky jako kmen použitý k přípravě matečného inokula.

Čistota bakteriální kultury se ověří metodami vhodné citlivosti. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antiserem.

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

**POLYSACHARID MENINGOKOKŮ SKUPINY C**

*N. meningitis* se pomnoží v tekuté živné půdě, která neobsahuje vysokomolekulární polysacharidy a je prostá látek, které se srážejí cetrimonium-bromidem. Kultura se může inaktivovat teplem a filtrací před vysrážením polysacharidu cetrimonium-bromidem. Sraženina se dále purifikuje vhodnými metodami, aby se odstranily nukleové kyseliny, bílkoviny a lipopolysacharidy a závěrečný purifikační krok tvoří ethanolové srážení. Může být zařazen také stupeň *O*-deacetylase. V purifikovaném polysacharidu se vhodnou metodou, jako je např. termogravimetrie (2.2.34), stanoví těkavé látky včetně vody. Zjištěná hodnota se použije k přepočítání výsledků jiných zkoušek na vysušenou látku, jak je předepsáno dále.

K přípravě konjugátu se může použít pouze polysacharid meningokoků skupiny C, který vyhovuje následujícím požadavkům.

**Bílkovina** (2.5.16). Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku.

**Nukleové kyseliny** (2.5.17). Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku.

***O*-acetyl skupiny**. Stanoví se vhodnou metodou (např. 2.5.19). Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá šarže polysacharidu meningokoků skupiny C musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Kyselina sialová** (2.5.23). Nejméně 0,800 g kyseliny sialové v gramu polysacharidu meningokoků skupiny C; k přípravě porovnávacího roztoku se použije *kyselina N-acetylneuraminová R*.

**Zbytkové látky**. Kde je to vhodné, provádějí se zkoušky na stanovení zbytkových látek použitých při inaktivaci a purifikaci. Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota pro každou látku a každá šarže polysacharidu meningokoků skupiny C musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu. Jestliže validační studie prokázaly odstranění zbytkových látek, může se zkouška u polysacharidu meningokoků skupiny C vypustit.

**Distribuce velikosti molekul**. Provede se vylučovací chromatografie (2.2.30). Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá šarže polysacharidu meningokoků skupiny C musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu. Kde je to vhodné, stanoví se distribuce velikosti molekul také po chemické úpravě polysacharidu meningokoků skupiny C.

**Totožnost a sérologická specifita**. Totožnost a sérologická specifita se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) nebo jinou vhodnou metodou, např. <sup>1</sup>H nukleární magnetickou rezonanční spektrometrií (2.2.33).

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 100 m. j./μg polysacharidu meningokoků skupiny C.

**BÍLKOVINNÝ NOSIČ**

Bílkovinný nosič se vybere tak, aby po konjugaci s polysacharidem meningokoků skupiny C byl schopen indukovat na T-buňkách závislou imunitní odpověď. K tomu je vhodný tetanický toxoid a netoxický mutant bílkoviny podobné difterickému toxinu CRM 197. Bílkovinný nosič se produ-

kuje v kultuře vhodných mikroorganismů ověřené na bakteriální čistotu.

Pouze bílkovinný nosič, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k výrobě konjugátu.

**Totožnost**. Bílkovinný nosič se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Bílkovina podobná difterickému toxinu**. Použije-li se jako nosič bílkovina podobná difterickému toxinu, obsahuje nejméně 90 % CRM 197, stanoví se vhodnou metodou. Provádějí se vhodné zkoušky pro validaci nebo běžné zkoušky, aby se prokázalo, že přípravek není toxický.

**Tetanický toxoid**. Použije-li se jako nosič tetanický toxoid, připravuje se, jak je popsáno v článku *Vaccinum tetanicum adsorbatum* (0452), a vyhovuje požadavkům předepsaným pro várku purifikovaného toxoidu, kromě antigenní čistoty (2.7.27); nejméně 1500 Lf na miligram bílkovinného dusíku.

**VÁRKA KONJUGÁTU**

Polysacharid meningokoků skupiny C se chemicky modifikuje, aby se umožnila konjugace; obvykle se před nebo během tohoto postupu částečně depolymeruje. Konjugát se získá kovalentním spojením aktivovaného oligosacharidu meningokoků skupiny C a bílkovinného nosiče. Postupy purifikace konjugátu jsou určeny k odstranění zbytků látek použitých při konjugaci. Odstranění zbytkových látek a vedlejších produktů reakce se potvrdí vhodnými zkouškami nebo validací purifikačního postupu.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka konjugátu, která vyhovuje následujícím požadavkům. Pro každou zkoušku a pro každý daný přípravek se určí přijatelné hodnoty a každá šarže konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Distribuce velikosti molekul**. Provede se vylučovací chromatografie (2.2.30). Pro každý daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá šarže várky konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Sacharidy**. Obsah sacharidu se stanoví vhodným validovaným postupem (např. 2.5.23). Pro stanovení obsahu sacharidu se také může použít iontoměničová kapalinná chromatografie s pulzní ampérometrickou detekcí (2.2.29). Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá jednotlivá šarže várky konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Bílkovina**. Obsah bílkoviny se stanoví vhodnou chemickou metodou (např. 2.5.16). Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá jednotlivá šarže várky konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Poměr sacharidu k bílkovině**. Poměr se stanoví výpočtem.

**Volné sacharidy**. Nenavázané sacharidy se stanoví po odstranění z konjugátu, např. iontoměničovou kapalinnou chromatografií, vylučovací nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinými validovanými metodami. Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá jednotlivá šarže várky konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.



**Volný bílkovinný nosič.** Stanoví se vhodnou metodou buď přímo, nebo odvozením obsahu výpočtem z výsledků ostatních zkoušek. Pro daný přípravek se určí přijatelná hodnota a každá jednotlivá šarže várky konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Zbytkové látky.** Odstranění zbytků látek, jako je kyanid, se prokáže vhodnými zkouškami nebo validací výrobního postupu.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo množství odpovídající 100 dávčkám, podle toho, co je méně.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

K várce konjugátu se před ředěním na konečnou koncentraci vhodným rozpouštědlem může přidat adjuvans a stabilizátor.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům a limitům schváleným pro daný přípravek, se může použít pro přípravu šarže.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek a každému z dále uvedených požadavků ve Zkouškách totožnosti, Zkouškách na čistotu a Stanovení účinnosti se může uvolnit pro použití.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost vakcíny se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH (2.2.3).** pH vakcíny, je-li třeba rekonstituované, je v rozmezí  $\pm 0,5$  hodnoty pH schválené pro daný přípravek.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, jestliže se jako adsorbent použil hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše 3,0 % u lyofilizovaných přípravků.

**Volné sacharidy.** Nenavázané sacharidy se stanoví po odstranění z konjugátu, např. iontoměničovou kapalinovou chromatografií, vylučovací nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinými validovanými metodami. Pro daný přípravek se ve shodě s náležitou imunogenitou určí přijatelná hodnota a každá šarže musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 25 m. j. v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Sacharidy.** Nejméně 80 % množství polysacharidu meningokoků skupiny C uvedeného v označení na obalu. Obsah

sacharidů se stanoví vhodnou validovanou metodou, např. stanovením sialových kyselin (2.5.23) nebo iontoměničovou kapalinovou chromatografií s pulzní ampérometrickou detekcí (2.2.29).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mikrogramů polysacharidu meningokoků skupiny C v jedné lidské dávce;
- druh a počet mikrogramů bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce.

## VACCINUM MENINGOCOCCALE POLYSACCHARIDICUM

6.0:0250

### Vakcína proti meningokokům polysacharidová

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek jednoho nebo více purifikovaných kapsulárních polysacharidů získaných z jednoho nebo více vhodných kmenů *Neisseria meningitidis* skupiny A, skupiny C, skupiny Y a skupiny W135, které jsou schopny trvale vytvářet polysacharidy.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny A tvoří opakující se jednotky částečně *O*-acetylovaného *N*-acetylmanosaminu spojené  $1\alpha \rightarrow 6$  fosfodiesterovými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny C tvoří opakující se jednotky částečně *O*-acetylované kyseliny sialové spojené  $2\alpha \rightarrow 9$  glykosidickými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny Y tvoří střídající se jednotky částečně *O*-acetylované kyseliny sialové a *D*-glukosy spojené  $2\alpha \rightarrow 6$  a  $1\alpha \rightarrow 4$  glykosidickými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny W135 tvoří střídající se jednotky částečně *O*-acetylované kyseliny sialové a *D*-galaktosy spojené  $2\alpha \rightarrow 6$  a  $1\alpha \rightarrow 4$  glykosidickými vazbami.

Polysacharidová složka nebo složky uvedené v označení na obalu tvoří společně s ionty vápníku a zbytkovou vlhkostí více než 90 % hmotnosti přípravku.

#### VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné přípravky s dostatečnou imunogenitou a bezpečností pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### INOKULA

Kmeny *N. meningitidis* použité pro matečná inokula se mají identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jejich původu a jejich biochemických a sérologických charakteristikách.

Kultury z každého pracovního inokula mají stejné charakteristiky jako kmen použitý k přípravě matečného inokula.

<sup>1</sup> Referenční hemaglutininový antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

Kmeny mají následující charakteristiky:

- kolonie získané z kultury jsou kruhové, jednotného tvaru a lesku s mukózním, opalescentním a našedlým vzhledem;
- barvení podle Grama ukazuje charakteristické gramnegativní diplokoky v uspořádání kávových zrn;
- oxidasová zkouška je pozitivní;
- kultury využívají glukosu a maltosu;
- suspenze kultur jsou aglutinovány vhodnými specifickými antiséremy.

Čistota bakteriálních kmenů použitých pro inokula se ověří metodami o vhodné citlivosti. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodnou živnou půdu, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

#### RŮST A SKLIZEŇ

Pracovní inokula se pěstují na pevných půdách neobsahujících složky krevních skupin ani látky savčího původu. Inokulum může pocházet z jednoho nebo více dílčích pomnožení v tekuté živné půdě před tím, než se použilo k inokulaci do konečné živné půdy. Použité tekuté půdy a konečná živná půda jsou semisyntetické a jsou prosté látek, které se srážejí cetrimonium-bromidem (hexadecyltrimethylamonium-bromid) a neobsahují složky krevních skupin ani vysokomolekulární polysacharidy.

Bakteriální čistota kultury se ověří metodami vhodné citlivosti, které mohou zahrnovat inokulaci do vhodné půdy, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

Kultury se odstředí a polysacharidy ze supernatantní tekutiny se vysrážejí přidáním cetrimonium-bromidu. Získaná sraženina se oddělí a může se uchovávat před další purifikací při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### PURIFIKOVANÉ POLYSACHARIDY

Po rozštěpení komplexu polysacharidů a cetrimonium-bromidu se polysacharidy purifikují za použití vhodných postupů, aby se odstranily zbylé nukleové kyseliny, bílkoviny a lipopolysacharidy.

Závěrečným purifikačním stupněm je ethanolové srážení polysacharidů, které se potom vysuší a uchovávají se při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ztráta sušením se stanoví termogravimetricky (2.2.34) a získaná hodnota se použije k přepočítání výsledků jiných chemických zkoušek na vysušenou látku.

K přípravě konečné várky vakcíny se mohou použít pouze purifikované polysacharidy, které vyhovují následujícím požadavkům.

**Bílkovina** (2.5.16). Nejvýše 10 mg bílkoviny v gramu purifikovaného polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

**Nukleové kyseliny** (2.5.17). Nejvýše 10 mg nukleových kyselin v gramu purifikovaného polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

**O-acetyl skupiny** (2.5.19). Nejméně 2 mmol O-acetyl skupin v gramu purifikovaných polysacharidů skupiny A, nejméně 1,5 mmol v gramu polysacharidu skupiny C, nejméně 0,3 mmol v gramu polysacharidu skupin Y a W135, vše počítáno na vysušenou látku.

**Fosfor** (2.5.18). Nejméně 80 mg fosforu v gramu purifikovaného polysacharidu skupiny A, počítáno na vysušenou látku.

**Kyselina sialová** (2.5.23). Nejméně 800 mg kyseliny sialové v gramu polysacharidu skupiny C a nejméně 560 mg kyseliny sialové v gramu purifikovaného polysacharidu skupiny Y a W135, vše počítáno na vysušenou látku. Použijí se tyto porovnávací roztoky:

- polysacharid skupiny C: roztok kyseliny *N-acetylneuraminové R* (150 mg/l);
- polysacharid skupiny Y: roztok obsahující kyselinu *N-acetylneuraminovou R* (95 mg/l) a glukosu *R* (55 mg/l);
- polysacharid skupiny W135: roztok obsahující kyselinu *N-acetylneuraminovou* (95 mg/l) a galaktosu *R* (55 mg/l).

**Vápník.** Jestliže byly při purifikaci použity vápenaté soli, provede se stanovení vápníku; obsah je v rozmezí schváleném pro daný výrobek.

**Distribuce velikosti molekul.** Provede se vylučovací chromatografie (2.2.30) za použití *agarosy pro chromatografii R* nebo *agarosy síťované pro chromatografii R*. Použije se kolona délky asi 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nanese 2,5 mg polysacharidu v objemu asi 1,5 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce asi po 2,5 ml a obsah polysacharidu se stanoví vhodnou metodou. Před dosažením distribučního koeficientu ( $K_0$ ) 0,50 se eluuje nejméně 65 % polysacharidu skupiny A, 75 % polysacharidu skupiny C, 80 % polysacharidu skupiny Y a 80 % polysacharidu skupiny W135. Procenta eluovaná před dosažením tohoto distribučního koeficientu jsou navíc v rozmezí schváleném pro daný výrobek.

**Totožnost a sérologická specifita.** Totožnost a sérologická specifita se ověří vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Potvrdí se totožnost a čistota každého polysacharidu a má se prokázat, že obsah polysacharidu heterologní skupiny *N. meningitidis* nepřesahuje 1 %.

**Pyrogenní látky** (2.6.8). Polysacharid vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka podá 1 ml roztoku obsahujícího 0,025  $\mu\text{g}$  purifikovaného polysacharidu v mililitru.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍN

Jeden nebo více purifikovaných polysacharidů jedné nebo více skupin *N. meningitidis* se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, které může obsahovat stabilizátor. Po úplném rozpuštění se roztok zfiltruje filtrem zadržujícím bakterie. K přípravě šarže se může použít jen konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku.

**Sterilita** (2.6.1). Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Ke spotřebě se může uvolnit jen šarže, která vyhovuje všem požadavkům předepsaným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti.

## VLASTNOSTI

Bílý nebo krémově zbarvený prášek nebo pelety snadno rozpustné ve vodě.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Každý polysacharid obsažený ve vakcíně se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Distribuce velikosti molekul.** Provede se vylučovací chromatografie (2.2.30). Použije se kolona délky asi 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nanese 2,5 mg každého polysacharidu v objemu asi 1,5 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce po asi 2,5 ml a obsah polysacharidu se stanoví vhodnou metodou.

Pro bivalentní vakcínu (skupina A + skupina C) se použije *agarosa síťovaná pro chromatografii R*. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- 65 % polysacharidu skupiny A se eluuje před  $K_0 = 0,50$ ;
- 75 % polysacharidu skupiny C se eluuje před  $K_0 = 0,50$ .

Pro tetravalentní vakcínu (skupina A + skupina C + skupina Y + skupina W135) se použije *agarosa síťovaná pro chromatografii R1* a vhodná imunochemická metoda (2.7.1), aby se zajistily eluční podmínky pro různé polysacharidy. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže  $K_0$  pro hlavní pík je:

- nejvýše 0,70 pro polysacharid skupiny A a skupiny C;
- nejvýše 0,57 pro polysacharid skupiny Y;
- nejvýše 0,68 pro polysacharid skupiny W135.

**Voda**, semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 %.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látky** (2.6.8). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka podá 1 ml roztoku obsahujícího:

- 0,025 µg polysacharidu monovalentní vakcíny;
- 0,050 µg polysacharidu bivalentní vakcíny;
- 0,10 µg polysacharidu tetravalentní vakcíny.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se stanovení každého polysacharidu obsaženého ve vakcíně.

Pro bivalentní vakcínu (skupina A a skupina C) se použije stanovení obsahu fosforu (2.5.18), aby se stanovil obsah polysacharidu A, a stanovení obsahu kyseliny sialové (2.5.23), aby se stanovil obsah polysacharidu C. Ke stanovení kyseliny sialové se jako referenční roztok použije roztok *kyseliny N-acetylneuraminové R* (150 mg/l).

Pro tetravalentní vakcínu (skupina A + skupina C + skupina Y + skupina W135) se použije vhodná imunochemická metoda (2.7.1) s referenčním přípravkem purifikovaného polysacharidu pro každou skupinu.

Vakcína obsahuje 70 % až 130 % množství každého polysacharidu uvedeného v označení na obalu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- skupina nebo skupiny polysacharidů (A, C, Y nebo W135) obsažené ve vakcíně;
- počet mikrogramů polysacharidu v lidské dávce.

## VACCINUM MORBILLORUM VIVUM

6.1:0213

## Vakcína proti spalničkám živá

## DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodný atenuovaný kmen spalničkového viru. Vakcína se rekonstruuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na obalu. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

## VÝROBA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace viru a je-li virus kultivován v lidských diploidních buňkách, na systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodnou živou spalničkovou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprošel od matečného inokula více pasážemi, než kolik jich bylo použito k přípravě vakcíny, jejíž bezpečnost a účinek byly prokázány v klinické studii; počet pasáží nad úroveň použitou pro klinické studie není ani se schválenými výjimkami vyšší než pět.

V průběhu preklinického vývoje se bere v úvahu potenciální neurovirulence vakcinačního kmene, založená na dostupných epidemiologických údajích týkajících se neurovirulence a neurotropismu, především pro divoký kmen viru. Na základě toho se provede analýza rizik. Je-li třeba a je-li to možné, provede se zkouška vakcinačního kmene za použití zvířecího modelu, který odliší divoký kmen viru od atenuovaného viru; mohou být také potřebné zkoušky na středně atenuované kmeny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

## SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3) nebo v kulturách buněk z kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2).

## INOKULUM

Kmen použitého spalničkového viru se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informaci o jeho původu a následném zacházení s ním. Virová inokula se připraví ve velkém množství a uchovávají se lyofilizovaná při teplotě nižší než  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo, pokud nejsou lyofilizovaná, nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako spalničkový virus sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ

Všechny práce s buněčnou bankou a s následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek a v prostředí, kde se při výrobě nepracuje s jinými buňkami. Do kultivačních médií se může přidat vhodné zvířecí sérum (nikoliv lidské), ale konečné médium pro udržování buněk při multiplikaci viru neobsahuje žádné zvířecí sérum. Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a kultivačních médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červená fenolová, a vhodná antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Nejméně 500 ml výrobních buněčných kultur se ponechá neinfikovaných (kontrolní buňky). Sklizně virových suspenzí probíhají v době vhodné pro použití kmen viru.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako spalničkový virus sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a k určení ředění pro konečnou várku vakcíny se stanoví koncentrace viru v jednotlivé sklizni postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkouškám na nepřítomnost cizích agens.

**Kontrolní buňky.** Jestliže byly pro výrobu použity lidské diploidní buňky, vyhovují kontrolní buňky zkoušce Totožnost a požadavkům zkoušky Cizí agens (2.6.16).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Virové sklizně, které vyhovely výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří se, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se příslušně naředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít k přípravě šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Nejnižší koncentrace viru pro propuštění přípravku se určí tak, že se pomocí stabilních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu.

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům na nejnižší koncentraci viru pro propuštění, následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři lahvičky šarže lyofilizované vakcíny v suchém stavu se udržují 7 dnů při  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Souběžně se stanoví koncentrace viru způsobem popsaným

v odstavci Stanovení účinnosti ve vzorku zahříváné a nezaříváné vakcíny uchovávané při teplotě doporučené pro skladování. Koncentrace viru v zahříváné vakcíně je nejméně o 1,0 log nižší než koncentrace viru v nezaříváné vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína, rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu, smíchá se specifickými spalničkovými protilátkami, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejméně 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejméně 3,0 %.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří lahviček vakcíny, inokuluje se vhodný počet jamek pro každé ředění. K validaci každého stanovení se jedna lahvička vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojnásobně. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titer se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Pokud se používá referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvičce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů ze tří lahviček nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu; minimální koncentrace uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log (CCID<sub>50</sub>) v jedné lidské dávce.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ ;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ ; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ .

Vakcínu proti spalničkám živou BRP je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM MORBILLORUM, PAROTITIDIS ET RUBELLAE VIVUM

6.7:1057

### Vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám živá

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodné atenuované kmeny virů spalniček, příušnic a zarděnek. Vakcína se rekonstruuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na obalu. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

Tři složky vakcíny se připravují, jak je popsáno v člancích *Vaccinum morbillorum vivum* (0213), *Vaccinum parotitidis vivum* (0538) a *Vaccinum rubellae vivum* (0162), a vyhovují požadavkům v nich předepsaným.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoseru a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Virové sklizně jednotlivých složek se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se příslušně naředí. Vhodná množství spojených sklizní jednotlivých složek se smíchají.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít pro přípravu šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pro každou složku se nejnižší koncentrace viru pro propuštění přípravku určí tak, že se pomocí stabilních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti bylo ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu.

Pouze šarže, která vyhovuje následujícím požadavkům na nejnižší koncentraci viru každé složky pro propuštění, následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Bovinní sérumalbumin a, kde je to vhodné, Ovalbumin provedeny s vyhovujícími výsledky v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři lahvičky šarže lyofilizované vakcíny v suchém stavu se udržují 7 dnů při  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Souběžně se stanoví koncentrace viru způsobem popsaným v odstavci Stanovení účinnosti ve vzorku zahříváné a nezahříváné vakcíny uchovávané při teplotě doporučené pro skladování. Pro každou složku je koncentrace viru v zahříváné vakcíně nejvýše o 1,0 log nižší než koncentrace viru v nezahříváné vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu smíchá se specifickými protilátkami proti viru spalniček, příušnic a zarděnek, není již schopná infikovat buněčné kultury vnímavé k těmto virům. Když se vakcína, rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu, smíchá s množstvím specifických protilátek postačujícím k neutralizaci dvou virových složek, třetí virová složka infikuje vnímavou buněčnou kulturu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Ovalbumin.** Je-li příušnicová složka připravena na kuřecích embryích, obsahuje vakcína nejvýše 1  $\mu\text{g}$  ovalbuminu v jedné lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda, semimikrostanovení** (2.5.12). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Buněčné linie a/nebo neutralizační antiséra se volí tak, aby se zajistilo stanovení účinnosti každé ze složek bez ovlivnění ostatními dvěma složkami.

Titrace virů spalniček, příušnic a zarděnek se provádí za použití nejméně tří lahviček vakcíny, inokuluje se vhodný počet jamek každého ředění. K validaci každého stanovení se jedna lahvička vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Pokud se používá referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvičce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů spalniček, příušnic a zarděnek ze tří lahviček nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu; minimální koncentrace viru spalniček uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce; minimální koncentrace viru příušnic uvedená v označení na obalu je nejméně 3,7 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce; minimální koncentrace viru zarděnek uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) kombinované koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyk-

lých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) kombinované koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3 \log CCID_{50}$ .

*Vakcínu proti spalničkám živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

*Vakcínu proti příušnicím živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

*Vakcínu proti zarděnkám živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmeny virů použité k přípravě vakcíny;
- kde je to vhodné, že byla při přípravě vakcíny použita kuřecí embrya;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace každé virové složky vakcíny;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM MORBILLORUM, PAROTITIDIS, RUBELLAE ET VARICELLAE VIVUM

7.3:2442

Vakcína proti spalničkám, příušnicím, zarděnkám a planým neštovicím živá

### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodné atenuované kmeny virů spalniček, příušnic, zarděnek a lidského herpesviru 3. Vakcína se rekonstruuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na obalu. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

### VÝROBA

Čtyři složky vakcíny se připravují, jak je popsáno v částech *Vaccinum morbillorum vivum* (0213), *Vaccinum parotitidis vivum* (0538), *Vaccinum rubellae vivum* (0162) a *Vaccinum varicellae vivum* (0648) a vyhovují požadavkům v nich předepsaným.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoserá a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Virové sklizně jednotlivých složek se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a každá složka spojené sklizně se příslušně naředí. Vhodná množství spojených sklizní jednotlivých složek se smíchají. Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít pro přípravu šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Proveďte se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

### ŠARŽE

Pro každou složku se nejnižší koncentrace viru pro propuštění přípravku určí tak, že se pomocí stabilních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu. Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se do obsahu vlhkosti, který se ukázal vhodným pro stabilitu vakcíny. Obaly se potom uzavřou, aby se zabránilo kontaminaci a přístupu vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje následujícím požadavkům na nejnižší koncentraci viru každé složky pro propuštění, následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu, bovinní sérumalbumin a vodu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Pro složku proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám se nejméně tři obaly šarže lyofilizované vakcíny v suchém stavu udržují 7 dnů při  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . V zahřáté vakcíně a paralelně v nezahřáté vakcíně, udržované při teplotě doporučené pro skladování, se stanoví koncentrace viru způsobem popsaným v odstavci Stanovení účinnosti. Pro každou složku je koncentrace viru v zahřáté vakcíně nejvýše o 1,0 log nižší než koncentrace viru v nezahřáté vakcíně.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše množství schválené oprávněnou autoritou; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše množství prokazatelně zajišťující stabilitu vakcíny, které bylo schváleno oprávněnou autoritou.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu smíchá se specifickými protilátkami proti viru spalniček, příušnic, zarděnek a proti lidskému herpesviru 3, není již schopná infikovat buněčné kultury vnímavé k těmto virům. Když se vakcína, rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu, smíchá s množstvím specifických protilátek postačujícím k neutralizaci ostatních tří virových složek, čtvrtá virová složka infikuje vnímavou buněčnou kulturu.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Buněčné linie a/nebo neutralizační antiséra se volí tak, aby se zajistilo stanovení účinnosti každé ze složek bez ovlivnění ostatními třemi složkami.

Titrace virů spalniček, příušnic, zarděnek a lidského herpesviru 3 se provádí za použití nejméně tří obalů vakcíny, inokuluje se vhodný počet jamek každého ředění. K validaci každého stanovení se jeden obal vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak,

pokud se pro viry spalniček, příušnic, zarděnek a lidského herpesviru 3 použije referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každém obalu vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Proveďte se statistické porovnání. Titry virů spalniček, příušnic, zarděnek a lidského herpesviru 3 ze tří obalů nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu; minimální koncentrace viru spalniček uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce; minimální koncentrace viru příušnic uvedená v označení na obalu je nejméně 3,7 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce; minimální koncentrace viru zarděnek uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub> (viry spalniček, příušnic a zarděnek) nebo  $\pm 0,3$  log PFU (lidský herpesvirus 3);
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> (viry spalniček, příušnic a zarděnek) nebo  $\pm 0,5$  log PFU (lidský herpesvirus 3) od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) kombinované koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub> (viry spalniček, příušnic a zarděnek) nebo  $\pm 0,3$  log PFU (lidský herpesvirus 3); pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) kombinované koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub> (viry spalniček, příušnic a zarděnek) nebo  $\pm 0,3$  log PFU (lidský herpesvirus 3).

*Vakcínu proti spalničkám živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

*Vakcínu proti příušnicím živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

*Vakcínu proti zarděnkám živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

*Vakcínu proti planým neštovicím živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmeny virů použité k přípravě vakcíny;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace každé virové složky vakcíny;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM PAPILOMAVIRI HUMANI (ADNr)

7.2:2441

### Vakcína proti papilomaviru (rDNA)

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující purifikované částice podobné virům (VLPs) složené z hlavního kapsulárního proteinu (L1) jednoho nebo více genotypů lidských papilomavirů (HPV); antigen se může adsorbovat na minerální nosič, jako je hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Vakcína také může jako adjuvans obsahovat 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipid A. Antigeny se získávají rekombinantní DNA technologií.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Vakcína má u člověka prokazatelně navodit tvorbu specifických neutralizačních protilátek. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat vakcíny shodné s vakcinou, jejíž účinek a bezpečnost byly klinicky ověřeny na člověku.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Přípravek se vyrábí expresí virových genů kódujících kapsulární proteiny v kvasinkovém nebo bakulovirovém expresním systému v tkáňových kulturách hmyzích buněk, purifikací vzniklých částic podobných virům (VLPs) a převedením těchto částic do imunogenního přípravku. Vhodnost a bezpečnost expresního systému schvaluje oprávněná autorita. Výroba vakcíny je založena na systému jednoduché inokulace/buněčné banky. Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, virus a buňky pro výrobu vakcíny nemají projít více pasážemi z matečného inokula/buněčné banky než virus a buňky použité k přípravě vakcíny, která vyhověla v klinických studiích z hlediska bezpečnosti a účinku.

*Referenční přípravek.* Jako referenční přípravek se používá šarže vakcíny, která vyhověla v klinických studiích nebo reprezentativní šarže vakcíny. Referenční vakcína se pokud možno stabilizuje a postup stabilizace nemá signifikantní vliv na validitu stanovení účinnosti.

#### CHARAKTERIZACE

*Charakterizace* částic podobných virům se provede na šaržích vyrobených během vývoje vakcíny, včetně šarží z procesních validací. Charakterizace zahrnuje složení bílkovin, např. za použití metod, jako je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s natrium-dodecyl-sulfátem (SDS-PAGE) a Western blott nebo hmotnostní spektrometrie, mapování peptidů a/nebo analýzy terminální sekvence aminokyselin. Určí se morfologické charakteristiky částic podobných virům a stupeň agregace, aby se potvrdila přítomnost konformačních epitopů, které jsou nezbytné pro účinek. Charakterizace částic podobných virům se mohou provádět mikroskopii atomárních sil a transmisní elektronovou mikroskopii, dynamickým rozptylem světla, mapováním epitopů a reaktivitou s neutralizačními monoklonálními protilátkami. Navíc, kde je to vhodné, se měří obsah bílkovin, lipidů, nukleových kyselin a cukrů. Hladina zbytkových bílkovin z hostitelských buněk odvozených z buněk

hmyzu splňuje kritéria bezpečnosti pro přijetí stanovená oprávněnou autoritou.

#### BUNĚČNÁ BANKA A INOKULA

*Výroba na rekombinantních kvasinkách.* Pouze buněčné banky, které byly uspokojivě charakterizovány z hlediska totožnosti, mikrobiální čistoty, růstových charakteristik a stability, se mají použít pro výrobu. Studuje se homogenita genů pro matečné a pracovní buněčné banky. Poskytuje se úplný popis biologických charakteristik hostitelských buněk expresních vektorů. Používají se detailní popisy fyziologických měření ke kontrole exprese klonovaných genů v hostitelských buňkách; ty zahrnují genetické markery hostitelských buněk, konstrukce, genetické a strukturální vlastnosti expresních vektorů a původ a totožnost genů, které jsou klonovány. Provádí se nukleotidové sekvence genů inzeru a přilehlých segmentů vektoru a restriktivní enzymové mapování vektoru obsahujícího genový inzer. Poskytují se údaje, které prokázaly stabilitu expresního systému během skladování rekombinantní pracovní buněčné banky až do nebo za hladinu pasáže použité pro výrobu.

#### *Výroba na expresním vektorovém systému z buněk hmyzu/bakuloviru*

– *Expresní systém z buněk hmyzu.* Pouze buněčné banky, které byly uspokojivě charakterizovány z hlediska totožnosti, čistoty, růstových charakteristik, stability, cizích agens a tumorogenity, se mají použít pro výrobu. Taková charakterizace se provádí ve vhodných stupních výroby v souladu se statěmi *Buněčné substráty pro výrobu humánních vakcín (5.2.3)* a *Důkaz cizích agens v humánních virových vakcínách (2.6.16)*. Zvláštní pozornost se věnuje virům přenášeným hmyzem, zejména potenciálně patogenním vůči člověku (např. arbovirům). Náhodná infekční agens z buněk hmyzu mohou být bez cytopatogenních účinků. Zkoušky proto zahrnují metody amplifikace nukleových kyselin a jiné další zkoušky, jako je elektronová mikroskopie a souběžná kultivace.

– *Rekombinantní bakulovirus.* Použití rekombinantního bakulovirového vektoru je založeno na systému jednotné inokulace s definovaným počtem pasáží od původního viru k matečnému a pracovnímu inokulu, jak bylo schváleno oprávněnou autoritou. Expresní rekombinantní bakulovirový vektor zahrnuje kódovací sekvenci HPV L1 antigenu. Segmenty konstrukce exprese se analyzují za použití metody amplifikace nukleových kyselin ve spojení s ostatními zkouškami prováděnými na purifikovaných rekombinantních bílkovinách, aby se zajistila jakost a shodnost exprese HPV L1 antigenů. Rekombinantní bakulovirus použitý ve výrobě HPV vakcín se identifikuje vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu a totožnosti klonovaného genu, konstrukci, genetice a struktuře vektoru (vektorů) exprese bakuloviru. Genetická stabilita konstrukce exprese se prokazuje z matečného inokula bakuloviru až přinejmenším k nejvyšší úrovni použité ve výrobě a pokud možno za tuto úroveň. Rekombinantní bakulovirová inokula se připravují ve větším množství a uchovávají se při teplotě příznivé pro stabilitu.

Pouze inokulum, které odpovídá následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** U každého matečného a pracovního inokula se ověří původ HPV typu vloženého genu vhodnými metodami, jako je metoda amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se v každém matečném a pracovním inokulu stanoví koncentrace viru.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula a kontrolní buňky. Zvláštní pozornost se věnuje druhu *Spiroplasma* a virům přenášeným hmyzem, zejména potenciálně patogenním vůči člověku (např. arbovirům).

#### KULTIVACE A SKLIZENĚ

Všechny práce s buněčnou bankou a bakulovirovými inokuly a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostoru, kde se nepracuje s jinými buňkami.

Kde je to zdůvodněno a schváleno pro výrobu na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru, může se pro kultivaci viru použít kultura viru skladovaná jako meziprodukt, která vyhovuje pěti dále uvedeným zkouškám.

**Totožnost.** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt se identifikuje podle typu HPV imunologickými metodami za použití specifických protilátek nebo zkoušky molekulární identity, jako jsou techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Koncentrace viru.** V každé kultuře viru skladované jako meziprodukt se k monitorování shodnosti výroby stanoví koncentrace bakuloviru vhodnými metodami, jako je obsah plaků nebo techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**Cizí agens (2.6.16).** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt vyhovuje požadavkům zkoušky na cizí agens.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z kultury produkčních buněk, ze kterých je odvozena kultura viru skladovaná jako meziprodukt, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům zkoušky Cizí agens (2.6.16).

*Výroba na rekombinantních kvasinkách.* Totožnost, mikrobiální čistota, retence plazmidů a shodnost výnosu se určí ve vhodném výrobním stupni.

*Výroba na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru.* Kultury buněk hmyzu se inokulují rekombinantním bakulovirem za definované multiplicity infekce, jak je schváleno oprávněnou autoritou. Některé jednotlivé sklizně se mohou spojit. Během sklizně ani v žádném pozdějším stupni výroby se nepřidávají antibiotika.

#### JEDNOTLIVÉ SKLIZNĚ

Pouze jednotlivá sklizeň viru nebo spojené jednotlivé sklizně vyhovující následujícím požadavkům se mohou použít k přípravě purifikovaného monovalentního antigenu.

**Totožnost.** Každá jednotlivá sklizeň se kontroluje na přítomnost odpovídajícího HPV typu imunologickými metodami nebo zkouškami založenými na molekulární biologii,



např. hybridizace nebo polymerasová řetězová reakce (PCR).

**Bakteriální a houbová kontaminace.** V případě výroby na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru vyhovuje jednotlivá sklizeň viru zkoušce na sterilitu (2.6.1). V případě výroby na rekombinantních kvasinkách se jednotlivá sklizeň zkouší na čistotu kultury na vhodné živné půdě, aby se zajistil nulový nárůst jiného než hostitelského organismu.

**Cizí agens (2.6.16).** V případě výroby na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru vyhovuje jednotlivá sklizeň požadavkům zkoušky na cizí agens. Zvláštní pozornost se věnuje virům přenášeným hmyzem, jak je uvedeno v části Buněčná banka a inokula.

**Kontrolní buňky.** V případě výroby na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru vyhovuje jednotlivá sklizeň požadavkům zkoušky Cizí agens (2.6.16). Zvláštní pozornost se věnuje virům přenášeným hmyzem, jak je uvedeno v části Buněčná banka a inokula.

#### PURIFIKOVANÝ MONOVALENTNÍ ANTIGEN

Sklizeň se purifikuje validovanými metodami. V případě výroby na expresním systému z buněk hmyzu/bakuloviru, validuje se výrobní postup na schopnost eliminovat (odstraněním nebo inaktivací) adventivní viry a rekombinantní bakuloviry.

Pouze purifikovaný monovalentní antigen, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky. Se souhlasem oprávněné autority může být jedna nebo více dále uvedených zkoušek vypuštěna, pokud byla provedena s adsorbovaným monovalentním antigenem.

**Celková bílkovina.** Stanoví se validovanou metodou. Obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost a obsah antigenu.** Množství a specifita každého antigenního typu se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je radioimunoanalýza (RIA), enzymově imunobentové stanovení (ELISA), imunoblot (přednostně se užívají monoklonální protilátky přímo proti protektivnímu epitopu) nebo jednoduchou radiální difuzí. Poměr antigenu k bílkovině je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Čistota antigenu.** Čistota každého purifikovaného monovalentního antigenu se stanoví vhodnou metodou, jako je SDS-PAGE s kvantifikací denzitometrickou analýzou s limitem detekce 1 % nečistot nebo raději vztaženo na celkovou bílkovinu. K validaci každé zkoušky se použije referenční přípravek. Čistota bílkoviny se vypočítá jako poměr pásu L1 bílkoviny k pásu celkové bílkoviny, vyjádřeno v procentech. Pro genotypy obsažené ve vakcíně je hodnota vypočítané čistoty v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Procentuální obsah intaktního L1 monomeru.** Čistota antigenu se často používá také k určení integrity L1 monomeru. Procentuální obsah intaktního L1 monomeru je poměr intaktního L1 monomeru k celkové bílkovině, vyjádřeno v procentech.

**Velikost a struktura částic podobných virům (VLPs).** Stanoví a monitoruje se vhodnou metodou, jako je dyna-

mický rozptyl světla. Velikost je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Složení.** Stanoví se obsah bílkovin, lipidů, nukleových kyselin a sacharidů, kde je to vhodné.

**DNA hostitelských buněk a z vektoru odvozená DNA.** Nejvýše 10 ng DNA v množství purifikovaného antigenu, které odpovídá jedné lidské dávce vakcíny, stanoví se u každého monovalentního purifikovaného antigenu vhodnými citlivými metodami.

**Zbytková bílkovina hostitelských buněk.** Provedou se zkoušky na zbytkovou bílkovinu hostitelských buněk, obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Chemikálie použité k rozbíjení mikroorganismů a purifikaci.** Provedou se zkoušky na chemické látky použité k purifikaci nebo v dalších stupních výroby, obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita (2.6.1).** Každý purifikovaný monovalentní antigen vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ADSORBOVANÝ MONOVALENTNÍ ANTIGEN

Purifikovaný monovalentní antigen se může adsorbovat na minerální vehikulum, jako je hlinitá sůl.

Pouze adsorbovaný monovalentní antigen, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky.

**Sterilita (2.6.1).** Každý adsorbovaný monovalentní antigen vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Každý adsorbovaný monovalentní antigen se zkouší na bakteriální endotoxiny, obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost a obsah antigenu.** Každý antigenní typ se identifikuje vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je radioimunoanalýza (RIA), enzymově imunobentové stanovení (ELISA), imunoblot (přednostně se užívají monoklonální protilátky přímo proti protektivnímu epitopu) nebo jednoduchou radiální difuzí. Stanoví se poměr antigenu k bílkovině.

**Koncentrace minerálního vehikula.** Každý adsorbovaný monovalentní antigen se zkouší na obsah minerálního vehikula, kde je to vhodné. Obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### NEROZPLNĚNÝ ADSORBOVANÝ 3-O-DEACYL-4'-MONOFOSFORYLLIPID A

Pokud vakcína obsahuje 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid A, vyhovuje článku 3-O-Desacyl-4'-monophosphoryllipidum A (2537). Je-li nerozplněný 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipid v tekuté formě adsorbován před zařazením do vakcíny, vyhovuje následujícím požadavkům.

**Stupeň adsorpce 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A.** Obsah neadsorbovaného 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A v adsorbovaném neředěném 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A se stanoví vhodnou metodou, např. kvantifikací mastných kyselin 3-O-deacyl-4'-monofosforyllipidu A

(2537) v supernatantní tekutině, po odstředění odpařené do sucha, plynovou chromatografií.

**Hodnota pH (2.2.3).** V rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví přímo z každého purifikovaného monovalentního antigenu typu HPV nebo adsorbovaného monovalentního antigenu typu HPV. Do formulace šarže se může zařadit protimikrobní látka, minerální adsorbent, jako jsou hlinité soli, a adjuvans 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipid A. Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Jestliže zkouška Protimikrobní látka (kde je to vhodné) byla provedena v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, může se u šarže vypustit. Je-li Stanovení účinnosti *in vivo* provedeno s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u konečné šarže vypustit.

**Adjuvans.** Jestliže vakcína obsahuje adjuvans, stanoví se jeho množství a vyhovuje limitu přijatelnosti. Vhodnou metodou pro stanovení 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipidu A je např. plynová chromatografie.

**Stupeň adsorpce.** Stanoví se stupeň adsorpce každého antigenu a, kde je to vhodné, 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipidu A.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přítomnost antigenu každého genotypu lidských papilomavirů (HPV) ve vakcíně se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Stanovení účinnosti *in vitro* se může použít jako zkouška totožnosti. Navíc, kde je to vhodné, zkouškou na 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipid A. Stanovení obsahu 3-*O*-deacyl-4'-monofosforyllipidu A je současně zkouškou totožnosti u vakcín, které jej obsahují.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce; jestliže se použil hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý jako adsorbent.

**3-*O*-Deacyl-4'-monofosforyllipid A.** 80 % až 120 % předpokládaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou metodou, např. plynovou chromatografií (2.2.28).

**Protimikrobní látka.** Nejméně prokazatelně nejnižší účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Nejvýše 5 m. j. v jedné lidské dávce. Jestliže přítomnost adjuvans brání stanovení bakteriálních endotoxinů, provede se vhodná zkouška během výroby.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Stanovení účinnosti vakcíny se provádí *in vivo* nebo *in vitro* zkouškou za použití kritérií pro přijetí stanovených srovnávacích studií se zkouškou *in vivo*.

**Zkouška *in vivo*.** Vhodná *in vivo* metoda stanovení účinnosti spočívá v injekčním podání nejméně tří ředění zkoušené vakcíny a referenčního přípravku, každé ředění se podá skupině vhodného počtu samic myši vhodného kmene. Vakcína se zředí roztokem *chloridu sodného R* obsahujícího hliníkové adjuvans použité při výrobě vakcíny. Myši jsou v době podání injekce stáří 6 až 8 týdnů, každé myši se podá po 0,5 ml. Vzorky séra před imunizací se odeberou před podáním injekce, konečné vzorky séra se odeberou v definovaném období mezi 21. a 28. dnem po injekci. V jednotlivých sérech se stanoví hladina specifických neutralizačních protilátek proti každému HPV typu vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- pro obě vakcíny (zkoušenou i referenční) není ED<sub>50</sub> mezi nejnižší a nejvyšší dávkou podanou zvířatům;
- statistická analýza vykazuje signifikantní odchylku od linearitity nebo rovnoběžnosti;
- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) není v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Zkouška *in vitro*.** Obsah každého antigenního typu se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Jako vhodné se ukázalo enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA) a radioimunoanalýza (RIA) za použití specifických monoklonálních protilátek proti protektivním epitopům L1 proteinu. Použije se vhodný počet ředění zkoušené vakcíny a referenční vakcíny výrobce a vhodný model k analýze údajů. Obsah antigenu pro každý typ je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- obsah L1 proteinu a genotyp lidských papilomavirů (HPV) obsažených ve vakcíně;
- buněčný substrát použitý k výrobě vakcíny;
- název a množství použitého adjuvans a/nebo adsorbentu;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM PAROTITIDIS VIVUM

6.1:0538

### Vakcína proti příušnicím živá

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodný atenuovaný kmen viru příušnic. Vakcína se rekonstituuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na obalu.

Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a, je-li virus kultivován v lidských diploidních buňkách, na systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodnou živou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprošel od matečného inokula více pasážemi, než kolik se jich použilo u vakcíny, jejíž bezpečnost a účinek byly prokázány v klinické studii.

V průběhu preklinického vývoje se bere v úvahu potenciální neurovirulence vakcinačního kmene založená na dostupných epidemiologických údajích týkajících se neurovirulence a neurotropismu, především pro divoký kmen viru. Na základě toho se provede analýza rizik. Je-li třeba a je-li to možné, provede se zkouška vakcinačního kmene za použití zvířecího modelu, který odliší divoký kmen viru od atenuovaného viru; mohou být také potřebné zkoušky na středně atenuované kmeny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3) nebo v kulturách buněk z kuřecích embryí, nebo v amniotické dutině kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2).

#### INOKULUM

Kmen použitého viru příušnic se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informaci o jeho původu a následném zacházení s ním. Virová inokula se připraví ve velkém množství a uchovávají se lyofilizovaná při teplotě nižší než  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo, pokud nejsou lyofilizovaná, nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze virové inokulum vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako virus příušnic sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ

Všechny práce s buněčnou bankou a s následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek a v prostředí, kde se při výrobě npracuje s jinými buňkami. Do kultivačních médií se může použít vhodné zvířecí sérum (nikoliv lidské). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červeně fenolová, a vhodná antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Nejméně 500 ml výrobních buněčných kultur se ponechává neinfikovaných (kontrolní buňky). Pokud se virus kultivuje na kuřecích embryích, pone-

chávací se 2 % (nejméně dvacet vajec) jako neinfikovaná kontrolní vejce. Sklizně virových suspenzí probíhají v době vhodné pro použití kmen viru.

Pouze sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako virus příušnic sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a k určení ředění pro konečnou várku vakcíny se stanoví koncentrace viru v jednotlivé sklizni postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkouškám na cizí agens.

**Kontrolní buňky nebo vejce.** Jestliže byly pro výrobu použity lidské diploidní buňky, vyhovují kontrolní buňky zkoušce Totožnost; kontrolní buňky a kontrolní vejce vyhovují požadavkům zkoušky Cizí agens (2.6.16).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Jednotlivé sklizně, které vyhověly výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří se, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se příslušně naředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít k přípravě šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Nejnižší koncentrace viru pro propuštění přípravku se určí tak, že se pomocí stabilitních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu.

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům na nejnižší koncentraci viru pro propuštění, následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Bovinní sérumalbumin a případně Ovalbumin provedeny s vyhovujícími výsledky v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři lahvičky šarže lyofilizované vakcíny v suchém stavu se udržují 7 dnů při  $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Souběžně se stanoví koncentrace viru způsobem popsaným v odstavci Stanovení účinnosti ve vzorku zahříváné a nezahříváné vakcíny uchovávané při teplotě doporučené pro skladování. Koncentrace viru v zahříváné vakcíně je nejméně o 1,0 log nižší než koncentrace viru v nezahříváné vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu smíchá se specifickými příušnicovými protilátkami, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Ovalbumin.** Je-li vakcína připravena na kuřecích embryích, obsahuje nejvýše 1 µg ovalbuminu v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří lahviček vakcíny a inokuluje se vhodný počet jamek pro každé ředění. K validaci každého stanovení se jedná lahvička vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Pokud se používá referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvičce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů ze tří lahviček nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu; minimální koncentrace uvedená v označení na obalu je nejméně 3,7 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>.

Vakcínu proti průšnicím živou BRP je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- zda byla vakcína připravena na kuřecích embryích nebo typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM PERTUSSIS EX CELLULIS INTEGRIS ADSORBATUM

Vakcína proti dávivému kašli (celobuněčná)  
adsorbovaná

7.2:0161

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující sterilní suspenzi inaktivovaných celých buněk jednoho nebo více kmenů *Bordetella pertussis* ošetřených tak, aby se minimalizovala toxicita a zachovala účinnost. Vakcína obsahuje minerální adsorbent, jako je hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup se validuje, aby výtěžnost vakcín byla srovnatelná s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Hladiny pertusového toxinu, termolabilního toxinu (dermonekrotický toxin) nebo tracheálního cytotoxinu musí být srovnatelné s hladinami naměřenými ve vakcíně, u níž byl prokázán účinek a bezpečnost pro člověka a která byla schválena oprávněnou autoritou.

##### VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Vakcína je tvořena směsí jednoho nebo více kmenů *B. pertussis*. Kmeny *B. pertussis* použité k přípravě vakcíny jsou dobře charakterizovány a vybrány takovým způsobem, aby konečná vakcína obsahovala převážně buňky fáze I vykazující fimbrie-2 a fimbrie-3, které se určují aglutinační zkouškou nebo jinou vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

##### INOKULA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Použité kmeny *B. pertussis* se identifikují úplnými vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu kmenů, následném zacházení s nimi, charakteristikách izolace a zejména o všech zkouškách prováděných periodicky k ověření charakteristik kmenů.

Živné půdy pro pomnožení *B. pertussis* se pečlivě vybírají a umožňují udržet charakteristiky fáze I.

Pokud se použije zvířecí krev nebo přípravky ze zvířecí krve, odstraní se promýváním sklizených bakterií.

Lidská krev nebo přípravky z lidské krve se nepoužívají v žádné živné půdě k pomnožení bakterií ani pro inokula či pro vakcínu.

##### POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZENÍ

Každý kmen se pomnožuje odděleně z matečného inokula. Kultury se kontrolují v různých stádiích fermentace (subkultury a základní kultury) na čistotu, totožnost, buněčnou opacitu a hodnotu pH. Nevyhovující kultury se musí odstranit.

Produkce kultur má prokázat shodnost ve vztahu k rychlosti růstu, hodnotě pH a výtěžnosti buněk nebo buněčných produktů.

Bakterie se sklídí a mohou se promýt, aby se odstranily příměsi pocházející z živné půdy, a suspendují se v roztoku

chloridu sodného (9 g/l) nebo v jiném vhodném izotonickém roztoku.

### MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ BUNĚK

Shodnost výroby se sleduje ve vztahu k rychlosti růstu, hodnotě pH, výtěžnosti a prokázání charakteristických znaků buněk fáze I v kultuře, jako je přítomnost fimbrií-2 a fimbrií-3

a hemolytické aktivity. Jednotlivé sklizně se nepoužijí pro konečnou várku vakcíny, pokud se neprokáže, že obsahují buňky *B. pertussis* se stejnými vlastnostmi z hlediska růstu a aglutinogenů jako původní kmen a že nejsou kontaminovány bakteriemi a houbami.

Pouze monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k další výrobě.

**Čistota.** Vzorky jednotlivých sklizní odebrané před inaktivací se hodnotí mikroskopicky barvením podle Grama, očkováním na vhodné pomnožovací půdy nebo jiným vhodným způsobem.

**Opacita.** Opacita každé jednotlivé sklizně se stanoví nejpозději dva týdny po sklizni, před tím, než je bakteriální suspenze podrobena jakémukoliv postupu schopnému opacitu změnit, porovnáním s mezinárodním referenčním přípravkem opacity a takto získaná hodnota se použije jako základ pro výpočet v následujících krocích při přípravě vakcíny. Hodnotu mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Spektrofotometrická metoda se validuje na mezinárodní referenční přípravek opacity, může se použít absorbance (2.2.25) měřená např. při 600 nm.

### INAKTIVACE A DETOXIKACE SUSPENZE BUNĚK *BORDETELLA PERTUSSIS*

Inaktivace se zahájí co nejdříve po odebrání vzorků jednotlivé sklizně pro zkoušky Čistota a Opacita. Bakterie se usmrtí a detoxikují za kontrolovaných podmínek vhodnými chemickými agens, teplem nebo kombinací těchto metod. Suspenze se udržují po vhodnou dobu při (5 ± 3) °C, aby se snížila její toxicita.

Pouze inaktivovaná monovalentní sklizeň buněk, která vyhovuje stanoveným specifikacím pro následující zkoušky se může použít k přípravě konečné várky.

**Zbytkové živé mikroby *B. pertussis*.** Inaktivace celých buněk *B. pertussis* se ověří za použití vhodné živné půdy.

**Pertusový toxin.** Přítomnost pertusového toxinu se měří pomocí obsahu CHO v buněčných kulturách za použití semikvantitativní metody a v rozsahu určeném pro daný přípravek.

**Hodnota pH (2.2.3).** Je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Totožnost.** Ověří se aglutinací nebo vhodnou imunodifuzí.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Opacita.** Opacita každé jednotlivé sklizně se stanoví v konečné fázi, na konci hlavního fermentačního procesu, porovnáním s mezinárodním referenčním přípravkem opacity.

Hodnotu mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace. Absorbance (2.2.25), např. měřená při 600 nm; je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

### KONEČNÁ VÁRKA

Konečná várka vakcíny se připraví asepticky smícháním vhodných množství inaktivovaných jednotlivých sklizní. Pokud se použily dva nebo více kmenů *B. pertussis*, má být složení všech šarží vyrobených z konečné várky vakcíny stejné z hlediska zastoupení jednotlivých kmenů; měří se v jednotkách opacity. Koncentrace bakterií v konečné várce nepřesáhne koncentraci odpovídající opacitě 20 m. j. na jednu lidskou dávku. Opacita naměřená u jednotlivých sklizní se použije k výpočtu bakteriální koncentrace v konečné várce. K suspenzi buněk se přidá minerální adsorbent, jako je hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky. Fenol se jako protimikrobní látka nepoužije.

Pouze konečná várka, která odpovídá následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Fimbrie.** Každá várka se před přidáním minerálního adsorbentu zkouší na přítomnost fimbrií-2 a fimbrií-3, aby se zaručilo, že během bakteriálního růstu došlo k odpovídající expesi těchto antigenů.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství; kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se zhomogenizuje a asepticky se rozplní do vhodných obalů.

Pouze šarže, která odpovídá limitům stanoveným pro daný přípravek a vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Specifická neškodnost, Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti u konečné várky vakcíny provedeny s vyhovujícími výsledky, mohou se u šarže vypustit.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Udržuje se 16 h při 37 °C a odstředěním se získá sediment obsahující bakterie. Totožnost vakcíny se prokáže imunologickou reakcí, např. aglutinací bakterií v resuspendovaném sedimentu se specifickými antiséry proti *B. pertussis* nebo jinou vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Specifická neškodnost.** Použijí se dvě skupiny (pro zkoušenou vakcínu a pro kontrolu fyziologickým roztokem) po nejméně pěti zdravých myších o hmotnosti 14 g až 16 g. Myši jsou stejného pohlaví nebo jsou obě pohlaví ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně podá 0,5 ml, který obsahuje

množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se podá 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího, pokud možno, stejné množství protimikrobní látky, které bylo podáno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dnů po podání. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny vakcinovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti vakcinovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti kontrolních myší a c) během zkoušky uhne nejvýše 5 % vakcinovaných myší. Jestliže se zkouška provedla na pěti myších a jedna vakcinovaná myš uhynula, může se zkouška opakovat za použití patnácti myší a výsledky obou zkoušek se sloučí.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l, kde je to vhodné.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (celobuněčné) (2.7.7).

Stanovená účinnost je nejméně 4,0 m. j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 2,0 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce;
- způsob inaktivace;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM PERTUSSIS SINE CELLULIS COPURIFICATUM ADSORBATUM

7.5:1595

Vakcína proti dávivému kašli (bezbuněčná)  
přečištěná adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek složený z antigenních složek *Bordetella pertussis* adsorbovaných na minerální adsorbent, jako je hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Vakcína obsahuje purifikované antigenní frakce, které nejsou rozděleny na jednotlivé antigenní složky. Antigenní frakce se připravuje přeměnou pertusového toxinu na toxoid postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přemě-

ně na toxin. Antigenní frakce se skládá z pertusového toxinu, filamentózního hemaglutininu, pertaktinu (69 kDa bílkoviny zevní membrány) a jiných definovaných složek *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Přípravek může obsahovat zbytkový pertusový toxin, jehož nejvyšší množství schvaluje oprávněná autorita.

Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

**Referenční vakcína.** Jako referenční vakcína se použije šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se přednostně stabilizuje metodou, u níž se prokázalo, že významně neovlivňuje postup stanovení účinnosti, při němž se porovnává stabilizovaná a nestabilizovaná šarže.

##### CHARAKTERISTIKA SLOŽEK

Při vývoji vakcíny se má výrobní postup validovat, aby se prokázalo, že poskytuje shodnou antigenní frakci, která vyhovuje následujícím požadavkům; prokáže-li se shodnost výroby, není třeba běžně provádět zkoušení každé šarže.

**Adenylatcyklasa.** Nejvýše 500 ng v množství odpovídajícímu jedné dávce vakcíny; stanoví se imunoblotovou analýzou nebo jinou vhodnou metodou.

**Tracheální cytotoxin.** Nejvýše 2 pmol v množství odpovídajícímu jedné dávce vakcíny; stanoví se vhodnou metodou, jako je např. biologické stanovení nebo kapalinná chromatografie (2.2.29).

**Nepřítomnost zbytkového dermonekrotického toxinu.** Každé ze tří neodstavených myší se intradermálně podá objem 0,1 ml obsahující množství antigenních frakcí odpovídajících jedné lidské dávce vakcíny. Zvířata se pozorují 48 h, nezjistí se dermonekrotická reakce.

**Specifické vlastnosti.** Antigenní frakce vakcíny se zkouší jednou nebo více metodami uvedenými dále, aby se prokázala totožnost a specifické vlastnosti (účinnost na jednotku množství bílkoviny) v porovnání s referenčními přípravky.

**Pertusový toxin.** Zkouší se *in vitro* metodami shlukování ovariálních buněk čínského křečka (CHO) a hemaglutinací; *in vivo* metodami stimulace lymfocytózy, senzibilizace na histamin a metodou sekrece insulinu. Toxin má ADP-ribosyl-transferasovou aktivitu, použije-li se transducin jako akceptor.

**Filamentózní hemaglutinin.** Zkouší se hemaglutinace a inhibice specifickými protilátkami.

**Pertaktin, fimbriální-2 a fimbriální-3 antigeny.** Zkouší se reakce se specifickými protilátkami.

**Pertusový toxoid.** Toxoid vyvolá u zvířat tvorbu protilátek schopných inhibovat všechny vlastnosti pertusového toxinu.

**PURIFIKOVANÁ ANTIGENNÍ FRAKCE**

Výroba antigenní frakce je založena na systému jednotné inokulace. Kultury matečného inokula jsou udržovány tak, aby se cíleným výběrem uchovala nebo, kde je třeba, obnovila jejich toxinogenita.

Žádná živná půda použitá v jakémkoliv stupni výroby neobsahuje lidskou krev ani výrobky z lidské krve. Půdy použité pro přípravu matečného inokula a inokula mohou obsahovat zvířecí krev nebo přípravky ze zvířecí krve.

Antigenní frakce se purifikuje a po přiměřené charakterizaci se detoxikuje vhodnými látkami postupem, který zajistí minimální zpětnou přeměnu pertusového toxoidu na pertusový toxin zvláště při skladování nebo působení tepla. Postup purifikace se validuje, aby se prokázalo dostatečné odstranění od látek použitých při pomnožování nebo purifikaci.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví jako ukazatel purifikačního postupu a aby se limitovalo množství endotoxinů v konečném přípravku. Limity jsou zvoleny tak, aby konečná vakcína obsahovala nejvýše 100 m. j. v jedné lidské dávce.

Čistota antigenní frakce se před detoxifikací stanoví vhodnou metodou, jako je např. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) nebo kapalinová chromatografie. Charakteristiku podjednotek vakcíny je možno provést metodou SDS-PAGE nebo imunoblotovou analýzou se specifickými monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami. Požadavky se stanoví pro každý jednotlivý přípravek.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze purifikovaná antigenní frakce, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije množství purifikované antigenní frakce odpovídající nejméně 100 dávkám konečné vakcíny.

**Zbytkový pertusový toxin.** Použijí se tři skupiny myši po nejméně pěti myších citlivých na histamin, každá o hmotnosti 18 g až 26 g. V tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným obsahujícím želatinu (2 g/l) se připraví sériová ředění purifikované antigenní frakce, u nichž byla prokázána stupňující se odpověď, a každé ředění se přiřadí jedné skupině myši. Každé myši se podá intraperitoneálně ředění určené pro danou skupinu. Čtvrté skupině, tj. kontrolním myším se podá ředící roztok. Za pět dnů se každé myši intraperitoneálně podá 1 mg histaminové báze v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml. Zaznamená se počet zvířat, která uhynou během 24 h od čelenže histaminem. Vhodnou statistickou metodou, jako je např. probitová metoda (viz 5.3), se vyhodnotí hmotnost nebo objem přípravku, který senzibilizoval 50 % celkového počtu zkoušených myši. Zbytková účinnost pertusového toxinu nepřekročí hodnotu naměřenou u šarží, u nichž byla v klinických zkouškách prokázána bezpečnost.

Používaný kmen myši se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenžuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myši je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná

z kontrolních myši, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenžovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

Místo zkoušky na myších lze použít validovanou zkoušku shlukování ovariálních buněk čínskému křečka (CHO).

**Zbytková detoxikační činidla a jiné látky.** Stanoví se obsah zbytkových detoxikačních činidel a jiných látek a prokáže se, že jsou nižší než schválené limity, pokud se validací postupu nepotvrdilo dostatečné odstranění.

**Obsah antigenu.** Stanoví se úplně kvantitativní složení antigenů v antigenní frakci vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) a bílkovinný dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) nebo jiným vhodným postupem. Poměr celkového obsahu antigenu k bílkovinnému dusíku je v rozmezí předepsaném pro přípravek.

**KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY**

Vakcína se připravuje adsorpcí vhodného množství antigenních frakcí na hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Může se přidat vhodná protimikrobní látka.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**ŠARŽE**

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Zbytkový pertusový toxin, Vratnost toxoidu, Protimikrobní látka, Volný formaldehyd a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Vakcína se podrobí vhodné desorpci, např. tímto postupem: ve zkoušené vakcíně se rozpustí *citronan sodný R* na koncentraci 10 g/l, udržuje se asi 16 h při 37 °C, potom se odštěďuje do získání čiré supernatantní tekutiny. Zkouší se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), čirá supernatantní tekutina reaguje se specifickými antiséry proti složkám vakcíny.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Zbytkový pertusový toxin.** Použijí se tři skupiny myši po nejméně pěti myších citlivých na histamin (viz odstavec Výroba), každá o hmotnosti 18 g až 26 g. V tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným obsahujícím želatinu (2 g/l) se připraví sériová ředění zkoušené vakcíny, u nichž byla prokázána stupňující se odpověď a každé ředění se přiřadí jedné skupině myši. Každé myši se podá intraperitoneálně ředění určené pro danou skupinu. Čtvrté skupině, tj. kontrolním myším se intraperitoneálně podá ředící roztok. Za pět dnů se každé myši intraperitoneálně podá 1 mg histaminové báze v objemu nepřevyšujícím

0,5 ml. Zaznamenaná se počet zvířat, která uhynou během 24 h od čelenže histaminem. Vhodnou statistickou metodou, jako je např. probitová metoda (viz 5.3), se vyhodnotí hmotnost nebo objem přípravku, který senzibilizoval 50 % celkového počtu zkoušených myší. Zbytková účinnost pertusového toxinu nepřekročí hodnotu naměřenou u šarží, u nichž byla v klinických zkouškách prokázána bezpečnost.

**Vratnost toxoidu.** Provede se zkouška na zbytkový pertusový toxin výše popsaným způsobem a použije se vakcína uchovávaná při 2 °C až 8 °C a vakcína inkubovaná čtyři týdny při teplotě 37 °C. Stupeň přeměny toxoidu na pertusový toxin nepřekročí hodnotu naměřenou u šarží, u nichž byla v klinických zkouškách prokázána bezpečnost.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Pertusová složka.** Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- názvy a množství antigenních složek obsažených ve vakcíně;
- maximální množství zbytkového pertusového toxinu obsažené ve vakcíně;
- maximální stupeň zpětné přeměny toxoidu na toxin během doby použitelnosti;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmrznout.

### VACCINUM PERTUSSIS SINE CELLULIS EX ELEMENTIS PRAEPARATUM ADSORBATUM

7.5:1356

Vakcína proti dávivému kašli (bezbuněčná)  
adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek složený z jednotlivě vyrobených a purifikovaných antigenních složek *Bordetella pertussis* adsorbovaných na minerální nosič, jako je např. hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

Vakcína obsahuje buď pertusový toxoid, nebo pertusovému toxinu podobnou bílkovinu prostou toxických vlastností, produkovanou geneticky modifikovanou formou příslušného genu. Pertusový toxoid se připravuje z pertusového toxinu postupem, který jej učiní neškodným při zachování odpovídající imunogenity a zabrání zpětné přeměně na toxin.

Vakcína může také obsahovat filamentózní hemaglutinin, pertaktin (69 kDa bílkovina zevní membrány) a jiné definované složky *B. pertussis*, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny. Poslední dva antigeny se mohou purifikovat společně. Antigenní složení a charakteristiky jsou založeny na prokázání ochrany a nepřítomnosti nežádoucích reakcí u cílové skupiny, pro kterou je vakcína určena.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny srovnatelné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost pro člověka byly klinicky ověřeny.

Jestliže se k výrobě použije geneticky modifikovaná forma *B. pertussis*, potvrdí se shodnost výroby a genetická stabilita v souladu s požadavky článku *Producta ab ADN recombinante (0784)*.

**Referenční vakcína.** Použije se šarže vakcíny s klinicky ověřenou účinností nebo reprezentativní šarže. Při výrobě reprezentativní šarže je nutné, aby byl přísně dodržen výrobní postup, který se použil při výrobě klinicky zkoušené šarže. Referenční vakcína se přednostně stabilizuje metodou, u níž se prokázalo, že významně neovlivňuje postup stanovení účinnosti, při němž se porovnává stabilizovaná a nestabilizovaná šarže.

##### CHARAKTERISTIKA SLOŽEK

Při vývoji vakcíny se výrobní proces validuje, aby se prokázalo, že poskytuje shodné jednotlivé složky, které vyhovují následujícím požadavkům; prokáže-li se shodnost výroby, není třeba běžně provádět zkoušení každé výrobní šarže.

**Adenylatcyklasa.** Nejvýše 500 ng v množství odpovídajícímu jedné dávce vakcíny; stanoví se imunoblotovou analýzou nebo jinou vhodnou metodou.

**Tracheální cytotoxin.** Nejvýše 2 pmol v množství odpovídajícímu jedné dávce vakcíny; stanoví se vhodnou metodou, jako je např. biologické stanovení nebo kapalinná chromatografie (2.2.29).

**Nepřítomnost zbytkového dermonekrotického toxinu.** Každé ze tří neodstavených myší se intradermálně podá objem 0,1 ml obsahující množství antigenních frakcí odpovídajících jedné lidské dávce vakcíny. Zvířata se pozorují 48 h; neprojeví se dermonekrotická reakce.

**Specifické vlastnosti.** Složky vakcíny se zkoušejí jednou nebo více dále uvedenými metodami, aby se prokázala jejich totožnost a specifické vlastnosti (účinnost na jednotku množství bílkoviny) v porovnání s referenčními přípravky.

**Pertusový toxin.** Zkouší se *in vitro* metodami shlukování ovariálních buněk čínské křečka (CHO) a hemaglutinace; *in vivo* metodami stimulace lymfocytózy, senzibilizace na



histamin a sekrece insulínu. Toxin má ADP-ribosyl-transferasovou aktivitu při použití transducinu jako akceptoru.

*Filamentózní hemaglutinin.* Zkouší se hemaglutinace a inhibice specifickými protilátkami.

*Pertaktin, fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny.*

Zkouší se reakce se specifickými protilátkami.

*Pertusový toxoid.* Toxoid vyvolává u zvířat tvorbu protilátek schopných inhibovat všechny vlastnosti pertusového toxinu.

#### PURIFIKOVANÉ SLOŽKY

Příprava každé složky je založena na systému jednotné inokulace. Kultury matečného inokula, ze kterých se toxin připravuje, se udržují tak, aby se cíleným výběrem uchovala nebo, kde je třeba, obnovila jejich toxinogenita.

Žádná živná půda použitá při jakémkoliv stupni výroby neobsahuje lidskou krev ani výrobky z lidské krve. Živné půdy použité pro přípravu matečného inokula a inokula mohou obsahovat zvířecí krev nebo výrobky z krve zvířecího původu.

Pertusový toxin a, kde je to vhodné, filamentózní hemaglutinin a pertaktin se purifikují a po vhodné charakterizaci detoxikují za použití vhodných chemických látek metodou, která vylučuje zpětnou přeměnu toxoidu na toxin, a to zejména během skladování nebo působením tepla. Ostatní složky, jako jsou fimbriální-2 antigeny a fimbriální-3 antigeny, se purifikují buď samostatně, nebo společně a zkoušením se prokáže, že neobsahují toxické látky. Postup purifikace se validuje, aby se prokázalo dostatečné odstranění od látek použitých při pomnožování nebo purifikaci.

Obsah bakteriálních endotoxinů (2.6.14) se stanoví jako ukazatel purifikačního postupu a aby se limitovalo množství endotoxinů ve vakcíně. Limity určené pro jednotlivé složky jsou takové, aby vakcína obsahovala méně než 100 m. j. v jedné lidské dávce.

Před detoxikací se stanoví čistota složek vhodnou metodou, jako je např. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) nebo kapalinová chromatografie. Charakteristiku podjednotek vakcíny je možno provést metodou SDS-PAGE nebo imunoblotovou analýzou se specifickými monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami. Požadavky se stanoví pro každý jednotlivý přípravek.

K přípravě konečné várky vakcíny se mohou použít pouze purifikované složky, které vyhovují následujícím požadavkům.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije množství purifikované složky odpovídající nejméně 100 dávkám.

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu.** Zkoušku není nutné provádět u přípravků získaných genetickou modifikací. Každé z nejméně pěti myši citlivých na histamin o hmotnosti 18 g až 26 g se intravenózně podá množství odpovídající jedné lidské dávce nebo intraperitoneálně množství, odpovídající dvěma lidským dávkám, naředěné tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným obsahujícím želatínu (2 g/l) na nejvýše 0,5 ml. Druhé skupině kontrolních myši se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš čelenžuje intraperitoneálně 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml

a zvířata se pozorují 24 h. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže neuhyne žádná myš.

Používaný kmen myši se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenžuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myši je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myši, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenžovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

*Pertusový toxin BRP* je vhodné použít jako referenční pertusový toxin.

Místo zkoušky na myších lze použít validovanou zkoušku shlukování ovariálních buněk čínské křečka (CHO).

**Zbytková detoxikační činidla a jiné látky.** Stanoví se obsah zbytkových detoxikačních činidel a jiných látek a prokáže se, že jsou nižší než schválené limity, pokud se validací postupu nepotvrdilo dostatečné odstranění.

**Obsah antigenu.** Obsah antigenu se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) a bílkovinný dusík mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) nebo jiným vhodným postupem. Poměr obsahu antigenu k množství bílkovinného dusíku je v rozmezí předepsaném pro přípravek.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Vakcína se připravuje adsorpcí vhodných množství purifikovaných složek jednotlivě, nebo společně na hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý. Může se přidat vhodná protimikrobní látka.

Pro přípravu šarže se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Pokud byly zkoušky Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu, Protimikrobní látka, Volný formaldehyd a Stanovení účinnosti provedeny u konečné várky vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vakcína se podrobí vhodné desorpci, např. tímto postupem: ve zkoušené vakcíně se rozpustí *citronan sodný R* na koncentraci 10 g/l, udržuje se asi 16 h při 37 °C, potom se odštěďuje do získání čiré supernatantní tekutiny. Zkouší se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), čirá supernatantní tekutina reaguje se specifickými antiséry proti složkám vakcíny uvedeným v označení na obalu.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nepřítomnost zbytkového pertusového toxinu a nevrátlost pertusového toxoidu.** Zkoušku není nutné provádět u přípravků vyrobených genetickou modifikací. Použijí se tři skupiny myši citlivých na histamin, každá skupina minimálně o pěti zvířatech. První skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny uchovávané při 2 °C až 8 °C. Druhé skupině se intraperitoneálně podá dvojnásobná lidská dávka vakcíny inkubované čtyři týdny při 37 °C. Třetí skupině se intraperitoneálně podá ředící roztok. Po pěti dnech se každá myš čelenžuje intraperitoneálně 2 mg báze histaminu v objemu nepřevyšujícím 0,5 ml a myši se pozorují 24 h. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině uhyne po podání histaminu jedna nebo více myši. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v první ani ve druhé skupině neuhyne po čelenži histaminem žádná myš. Jestliže v první nebo druhé skupině nebo obou skupinách uhyne jedna myš, zkouška se může opakovat se stejným nebo vyšším počtem myši a výsledky platných zkoušek se sloučí; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v obou skupinách, kterým byla podána vakcína, neuhyne po čelenži histaminem více než 5 % z celkového počtu myši.

Používaný kmen myši se zkouší ve vhodných intervalech na vnímavost k histaminu tímto postupem: intravenózně se podají trojnásobná ředění referenčního pertusového toxinu v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným s obsahem želatiny (2 g/l) a čelenžuje se histaminem výše uvedenou metodou. Kmen je vhodný, jestliže více než 50 % myši je senzibilizováno 50 ng pertusového toxinu a žádná z kontrolních myši, kterým byl podán pouze ředící roztok a byly čelenžovány histaminem, nevykazuje známky přecitlivělosti.

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnížší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

## STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti bezbuněčné vakcíny proti dávivému kašli (2.7.16). Schopnost vakcíny indukovat tvorbu specifických protilátek proti každému zařazenému bezbuněčnému pertusovému antigenu není signifikantně nižší ( $P = 0,95$ ) než u referenční vakcíny.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- názvy a množství jednotlivých složek obsažených ve vakcíně;
- kde je to vhodné, že vakcína obsahuje pertusovému toxinu podobnou bílkovinu vyrobenou genetickou modifikací;
- název a množství adsorbentu;

- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

VACCINUM PNEUMOCOCCALE  
POLYSACCHARIDICUM

6.0:0966

## Vakcína proti pneumokokům polysacharidová

## DEFINICE

Je to přípravek obsahující směs stejných částí purifikovaných kapsulárních polysacharidových antigenů připravených ze vhodných patogenních kmenů *Streptococcus pneumoniae*, jejichž pouzdra jsou prokazatelně tvořena polysacharidy, které jsou schopné u člověka navodit tvorbu uspokojivých hladin specifických protilátek. Přípravek obsahuje dvacet tři imunochemicky odlišných kapsulárních polysacharidových antigenů, které jsou uvedeny v tabulce 1.

Vakcína je čirá bezbarvá tekutina.

## VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace pro každý typ. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné pneumokokové polysacharidové vakcíny s přiměřenou bezpečností a imunogenitou pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že přípravek bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9), která je pro morčata upravená takto: každému morčeti se podá deset lidských dávek a pozoruje se 12 dní.

## MONOVALENTNÍ VÁRKA POLYSACHARIDŮ

Bakterie se kultivují ve vhodné tekuté živné půdě, která neobsahuje látky krevních skupin nebo vysokomolekulární polysacharidy. Ověří se bakteriální čistota kultury a kultura se inaktivuje fenolem. Nečistoty se odstraní postupem, jako je např. frakcionační srážení, enzymatické štěpení a ultrafiltrace. Polysacharid se získá frakcionačním srážením, promyje se a suší se ve vakuu na takový obsah zbytkové vlhkosti, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu polysacharidu. Obsah zbytkové vlhkosti se stanoví sušením za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným nebo termogravimetrickou analýzou a získaná hodnota se použije k přepočítání výsledků na vysušenou látku v dále uvedených zkouškách. Monovalentní várka polysacharidu se skladuje při vhodné teplotě za podmínek, které brání zvýšení vlhkosti.

Pouze várka monovalentního polysacharidu, která vyhovuje dále uvedeným požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny. Obsahy jednotlivých složek uvedené v procentech a určené metodami dále předepsanými jsou uvedeny v tabulce 1.

**Bílkovina (2.5.16).**

**Nukleové kyseliny (2.5.17).**

**Celkový dusík (2.5.9).**

**Fosfor (2.5.18).**

**Velikost molekul.** Stanoví se vylučovací chromatografií (2.2.30). Použije se agarosa síťovaná pro chromatografii R nebo agarosa síťovaná pro chromatografii R1.

**Kyseliny uronové** (2.5.22).

**Hexosaminy** (2.5.20).

**Methylpentosy** (2.5.21).

**O-acetylové skupiny** (2.5.19).

**Totožnost** (2.7.1). Totožnost monovalentní várky polysacharidu se potvrdí dvojitou imunodifuzí nebo elektroimunodifuzí (kromě polysacharidů 7F, 14 a 33F) s použitím specifických antisér.

**Specifická.** Jsou-li antigeny zkoušeny specifickými antiséry proti všem ostatním polysacharidům vakcíny, včetně faktorových sér pro rozlišení jednotlivých typů mezi skupinami, nedojde k reakci. Polysacharidy se zkoušejí v koncentraci 50 µg/ml metodou schopnou detekovat 0,5 µg/ml.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se získá aseptickým smícháním různých polysacharidových prášků. Jednotná směs se asep-

ticky rozpustí ve vhodném izotonickém roztoku tak, aby jedna lidská dávka 0,50 ml obsahovala 25 µg každého polysacharidu. Může se přidat protimikrobní látka. Roztok se sterilizuje filtračními filtry zachycujícími bakterie.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Fenol a Protimikrobní látka provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícím výsledkem, mohou se u šarže vypustit. Jestliže byla na vhodném počtu po sobě následující-

**Tab. 1** Obsah složek monovalentní várky polysacharidů v procentech

Typ molekuly*	Bílko- vina	Nukle- ové kyseliny	Celkový dusík	Fosfor	Velikost molekuly (K <sub>0</sub> )		Kyseliny uronové	Hexos- aminy	Methyl- pentosy	O-acety- lové skupiny
					**	***				
1	≤ 2	≤ 2	3,5–6	0–1,5	≤ 0,15		≥ 45			≥ 1,8
2	≤ 2	≤ 2	0–1	0–1,0	≤ 0,15		≥ 15		≥ 38	
3	≤ 5	≤ 2	0–1	0–1,0	≤ 0,15		≥ 40			
4	≤ 3	≤ 2	4–6	0–1,5	≤ 0,15			≥ 40		
5	≤ 7,5	≤ 2	2,5–6,0	≤ 2		≤ 0,60	≥ 12	≥ 20		
6B	≤ 2	≤ 2	0–2	2,5–5,0		≤ 0,50			≥ 15	
7F	≤ 5	≤ 2	1,5–4,0	0–1,0	≤ 0,20				≥ 13	
8	≤ 2	≤ 2	0–1	0–1,0	≤ 0,15		≥ 25			
9N	≤ 2	≤ 1	2,2–4	0–1,0	≤ 0,20		≥ 20	≥ 28		
9V	≤ 2	≤ 2	0,5–3	0–1,0		≤ 0,45	≥ 15	≥ 13		
10A	≤ 7	≤ 2	0,5–3,5	1,5–3,5		≤ 0,65		≥ 12		
11A	≤ 3	≤ 2	0–2,5	2,0–5,0		≤ 0,40				≥ 9
12F	≤ 3	≤ 2	3–5	0–1,0	≤ 0,25			≥ 25		
14	≤ 5	≤ 2	1,5–4	0–1,0	≤ 0,30			≥ 20		
15B	≤ 3	≤ 2	1–3	2,0–4,5		≤ 0,55		≥ 15		
17A nebo 17F	≤ 2	≤ 2	0–1,5	0–3,5		≤ 0,45			≥ 20	
18C	≤ 3	≤ 2	0–1	2,4–4,9	≤ 0,15				≥ 14	
19A	≤ 2	≤ 2	0,6–3,5	3,0–7,0	≤ 0,45			≥ 12	≥ 20	
19F	≤ 3	≤ 2	1,4–3,5	3,0–5,5	≤ 0,20			≥ 12,5	≥ 20	
20	≤ 2	≤ 2	0,5–2,5	1,5–4,0		≤ 0,60		≥ 12		
22F	≤ 2	≤ 2	0–2	0–1,0		≤ 0,55	≥ 15		≥ 25	
23F	≤ 2	≤ 2	0–1	3,0–4,5	≤ 0,15				≥ 37	
33F	≤ 2,5	≤ 2	0–2	0–1,0		≤ 0,50				

\* jednotlivé typy polysacharidů jsou označeny podle dánské nomenklatury

\*\* agarosa síťovaná pro chromatografii R

\*\*\* agarosa síťovaná pro chromatografii R1

cích šarží prokázána shodnost výroby, může se stanovení obsahu nahradit kvalitativní zkouškou, která prokáže totožnost každého polysacharidu za předpokladu, že stanovení obsahu bylo provedeno v každé monovalentní várece polysacharidu použitého k přípravě šarže vakcíny.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH (2.2.3).** 4,5 až 7,4; měří se zkoušený přípravek.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Je-li to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Fenol (2.5.15).** Nejvýše 2,5 g/l.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Pyrogenní látka (2.6.8).** Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látku. Na 1 kg hmotnosti králíka se podá 1 ml ředění vakcíny obsahující 2,5 µg/ml každého polysacharidu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Obsah jednotlivých polysacharidů se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), při níž se použijí specifická antiséra proti všem polysacharidům obsaženým ve vakcíně, včetně faktorových sér pro typizaci uvnitř jednotlivých skupin, a jednotlivé purifikované polysacharidy jako standardy. Vakcína obsahuje 70 % až 130 % množství uvedeného pro každý polysacharid v označení na obalu. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanoveného obsahu je v rozmezí 80 % až 120 %.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- množství každého jednotlivého polysacharidu v jedné lidské dávce v mikrogramech;
- celkové množství polysacharidů v obalu.

## VACCINUM PNEUMOCOCCALE POLYSACCHARIDICUM CONIUGATUM ADSORBATUM

6.0:2150

Vakcína proti pneumokokům polysacharidová  
konjugovaná adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to tekutý sterilní přípravek purifikovaných kapsulárních polysacharidových antigenů připravených ze sérotypů kmenů *Streptococcus pneumoniae* jednotlivě navázaných na bílkovinný nosič. Vakcína může obsahovat adjuvans nebo adsorbent.

Každý sérotyp vhodných patogenních kmenů *S. pneumoniae* se pomnoží ve vhodné živné půdě.

Jednotlivé polysacharidy se purifikují vhodnými metodami (např. odstředováním, srážením, ultrafiltrací a sloupcovou chromatografií).

U každého polysacharidu se definuje složení a rozmezí velikosti molekul.

Výběr polysacharidů závisí na četnosti výskytu sérotypů zodpovědných za akutní patologické stavy a jejich geografickém rozšíření. Obsahuje imunochemicky odlišné kapsulární polysacharidy.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné konjugované vakcíny proti *S. pneumoniae* s dostatečnou imunitou a bezpečností pro člověka. Výroba polysacharidů a bílkovinného nosiče je založena na systému jednotné inokulace.

V průběhu vývojových studií a kdykoliv je nutná revalidace, se provede zkouška na pyrogenní látku (2.6.8) na králících, při které se podává vhodná dávka šarže. Má se prokázat, že vakcína je přijatelná vzhledem k pyrogenní aktivitě.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že vakcína, bude-li zkoušena, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoseru a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

V průběhu vývojových studií a kdykoliv je nutná revalidace výrobního postupu, se zkouškami na zvířatech prokáže, že vakcína shodně navozuje na T-buňkách závislou imunitní odpověď B-buněk.

Stabilita šarže a pneumokokových polysacharidů se hodnotí vhodnými zkouškami. Tyto zkoušky mohou zahrnovat stanovení velikosti molekul, stanovení obsahu sacharidů a volných polysacharidů v konjugátu.

##### BAKTERIÁLNÍ INOKULA

Bakteriální kmeny použité pro matečná inokula se mají identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jejich původu a zkouškách použitých k charakterizaci kmene.

Kultury z pracovního inokula mají mít stejné charakteristiky jako kmen použitý k přípravě matečného inokula.

Čistota bakteriálních kultur se ověří metodami vhodné citlivosti. Tyto metody mohou zahrnovat inokulaci na vhodné živné půdy, vyšetření morfologie kolonií, mikroskopické vyšetření nátěrů barvených podle Grama a aglutinaci kultury vhodným specifickým antisérem.

##### POLYSACHARIDY PNEUMOKOKŮ

Každý kmen sérotypů *S. pneumoniae* se jednotlivě pomnoží v tekuté živné půdě, která neobsahuje vysokomolekulární polysacharidy; jestliže některá složka půdy obsahuje složky krevních skupin, postup se validuje, aby se prokázalo, že po purifikačních krocích nejsou tyto látky dále detekovatelné. Čistota bakteriální kultury se ověří vhodnými metodami. Kultura se potom inaktivuje. Polysacharid se oddělí od tekuté kultury a purifikuje se vhodnými metodami. V purifikovaném polysacharidu se vhodnou metodou, jako je např. termogravimetrie (2.2.34), stanoví těkavé látky včetně vody. Zjištěná hodnota se použije k přepočítání výsledků jiných chemických zkoušek na vysušenou látku, jak je dále předepsáno.

Pouze polysacharidy, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít pro přípravu konjugátu.

**Totožnost.** Každý polysacharid se prokáže imunochemickou metodou (2.7.1) nebo jinými vhodnými metodami, např. <sup>1</sup>H nukleární magnetickou rezonanční spektrometrií (2.2.33) (zkouška na funkční skupiny).

**Bílkovina (2.5.16).** V závislosti na použitém sérotypu obsahuje nejvýše limit schválený pro daný přípravek, přepočteno na vysušenou látku.

**Nukleová kyselina (2.5.17).** V závislosti na použitém sérotypu obsahuje nejvýše limit schválený pro daný přípravek, přepočteno na vysušenou látku.

**Velikost molekul.** Stanoví se kapalinovou chromatografií (2.2.29) s detektorem na bázi víceúhlového rozptylu laserového světla nebo jinou vhodnou metodou. Hodnoty se pohybují v rozmezí schváleném pro každý sérotyp.

Validované stanovení stupně polymerace nebo poměrného zastoupení molekulové hmotnosti a rozptylu molekulových hmotností se mohou použít místo stanovení distribuce velikosti molekul.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo množství odpovídající sto dávkám, podle toho, co je méně.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 0,5 m. j. v mikrogramu polysacharidu.

**Zbytkové látky.** Kde je to vhodné, provádějí se zkoušky na stanovení zbytkových látek použitých při inaktivaci a purifikaci. Stanoví se hodnota přijatelnosti pro každou látku pro daný přípravek a každá šarže polysacharidu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu. Jestliže validační studie prokázaly odstranění zbytkových látek, může se zkouška u polysacharidů vypustit.

#### AKTIVOVANÉ POLYSACHARIDY PNEUMOKOKŮ

Polysacharid se před konjugací chemicky aktivuje; před nebo během tohoto procesu dojde obvykle k částečné depolymeraci.

Pouze aktivované polysacharidy, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít pro přípravu konjugátu.

**Stupeň oxidace.** Je dán poměrem molů opakující se sacharidové jednotky k molu aldehydu a stanoví se vhodnou metodou. Hodnoty jsou v rozmezí schváleném pro každý sérotyp.

**Velikost molekul.** Stanoví se kapalinovou chromatografií (2.2.29) s detektorem na bázi víceúhlového rozptylu laserového světla nebo jinou vhodnou metodou. Hodnoty jsou v rozmezí schváleném pro každý sérotyp.

#### BÍLKOVINNÝ NOSIČ

Bílkovinný nosič je produkován kulturou vhodných mikroorganismů ověřenou na bakteriální čistotu. Kultura se inaktivuje; bílkovinný nosič se vhodnou metodou purifikuje.

K výrobě konjugátu se může použít pouze bílkovinný nosič, který vyhovuje následujícím požadavkům.

**Totožnost.** Prokáže se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo množství odpovídající sto dávkám podle toho, co je méně.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14)** Méně než 1 m. j. v mikrogramu bílkoviny.

**Bílkovinný nosič.** Nejméně 90 % celkové bílkoviny, stanoví se vhodnou metodou. Vhodnými zkouškami se provede validace, aby se prokázalo, že přípravek není toxický.

#### MONOVALENTNÍ VÁRKA KONJUGÁTU

Konjugát se získá kovalentním spojením aktivovaných polysacharidů a bílkovinného nosiče.

Postupy purifikace konjugátu jsou navrženy tak, aby se odstranily zbytky látek použitých při konjugaci. Odstranění zbytkových látek se potvrdí vhodnými zkouškami nebo validací purifikačního postupu.

Pouze várka konjugátu, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny. Pro každou zkoušku se určí limity pro přijetí a každá šarže konjugátu musí prokazatelně těmto limitům vyhovovat.

**Sacharidy.** Obsah polysacharidu se stanoví vhodnou fyzikální, chemickou nebo imunochemickou metodou (2.7.1). Naměřená hodnota odpovídá požadavku schválenému pro každý sérotyp.

**Bílkovina.** Obsah bílkoviny se stanoví vhodnou fyzikální nebo chemickou metodou (např. 2.5.16). Naměřená hodnota odpovídá požadavku schválenému pro každý sérotyp.

**Poměr sacharidu k bílkovině.** Poměr se stanoví výpočtem; hodnota odpovídá požadavku schválenému pro každý sérotyp.

**Volné sacharidy.** Nenavázaný polysacharid se stanoví po odstranění z konjugátu, např. iontoměničovou kapalinovou chromatografií, vylučovací nebo hydrofobní chromatografií, ultrafiltrací nebo jinými validovanými metodami. Pro každý sérotyp se určí hodnota odpovídající imunogenitě klinicky ověřené šarže a každá jednotlivá šarže musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu.

**Volný bílkovinný nosič.** Obsah se stanoví vhodnou metodou buď přímo, nebo se odvodí výpočtem z výsledků ostatních zkoušek; hodnota vyhovuje požadavku schválenému pro každý sérotyp.

**Velikost molekul.** Stanoví se kapalinovou chromatografií (2.2.29) s detektorem na bázi víceúhlového rozptylu laserového světla nebo jinými vhodnými metodami. Hodnoty se pohybují v limitech schválených pro každý sérotyp.

**Zbytkové látky.** Kde je to vhodné, provádějí se zkoušky na stanovení zbytkových látek použitých při inaktivaci a purifikaci. Stanoví se hodnota přijatelnosti pro každou látku pro daný přípravek a každá šarže konjugátu musí prokazatelně vyhovovat tomuto limitu. Jestliže validační studie prokázaly odstranění zbytkových látek, může se zkouška u konjugátu polysacharidů vypustit.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml nebo množství odpovídající sto dávkám, podle toho, co je méně.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14.)** Méně než 0,75 m. j. v mikrogramu polysacharidu.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Získá se spojením monovalentních várek konjugátu. Před ředěním na konečnou koncentraci se může přidat adjuvans. Pro přípravu šarže se může použít pouze konečná várka, která vyhovuje následujícím požadavkům a limitům schváleným pro daný přípravek.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek a každému z požadavků dále uvedených ve Zkouškách totožnosti, Zkouškách na čistotu a Stanovení obsahu, se může uvolnit pro použití.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Každý polysacharid přítomný ve vakcíně se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník** (2.5.13). Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce.

**Sterilita** (2.6.1). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 12,5 m. j. v jedné lidské dávce, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Sacharidy.** Obsah polysacharidů pro každý sérotyp se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (např. nefelometrií). Stanovené množství každého polysacharidu ve vakcíně je 70 % až 130 % množství uvedeného v označení na obalu. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanoveného obsahu je v rozmezí 80 % až 120 %.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- počet mikrogramů každého polysacharidu v jedné lidské dávce;
- počet mikrogramů bílkovinného nosiče v jedné lidské dávce.

## VACCINUM POLIOMYELITIDIS INACTIVATUM

6.7:0214

### Vakcína proti poliomyelitidě inaktivovaná

#### DEFINICE

Je to tekutý přípravek obsahující vhodné kmeny lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3, kultivovaných ve vhodných buněčných kulturách a inaktivované validovanou metodou. Je to čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny přijatelné bezpečnosti a imunogenity pro člověka.

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. U buněčných linií se používá systém buněčné banky. Použijí-li se při výrobě primární, sekundární nebo terciární opičí buňky, vyhovuje výroba dále uvedeným požadavkům.

Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus ve vakcíně neprojde od matečného inokula více pasážemi, než kolik se jich použilo k přípravě vakcíny, jejíž bezpečnost a účinek byly prokázány v klinických studiích.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3), v kontinuálních buněčných liniích (5.2.3) nebo v primárních, sekundárních nebo terciárních buňkách opičích ledvin.

**Primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin.** Na primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin se vztahují následující zvláštní požadavky na substrát pro pomnožení viru.

*Opice používané pro přípravu kultur buněk ledvin pro výrobu a kontrolu vakcíny.* Použitá zvířata jsou druhu schváleného oprávněnou autoritou, v dobrém zdravotním stavu a, není-li zdůvodněno a schváleno jinak, nebyla předtím použita k pokusným účelům. Buňky ledvin použité pro výrobu a kontrolu vakcíny se získají ze sledovaných uzavřených chovů opic narozených v zajetí, ne z opic odchycených v přírodě. Dříve schválené inokulum připravené z viru, který byl pasážován v buňkách pocházejících z divokých opic, se může po schválení oprávněnou autoritou použít k výrobě vakcíny, jestliže k tomu opravňují vývojové záznamy o bezpečnosti.

*Sledované uzavřené chovy opic.* Opice jsou ustájeny po skupinách v klecích. Nepřítomnosti cizích agens se dosáhne použitím zvířat chovaných v uzavřených chovech, které jsou podrobeny stálému a systematickému veterinárnímu a laboratornímu vyšetřování na přítomnost infekčních agens. Dodavatele zvířat schvaluje oprávněná autorita. Každá opice se po dobu nejméně šestitýdenní karantény před zařazením do chovů a potom během jejího pobytu v chovech v pravidelných intervalech sérologicky vyšetřuje.

Použité opice jsou prokazatelně tuberkulin-negativní a nemají protilátky proti opičímu viru 40 (SV40) a viru opičí imunodeficiencie. Vzorky krve použité ve zkoušce na protilátky proti viru SV40 se musí odebrat co nejtěsněji před odběrem ledvin. Jestliže se k výrobě použijí opice rodu *Macaca*, nemají prokazatelně protilátky proti herpesviru B (cerkopitecidní herpesvirus 1). Aby se předešlo nebezpečí vyplývajícím ze zacházení s herpesvirem B (cerkopitecidní herpesvirus 1), použije se jako indikátor nepřítomnosti protilátek proti herpesviru B lidský herpesvirus 1.

Opice, ze kterých se ledviny odebírají, se pečlivě vyšetřují, zvláště na nepřítomnost tuberkulózy a infekce herpesvirem B (cerkopitecidní herpesvirus 1). Vykazuje-li některá opice patologické léze závažné z hlediska použití ledvin k přípravě inokula nebo vakcíny, nemohou se použít. Ani ostatní opice ze skupiny se nemohou použít, pokud není zřejmé, že jejich použití nesníží bezpečnost přípravku.

Všechny postupy popsané v této části se provádějí mimo prostor, v němž se vyrábí vakcína.

*Kultury opičích buněk pro výrobu vakcíny.* Pro přípravu buněčných kultur se použijí ledviny bez patologických změn. Každá skupina buněčných kultur připravených z jedné opice tvoří samostatnou výrobní buněčnou kulturu, která poskytuje samostatnou jednotlivou sklizeň.

Primární buňky opičích ledvin vyhovují zkoušce na mykobakterie (2.6.2); buňky se před provedením zkoušky rozruší. Použijí-li se sekundární nebo terciární buňky, prokáže se vhodnými validovanými zkouškami, že buněčné kultury na úrovni pasáže použité k výrobě nejsou tumorogenní.

#### INOKULA

Každý ze tří použitých kmenů poliomyelitického viru je určen vývojovými záznamy, které obsahují informace o původu viru a následném zacházení s ním.

Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé pracovní inokulum se identifikuje jako lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 nebo typu 3 neutralizací viru v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Stanoví se koncentrace viru v každém pracovním inokulu, aby se určilo množství viru, které se použije k inokulaci výrobních buněčných kultur.

**Cizí agens.** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula pro virové vakcíny (2.6.16).

Pokud se k izolaci kmene použily primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin, provedou se navíc opatření, která zajistí, aby kmen nebyl kontaminován takovými opičími viry, jako je virus opičí imunodeficiency, SV40, filoviry a herpesvirus B (cerkopitecidní herpesvirus 1). Pracovní inokulum připravené v primárních, sekundárních nebo terciárních buňkách opičích ledvin vyhovuje požadavkům uvedeným dále v odstavci Kultivace viru a sklizeň u jednotlivé sklizeň připravené v těchto buňkách.

#### KULTIVACE VIRU A SKLIZEŇ

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde se nepracuje s jinými buňkami nebo s viry. Při přípravě médií pro kultivaci se může použít schválené zvířecí sérum (nikoliv však lidské sérum). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a médií prokazatelně neobsahují cizí agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červená fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky); použijí-li se kontinuální linie kultivované ve fermentoru, použije se jako kontrolní buňky  $200 \times 10^6$  buněk; použijí-li se k výrobě primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin, odebere se k přípravě kontrolních buněk vzorek odpovídající nejméně 500 ml buněčné suspenze v koncentraci použité pro výrobu vakcíny.

Pouze jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu vakcíny. Zkouška Totožnost a zkouška Bakteriální a houbová kontaminace se mohou provést u purifikované sklizeň místo u spojené monovalentní sklizeň. Po prokázání shodnosti výroby na úrovni jednotlivé sklizeň se může koncentrace viru stanovit u purifikované sklizeň místo u spojené monovalentní sklizeň.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z kultury produkčních buněk vyhovují zkoušce Totožnosti (při použití systému

buněčné banky k výrobě) a zkoušce Cizí agens (2.6.16); při použití primárních, sekundárních nebo terciárních buněk opičích ledvin se zkoušky buněčných kultur provádějí podle dále uvedených odstavců Zkouška na kulturách buněk králičích ledvin a Zkouška na kulturách buněk ledvin cerkopitecidních opic.

*Zkouška na kulturách buněk králičích ledvin.* Vzorek nejméně 10 ml spojené supernatantní tekutiny z kontrolních kultur se inokulací do kultur buněk králičích ledvin zkouší na nepřítomnost herpesviru B (cerkopitecidní herpesvirus 1) a dalších virů. Ředění supernatantní tekutiny v živném médiu není větší než 1 : 4 a plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm<sup>2</sup> na mililitr inokula. Jako neinokulované kontrolní buňky se uchovávají jedna nebo více lahviček každé šarže buněk se stejným médiem. Kultury se inkubují při 37 °C a pozorují se nejméně dva týdny. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže bylo pro nespécifické náhodné důvody vyřazeno více než 20 % kontrolních buněk.

*Zkoušky na kulturách buněk ledvin cerkopitecidních opic.* Vzorek nejméně 10 ml spojené supernatantní tekutiny z kontrolních kultur se metodou popsanou v odstavci Zkoušky na kulturách buněk králičích ledvin zkouší na nepřítomnost viru SV40 a jiných cizích agens inokulací do buněčných kultur připravených z ledvin cerkopitecidních opic nebo jiných buněk prokazatelně stejně citlivých na virus SV40. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže bylo pro nespécifické náhodné důvody vyřazeno více než 20 % kontrolních buněk.

**Totožnost.** Neutralizací specifickými protilátkami se v buněčných kulturách prokáže, že jednotlivá sklizeň obsahuje poliomyelitický virus typu 1, typu 2 nebo typu 3.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru v jednotlivé sklizeň se stanoví titrací infekčního viru v buněčných kulturách.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata** (2.6.7). Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na mykoplazmata; použije se 10 ml.

**Zkouška na kulturách buněk králičích ledvin.** Použijí-li se pro výrobu vakcíny primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin, zkouší se nejméně 10 ml z jednotlivé sklizeň na nepřítomnost herpesviru B (cerkopitecidní herpesvirus 1) a dalších virů na kulturách buněk králičích ledvin, jak je výše popsáno pro kontrolní buňky.

**Zkouška na kulturách buněk ledvin cerkopitecidních opic.** Použijí-li se pro výrobu vakcíny primární, sekundární nebo terciární buňky opičích ledvin, zkouší se vzorek nejméně 10 ml jednotlivé sklizeň na nepřítomnost viru SV40 a jiných cizích agens. Vzorek se neutralizuje antisérem o vysokém titru protilátek proti danému typu poliomyelitického viru. Vzorek se zkouší na kulturách primárních buněk ledvin cerkopitecidních opic nebo na buňkách prokazatelně nejméně stejně vnímavých k viru SV40. Kultury se inkubují při 37 °C a pozorují se po dobu 14 dnů. Na konci této doby se připraví nejméně jedna subkultura z tekutiny ve stejném buněčném systému a dalších dva týdny se pozorují primární kultury i subkultury.

### PURIFIKACE A PURIFIKOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ

Několik jednotlivých sklizní téhož typu se může spojit a koncentrovat. Monovalentní sklizeň nebo spojená monovalentní sklizeň se purifikuje validovanými metodami. Použije-li se pro výrobu kontinuální buněčná linie, vykazují purifikační metoda prokazatelný pokles obsahu DNA z buněčného substrátu na méně než 100 pg v jedné lidské dávce.

Pouze purifikovaná monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu inaktivované monovalentní sklizně.

**Totožnost.** Virus se identifikuje neutralizací viru v buněčných kulturách za použití specifických protilátek nebo určením D-antigenu.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru se stanoví titrací infekčního viru.

**Specifická účinnost.** Poměr koncentrace viru nebo obsahu D-antigenu, stanoveného vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), k celkovému obsahu bílkovin (specifická účinnost) purifikované monovalentní sklizně je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

### INAKTIVACE A INAKTIVOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ

Před inaktivací se může spojit několik purifikovaných monovalentních sklizní stejného typu. Aby se vyloučila neúčinnost inaktivace způsobená přítomností virových agregátů, tekutina se před inaktivací nebo v průběhu inaktivace filtruje. Inaktivace se provádí ve vhodné době: nejlépe do 24 h po filtraci a v každém případě nejpozději do 72 h po filtraci. Virová suspenze se inaktivuje validovanou metodou, která prokazatelně inaktivuje poliomyelitický virus bez poškození imunogenity. Validační studie zahrnuje inaktivací křivku nejméně o čtyřech bodech (např. v čase 0 h, 24 h, 48 h a 96 h), která vykazuje pokles koncentrace živého viru v čase. Použije-li se k inaktivaci formaldehyd, ověří se na konci inaktivace jeho přebytek. Zkouška inaktivací kinetiky uvedená dále se provádí u každé šarže, aby se zajistila shodnost inaktivacího postupu.

Pouze inaktivovaná monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě trivalentní směsi inaktivovaných monovalentních sklizní nebo konečné várky vakcíny.

**Zkouška účinnosti inaktivace.** Po neutralizaci formaldehydu disiřičitanem sodným (kde je to vhodné) se ověří nepřítomnost zbylého živého viru inokulací na vhodné buněčné kultury. K inokulaci se z každé inaktivované monovalentní sklizně použijí dva vzorky odpovídající nejméně 1500 lidským dávkám. Buňky použité pro zkoušku musí mít optimální citlivost týkající se zbytkového infekčního poliomyelitického, např. buňky z ledvin některých druhů opic (*Macacus*, *Cercopithecus* nebo *Papio*), nebo Hep-2 buňky. Jestliže se použijí jiné buňky, musí se prokázat udržení nejméně stejné citlivosti jako u výše uvedených druhů. Jeden vzorek se odebere nejpozději ve 3/4 inaktivací doby a druhý na konci inaktivace. Vzorky se do buněčných kultur inokulují tak, aby zředění vakcíny v médiu nebylo větší než 1 : 4 a plocha vrstvy buněk byla nejméně

3 cm<sup>2</sup> na mililitr inokula. Jedna nebo více lahví se stejným médiem se ponechá jako kontrolní neinfikované buňky. Buněčné kultury se pozorují nejméně tři týdny. Z každé lahve se provedou nejméně dvě pasáže, jedna týden před koncem pozorovacího období a druhá na jeho konci. Pro tyto pasáže se použije supernatantní tekutina z buněčných kultur a inokuluje se stejně jako počáteční vzorek. Tyto subkultury se pozorují nejméně dva týdny. Na buněčných kulturách se nepozorují známky kultivace poliomyelitického viru. Na konci pozorovacího období se provede zkouška citlivosti použité buněčné kultury inokulací živého poliomyelitického viru stejného typu, jaký byl obsažen v inaktivované monovalentní sklizni.

**Inaktivací kinetika.** Kinetika inaktivace se stanoví a schvaluje oprávněnou autoritou. Získají se odpovídající údaje o inaktivací kinetice a sleduje se shodnost inaktivacího postupu.

**Sterilita (2.6.1).** Inaktivovaná monovalentní sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Obsah D-antigenu.** Obsah D-antigenu stanovený vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví přímo z inaktivovaných monovalentních sklizní lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 nebo z trivalentní směsi inaktivovaných monovalentních sklizní. Může se přidat stabilizátor a vhodná protimikrobní látka.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Sterilita (2.6.1).** Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se její množství vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Jsou-li zkoušky Volný formaldehyd, Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti *in vivo* provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vynechat.

Zkouška *in vivo* se může pro přijetí, nebo vyřazení šarže vynechat, jakmile se prokáže u daného přípravku a každého typu poliomyelitického viru, že pro tuto zkoušku platí stejná kritéria pro přijetí jako pro stanovení D-antigenu. Prokazování musí zahrnovat zkoušení šarží s nižší než požadovanou účinností, vyráběných experimentálně, je-li třeba, např. tepelným ošetřením nebo jiným způsobem zajišťujícím pokles imunogenity. Dojde-li k významné změně postupu při výrobě antigenů nebo změně jejich složení, musí se provést zkoušky účinnosti *in vivo* a *in vitro* a považují se za revalidaci.

Předpokládá se, že obsah bílkovin se stanoví v purifikovaných monovalentních sklizních nebo v inaktivovaných monovalentních sklizních a prokáže se, že obsah bílkovin v šarži nepřesáhne 10 µg v jedné lidské dávce, může se tato zkouška u šarže vynechat.



Je-li zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s vyhovujícím výsledkem v trivalentní směsi inaktivovaných monovalentních sklizní nebo v konečné várce vakcíny, může se u šarže vynechat.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přítomnost lidského poliomyelitického viru typu 1, typu 2, a typu 3 ve vakcíně se prokáže vhodnou imunochemickou metodou, jako je enzymově imunisorbentové stanovení (ELISA) D-antigenu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně minimální prokazatelné účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se její množství vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou.

**Obsah bílkovin (2.5.33, Metoda 2).** Nejvýše 10 µg v jedné lidské dávce.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 5 m. j. endotoxinu v jedné lidské dávce.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

**Obsah D-antigenu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se stanoví obsah D-antigenu pro lidský poliomyelitický virus typu 1, typu 2 a typu 3 jako ukazatel shodnosti výroby. Použije se referenční přípravek kalibrovaný v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen. Pro každý typ je naměřený obsah, vyjádřený ve vztahu k množství D-antigenu uvedenému v označení na obalu, v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

*Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě BRP* je kalibrovaná v jednotkách Evropského lékopisu a určena pro použití při stanovení obsahu D-antigenu. Jednotky Evropského lékopisu odpovídají mezinárodním jednotkám.

**Zkouška *in vivo*.** Vakcína vyhovuje Stanovení účinnosti inaktivované vakcíny proti poliomyelitidě *in vivo* (2.7.20).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- typy poliomyelitického viru obsažené ve vakcíně;
- jmenovité množství poliomyelitického viru každého typu (1, 2 a 3), vyjádřené v jednotkách Evropského lékopisu pro D-antigen, které je obsaženo v jedné lidské dávce;
- typ buněčného substrátu použitého k přípravě vakcíny.

## VACCINUM POLIOMYELITIDIS PERORALE

7.3:0215

Vakcína proti poliomyelitidě živá perorální

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující schválené kmeny živého atenuovaného poliomyelitického viru typu 1, typu 2 nebo typu 3

kultivované *in vitro* v kulturách schválených buněk. Obsahuje buď jeden typ, nebo jakoukoliv kombinaci tří typů kmenů podle Sabina, upravených do formy vhodné pro perorální podání.

Je to čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

Vakcinační kmeny a výrobní postup mají prokazatelně poskytovat shodné vakcíny, které mají přijatelnou imunogenitu a bezpečnost pro člověka.

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pro buněčné linie se používá systém buněčné banky. Použije-li se při výrobě primární, sekundární nebo terciární opičí buňky, vyhovuje výroba dále uvedeným požadavkům. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, neprojde virus v konečném přípravku více než dvěma pasážemi od matečného inokula.

#### REFERENČNÍ PŘÍPRAVKY

Jako virový referenční přípravek ve zkoušce Stanovení účinnosti je vhodné použít *vakcínu proti poliomyelitidě perorální BRP*.

Pro použití ve zkouškách na genetické markery a pro molekulární zkoušky ke zjištění shodnosti výroby je vhodný Mezinárodní standard pro poliomyelitický virus typu 2 (Sabin) pro MAPREC zkoušku (mutační analýza polymerasovou řetězovou reakcí a restrikčním enzymovým štěpením) a Mezinárodní standard pro poliovirus typu 3 (Sabin), syntetická DNA pro MAPREC zkoušku.

Pro porovnání ve zkoušce neurovirulence *in vivo* u homotypických vakcín jsou dostupné referenční přípravky každého typu poliomyelitického viru, tj. originál podle Sabina + dvě úrovně pasáže, jmenovitě WHO (SO + 2)/I pro typ 1 viru, WHO (SO + 2)/II pro typ 2 viru a WHO (SO + 2)/III pro typ 3. Tyto referenční přípravky pro zkoušky neurovirulence *in vivo* lze získat ve Světové zdravotnické organizaci (WHO), Biologické přípravky (WHO, Biologicals, Geneva, Switzerland).

Do každé zkoušky se zařadí vhodný referenční přípravek.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3), v kontinuálních buněčných liniích (5.2.3) nebo v kulturách primárních buněk opičích ledvin (včetně sériově pasážovaných buněk z primárních buněk opičích ledvin).

**Kultury primárních buněk opičích ledvin.** Následující speciální požadavky na substrát pro pomnožení viru se vztahují na kultury primárních buněk opičích ledvin.

*Opice použité pro přípravu kultur primárních buněk opičích ledvin a pro zkoušení viru.* Přípravuje-li se vakcína v kulturách primárních buněk opičích ledvin, použijí se zvířata druhu schváleného oprávněnou autoritou, zcela zdravá, chovaná v uzavřených nebo intenzivně monitorovaných chovech a která nebyla dříve použita k pokusným účelům. Opice se chovají v dobře postaveném zvěřinci, v náležitě větraných místnostech, v klecích umístěných co nejdále od sebe. Přijmou se odpovídající opatření k zabránění přenosu infekce mezi klecemi. Do jedné klece se umístí nejvýše dvě opice a osazení klecí se nemění. V zemi výroby vakcíny se

opice drží v karanténě nejméně šest týdnů před použitím. Karanténní skupina je skupina vybraných zdravých opic chovaných v jedné místnosti se zvláštním režimem krmení a úklidu, která v karanténním období není ve styku s jinými opicemi. Jestliže dojde během karanténního období k celkovému úhynu dosahujícímu 5 % (při vyloučení úhynů v důsledku nehod nebo, když je prokázáno, že příčinou není infekční onemocnění) dodávky, kterou tvoří jedna nebo více skupin, opice z celé dodávky setrvávají v karanténě nejméně šest dalších týdnů. Jednotlivé skupiny se drží nepřetržitě v izolaci jako v karanténě, i po ukončení karanténního období, až do použití opic. Po odebrání poslední opice ze skupiny se místnost, kde byla skupina ustájena, důkladně vyčistí a dekontaminuje před použitím pro další skupinu. Jestliže se použijí ledviny novorozenců opic, chovají se matky v karanténě po dobu březosti.

Opice, jejichž ledviny se mají vyjmout, se anestetizují a pečlivě vyšetří, zvláště na příznaky tuberkulózy a infekce herpesvirem B (cerkopitecidní herpesvirus 1).

Jestliže opice vykazují jakékoliv patologické léze, závažné z hlediska použití jejich ledvin pro přípravu inokula nebo vakcíny, nepoužijí se a ani ostatní opice z téže karanténní skupiny se nemohou použít, pokud není zřejmé, že jejich použití nesníží bezpečnost výrobku.

Všechny postupy popsané v této části se provádějí mimo prostor, v němž se vyrábí vakcína. Použité opice mají být prokazatelně prosté protilátek proti opičímu viru 40 (SV40), viru opičí imunodeficiencie a spumavirům. Vzorek krve použitý ke zkoušce na protilátky proti viru SV40 se musí odebrat co nejdříve před odběrem ledvin. Jestliže se pro výrobu použijí opice rodu *Macaca*, nemají prokazatelně protilátky proti cerkopitecidnímu herpesviru 1 (herpesvirus B). Jako indikátor nepřítomnosti protilátek proti viru B se použije lidský herpesvirus s ohledem na nebezpečí při zacházení s cerkopitecidním herpesvirem 1 (herpesvirus B). Opice použité pro výrobu nových inokul mají být prokazatelně prosté protilátek proti opičímu cytomegaloviru (sCMV).

*Kultury primárních buněk opičích ledvin pro výrobu vakcíny.* Pro přípravu buněčných kultur se použijí pouze ledviny bez patologických změn. Jestliže opice pocházejí ze skupiny určené pro výrobu vakcíny, mohou se pro kultivaci viru použít sériově pasážované kultury buněk opičích ledvin z primárních buněk opičích ledvin, jinak se buňky opičích ledvin sériově nepasážují. Virus pro přípravu vakcíny se v kulturách kultivuje asepticky. Jestliže se pro kultivaci buněk používá zvířecí sérum, po inokulaci viru se používá udržovací médium bez séra.

Každá skupina buněčných kultur připravených z jedné opice nebo ze skupiny nejvýše deseti novorozenců opic se připravuje a zkouší jako samostatná skupina.

#### VIROVÁ INOKULA

Použité kmeny poliovirů se identifikují vývojovými známkami, které obsahují informace o jejich původu a následném zacházení s nimi.

Pracovní inokula se připraví jedinou pasáží z matečného inokula a ve schválené úrovni pasáží od originálního Sabina viru. Inokula se připraví ve velkých množstvích a uchovávají se při teplotě nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé pracovní inokulum se identifikuje jako poliomyelitický virus daného typu za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Stanoví se dále popsanou metodou. Koncentrace viru je základem pro množství viru, který se použije ve zkoušce Neurovirulence.

**Cizí agens (2.6.16).** Jestliže se pracovní inokulum připravuje v lidských diploidních buňkách nebo v kontinuální buněčné linii, vyhovuje požadavkům na inokulum pro virové vakcíny. Jestliže se pracovní inokulum připravuje v kulturách primárních buněk opičích ledvin, vyhovuje požadavkům dále uvedeným v odstavcích Kultivace a sklizeň viru a Monovalentní spojená sklizeň a zkouškám na dospělých myších, na sajících myších a na morčatech uvedeným ve statí 2.6.16.

Kromě požadavků uvedených ve statí 2.6.16 se u vakcín vyráběných na buněčných liniích (a pokud bylo inokulum připraveno na kulturách primárních buněk opičích ledvin) provede validovaná zkouška na nepřítomnost sCMV.

Pracovní inokula mají být prosta detekovatelných DNA sekvencí opičího viru 40 (SV40)

**Neurovirulence (2.6.19).** Každé matečné a pracovní inokulum vyhovuje zkoušce neurovirulence pro vakcíny proti obrně (perorální) provedené na opičích (2.6.19). Navíc nejméně první čtyři po sobě jdoucí šarže monovalentní spojené sklizeň připravené z těchto inokul prokazatelně vyhovují zkoušce neurovirulence pro vakcínu proti obrně (perorální) (2.6.19) provedené na opičích před tím, než se inokulum posoudí jako vhodné pro použití. Kromě toho se zastaví používání pracovního inokula ve výrobě vakcíny, jestliže výskyt nedostatků v monovalentních spojených sklizních z něho vyrobených je větší, než byla statistická předpověď. Tato statistická předpověď se vypočítá po každé zkoušce na základě všech zkoušených monovalentních spojených sklizní; rovná se pravděpodobnosti falešného odmítnutí v případě první zkoušky (tj. 1 %). Pravděpodobnost falešného odmítnutí v případě nové zkoušky bývá zanedbatelná. Je-li tato zkouška prováděna pouze výrobcem, poskytnou se zkušební skla kontrolní autoritě k posouzení.

**Genetické markery.** Každé pracovní inokulum se zkouší na replikační vlastnosti při  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jak je popsáno v odstavci Monovalentní spojená sklizeň. Připraví se profil (tj. procento mutantů) viru použitého ve zkoušce MAPREC. Inokulum viru typu 3 vyhovuje MAPREC zkoušce, jak je popsáno v odstavci Monovalentní spojená sklizeň.

#### KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU

Všechny práce s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí v aseptických podmínkách v prostorách, kde se v průběhu výroby nepracuje s jinými buňkami. Do růstových médií se může použít schválené zvířecí (nikoliv však lidské) sérum, avšak konečné udržovací médium pro buňky v době kultivace viru zvířecí sérum neobsahuje. Sérum a trypsin použité k přípravě buněčných suspenzí a médií prokazatelně neobsahují živá cizí agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH,

jako je fenolová červeň, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Přednostně se používá při výrobě substrát bez antibiotik. V den inokulace pracovním virovým inokulem se ponechá nejméně 5 % nebo 1000 ml buněčných kultur (podle toho, co je méně) použitých pro výrobu vakcíny jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky); speciální požadavky, uvedené dále, se vztahují na kontrolní buňky, když se vakcína připravuje na kulturách primárních buněk opičích ledvin. Virová suspenze se sklídí nejpozději 4 dny po inokulaci viru. Po inokulaci výrobní buněčné kultury pracovním inokulem se inokulované buňky udržují při stanovené teplotě, jež je prokazatelně vhodná, v rozmezí 33 °C až 35 °C. Udržuje se konstantní teplota s odchylkou  $\pm 0,5$  °C. Kontrolní buněčné kultury se inkubují při 33 °C až 35 °C po odpovídající dobu.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru ve virových sklizních se stanoví, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se monitorovala shodnost výroby a k výpočtu ředění, které se použije u konečné várky vakcíny.

**Molekulární zkoušky pro kontrolu shodnosti výroby.** Zkouška MAPREC se provede u každé virové sklizně. Kritéria pro přijetí/odmítnutí pro shodnost výroby jsou stanovena pro každého výrobce a pro každé pracovní inokulum se souhlasem oprávněné autority. Tato kritéria jsou pro uspokojení oprávněné autority pravidelně přezkoumávána a aktualizována. Ověření shodnosti výroby se požaduje, jestliže výsledky sklizně viru nejsou shodné s vývojovými záznamy výroby.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky produkční buněčné kultury, ze které pochází sklizeň viru, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům zkoušky Cizí agens (2.6.16) nebo, při použití kultur primárních buněk opičích ledvin, dále uvedeným požadavkům.

**Kultury primárních buněk opičích ledvin.** Následující speciální požadavky se vztahují na kultivaci a sklizeň viru na kulturách primárních buněk opičích ledvin.

**Buněčné kultury.** V den inokulace virovým inokulem se všechny buněčné kultury vyšetří na degeneraci způsobenou infekčním agens. Jestliže se při ověřování zjistí přítomnost cizího agens v některé buněčné kultuře, vyřadí se celá související skupina kultur.

V den inokulace pracovního inokula se odebere vzorek nejméně 30 ml spojené tekutiny buněčných kultur z ledvin každé jednotlivé opice nebo ze skupiny nejvýše deseti novorozenců opic a rozdělí se na dvě stejné části. Jedna část spojené tekutiny se zkouší na kulturách buněk opičích ledvin připravených z téhož druhu, ale z jiného zvířete, než které se použilo k výrobě vakcíny. Druhá část vzorku spojené tekutiny se, kde je to třeba, zkouší na kulturách buněk opičích ledvin z jiného druhu tak, aby se zkoušky spojených tekutin provedly v buněčných kulturách nejméně jednoho druhu, o němž je známo, že je citlivý na SV40. Spojená tekutina se inokuluje do lahví s těmito buněčnými kulturami tak, aby ředění spojené tekutiny živným médiem nebylo vyšší než 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm<sup>2</sup> na mililitr spojené tekutiny. Nejméně jedna láhev každého druhu buněčné kultury zůstává neinokulovaná

a slouží jako kontrola. Jestliže se pro výrobu vakcíny použije opičí druh citlivý na SV40, zkouška na dalším druhu se nepožaduje. Pro kultivaci buněk se může použít zvířecí sérum za předpokladu, že neobsahuje protilátky proti SV40. Udržovací médium používané po inokulaci zkoušeného materiálu neobsahuje přídavek séra, kromě dále uvedených výjimek.

Buněčné kultury se inkubují při teplotě mezi 35 °C a 37 °C a pozorují se po celou dobu nejméně čtyř týdnů. Během pozorovacího období a po nejméně dvou týdnech inkubace se z tkáňových tekutin založí nejméně jedna subkultura na stejném buněčném systému. Tyto subkultury se pozorují také nejméně dva týdny.

Sérum se může přidat do původní kultury při vytváření subkultur, pokud neobsahuje protilátky proti SV40.

Pro detekci viru SV40 a ostatních virů v buňkách se mohou použít techniky využívající fluorescenční protilátky.

Další vzorek nejméně 10 ml spojené tekutiny se zkouší na přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (herpesvirus B) a na přítomnost dalších virů v kulturách buněk králičích ledvin. Sérum používané v živném médiu těchto kultur je prokazatelně prosté inhibitorů viru B. Jako indikátor nepřítomnosti inhibitorů viru B se používá lidský herpesvirus s ohledem na nebezpečí při zacházení s cerkopitecidním herpesvirem 1 (herpesvirus B). Vzorek se inokuluje do lahví s těmito buněčnými kulturami tak, aby ředění spojené tekutiny živným médiem nebylo vyšší než 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm<sup>2</sup> na mililitr spojené tekutiny. Nejméně jedna láhev buněčné kultury zůstává neinokulovaná a slouží jako kontrola.

Kultury se inkubují při 35 °C až 37 °C a pozorují se nejméně dva týdny.

Další vzorek 10 ml spojené tekutiny odebrané z buněčných kultur v den inokulace virovým inokulem se zkouší na přítomnost cizích agens inokulací do kultur lidských buněk citlivých na virus spalniček.

Zkoušky nelze hodnotit, jestliže do konce vlastní zkušební doby bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické důvody více než 20 % lahví s kulturami.

Jestliže se při těchto zkouškách najde důkaz přítomnosti cizího agens, jednotlivá sklizeň se z celé skupiny buněčných kultur vyřadí.

Jestliže se prokáže přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (herpesvirus B), výroba perorální vakcíny proti poliomyelitidě se přerušuje a informuje se oprávněná autorita. Výroba se neobnoví, dokud se neuzavře vyšetřování a nepřijmou se opatření proti jakémukoliv znovuobjevení infekce. Výroba se obnoví jen se souhlasem oprávněné autority.

Jestliže se tyto zkoušky neprovádějí ihned, vzorky spojené tekutiny buněčných kultur se uchovávají při teplotách – 60 °C nebo nižších, s výjimkou vzorku pro zkoušku na B virus, který se může uchovávat při 4 °C za předpokladu, že se zkouška provede nejvýše do 7 dnů po odběru.

**Kontrolní buněčné kultury.** V den inokulace virovým pracovním inokulem se 25 % (ale nejvýše 2,5 l) buněčné suspenze získané z ledvin jednotlivé opice nebo z nejvýše deseti novorozenců opic ponechá jako neinokulované kontrolní buněčné kultury. Tyto kontrolní buněčné kultury se kultivují nejméně 2 týdny za stejných podmínek jako

kultury inokulované a během této doby se vyšetřují na výskyt cytopatických změn. Zkoušky nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kontrolních buněčných kultur bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické příčiny. Na konci pozorovacího období se kontrolní buněčné kultury vyšetří na degeneraci způsobenou nějakým infekčním agens. Jestliže se tímto vyšetřením nebo některou ze zkoušek požadovaných v tomto odstavci prokáže v kontrolní kultuře přítomnost jakéhokoliv cizího agens, vyřadí se poliovirus kultivovaný na souvisejících inokulovaných kulturách stejné skupiny.

*Zkoušky na hemadsorbující viry.* V době sklizně viru nebo během 4 dnů po inokulaci výrobních kultur virovým pracovním inokulem se odebere vzorek o velikosti 4 % kontrolních buněčných kultur a zkouší se na hemadsorbující viry. Na konci pozorovacího období se podobně zkoušejí zbývající kontrolní buněčné kultury. Tyto zkoušky se provedou způsobem popsáným ve stati *Důkaz cizích agens v lidských virových vakcínách (2.6.16)*.

*Zkoušky na další cizí agens.* V době sklizně nebo během 7 dnů po inokulaci výrobních kultur virovým pracovním inokulem se odebere vzorek nejméně 20 ml spojené tekutiny z každé skupiny kontrolních kultur a zkouší se na dvou druhích buněčných kultur opičích ledvin, jak je popsáno výše.

Na konci pozorovacího období původních kontrolních buněčných kultur se odeberou obdobné vzorky spojené tekutiny a opakují se zkoušky uvedené v této části na dvou druhích kultury buněk opičích ledvin a na kulturách králičích buněk, jak je výše popsáno v odstavci *Buněčné kultury*.

Jestliže se prokáže přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (herpesvirus B), výrobní buněčná kultura se nepoužije a musí se provést výše popsaná opatření týkající se výroby vakcíny.

Tekutiny odebrané z kontrolních buněčných kultur v době sklizně viru a na konci pozorovacího období se před zkouškou na cizí agens mohou spojit. Vzorek 2% spojené tekutiny se zkouší v každém specifikovaném systému buněčných kultur.

#### *Jednotlivé sklizně*

*Zkoušky neutralizovaných jednotlivých sklizní na kulturách primárních buněk opičích ledvin.* Vzorek nejméně 10 ml z každé jednotlivé sklizně se neutralizuje typově specifickým antisérem proti poliomyelitidě připraveným z jiných zvířat, než jsou opice. Při přípravě antiséra pro tento účel se imunitační antigeny připraví v jiných buňkách než v opičích.

Polovina neutralizované suspenze (odpovídající nejméně 5 ml z jednotlivé sklizně) se zkouší na kulturách buněk opičích ledvin připravených z téhož druhu, který se použil pro výrobu vakcíny, ale ne ze stejného zvířete. Druhá polovina neutralizované suspenze se zkouší, je-li to nutné, na buněčných kulturách opičích ledvin tak, že se provedou zkoušky neutralizované suspenze na buněčných kulturách z nejméně jednoho dalšího opičích druhu, o němž je známo, že je citlivý na SV40.

Neutralizované suspenze se inokulují do lahví s těmito buněčnými kulturami tak, aby ředění suspenze živným médiem nebylo vyšší než 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm<sup>2</sup>/ml neutralizované suspenze. Nejméně jedna láhev

každého typu buněčné kultury zůstane neinokulovaná a slouží jako kontrola. Udržuje se živným médiem obsahujícím stejnou koncentraci specifického antiséra použitého k neutralizaci.

Pro růst buněk se může použít zvířecí sérum za předpokladu, že neobsahuje protilátky proti SV40, ale udržovací médium používané po inokulaci zkoušeného materiálu, neobsahuje žádný přídavek séra jiného než antisérum neutralizujícího poliovirus, kromě dále uvedené výjimky.

Kultury se inkubují při teplotě 35 °C až 37 °C a pozorují se po celé období nejméně 4 týdnů. Během pozorovacího období a po nejméně dvou týdnech inkubace se založí nejméně jedna subkultura z tekutiny každé z těchto kultur na stejném systému buněčné kultury. Subkultury se také pozorují nejméně dva týdny.

Sérum se může přidat k původním kulturám v době založení subkultury, pokud neobsahuje protilátky proti SV40.

Na dalším vzorku neutralizovaných jednotlivých sklizní se provedou další zkoušky na cizí viry inokulací 10 ml do kultur lidských buněk citlivých na virus spalniček. Tato zkouška se také validuje pro detekci sCMV.

Pro detekci viru SV40 a dalších virů v buňkách se mohou použít techniky využívající fluorescenční protilátky.

Zkoušky nelze hodnotit, jestliže do konce vlastní zkušební doby bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické důvody více než 20 % nádob s kulturami.

Když se objeví cytopatické změny v kterékoliv z kultur, příčiny těchto změn se vyšetří. Jestliže se prokáže, že cytopatické změny způsobil neneutralizovaný poliomyelitický virus, zkouška se opakuje. Projeví-li se známky přítomnosti SV40 nebo jiného cizího agens, které lze přisoudit jednotlivé sklizni, tato sklizeň se vyřadí.

#### *MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ*

Monovalentní spojená sklizeň se připraví spojením více vyhovujících jednotlivých sklizní téhož typu viru. Monovalentní spojené sklizeň z kontinuálních buněčných linií se mohou purifikovat. Každá monovalentní spojená sklizeň se filtruje filtrem zadržujícím bakterie.

Pouze monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Každá monovalentní spojená sklizeň se identifikuje jako poliomyelitický virus daného typu za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru se stanoví dále popsanou metodou a používá se jako základ pro výpočet ředění pro přípravu konečné várky, pro množství viru použitého ve zkoušce na neurovirulenci a ke stanovení a sledování shodnosti výroby.

**Genetické markery.** Sabinův poliomyelitický virus typu 3 se zkouší validovanou MAPREC zkouškou. Zjistí se množství mutací na pozici 472 genomu (472-C) a vyjádří se jako poměr k mezinárodnímu standardu pro MAPREC zkoušku poliomyelitického viru typu 3 (Sabin). Pokud se v monovalentní spojené sklizni poliomyelitického viru typu 3 nalezne významně více 472-C, než obsahuje mezinárodní standard pro MAPREC zkoušku, zkoušku nelze hodnotit.

MAPREC analýza poliomyelitického viru typu 3 se provede standardním operačním postupem schváleným oprávněnou autoritou. Vyhovující postup [*Analýza mutací pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) a restričního enzymového štěpení (MAPREC) pro perorální vakcinální poliomyelitického viru (Sabin)*] je dostupný ve Světové zdravotnické organizaci, Jakost a bezpečnost biologických přípravků (WHO, Quality and Safety of Biologicals, Geneva). Laborať musí odpovědně autoritě prokázat, že je schopna zkoušku provádět. Jestli obsahuje monovalentní spojená sklizeň významně více 472-C než mezinárodní standard, dohodnou se výrobce a oprávněná autorita na postupu a rozhodovacích kritériích. Kritéria pro přijetí/odmítnutí stanovení shodnosti výroby jsou určena pro každého výrobce a pro každé pracovní inokulum se souhlasem oprávněné autority. Tato kritéria se aktualizují po přípravě a analýze každé nové várky. K ověření shodnosti výroby se přistoupí, jestliže výsledky virové sklizeň nejsou shodné s vývojovými záznamy výroby.

MAPREC zkouška pro poliomyelitický virus typu 3 (Sabin) má vysoký stupeň předvídatosti pro zkoušku neurovirulence *in vivo*. Pokud filtrovaná spojená monovalentní sklizeň poliomyelitického viru typu 3 nevyhoví této zkoušce, zahájí se ověřování shodnosti výroby, které také zahrnuje posouzení vhodnosti pracovního inokula.

Monovalentní spojené sklizeň vyhovující MAPREC zkoušce jsou následně zkoušeny na neurovirulenci *in vivo*.

Výsledky zkoušky MAPREC a zkoušky neurovirulence na opicích (2.6.19) pro poliomyelitický virus typu 3 se použijí pro hodnocení dopadu změn ve výrobě nebo při zavádění výroby u nového výrobce.

Není vyřešená validace zkoušky MAPREC pro poliomyelitické viry typu 1 a typu 2; tyto viry se ve filtrované suspenzi várky zkoušejí na schopnost reprodukce při teplotách 36 °C a 40 °C. Poměr replikačních kapacit viru v monovalentní spojené sklizni se získá při teplotách v rozmezí mezi 36 °C a 40 °C ve srovnání s inokulem nebo referenčním přípravkem pro markerové zkoušky a s vhodnými rct/40– a rct/40+ kmény poliomyelitického viru téhož typu. Inkubační teploty užívané v této zkoušce se řídí v rozmezí ±0,1 °C. Monovalentní spojená sklizeň vyhovuje této zkoušce, jestliže titer viru ze sklizeň a vhodného referenčního materiálu je při 36 °C nejméně o 5,0 log vyšší než titer stanovený při 40 °C. Je-li růst při 40 °C tak nízký, že validní srovnání nelze provést, použije se teplota v rozmezí 39,0 °C až 39,5 °C. Při této teplotě musí být snížení titru referenčního materiálu v rozmezí od 3,0 log do 5,0 log proti hodnotě při 36 °C. Přijatelná minimální redukce se pro každý kmen viru stanoví při dané teplotě. Jestliže titry získané pro jeden nebo více referenčních virů nejsou ve shodě s očekávanými hodnotami, zkouška se musí opakovat.

**Neurovirulence (2.6.19).** Každá monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce neurovirulence pro vakcíny proti obrně (perorální) (2.6.19). Je-li tato zkouška na opicích prováděna pouze výrobcem, poskytnou se zkušební skla také oprávněné autoritě k posouzení. TgPVR 21 transgenní myš model poskytne vhodnou alternativu ke zkoušce neurovirulence na opicích pro zkoušky neurovirulence u vakcín typu 1, typu 2 nebo typu 3, jakmile se laborať kvalifikuje k provádění této zkoušky a získá zkušenosti k uspokojení oprávněné autority. Zkouška se provádí podle standardního

operačního postupu schváleného oprávněnou autoritou. Vhodný postup uvádí *Zkouška neurovirulence pro typ 1, typ 2a a typ 3 živé poliomyelitické vakcíny (perorální) na transgenních myších citlivých na poliomyelitický virus*, kterou lze získat ve Světové zdravotnické organizaci Jakost a bezpečnost biologických přípravků (WHO, Quality and Safety of Biologicals, Geneva).

**Kultury primárních buněk opicích ledvin.** Následující speciální požadavky se vztahují na monovalentní spojené sklizeň odvozené z kultur primárních buněk opicích ledvin. *Retroviry.* Monovalentní spojená sklizeň se zkouší na přítomnost reverzní transkriptasy. Neprokáže se přítomnost retrovirů.

*Zkouška na králících.* Vzorek monovalentní spojené sklizeň se zkouší na přítomnost herpesviru B (cerkopitecidní herpesvirus 1) a dalších virů injekčním podáním nejméně 100 ml nejméně deseti zdravým králíkům hmotnosti 1,5 kg až 2,5 kg. Každý králik dostane nejméně 10 ml a nejvýše 20 ml, přičemž se 1 ml podá intradermálně na několik míst, přičemž nejvyšší objem pro intradermální podání na jednotlivé místo je 0,1 ml, a zbytek subkutánně. Králíci se pozorují nejméně tři týdny, sleduje se úhyn a příznaky onemocnění.

Všichni králíci, kteří uhynuli po prvních 24 h zkoušky a kteří vykazují příznaky onemocnění, se pitvají a vyjme se jim mozek a orgány k podrobnému vyšetření pro zjištění příčiny úhynu.

Zkouška nelze hodnotit, jestliže během pozorovacího období více než 20 % inokulovaných králíků vykazuje příznaky interkurentní infekce. Monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce, jestliže žádný z králíků nemá příznaky infekce virem B nebo dalšími cizími agens nebo léze jakéhokoliv druhu, které lze přisoudit suspenzi várky.

Při prokázání přítomnosti viru B se provedou opatření týkající se výroby vakcíny uvedené výše v odstavci *Buněčné kultury*.

*Zkouška na morčatech.* Jestliže kultury buněk opicích ledvin nejsou připraveny z opic pocházejících z uzavřených chovů, vyhovují monovalentní spojené sklizeň následující zkoušce. Každému z nejméně pěti morčat o hmotnosti 350 g až 450 g, se podá 0,1 ml monovalentní spojené sklizeň intracerebrálně (0,05 ml do každé cerebrální hemisféry) a 0,5 ml intraperitoneálně. Po 6 týdny se každý pracovní den měří rektálně teplota každému zvířeti. Na konci pozorovacího období se provede pitva každého zvířete.

Navíc se nejméně pěti morčatům podá intraperitoneálně 0,5 ml a 2 až 3 týdny se pozorují, jak je popsáno výše. Na konci pozorovacího období se provede pasáž krve a suspenze jaterní nebo slezinné tkáně nejméně dalším pěti morčatům. Těmto morčatům se po dobu 2 až 3 týdnů měří rektálně teplota. Jestliže dojde po prvním dni k úhynu nebo jsou zvířata utracena pro příznaky onemocnění, provede se pitva. Pitva se provede také v případě, že vykazují po tři za sebou následující dny teplotu vyšší než 40,1 °C; provede se histologické vyšetření k detekci infekce filoviry; navíc se intraperitoneálně podá suspenze jaterní nebo slezinné tkáně nebo krve nejméně třem dalším morčatům. Jestliže se zjistí jakékoliv příznaky infekce filoviry, provede se potvrzující sérologická zkouška z krve postižených zvířat. Monovalentní

lentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % morčat přežije do konce pozorovacího období v dobrém zdravotním stavu a žádné zvíře nemá příznaky infekce filoviry.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více vyhovujících monovalentních spojených sklizní a může obsahovat více než jeden typ viru. Mohou se přidat vhodné ochucující látky a stabilizátory.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři obaly šarže se 48 h udržují při  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ . V zahřáté vakcíně a paralelně v nezahřáté vakcíně, udržované při teplotě doporučené pro skladování, se stanoví celková koncentrace viru postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti. Celková koncentrace viru v obalech zahřáté vakcíny není v průběhu sledování nižší o více než 0,5 log koncentrace viru v obalech nezahřáté vakcíny.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Použitím specifických protilátek se prokáže, že vakcína obsahuje poliomyelitický virus každého typu uvedeného v označení na obalu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří obalů dále popsanou metodou. K validaci každého stanovení se použije jeden obal vhodného referenčního přípravku, stanoví se trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titer se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Jestliže vakcína obsahuje více než jeden typ polioviru, titruje se každý typ odděleně za použití vhodných typově specifických antisér (nebo přednostně monoklonálních protilátek) k neutralizaci ostatních přítomných typů.

Koncentrace viru v každém obalu vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku se vyhodnotí za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3).

Pro trivalentní vakcínu musí být titry virů v jedné lidské dávce:

- nejméně 6,0 log infekčních virových jednotek (CCID<sub>50</sub>) pro typ 1;
- nejméně 5,0 log infekčních virových jednotek (CCID<sub>50</sub>) pro typ 2;
- nejméně 5,5 log infekčních virových jednotek (CCID<sub>50</sub>) pro typ 3.

Pro monovalentní nebo divalentní vakcínu rozhodne o výši minimálního titru oprávněná autorita.

*Postup.* Vhodný počet jamek na mikrotitrační destičce se inokuluje vhodným objemem vybraného ředění viru a následně se přidá vhodný objem suspenze buněk linie Hep-2 (Cincinnati). Kultury se hodnotí mezi 7. dnem až 9. dnem.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ ;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> od stanovené hodnoty; poměr mezi vhodným biologickým referenčním přípravkem Evropského lékopisu a referenčním přípravkem výrobce se nastavuje a sleduje v pravidelných intervalech.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ ; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3).

Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny není větší než  $\pm 0,3 \log \text{CCID}_{50}$ .

*Vakcínu proti poliomyelitidě perorální BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- typy poliomyelitického viru obsažené ve vakcíně;
- minimální množství viru každého typu obsažené v jedné lidské dávce;
- buněčný substrát použitý pro výrobu vakcíny.

## VACCINUM RABIEI EX CELLULIS AD USUM HUMANUM

6.1:0216

Vakcína proti vzteklině připravená v buněčných kulturách pro humánní použití

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodný stabilní kmen viru vztekliny kultivovaný v buněčných kulturách a inaktivovaný validovanou metodou.

Vakcína se těsně před použitím rekonstruuje podle návodu uvedeného v označení na obalu; vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

##### OBEČNÁ USTANOVENÍ

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a, je-li ke kultivaci viru použita buněčná linie, na systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny, které vyhovují požadavkům na imunitu, bezpečnost a stabilitu. Není-li zdůvodněno a schvá-

leno jinak, virus ve vakcíně nesmí projít od matečného inokula více pasážemi, než kolik se jich použilo k přípravě vakcíny, jejíž bezpečnost a účinek byly prokázány v klinických studiích; počet pasáží nad úroveň použitou v klinických studiích nesmí být ani se schválenými výjimkami vyšší než pět.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### *SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU*

Virus se kultivuje v buňkách lidské diploidní linie (5.2.3), v kontinuální buněčné linii schválené oprávněnou autoritou nebo v kulturách kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2).

#### *INOKULA*

Použitý kmen viru vztekliny se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o původu kmene a následném zacházení s ním.

Pracovní inokulum se připraví nejvýše pěti pasážemi od matečného inokula. Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím zkouškám, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé pracovní inokulum se identifikuje jako virus vztekliny za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** K zajištění shodnosti výroby se koncentrace viru v každém pracovním inokulu stanoví metodou buněčné kultury za použití imunofluorescence.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na virová inokula. Jestliže byl virus pasážován v myších mozcích, provedou se specifické zkoušky na myši viry.

#### *KULTIVACE A SKLIZEŇ VIRU*

Všechny činnosti spojené s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do kultivačních médií se může použít schválené zvířecí (nikoliv však lidské) sérum, ale konečné médium pro udržování buněk při multiplikaci viru neobsahuje živočišné sérum; média mohou obsahovat lidský albumin. Sérum a trypsin použité pro přípravu buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro buněčnou kulturu mohou obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá neinfikovaných (kontrolní buňky). Virová suspenze se sklízí jednou nebo vícekrát během inkubace. Více sklizní z téže produkční buněčné kultury se může spojit a považovat za jednu sklizeň.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu inaktivované virové sklizně.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako virus vztekliny za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Infekční virus se stanoví na buněčných kulturách; titrem se sleduje shodnost výroby.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury, z níž se odvozuje jednotlivé sklizně, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na cizí agens (2.6.16).

#### *PURIFIKACE A INAKTIVACE*

Virová sklizeň se může koncentrovat a/nebo purifikovat vhodnými metodami; virová sklizeň se inaktivuje validovanou metodou v pevně definovaném stadiu výroby, které může být před, během nebo po koncentraci nebo purifikaci. Metoda má být prokazatelně schopná inaktivovat virus vztekliny bez zničení imunogenní aktivity. Při použití beta-propiolaktonu nemá jeho koncentrace přesáhnout 1 : 3500. Pouze inaktivovaná virová suspenze, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Zbytkový infekční virus.** Proveďte se kultivační zkouška na zbytkový infekční virus vztekliny ihned po inaktivaci nebo se použije vzorek zmrazený těsně po inaktivaci a skladovaný při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inokuluje se takové množství inaktivované virové suspenze, které odpovídá nejméně dvaceti pěti lidským dávkám vakcíny na buněčné kultury téhož typu, jaký se použil pro výrobu vakcíny. Za 7 dnů se může provést pasáž. Kultury se udržují celkem 21 dnů a následně se zkoušejí na přítomnost viru vztekliny imunofluorescenční zkouškou. Virus vztekliny se nezjistí.

**Zbytková DNA hostitelských buněk.** Jestliže se pro kultivaci viru použije kontinuální buněčná linie, stanoví se obsah zbytkové DNA hostitelských buněk vhodnou metodou, jak je uvedeno v článku *Producta ab ADN recombinante (0784)*; a není větší než 10 ng v jedné lidské dávce.

#### *KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY*

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více inaktivovaných virových suspenzí. Může se přidat schválený stabilizátor k uchování účinnosti přípravku během lyofilizace a po ní.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Obsah glykoproteinu.** Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), např. jednoduchou radiální imunodifuzí, enzymově imunosorbentovým stanovením nebo zkouškou vazby protilátek, se stanoví obsah glykoproteinu. Obsah je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### *ŠARŽE*

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů a lyofilizuje až do obsahu vlhkosti, který zaručuje optimální stabilitu přípravku. Obaly se uzavírají tak, aby se zabránilo kontaminaci a pronikání vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje každému z požadavků uvedených dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkouška Zbytkový infekční virus v inaktivované virové suspenzi a zkouška Bovinní sérumalbumin v konečné várce byly provedeny s vyhovujícími výsledky, mohou se tyto zkoušky u šarže vynechat.

#### *ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI*

Přítomnost antigenu viru vztekliny se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) za použití specifických

protilátek, nejlépe monoklonálních. Alternativně se také stanovení účinnosti použije jako zkouška totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Zbytkový infekční virus.** Množství odpovídající nejméně dvaceti pěti lidským dávkám vakcíny se inokuluje na buněčnou kulturu téhož typu, který se použil pro přípravu vakcíny. Za 7 dnů se může provést pasáž. Kultury se udržují celkem 21 dnů a následně se zkoušejí na přítomnost viru vztekliny imunofluorescenční zkouškou. Virus vztekliny se nezjistí.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce. Obsah se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Sterilita (2.6.1).** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 25 m. j. v jedné lidské dávce.

**Pyrogenní látky (2.6.8).** Vakcína vyhovuje zkoušce, při níž se, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, podá každému králíkovi jedna lidská dávka desetkrát zředěná.

**Voda, semimikrostanovení (2.5.12).** Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Účinnost se stanoví porovnáním dávky nezbytné k ochraně myši proti účinku letální dávky viru vztekliny podané intracerebrálně s množstvím referenčního přípravku nezbytným k vytvoření stejné ochrany. Pro toto porovnání je třeba referenční vakcína kalibrovaná v mezinárodních jednotkách a vhodný virus vztekliny používaný jako čelenžní přípravek. Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Dále uvedená zkouška používá model rovnoběžnosti s nejméně třemi body pro zkoušený přípravek i pro referenční přípravek. Pouze pracovník se zkušenostmi s touto metodou je oprávněn provádět zjednodušenou zkoušku s jedním ředěním zkoušeného přípravku. Taková zkouška dovoluje pracovníkovi určit, že vakcína má účinnost signifikantně vyšší, než je požadované minimum, ale nedává plnou informaci o validitě každého jednotlivého stanovení účinnosti. Použití jednoho ředění umožňuje značně snížit počet zvířat požadovaných pro zkoušku a musí být zvažováno každou laboratoří v souladu s ustanovením Evropské úmluvy o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely.

**Výběr a rozložení zkušebních zvířat.** Používají se zdravé samice myši staré asi 4 týdny o hmotnosti 11 g až 15 g pocházející z jednoho chovu. Myši se rozdělí do šesti skupin o tolika zvířatech, aby byly splněny požadavky na validitu zkoušky. Pro titraci čelenžní suspenze se rozdělí do čtyř skupin po pěti zvířatech.

**Příprava čelenžní suspenze.** Myšim se intracerebrálně inokuluje kmen viru vztekliny čelenžní virový standard (CVS) a když myši vykazují známky vztekliny, ale před jejich úhynem, se humánně usmrtí, vyjmou se mozky a připraví se homogenát mozkové tkáně ve vhodném ředidle. Větší částice se oddělí odstředěním a supernatantní tekutina se použije jako čelenžní suspenze. Suspenze se rozplní v malých objemech do ampulí, které se zataví a uchovávají při teplotě

nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jedna ampule se suspenzí se rozmrazí a připraví se sériová ředění s vhodným ředidlem. Každé ředění se přiřadí skupině pěti myši a každé myši se intracerebrálně podá 0,03 ml příslušného ředění. Myši se pozorují po dobu 14 dnů. Hodnota  $LD_{50}$  neředěné suspenze se vypočítá z počtu zvířat v každé skupině, která vykazují příznaky nebo uhynou na vzteklinu mezi 5. až 14. dnem.

**Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny.** Připraví se tři pětinasobná sériová ředění zkoušeného přípravku a tři pětinasobná sériová ředění referenčního přípravku. Ředění se připraví tak, že u nejkonzentrovějších suspenzí lze očekávat, že ochrání více než 50 % zvířat, kterým se podá, a u nejméně koncentrovaných suspenzí lze očekávat, že ochrání méně než 50 % zvířat, kterým se podá. Každé ze šesti ředění se přiřadí jedné ze šesti skupin zvířat a každé myši se intraperitoneálně podá 0,5 ml toho ředění, které bylo skupině přiděleno. Po 7 dnech se připraví tři identická ředění zkoušeného přípravku a referenčního přípravku a injekce se opakuje. Sedm dnů po druhé injekci se připraví na základě předchozí titrace taková suspenze čelenžního viru, aby 0,03 ml obsahovalo 50  $LD_{50}$ . Intracerebrálně se každé vakcinované myši podá 0,03 ml této suspenze. Připraví se tři vhodná sériová ředění čelenžní suspenze. Čelenžní suspenze a tři ředění se přiřadí čtyřem skupinám po pěti myších. Intracerebrálně se podá každé myši 0,03 ml jednoho ředění přiřazeného skupině. Zvířata všech skupin se pozorují 14 dnů a zaznamenávají se počty zvířat, která vykazovala příznaky nebo uhynula na onemocnění vzteklinou od 5. do 14. dne po čelenži.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže:

- 50% ochranná dávka referenčního přípravku i zkoušeného přípravku je mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou myši;
- titrace čelenžní suspenze prokáže, že 0,03 ml čelenžní suspenze obsahuje nejméně 10  $LD_{50}$ ;
- statistická analýza vykazuje signifikantní sklon a nesignifikantní odchylku linearitu nebo rovnoběžnosti v závislosti dávka/odpověď;
- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 25 % až 400 % stanovené účinnosti.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže stanovená účinnost je nejméně 2,5 m. j. v lidské dávce.

**Použití alternativního koncového bodu.** Některé laboratoře ustanovily pro běžné použití výše uvedeného stanovení účinnosti náhradu letálního koncového bodu pozorováním klinických příznaků a dřívejším ukončením zkoušky než úhynem, aby se snížilo utrpení zvířat. Následující postup je uveden jako příklad.

Postup infekce vzteklinou u myši po intracerebrální injekci se může shrnout do pěti stadií definovaných typickými klinickými příznaky:

stadium 1: naježená srst, vyhrbení;

stadium 2: pomalé pohyby, ztráta ostražitosti (mohou se také pozorovat pohyby v kruhu);

stadium 3: nejisté pohyby, třes, křeče;

stadium 4: příznaky parézy nebo paralýzy;

stadium 5: úhyn.

Myši se pozorují nejméně dvakrát denně od 4. dne po čelenži. Klinické příznaky se zaznamenávají, příklad zázna-



mové karty je uveden v tabulce 1. Zkušenosti ukázaly, že stadium 3 je možné považovat za koncový bod, jehož výsledky jsou stejné, jako při čekání na letální koncový bod.

**Tab. 1** Příklad protokolu pro záznam klinických příznaků ve stanovení účinnosti vakcíny proti vzteklině

Klinické příznaky	Dny po čelení							
	4	5	6	7	8	9	10	11
naježená srst vyhrbení								
pomalé pohyby ztráta ostrážitosti pohyby v kruhu								
nejisté pohyby třes křeče								
paréza paralýza								
úhyn								

Tato metoda se musí v každé laboratoři potvrdit na vhodném počtu stanovení účinnosti provedeném za použití metody jak alternativního, tak i letálního koncového bodu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede biologický původ buněk použitých k přípravě vakcíny.

## VACCINUM ROTAVIRI VIVUM PERORALE

7.3:2417

### Vakcína proti rotaviru živá perorální

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných virových sérotypů, kultivovaných na schváleném buněčném substrátu, upravený do formy vhodné pro perorální podání. Vakcína je čirá kapalina, nebo může být lyofilizovaná a rekonstituuje se těsně před použitím podle návodu na obalu na slabě zakalenou tekutinu, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Vakcinační kmeny a výrobní postup mají prokazatelně poskytovat vakcíny shodné s vakcínou, jejíž účinek a bezpečnost byly klinicky ověřeny na člověku. Vakcína se formuluje tak, aby se zabránilo inaktivaci žaludečních šťáv. Pokud je vakcína lyofilizovaná, nastaví se u rozpouštědla antacidní schopnost a její stabilita.

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a na systému buněčné banky. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus neprojde v konečné vakcíně více pasážemi z matečného inokula než virus použitý k přípravě vakcíny, která vyhověla v klinických studiích z hlediska bezpečnosti a účinku.

Pokud jsou zařazeny postupy purifikace, sleduje se pro stanovení shodnosti purifikačního postupu pokles vybraných nečistot vztahujících se k postupu a zbytkových nečistot, jako je zbytková bílkovina hostitelských buněk, zbytková buněčná DNA, endotoxiny, bovinní sérum, trypsin a antibiotika.

#### REFERENČNÍ PŘÍPRAVEK

Pro zkoušku stanovení virové koncentrace se určí vhodný referenční přípravek, který je reprezentativní vzhledem k šarži, která vyhověla v klinických studiích z hlediska účinku. Vzhledem k rozdílům ve složení a charakteristikách rotavirových vakcín, bude pro každou z vakcín specifický referenční přípravek.

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje ve vhodné buněčné linii (5.2.3).

#### INOKULA VIRU

Kmen (kmeny) rotavirů se mají identifikovat na základě vývojových záznamů, které zahrnují informace o původu kmene a následném zacházení s ním, včetně metody oslabení, informace, zda byly kmeny biologicky klonovány před vytvořením matečného inokula, informace o sekvenci genů, o fenotypové a genotypové stabilitě matečného a pracovního inokula, o pasážování na jednotlivou sklizeň a úrovni pasáže, při které bylo oslabení pro člověka prokázáno klinickými studiemi. Inokulum viru se skládá při teplotě pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pokud je lyofilizované, nebo při teplotě pod  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pokud není lyofilizované.

Pouze inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečné a pracovní inokulum se identifikuje jako odpovídající typu rotaviru imunologickými metodami za použití specifických protilátek nebo zkoušky molekulární identity, jako je elektroforéza RNA v polyakrylamidovém gelu, RNA/RNA hybridizace, nebo restrikční enzymové mapování sekvencí genů polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) amplifikací VP7 segmentů genu.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se v matečném a pracovním inokulu stanoví koncentrace viru. Mohou se použít přímé metody založené na buněčné kultivaci a technikách amplifikace nukleových kyselin (2.6.21), jako je kvantifikace replikací viru v buněčné kultuře polymerasovou řetězovou reakcí.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula pro virové vakcíny.

#### KULTIVACE VIRU, JEDNOTLIVÁ SKLIZEŇ, MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ

Veškeré práce s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí v aseptických podmínkách v prostorech, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě pro kultivaci buněk se může použít vhodné zvířecí sérum (ni-

koliv lidské), ale konečné médium pro udržování buněčného růstu během multiplikace viru zvířecí sérum neobsahuje. Sérum a trypsin použité při přípravě buněčných suspenzí a kultivačních médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červená fenolová, a vhodná antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Přednostně se používá substrát bez antibiotik.

#### *KULTURA VIRU SKLADOVANÁ JAKO MEZIPRODUKT*

Pokud se kultura viru skladuje jako meziprodukt, ponechá se v den inokulace pracovním virovým inokulem nejméně 5 % nebo 500 ml použitých buněčných kultur (podle toho, co je více) jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). Kultura viru skladovaná jako meziprodukt se sklídí v dobu vhodnou pro kmen viru a skladuje se při teplotě pod  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze kultura viru skladovaná jako meziprodukt, která odpovídá následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt se identifikuje podle typu rotaviru imunologickými metodami za použití specifických protilátek nebo zkoušky molekulární identity, jako jsou techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru v každé kultuře viru skladované jako meziprodukt se stanoví, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se monitorovala shodnost výroby. Mohou se použít přímé metody založené na buněčné kultivaci a technikách amplifikace nukleových kyselin (2.6.21), jako je kvantifikace replikace viru v buněčné kultuře polymerasovou řetězovou reakcí.

**Cizí agens (2.6.16).** Každá kultura viru skladovaná jako meziprodukt vyhovuje požadavkům zkoušky na cizí agens.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z kultury produkčních buněk, ze kterých je odvozena kultura viru skladovaná jako meziprodukt, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

#### *KULTIVACE A JEDNOTLIVÁ SKLIZEŇ VIRU*

Buněčné kultury určené k výrobě vakcíny se v den inokulace viru z pracovního inokula nebo viru skladovaného jako meziprodukt ponechávají jako neinfikovaná buněčná kultura (kontrolní buňky). Pokud se používá bioreaktorová technologie, je velikost buněčných vzorků a zacházení s nimi schváleno oprávněnou autoritou. Virové suspenze se sklídí v dobu vhodnou pro použitý kmen viru.

Pouze jednotlivá sklizeň viru vyhovující následujícím požadavkům se může použít k dalšímu zpracování.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Každá jednotlivá sklizeň viru vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky z produkční kultury, ze kterých je odvozena jednotlivá sklizeň, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

#### *MONOVALENTNÍ SPOJENÁ SKLIZEŇ*

Monovalentní spojená sklizeň se připraví spojením jednotlivých sklizní téhož typu viru. Jestliže se monovalentní spojená sklizeň nepřipravuje, použijí se dále uvedené zkoušky pro každou jednotlivou sklizeň.

Pouze jednotlivá sklizeň nebo monovalentní spojená sklizeň, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít k přípravě monovalentní purifikované sklizně.

**Totožnost.** Každá jednotlivá sklizeň nebo monovalentní spojená sklizeň se identifikuje podle typu rotaviru imunologickými metodami za použití specifických protilátek nebo zkoušky molekulární identity, jako jsou techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Každá jednotlivá sklizeň nebo monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru v každé jednotlivé sklizni nebo monovalentní spojené sklizni se stanoví, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se monitorovala shodnost výroby. Mohou se použít obě metody, založené na buněčné kultivaci i na technikách amplifikace nukleových kyselin (2.6.21), jako je kvantifikace replikace viru v buněčné kultuře polymerasovou řetězovou reakcí.

**Cizí agens (2.6.16).** Každá jednotlivá sklizeň nebo monovalentní spojená sklizeň vyhovuje požadavkům zkoušky na cizí agens.

#### *PURIFIKOVANÁ MONOVALENTNÍ SKLIZEŇ*

Purifikovaná monovalentní sklizeň se připraví z jednotlivé sklizně nebo monovalentní spojené sklizně. Jednotlivá sklizeň nebo monovalentní spojená sklizeň se vyčistí od buněčných zbytků a může se dále purifikovat.

Pouze purifikovaná monovalentní sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Purifikovaná monovalentní sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru v purifikované monovalentní sklizni se stanoví, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se monitorovala shodnost výroby. Mohou se použít obě metody, založené na buněčné kultivaci i na technikách amplifikace nukleových kyselin (2.6.21), jako je kvantifikace replikace viru v buněčné kultuře polymerasovou řetězovou reakcí.

**Zbytková buněčná DNA.** Nejvýše 100  $\mu\text{g}$  buněčné DNA v jedné lidské dávce pro viry kultivované v kontinuálních buněčných liniích.

#### *KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY*

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více vyhovujících purifikovaných monovalentních sklizní a může obsahovat více než jeden typ viru. Mohou se přidat vhodné stabilizátory.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít k přípravě šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů a může se lyofilizovat do obsahu vlhkosti, který byl shledán vhodným pro stabilitu vakcíny. Obaly se potom uzavřou tak, aby se zabránilo kontaminaci a přístupu vlhkosti.

Schválená nejnižší koncentrace viru pro propouštění se určí na základě stabilitních údajů pro každý virus tak, že se pomocí stabilitních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu.

Pro lyofilizované vakcíny se zkoušky totožnosti, hodnota pH, objem, sterilita a obsah klíčových složek provedou za použití rozpouštědla.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři obaly šarže vakcíny se po definované dobu udržují při zvýšené teplotě za použití podmínek, které byly shledány jako vhodné pro zamýšlený přípravek a byly schváleny oprávněnou autoritou. V zahřáté vakcíně a paralelně v nezahřáté vakcíně udržované při teplotě doporučené pro skladování se stanoví koncentrace viru způsobem popsáným v odstavci Stanovení účinnosti. Koncentrace viru v obalech zahřáté vakcíny nepoklesne v průběhu sledování o více než o povolené množství. U vícevalentní vakcíny, pokud není podstatný rozdíl ve ztrátě viru mezi jednotlivými sérotypy, se může ztráta určit z celkové koncentrace viru.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přítomnost každého typu rotaviru uvedeného v označení na obalu se ve vakcíně prokáže imunologickou zkouškou za použití specifického antigenu nebo molekulární zkouškou. Jestliže se ke stanovení účinnosti použije polymerasová řetězová reakce, může se použít jako zkouška totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 % pro každou konečnou šarži lyofilizované vakcíny.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Stanovení účinnosti vakcíny proti rotaviru se provádí inokulací zředěné vakcíny do vhodných buněčných kultur a vyhodnocením koncentrace rotaviru buď vizualizací infektovaných ploch jednovrstvé kultury buněk (monolayer), nebo porovnáním schopnosti vakcíny vytvořit virovou RNA následující infekci buněk s odpovídající schopností schváleného referenčního přípravku.

*Pro stanovení založené na vizualizaci infektovaných ploch jednovrstvé kultury buněk* se provádí titrace infekčního viru vakcíny za použití nejméně tří jednotlivých obalů. K validaci každého stanovení se jeden obal vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Pokud vakcína

obsahuje více než jeden typ viru, titruje se každý typ odděleně za použití metod vhodné specifity. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titer se stanoví na základě záznamů každé laboratoře.

Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každém obalu vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3 \log$  CCID<sub>50</sub> (nebo ekvivalentní hodnotu vyjádřenou v jednotkách vhodných pro stanovení účinnosti);
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než  $0,5 \log$  CCID<sub>50</sub> (nebo o ekvivalentní hodnotu vyjádřenou v jednotkách vhodných pro stanovení účinnosti) od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3 \log$  CCID<sub>50</sub> (nebo ekvivalentní hodnotu vyjádřenou v jednotkách vhodných pro stanovení účinnosti); pouze výsledky platných stanovení účinnosti se sloučí a vyhodnotí se za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3 \log$  CCID<sub>50</sub> (nebo ekvivalentní hodnotu vyjádřenou v jednotkách vhodných pro stanovení účinnosti).

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

*Pro stanovení založené na porovnání schopnosti vakcíny tvořit virovou RNA v buňkách infikovaných virem s odpovídající schopností schváleného referenčního přípravku* se vhodný počet buněčných kultur na mikrotitrační destičce souběžně infikuje sériovými ředěními vakcíny a referenčního přípravku. Po inkubaci, aby se umožnila replikace viru, se virová RNA uvolněná z buněk v jednotlivých jamkách kvantifikuje technikami amplifikace nukleových kyselin (2.6.21), jako je metoda kvantitativní reakce reverzního transkriptasového řetězce (RT-PCR).

Stanovení se provádí za použití nejméně tří obalů vakcíny proti jednomu obalu vhodného referenčního přípravku, stanoví se trojmo.

Koncentrace viru vakcíny v každém obalu, stejně jako celková koncentrace viru, se vypočítá proti referenčnímu přípravku za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3).

Celkový titer virů ve třech obalech není menší, než je uvedeno v označení na obalu.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže:

- negativní kontroly externí amplifikace nukleových kyselin jsou jednoznačně negativní;
- pozitivní kontroly externí amplifikace nukleových kyselin jsou jednoznačně pozitivní;
- negativní kontroly matrixu (neinfikovaných buněk) jsou jednoznačně negativní;

- pozitivní kontroly matrixu (buněk obohacených virovou RNA) jsou jednoznačně pozitivní;
- při statistickém hodnocení vykazuje křivka závislosti od povědi na dávce významný sklon a nevykazuje signifikantní odchylku od linearitu nebo rovnoběžnosti.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log infekčních jednotek; pouze výsledky platných stanovení účinnosti se vyhodnotí za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3$  log infekčních jednotek.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- typ nebo typy rotaviru obsažené ve vakcíně;
- minimální množství viru každého typu obsažené v jedné lidské dávce;
- buněčný substrát použitý pro výrobu vakcíny.

## VACCINUM RUBELLAE VIVUM

6.7:0162

### Vakcína proti zarděnkám živá

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující suspenzi vhodného atenuovaného kmene zarděnkového viru. Vakcína se rekonstituuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na obalu. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

#### VÝROBA

Výroba je založena na systému jednotné inokulace a buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodnou živou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Není-li zdůvodněno a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprošel od matečného inokula více pasážemi, než kolik se jich použilo k přípravě vakcíny, jejíž bezpečnost a účinek byly prokázány v klinické studii.

V průběhu preklinického vývoje se bere v úvahu potenciální neurovirulence vakcinačního kmene založená na dostupných epidemiologických údajích týkajících se neurovirulence a neurotropismu, především pro divoký kmen viru. Na základě toho se provede analýza rizik. Je-li třeba a je-li to možné, provede se zkouška vakcinačního kmene za použití zvířecího modelu, který odliší divoký kmen viru od atenuovaného viru; mohou být také potřebné zkoušky na středně atenuované kmeny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoseru a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3).

#### VIROVÉ INOKULUM

Kmen použitého zarděnkového viru se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informaci o jeho původu a následném zacházení s ním. Virová inokula se připraví ve velkém množství a uchovávají se lyofilizovaná při teplotě

nižší než  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo, pokud nejsou lyofilizovaná, nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze virové inokulum vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro kultivaci viru

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako zarděnkový virus sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula.

#### KULTIVACE VIRU A SKLIZEŇ

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě médií pro kultivaci se může použít vhodné zvířecí sérum (nikoliv lidské sérum), ale konečné médium pro udržování růstu buněk při kultivaci viru neobsahuje žádné zvířecí sérum. Sérum a trypsin, používané při přípravě buněčných suspenzí a médií, jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a vhodná antibiotika o nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). V průběhu kultivace viru se kontroluje teplota inkubace a za 28 dnů od inokulace nebo dříve se sklízí virus, a to najednou, nebo opakovaně. Opakované sklizeně viru z jedné buněčné kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň.

Pouze jednotlivá sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň viru obsahuje virus, který se identifikuje jako zarděnkový virus sérum neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a k určení ředění pro konečnou várku vakcíny se stanoví koncentrace viru v jednotlivé sklizni postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkouškám na nepřítomnost cizích agens.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky vyhovují zkoušce Totožnosti a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Jednotlivé sklizeně, které vyhovují výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří se, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizeně se příslušně naředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít k přípravě šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Nejnižší koncentrace viru pro propuštění přípravku se určí tak, že se pomocí stabilitních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla ve vakcíně nejméně koncentrace uvedená v označení na obalu.

Pouze konečná šarže, která vyhovuje požadavkům na nejnižší virovou koncentraci pro propuštění, následujícímu požadavku na tepelnou stabilitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Tepelná stabilita.** Nejméně tři lahvičky šarže lyofilizované vakcíny v suchém stavu se udržují 7 dnů při  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Souběžně se stanoví koncentrace viru způsobem popsáným v odstavci Stanovení účinnosti ve vzorku zahříváné a nezahříváné vakcíny uchovávané při teplotě doporučené pro skladování. Koncentrace viru v zahříváné vakcíně je nejvýše o 1,0 log nižší než koncentrace viru v nezahříváné vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu smíchá se specifickými zarděnkovými protilátkami, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří lahviček vakcíny, inokuluje se vhodný počet jamek pro každé ředění. K validaci každého stanovení se jedna lahvička vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Pokud se používá referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvičce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Proveďte se statistické porovnání. Titry virů ze tří lahviček nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu; minimální koncentrace uvedená v označení na obalu je nejméně 3,0 log CCID<sub>50</sub> v jedné lidské dávce.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log CCID<sub>50</sub> od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3$  log CCID<sub>50</sub>.

Vakcínu proti zarděnkám živou BRP je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM TETANI ADSORBATUM

6.0:0452

### Vakcína proti tetanu adsorbovaná

#### DEFINICE

Je to tetanický toxoid adsorbovaný na minerální adsorbent. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury *Clostridium tetani*.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Specifická neškodnost. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví následující zkoušce: každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým nebyla předtím podána žádná látka, jež by mohla ovlivnit zkoušku, se podá subkutánně pětinasobek jedné lidské dávky uvedené v označení na obalu. Jestliže se u některého ze zvířat během 21 dnů po injekci projeví příznaky tetanu nebo na něj zvíře uhyne, vakcína nevyhovuje zkoušce. Pokud z nesespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, vakcína nevyhovuje zkoušce.

##### VÁRKA PURIFIKOVANÉHO TOXOIDU

Výroba tetanického toxinu, ze kterého se připravuje toxoid, vychází z matečné kultury udržované v definovaném systému jednotné inokulace se zachovanou toxinogenitou a kde je třeba, obnovuje se novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Clostridium tetani* známého původu a vývoje se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Asepticky se shromáždí živné půdy obsahující toxin. Pro sledování shodnosti výroby se kontroluje (2.7.27) obsah toxinu (Lf v ml). Jednotlivé sklizeně se mohou pro přípravu várky purifikovaného toxoidu spojit. Toxin se purifikuje, aby se odstranily složky, které by mohly u člověka způsobit nežádoucí vedlejší účinky. Purifikovaný toxin se detoxikuje formaldehydem metodou, která vyloučí poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětnou přeměnu na toxin, zvláště působením tepla. Purifikaci je také možné provést až po detoxikaci.

Pouze várka purifikovaného toxoidu, který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Sterilita** (2.6.1). Proveďte se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Nepřítomnost tetanického toxinu a nevratnost toxoidu.** Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro vakcínu, ale bez adsorbentu, se připraví takové ředění purifikovaného toxoidu, které odpovídá koncentraci ve vakcíně a rozdělí se na dva stejné díly. Jeden se udržuje při teplotě  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  a druhý šest týdnů při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Obě ředění se zkouší dále uvedeným postupem. Pro zkoušku se použije 15 zdravotních morčat o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým předtím nebyla podána žádná látka, jež by mohla ovlivnit zkoušku. Každému z pěti morčat první skupiny se podá subkutánně 5 ml naředěného roztoku udržovaného při teplotě  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , každému z pěti morčat další skupiny se podá subkutánně 5 ml naředěného roztoku udržovaného při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a každému z pěti morčat poslední skupiny se podá subkutánně nejméně 500 Lf neinkubované várky purifikovaného toxoidu v objemu 1 ml. Várka purifikovaného toxoidu vyhovuje zkoušce, jestliže se u žádného ze zvířat během 21 dnů po injekci neprojeví příznaky tetanu a nebo na něj žádné zvíře neuhyne. Pokud z nespecifických příčin uhne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje zkoušce.

**Antigenní čistota (2.7.27).** Nejméně 1000 Lf na miligram bílkovinného dusíku.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství purifikovaného tetanického toxoidu na minerální nosič, jako je např. hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Mohou se přidat vhodné protimikrobní látky. Některé protimikrobní látky, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu, a nesmí se tedy použít.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

**Protimikrobní látka.** 85 % až 115 % zamýšleného množství. Kde je to vhodné, stanoví se vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky Protimikrobní látka a Stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Pokud byla zkouška Volný formaldehyd provedena u várky purifikovaného toxoidu nebo u konečné várky vakcíny a bylo prokázáno, že jeho obsah u hotové šarže nebude vyšší než 0,2 g/l, může se tato zkouška u šarže vypustit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Provede se zkouška totožnosti vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Následující metoda, vhodná pro některé vakcíny, je uvedena jako příklad. Ve zkoušené vakcíně se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsled-

ná koncentrace byla 100 g/l. Udrží se 16 h při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a pak se odstředí, dokud se nezíská čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným tetanickým anti-toxinem za vzniku precipitátu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hliník (2.5.13).** Nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud se jako adsorbent použije hydroxid hlinitý nebo hydratovaný fosforečnan hlinitý.

**Volný formaldehyd (2.4.18).** Nejvýše 0,2 g/l.

**Protimikrobní látka.** Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % množství uvedeného v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se obsah protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (2.7.8).

Dolní mez spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené účinnosti je nejméně 40 m. j. v jedné lidské dávce.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce;
- název a množství adsorbentu;
- že vakcína se musí před použitím roztřepat;
- že vakcína nesmí zmraznout.

## VACCINUM TUBERCULOSIS (BCG) CRYODESICCATUM

7.3:0163

### Vakcína proti tuberkulóze (BCG) lyofilizovaná

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující živé bakterie získané z kultury bacila Calmettova a Guérinova (*Mycobacterium bovis* BCG), jehož schopnost chránit proti tuberkulóze byla prokázána.

#### VÝROBA

##### VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Vakcínu vyrábí pracovní skupina složená ze zdravých osob, které nepracují s jiným infekčním agens; především nemají pracovat s virulentními kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, ani nemají být vystaveni známému riziku nákazy tuberkulózou. Pracovníci jsou pravidelně vyšetřováni na tuberkulózu. Přípravek je citlivý na sluneční světlo: postupy jeho výroby jsou uspořádány tak, aby všechny kultury a vakcíny byly chráněny před přímým slunečním světlem a ultrafialovým zářením při všech stupních výroby, zkoušení a skladování.

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup má prokazatelně zajišťovat výrobu shodných vakcín, které u člověka vyvolávají odpovídající senzibilizaci na tuberkulin, které mají přijatelnou ochrannou účinnost na zvířatech a jsou bezpečné. Vakcína se připravuje z kultur pocházejících z matečného inokula při co nejmenším mož-

ném počtu dílčích pomnožení, v každém případě nejvýše z osmi. Během těchto pomnožení se přípravek lyofilizuje nejvýše jedenkrát.

Použije-li se bioluminiscenční zkouška nebo jiná biochemická metoda místo stanovení počtu životaschopných zárodků, validuje se metoda pro každý stupeň výrobního procesu, ve kterém se použije, proti metodě stanovení počtu životaschopných zárodků.

#### BAKTERIÁLNÍ INOKULA

Kmen pro matečné inokulum se vybere a udržuje tak, aby se zachovaly jeho charakteristiky, jeho schopnost senzibilizovat člověka na tuberkulin a chránit zvířata proti tuberkulóze a také aby byl relativně nepatogenní pro člověka a laboratorní zvířata. Vlastnosti použitého kmene se mají doložit vývojovými záznamy o jeho původu a dalším zacházení s ním.

Z primární pracovní kultury se připraví vhodná šarže vakcíny, která se uchovává jako porovnávací vakcína. Je-li připraveno nové pracovní inokulum, provedou se se šarží vakcíny z něho připravené vhodné zkoušky na pozdní přecitlivělost na morčatech; šarže vakcíny se prokazatelně neliší ve své účinnosti od porovnávací vakcíny. Provede se také zkouška citlivosti na protimikrobní látky.

Pouze pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se použije pro pomnožování.

**Totožnost.** Mikrobiologickými metodami nebo metodami molekulární biologie (např. technika amplifikace nukleových kyselin nebo rozdílů délky restrikčních fragmentů) se prokáže, že bakterie v pracovním inokulu jsou *Mycobacterium bovis* BCG.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml. Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce na sterilitu, kromě přítomnosti mykobakterií.

**Virulentní mykobakterie.** Pracovní inokulum se zkouší postupem uvedeným ve Zkouškách na čistotu; použije se deset morčat.

#### POMNOŽOVÁNÍ A SKLIZEŇ

Bakterie se pomnoží ve vhodné živné půdě nejdéle 21 dnů v povrchové nebo hloubkové kultuře. Živná půda neobsahuje složky, o nichž je známo, že u člověka způsobují toxickou nebo alergickou reakci nebo že způsobují přeměnu bakterií na kmen virulentní pro morčata. Kultura se sklídí a suspenduje se ve sterilní živné půdě, která chrání životnost vakcíny, což se určí vhodnou metodou stanovení počtu životaschopných zárodků.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Konečná várka vakcíny se připraví z jednotlivé sklizně nebo spojením jednotlivých sklizní. Může se přidat stabilizátor; jestliže stabilizátor ruší stanovení koncentrace bakterií v konečné várce vakcíny, provede se toto stanovení ještě před přidáním stabilizátoru.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se použije pro přípravu šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu kromě přítomnosti mykobakterií.

**Počet životaschopných zárodků.** Počet životaschopných zárodků v rekonstituované vakcíně se stanoví na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušenou vakcínu nebo vhodnou biochemickou metodou. Současně se provede toto stanovení s referenčním přípravkem stejného kmene.

**Koncentrace bakterií.** Celková koncentrace bakterií se stanoví vhodnou metodou buď přímo stanovením bakteriální hmoty, nebo nepřímo zákalovou metodou kalibrovanou podle množství mikroorganismů. Je-li bakteriální koncentrace stanovena před přidáním stabilizátoru, stanoví se koncentrace v konečné várce vakcíny přepočtem. Celková koncentrace bakterií je v rozmezí schváleném pro daný přípravek.

Poměr počtu životaschopných zárodků k celkové koncentraci bakterií není nižší než poměr schválený pro daný přípravek.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se rozplní do sterilních obalů a lyofilizuje se tak, aby zbytková vlhkost byla vhodná pro stabilitu vakcíny; obaly se uzavřou buď ve vakuu, nebo v atmosféře inertního plynu.

Doba použitelnosti může být nejvýše 4 roky od data sklizně kromě případu, kdy se naplněné a uzavřené obaly skladují při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší.

Pouze konečná šarže, která vyhovuje dále uvedeným požadavkům na počet životaschopných zárodků a jednotlivým požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení počtu zárodků, se může uvolnit k použití. Jestliže zkouška Virulentní mykobakterie byla u konečné várky vakcíny provedena s vyhovujícím výsledkem, může se u šarže vynechat. Je-li provedena zkouška Nadměrná kožní reaktivita s vyhovujícím výsledkem u pracovního inokula a u pěti po sobě následujících šarží z něho připravených, je možno tuto zkoušku u šarže vynechat.

**Počet životaschopných zárodků.** Počet životaschopných zárodků v rekonstituované vakcíně se stanoví na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušenou vakcínu nebo vhodnou biochemickou metodou. Poměr počtu životaschopných zárodků před a po lyofilizaci není nižší než hodnota schválená pro daný přípravek.

**Tepelná stabilita.** Obaly obsahující šarži lyofilizované vakcíny v suchém stavu se ponechají čtyři týdny při teplotě  $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V zahřáté vakcíně a paralelně v nezahřáté vakcíně, udržované při teplotě doporučené pro skladování, se stanoví počet životaschopných zárodků postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti. Počet životaschopných zárodků v zahřáté vakcíně není menší než 20 % počtu životaschopných zárodků v nezahřáté vakcíně.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost zkoušeného přípravku se prokáže mikroskopickým vyšetřením přítomnosti acidorezistentních bacilů v obarvených nátěrech a růstem kolonií charakteristického vzhledu při pomnožení na pevných půdách. Alternativně se mohou použít metody molekulární biologie (např. amplifikace nukleových kyselin).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Virulentní mykobakterie.** Každému ze šesti morčat hmotnosti 250 g až 400 g, jimž nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit tuto zkoušku, se subkutánně nebo intramuskulárně podá množství vakcíny odpovídající nejméně padesáti lidským dávkám. Zvířata se pozorují nejméně 42 dnů. Po uplynutí této doby se morčata šetrně usmrtí a při pitvě se vyšetří na známky infekce tuberkulózou. Menší reakce v místě vpichu se nehodnotí. Zvířata, která uhynou během sledovaného období, se také vyšetřují na tuberkulózu. Vakcína vyhovuje zkoušce, pokud žádné z morčat nevykazuje známky tuberkulózy a pokud během sledovaného období neuhyne více než jedno morče. Jestliže během sledované doby uhynou dvě morčata a pitvou se neprokáže tuberkulóza, zkouška se opakuje na dalších šesti morčatech. Vakcína vyhovuje, jestliže během 42 dní po podání neuhyne více než jedno morče a pitva neprokáže žádné známky tuberkulózy.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1), kromě přítomnosti mykobakterií.

**Nadměrná kožní reaktivita.** Použije se šest zdravých bílých nebo světle zbarvených morčat hmotnosti nejméně 250 g, jimž nebyla podána žádná látka, která by mohla tuto zkoušku ovlivnit. Podle randomizačního plánu se každému morčeti intradermálně podá 0,1 ml rekonstituované vakcíny a dalších dvou desetinasobných sériových ředění a stejné dávky porovnávací vakcíny. Léze v místě podání se sledují čtyři týdny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže reakce, které vyvolala, se výrazně neliší od reakcí vyvolaných porovnávací vakcínou.

**Voda.** Stanoví se vhodnou metodou. Vyhovuje limitům schváleným pro daný přípravek.

## STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Počet životaschopných zárodků v rekonstituované vakcíně se stanoví na pevně živné půdě metodou vhodnou pro zkoušenou vakcínu nebo vhodnou validovanou biochemickou metodou. Počet je v rozmezí uvedeném v označení na obalu. Současně se stanoví počet životaschopných zárodků v porovnávací vakcíně.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- minimální a maximální počet životaschopných zárodků v mililitru rekonstituované vakcíny;
- že vakcína se musí chránit před přímým slunečním světlem.

## VACCINUM VARICELLAE VIVUM

7.0:0648

Vakcína proti planým neštovicím živá

## DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek obsahující vhodný atenuovaný kmen lidského herpesviru 3. Vakcína se rekonstruuje těsně před použitím podle návodu uvedeného v označení na oba-

lu. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

## VÝROBA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a na systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodnou živou vakcínu proti planým neštovicím přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Virus v konečné vakcíně nemá projít více pasážemi v buněčných kulturách než je definovaný počet pasáží schválený oprávněnou autoritou u původně izolovaného viru.

V průběhu preklinického vývoje se bere v úvahu potenciální neurovirulence vakcinačního kmene založená na dostupných epidemiologických údajích týkajících se neurovirulence a neurotropismu, především pro divoký kmen viru. Na základě toho se provede analýza rizik. Je-li třeba a je-li to možné, provede se zkouška vakcinačního kmene za použití zvířecího modelu, který odliší divoký kmen viru od atenuovaného viru; mohou být také potřebné zkoušky na středně atenuované kmeny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

## SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3).

## VIROVÉ INOKULUM

Kmen lidského herpesviru 3 se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informaci o jeho původu a následném zacházení s ním. Virus se nikdy nemá pasážovat v kontinuální buněčné linii. Inokula se připravují na stejném druhu buněk, jaký se použije při výrobě konečné vakcíny. Virová inokula se připraví ve velkém množství a uchovávají se lyofilizovaná při teplotě nižší než  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo, pokud nejsou lyofilizovaná, nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pouze virové inokulum vyhovující následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako lidský herpesvirus 3 sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula živých virových vakcín; pro zkoušku v buněčných kulturách se použije 50 ml vzorku.

## KULTIVACE VIRU A SKLIZENĚ

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky nebo viry. Při přípravě médií pro kultivaci se může přidat schválené zvířecí sérum (nikoliv lidské sérum). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a kultivačních médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červené fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky) se uchovává 5 % buněk použitých k výrobě vakcí-



ny, nejméně však 50 ml. Infikované buňky tvořící jednotlivou sklizeň se promyjí, uvolní se z povrchu podložky a smíchají se. Buněčná suspenze se lyzuje ultrazvukem.

Pouze jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako lidský herpesvirus 3 sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a k určení ředění pro konečnou várku vakcíny se stanoví koncentrace viru v jednotlivé sklizni postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Pro zkoušku v buněčných kulturách se použije 50 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury, z níž se odvozuje jednotlivá sklizeň, vyhovují zkoušce Totožnosti a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Sklizně viru, které vyhověly výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se zředí vhodným způsobem.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml. Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze konečná šarže, která vyhovuje zkoušce Voda a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s uspokojivým výsledkem na konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše množství prokazatelně zajišťující stabilitu vakcíny, které bylo schváleno oprávněnou autoritou.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů v označení na obalu smíchá se specifickými protilátkami proti lidskému herpesviru 3, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 0,5 µg v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří lahviček vakcíny. K validaci každého stanovení se

jedna lahvička vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titr se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Pokud se používá referenční přípravek výrobce, v pravidelných intervalech se nastavuje a sleduje jeho poměr ke vhodnému biologickému referenčnímu přípravku Evropského lékopisu. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvičce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů ze tří lahviček vakcíny nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3$  log PFU;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log PFU od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3$  log PFU; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3$  log PFU.

*Vakcínu proti planým neštovicím živou BRP* je vhodné použít jako referenční přípravek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky.

## VACCINUM VARIOLAE VIVUM

7.3:0164

### Vakcína proti neštovicím živá

#### DEFINICE

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující živý virus vacciniae kultivovaný *in ovo* na membránách kuřecích embryí, na buněčných kulturách nebo v kůži živých zvířat. Tento článek se vztahuje na vakcíny vyráběné z kmenů, u kterých je potvrzen účinek u člověka, zvláště kmenů používaných při eradikaci neštovic, např. Lister (někdy uváděný jako Lister/Elstree kmen) a NYCBOH (New York City Board of Health) kmen. Nevztahuje se na nereplikující kmény, např. MVA (Modified Virus Ankara) kmen.

## VÝROBA

## VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné vakcíny proti neštovicím s odpovídající bezpečností a imunogenitou pro člověka. Použitý kmen má u člověka prokazatelně tvořit typické kožní léze vaccinie. Výroba je založena na systému jednotné inokulace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunoser a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

Pro titraci viru je vhodné použít jako referenční přípravek mezinárodní referenční přípravek vakcíny proti neštovicím.

## SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**Zvířata použitá pro výrobu vakcín odvozených z kůže.**

Pokud se vakcína připravuje v kůžích zvířat, použijí se zvířata druhu schváleného oprávněnou autoritou zdravá a chovaná v uzavřených nebo intenzivně monitorovaných chovech, která nebyla dříve použita k pokusným účelům. Pro výrobu vakcíny se mohou použít pouze zvířata vnímavá k infekci virem vaccinie inokulací do kůže.

Zvířata se chovají ve stavebně vhodných a náležitě větraných místnostech, v klecích umístěných co nejdále od sebe. Přijmou se odpovídající opatření k předcházení přenosu infekce mezi klecemi. Ve stání se umístí jen jedno velké zvíře. Do jedné klece se umístí nejvýše dvě malá zvířata a obsazení klecí se nemění. V zemi výroby vakcíny se zvířata musí držet v karanténě nejméně 6 týdnů před použitím. Jestliže dojde během karanténního období ve skupině k úhynu více jak 5 % zvířat, žádné zvíře z této skupiny se nesmí použít pro výrobu vakcíny.

Jednotlivé skupiny se drží nepřetržitě v izolaci jak v karanténě, tak i po ukončení karanténního období, až do jejich použití. Po použití posledního zvířete ze skupiny se místnost, kde byla skupina ustájena, důkladně vyčistí a dekontaminuje před dodávkou nové skupiny.

Zvířata použitá k inokulaci se anestetizují a důkladně vyšetří. Pokud některé zvíře vykazuje jakékoliv patologické léze, nepoužije se k přípravě inokula ani vakcíny a ani ostatní zvířata z této karanténní skupiny se nemohou použít, pokud není zřejmé, že jejich použití nesníží bezpečnost výrobku.

Přijátá profylaktická a diagnostická opatření k vyloučení infekčního onemocnění schvaluje oprávněná autorita. Tato opatření se mohou lišit podle druhu použitých zvířat a nemocí, kterými bývají zvířata postižena v zemi, kde se vakcína vyrábí. Uvážit se musí také nebezpečí přenosu onemocnění do ostatních zemí, kam se vakcína bude dodávat. Zvláštní pozornost se musí věnovat slintavce a kulhavce, brucelóze, Q-horečce, tuberkulóze a dermatomykózám a může se také třeba uvažovat i o infekční pustulární dermatitidě, antraxu, moru skotu, hemoragické septikémii, horečce údolí Rift a dalších.

**Embryonovaná vejce.** Jestliže se pro výrobu použijí embryonovaná vejce, získávají se z chovů prostých specifických patogenů (SPF) (5.2.2).

**Lidské diploidní buňky, kontinuální buněčné linie.** Lidské diploidní buňky a kontinuální buněčné linie vyhovují požadavkům na buněčné substráty (5.2.3).

**Primární buňky kuřecích embryí.** Primární buňky kuřecích embryí jsou odvozeny z SPF chovů (5.2.2).

**Primární buňky králíciích ledvin.** Použijí se pouze zdraví králíci pocházející z uzavřených chovů schválených oprávněnou autoritou. Zvířata, přednostně ve stáří 2 týdny až 4 týdny, se zkouší na nepřítomnost specifických patogenů nebo protilátek proti nim.

Jestliže se do chovu přidávají nová zvířata, drží se nejméně 2 měsíce v karanténě a prokáže se, že jsou prostá specifickými patogeny. Zvířata, ze kterých se odeberou ledviny, nesmějí být předtím použita k pokusným účelům, zejména ne pro práci s infekčními agens. V pravidelných intervalech se chov vyšetřuje na přítomnost zoonotických virů a na markery kontaminace.

Při založení chovu se všechna zvířata zkouší na nepřítomnost protilátek proti možným virovým kontaminantům schopným infikovat člověka nebo se replikovat *in vitro* v buňkách lidského původu. Provede se také zkouška na nepřítomnost retrovirů za použití citlivé PCR (polymerasaová řetězová reakce s reverzní transkriptasou). Pro zkoušku na retroviry se mohou použít i techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

Po ustavení se chov monitoruje zkoušením reprezentativní skupiny nejméně 5 % zvířat, kterým se odebírá krev ve vhodných (např. měsíčních) intervalech. Navíc se v chovu aktivně vyhledávají patogenní mikroorganismy, včetně mykobakterií, hub a mykoplazmat. Vyhledávací program je navržen tak, aby se zajistilo, že během daného časového období jsou přezkoušena všechna zvířata.

U každého uhynulého zvířete se zjistí příčina úhynu. Jestliže se v chovu zjistí jako příčina úhynu přítomnost infekčního agens, výroba vakcíny se přeruší.

V době odběru ledvin se zvířata vyšetří na přítomnost abnormalit a jestliže jsou nějaké zjištěny, zvířata se pro výrobu vakcíny nepoužijí.

Každá sada kontrolních kultur odvozená z jedné skupiny zvířat použitá k výrobě jedné virové sklizně musí zůstat identifikovatelná, zejména na cizí agens, dokud není ukončeno celé zkoušení.

## VIROVÉ INOKULUM

Izolát viru vaccinie použitý pro matečné inokulum se identifikuje vývojovými záznamy, které obsahují informace o původu a zkouškách provedených k jeho charakterizaci.

Virus pracovního inokula musí mít tytéž charakteristiky jako kmen použitý k přípravě matečného inokula. Počet pasáží od originálního izolátu potřebných k výrobě jednotlivých sklizní je omezen a schválen oprávněnou autoritou. Vakcína se vyrábí z pracovního inokula s minimálním počtem zprostředkujících pasáží.

Protože výroba na buněčných kulturách a klonová selekce (např. purifikace plaku) mohou vést ke změně charakteristik viru, matečné inokulum se musí charakterizovat tak podrobně, jak je možné, např. srovnáním bezpečnostního profilu a biologických charakteristik kmene s kmenem původního izolátu. Charakteristika má zahrnovat:

– analýzy antigenů za použití specifických antisér a/nebo monoklonálních protilátek;

- biologické studie, jako je titr infekivity, zkouška účinnosti na chorioalantoidní membráně (CAM), *in vitro* výtěžnost a *in vivo* růstové charakteristiky na vhodném zvířecím modelu;
- genetické analýzy, jako je restrikční mapování/southern blot, polymerasové řetězové analýzy (PCR) a limitované sekvenční studie;
- fenotypovou a genetickou stabilitu po pasáži v substrátu;
- zkoušku neurovirulence a studie imunogenity.

Charakterizační zkoušky se provedou také u každého pracovního inokula u třech šarží vakcíny z prvního pracovního inokula k ověření genetické stability kmene vakcíny.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Každé pracovní inokulum se identifikuje jako virus vaccinie za použití specifických protilátek a molekulárních zkoušek. Provedou se vhodné zkoušky na vyloučení přítomnosti viru varioly a dalších orthopoxvirů.

**Koncentrace viru.** Provede se zkouška účinnosti na chorioalantoidní membráně (CAM) nebo vhodná validovaná *in vitro* zkouška [plakové titrace nebo zkouška infekčních virových jednotek (CCID<sub>50</sub>)]. Koncentrace viru je základem pro stanovení množství viru, které se použije ve zkoušce Neurovirulence.

**Cizí agens (2.6.16).** Pokud se pracovní inokulum připravuje na embryonovaných vejcích, v lidských diploidních buňkách nebo v kontinuální buněčné linii, vyhovuje požadavkům na inokula pro virové vakcíny. Inokula připravená na embryonovaných vejcích a inokula připravená na primárních buněčných kulturách vyhovují také dále uvedeným požadavkům.

Jestliže se předepsané zkoušky nemohou provést, protože nelze úplně neutralizovat virus inokula, může se inokulum naředit na koncentraci odpovídající inokulu pro výrobu vakcíny před zkouškou na cizí viry. Může se také provést doplňkové specifické zkoušení na cizí viry za použití validovaných technik amplifikace nukleových kyselin (2.6.21) nebo imunochemických metod (2.7.1). Pokud se pro detekci mykoplazmat nemůže použít metoda indikátorových buněk (2.6.7), provede se místo ní zkoušení amplifikace nukleových kyselin.

Inokula pro použití ve výrobě na embryonovaných vejcích nebo v buněčné kultuře se navíc zkouší na přenos potenciálních cizích agens z původního inokula. Pokud nejsou k dispozici úplné záznamy pasáží od původního inokula a použil se více než jeden živočišný druh, musí tato další zkoušení pokrývat nejdůležitější možná cizí agens.

Biozátěž matečných a pracovních inokul připravovaných ve zvířecí kůži se omezuje pečlivou kontrolou zařízení, osob i zvířat použitých při výrobě a specifickými zkouškami inokul. Jakkoliv je obtížné zajistit, aby inokula připravovaná v kůži neobsahovala žádná cizí agens, musí se výrobní proces navrhnout tak, aby se cizí agens odstranila nebo redukovala. Tato inokula musí odpovídat dále uvedeným požadavkům. Nepřítomnost specifických lidských patogenů se potvrdí dodatečným zkoušením, např. pomnožením bakterií a hub, kultivací virů, zkouškou amplifikace nukleových kyselin (2.6.21) pro virová agens.

**Neurovirulence.** Neurovirulence matečného a pracovního inokula se zjišťuje na vhodném zvířecím modelu, např. na opicích nebo na myších. Pro srovnání se použije původní izolát. Pokud původní izolát není pro tento účel dostupný, mohou se použít odpovídající materiály.

#### KULTIVACE VIRU A SKLIZEŇ

##### VAKCÍNA VYRÁBĚNÁ NA ŽIVÝCH ZVÍŘATECH

Před inokulací se zvířata očistí a až do sklizně materiálu vaccinie se v úzkostlivé čistotě udržují i stáje. Po dobu 5 dnů před inokulací a během inkubace jsou zvířata pod stálým veterinárním dohledem a trvale nesmí vykazovat příznaky onemocnění, denně se jim rektálně měří teplota a zaznamenává se. Pokud dojde k abnormálnímu vzestupu teploty nebo se objeví jiné klinické příznaky onemocnění, musí se zastavit výroba vakcíny v celé skupině zvířat až do zjištění příčiny.

Inokulace se provádí na ty části těla, které nemohou být znečištěny močí nebo výkaly. Povrch pro inokulaci se oholí a očistí, aby se docílilo pokud možno podmínek chirurgické aseptise. Jestliže se při očištění použije antiseptikum škodlivé pro použitý virus, před inokulací se důkladně smyje sterilní vodou. Během inokulace se povrch té části těla, na který se neinokuluje, kryje sterilním krytem. Podle předchozích zkušeností je vhodné u samic inokulovat na ventrální povrch a u samců na bok.

Před sběrem materiálu vaccinie se odstraní všechna antibiotika a inokulovaná oblast se očistí. Neinokulované povrchy se sterilně zakryjí. Před sklizní se zvířata usmrtí humánním způsobem a vykrví, aby se vyloučila větší příměs krve v materiálu vaccinie. Materiál se sbírá za aseptických podmínek odděleně z každého zvířete. Všechna použitá zvířata se pitvají. Pokud se zjistí příznaky generalizovaného nebo systémového onemocnění jiného než vaccinae, materiál z tohoto zvířete se zničí. Pokud se jedná o přenosné onemocnění, sklizeň od celé skupiny zvířat se musí zničit, není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

##### VAKCÍNA VYRÁBĚNÁ NA VEJCÍCH

Veškeré zpracovávání embryonovaných vajec probíhá v aseptických podmínkách v prostoru, kde se ve stejné době nezpracovávají jiná infekční agens nebo buňky. Po inokulaci a inkubaci za kontrolované teploty se sklídí pouze živá a vhodná kuřecí embrya. Stáří embryí v době sklizně viru se počítá od počátečního vložení vejce do inkubátoru a nemá být více než 12 dnů. Po homogenizaci a vyčeření odstředováním se extrakt embryonální drtě zkouší, jak je dále popsáno, a před dalším zpracováním se udržuje při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší. Virové sklizně, které vyhovují předepsaným zkouškám, se mohou spojit. Do virové suspenze se v žádné fázi výroby nepřidá lidská bílkovina. Pokud se přidá stabilizátor, má se prokázat, že nemá antigenní nebo senzitivizující vlastnosti pro člověka.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Kontrolní vejce.** Kontrolní vejce vyhovují zkouškám na cizí agens (2.6.16). Vzorek 2 % neinokulovaných embryonovaných vajec (nejméně 20 a nejvíce 50) ze šarže použité pro výrobu vakcíny se má inkubovat za stejných podmínek jako inokulovaná vejce. V době sklizně viru se tato vejce zpracují stejným způsobem jako inokulovaná.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**VAKCÍNA VYRÁBĚNÁ NA BUNĚČNÝCH KULTURÁCH (PRIMÁRNÍ BUŇKY KUŘECÍCH EMBRYÍ, PRIMÁRNÍ BUŇKY KRÁLIČÍCH LEDVIN, LIDSKÉ DIPLOIDNÍ BUŇKY NEBO KONTINUÁLNÍ BUNĚČNÉ LINIE)**

Všechny práce s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí v aseptických podmínkách v prostorách, kde se v době výroby současně nepracuje s jinými buňkami. Do média se může přidat schválené zvířecí (ne však lidské) sérum, ale udržovací médium pro buňky během multiplikace viru neobsahuje žádné zvířecí sérum. Sérum a trypsin použité při přípravě buněčných suspenzí a použitá média jsou prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červeně fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Přednostně se při výrobě používá médium bez antibiotik. V den inokulace pracovním virovým inokulem se ponechá nejméně 5 % nebo 1000 ml, podle toho, co je méně, buněčných kultur pro výrobu vakcíny jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). Pokud je vakcína vyráběna na primárních buněčných kulturách králičích ledvin, použijí se pro kontrolu zvláštní dále uvedené požadavky.

Po inokulaci výrobní buněčné kultury pracovním inokulem se inokulované buňky udržují při stálé vhodné teplotě a virová suspenze se sklídí po vhodné inkubační době.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury, ze které je odvozena sklizeň viru, vyhovují zkoušce Totožnost a zkoušce Cizích agens (2.6.16). Použijí-li se kultury primárních buněk králičích ledvin, provedou se zvláštní zkoušky uvedené dále. Zkoušku lze hodnotit, pokud se na konci pozorovacího období vyřadí nejvýše 20 % kontrolních buněčných kultur.

**Cizí agens (2.6.16).** Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na cizí agens. Při vysoké koncentraci viru může být obtížné provést úplnou neutralizaci viru vaccinie. V takovém případě mohou specifické zkoušky, jako je amplifikace nukleových kyselin (2.6.21) a imunochemické zkoušky (2.7.1), nahradit nespecifické zkoušky na buněčných kulturách nebo na vejcích. Aby se ušetřila biologická činidla, jako vaccinii neutralizující antiséra, může se zkouška na cizí agens provést u konečné várky místo u jednotlivých sklizní. *Vakcína připravená na primárních buňkách kuřecích embryí.* Vzorek tekutin spojených kontrolních kultur se zkouší na nepřítomnost adenovirů a ptačích retrovirů, jako jsou viry ptačích leukóz. Navíc se objem každého neutralizovaného spojeného viru odpovídající 100 lidským dávkám vakcíny nebo 10 ml (podle toho, co je více) zkouší na skupině embryonovaných vajec inokulací do alantoidní dutiny a podobný vzorek se zkouší na další skupině vajec inokulací do žloutkového vaku. V obou případech se použije 0,5 ml inokula na vejce. Spojený virus vyhovuje zkoušce, jestliže se po třech až sedmi dnech neobjeví známky přítomnosti cizích agens.

*Vakcína připravená na primárních buňkách králičích ledvin.* Následující zvláštní požadavky se vztahují na kultivaci viru, sklizeň a zkoušení. Z buněčných kultur ledvin každé skupiny zvířat použitých k přípravě primární buněčné suspenze se v den inokulace pracovním virovým inokulem odebere vzorek nejméně 30 ml spojené tekutiny. Spojená tekutina se inokuluje na kultury primárních buněk králičích ledvin v ředění nejvýše 1 : 4. Kultury se inkubují při 34 °C až 36 °C a pozorují se nejméně 4 týdny. Během tohoto pozorovacího období a nejméně po 2 týdnech inkubace se provede nejméně jedna subkultura z každé kultury a pozoruje se také po dobu 2 týdnů. Zkoušku lze hodnotit, jestliže se vyřadí nejvýše 20 % kultur. Pokud se získá důkaz o přítomnosti nějakého cizího agens, nesmí se pro výrobu vakcíny použít žádná buněčná kultura od celé skupiny.

- *Kontrolní buněčné kultury.* 25 % buněčných suspenzí získaných z ledvin každé skupiny zvířat v den inokulace pracovním virem se ponechá jako kontroly. Tyto kontrolní buněčné kultury se inkubují za stejných podmínek jako inokulované kultury nejméně 2 týdny. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se z nespecifických příčin vyřadí více než 20 % kontrolních buněčných kultur.
- *Zkouška na hemadsorbující viry.* V době sklizně nebo nejvýše 4 dny po inokulaci výrobních kultur pracovním virovým inokulem se vzorek 4 % kontrolních buněčných kultur zkouší na hemadsorbující viry přidáním morčecích červených krvinek.
- *Zkouška na další cizí agens.* V době sklizně nebo nejvýše 7 dnů po inokulaci výrobních kultur pracovním virovým inokulem se vzorek nejméně 20 ml spojené tekutiny z každé skupiny kontrolních kultur zkouší na další cizí agens.
- *Zkoušky neutralizované jednotlivé sklizně na primárních buňkách králičích ledvin.* Každá neutralizovaná jednotlivá sklizeň se navíc zkouší na kulturách primárních buněk králičích ledvin připravených z jiné skupiny zvířat, než která se použila pro výrobu.

#### SPOJENÁ SKLIZEŇ

Pouze spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům a rozmezím schváleným pro daný přípravek, se může použít pro výrobu šarže.

**Totožnost.** Virus vaccinie se ve spojené sklizni stanoví sérologickými metodami, které se mohou doplnit molekulárními metodami. Mohou se použít molekulární zkoušky, jako je metoda analýzy polymorfie délky restričních fragmentů (RFLP) nebo metoda parciálního sekvenování speciálně terminálních DNA sekvencí, které ukazují největší rozdíly mezi kmeny viru vaccinie.

**Koncentrace viru.** Koncentrace viru vaccinie ve spojené sklizni se stanoví zkouškou na chorioalantoidní membráně kuřecích embryí (CAM) nebo zkouškou na buněčných kulturách. Pro validaci titrace spojené sklizně se souběžně ve stejném systému zkouší referenční přípravek. Koncentrace viru je základem pro určení množství viru, které se použije ve zkoušce neurovirulence na myších.

**Shodnost virových charakteristik.** Virus vaccinie ve spojené sklizni nebo v konečné várce se ověřuje zkouškami, které jsou schopné odhalit, zda se během multiplikace ve výrobním systému nezměnily jeho fenotypové a genetické charakteristiky. Pro porovnání se použije matečné inokulum

nebo jiný rovnocenný přípravek. Porovnávací přípravek a použité zkoušky schvaluje oprávněná autorita.

**Neurovirulence.** Neurovirulence spojené sklizně se stanoví porovnáním proti původnímu inokulu nebo jinému rovnocennému přípravku. Zkouška se provede intracerebrální inokulací sajícím myším. K rozlišení mezi vyhovujícími a nevyhovujícími šaržemi se mohou použít další zkoušky.

**Zbytková DNA.** Při pomnožení virů na kontinuální buněčné linii se spojená sklizeň zkouší na zbytkovou DNA. Výrobní proces prokáže, že hladina buněčné DNA je nižší než 10 ng v lidské dávce.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** U vakcín připravených jiným způsobem než ve zvířecí kůži vyhovuje konečná várka zkoušce na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

**Mykoplazmata (2.6.7)** U vakcín připravených jiným způsobem než ve zvířecí kůži vyhovuje konečná várka zkoušce na mykoplazmata; použije se 10 ml.

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍN

Koncentrace viru pro uvolnění výrobku se stanoví tak, že se pomocí stabilitních údajů zajistí, aby na konci doby použitelnosti byla nejméně koncentrace viru uvedená v označení na obalu.

#### VAKCÍNA VYRÁBĚNÁ NA ŽIVÝCH ZVÍŘATECH

Spojená sklizeň se odstředí. Pokud je vakcína určena pro podání v tekuté formě, ošetří se přidáním glycerolu nebo jiného vhodného rozpouštědla, aby se snížila přítomnost cizích agens. Rozpouštědlo může obsahovat protimikrobní látku. Směs se může krátkodobě uchovat při vhodné teplotě. Pokud je vakcína určena pro podání v suché formě, může se ošetřit přidáním vhodné protimikrobní látky. Následující speciální požadavky platí pro konečnou várku vakcíny u vakcín připravených na živých zvířatech.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro výrobu konečné šarže.

**Celkový počet bakterií.** Nejvýše 50 v mililitru u vakcín vyrobených pouze ve zvířecí kůži; stanoví se počítáním na pevných půdách za použití vhodného objemu konečné várky vakcíny.

***Escherichia coli.*** Nejméně 1 ml vzorků konečné várky v ředění 1 : 100 se pomnožuje na miskách s půdou vhodnou pro odlišení *E. coli* od ostatních bakterií. Misky se inkubují 48 h při 35 °C až 37 °C. Jestliže se v konečné várce prokáže *E. coli*, konečná várka se vyřadí nebo se po souhlasu oprávněné autority zpracuje později.

**Hemolytické streptokoky, koagulasa – pozitivní stafylokoky nebo jiné patogenní mikroorganismy, které jsou známé jako škodlivé pro člověka při vakcinaci.** Nejméně 1 ml vzorků konečné várky v ředění 1 : 100 se pomnožuje na krevním agaru. Misky se inkubují 48 h při 35 °C až 37 °C. Jestliže se v konečné várce prokáží tyto mikroorganismy, konečná várka vakcíny se vyřadí.

***Bacillus anthracis.*** Přezkouší se každá kolonie na každé misce, která morfologicky připomíná *B. anthracis*. Jestliže jsou organismy obsažené v kolonii nepohyblivé, provedou se další zkoušky na charakter kultury *B. anthracis*, včetně zkoušek patogenity na vhodných zvířatech. Pokud se pro-

káže přítomnost *B. anthracis*, konečná várka vakcíny a ostatní přidružené várky se vyřadí. Také se může provést validované molekulární zkoušení.

***Clostridium tetani* a další patogenní sporulující anaerobní mikroorganismy.** Celkový objem nejméně 10 ml konečné várky vakcíny se rozdělí stejnoměrně do nejméně deseti zkumavek, z nichž každá obsahuje nejméně 10 ml živné půdy vhodné pro růst anaerobních mikroorganismů. Zkumavky se 1 h inkubují při 65 °C, aby se snížil počet nesporelujících organismů, a potom se anaerobně inkubují nejméně 1 týden při 35 °C až 37 °C. Z každé zkumavky nebo misky, kde se projeví růst, se založí subkultury na misky se vhodnou živnou půdou a inkubují se anaerobně při stejné teplotě. Všechny anaerobní kolonie se zkoušejí a identifikují a pokud se prokáže *C. tetani* nebo jiné sporulující anaerobní patogenní mikroorganismy, konečná várka se vyřadí.

#### VAKCÍNY VYRÁBĚNÉ NA VEJCÍCH

Spojená sklizeň se vyčeří a může se následně purifikovat.

#### VAKCÍNY VYRÁBĚNÉ NA BUNĚČNÝCH KULTURÁCH (PRIMÁRNÍ KUŘECÍ EMBRYONÁLNÍ FIBROBLASTY, LIDSKÉ DIPLOIDNÍ BUŇKY NEBO KONTINUÁLNÍ BUNĚČNÉ LINIE)

Spojená sklizeň se vyčeří, aby se odstranily buňky, a může se následně purifikovat.

#### ŠARŽE

Pouze šarže, která vyhovuje požadavkům na minimální obsah viru pro uvolnění a následujícím požadavkům na tepelnou stabilitu a každému z požadavků dále uvedených ve Zkouškách totožnosti, Zkouškách na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit pro použití. Provedou-li se zkoušky na Protimikrobní látky, Obsah bílkoviny, Bovinní sérumalbumin a Ovalbumin s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vynechat.

**Tepelná stabilita.** U tekutých přípravků se nejméně tři obaly šarže udržují při zvýšené teplotě po definovanou dobu za podmínek zkoušky, které byly pro výrobek shledány jako vhodné, a jsou schváleny oprávněnou autoritou. V zahřáté vakcině a paralelně v nezahřáté vakcině udržované při teplotě doporučené pro skladování se stanoví koncentrace viru postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti. Koncentrace viru v obalech zahřáté vakcíny nepoklesne v průběhu sledování o více než o povolené množství. Podmínky zkoušky a požadavky schvaluje oprávněná autorita. U lyofilizovaných přípravků se inkubují nejméně tři obaly obsahující šarži v suchém stavu po dobu 28 dnů při (37 ± 1) °C. V zahřáté vakcině a paralelně v nezahřáté vakcině udržované při teplotě doporučené pro skladování se stanoví koncentrace viru postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti. Koncentrace viru v zahřáté vakcině je nejvýše o 1,0 log nižší než v nezahřáté vakcině.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Virus vaccinie se identifikuje vhodnou metodou.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Protimikrobní látky.** Nejméně minimální prokazatelné účinné množství a nejvýše 115 % množství uvedeného

v označení na obalu. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní látky vhodnou chemickou metodou.

**Fenol** (2.5.15). Nejvýše 0,5 %; zkouší se u přípravků, u nichž se fenol použil ve výrobě.

**Obsah bílkoviny.** Stanoví se u každé rozplněné šarže, pokud nebylo stanovení provedeno v konečné várce; vyhovuje limitům schváleným oprávněnou autoritou.

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), pokud se bovinní sérumalbumin použil v průběhu buněčného pomnožování.

**Ovalbumin.** Pokud se vakcína vyrábí na embryonovaných vejících, vyhovuje obsah ovalbuminu limitům schváleným oprávněnou autoritou.

**Zbytková vlhkost.** Obsah zbytkové vlhkosti v každé šarži lyofilizované vakcíny vyhovuje limitům schváleným oprávněnou autoritou.

**Počet bakterií.** Pro vakcíny vyrobené v kůži se vhodnými kultivačními a mikroskopickými metodami stanoví mikroorganismy patogenní pro člověka, zejména hemolytické streptokoky, stafylokoky, sporující patogeny, zvláště *B. anthracis* a *E. coli*. Vakcína tyto kontaminanty neobsahuje. Celkový počet nepatogenních bakterií nepřesáhne 50 v mililitru.

**Sterilita** (2.6.1). Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu, s výjimkou vakcín připravených v kůži.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Vakcína vyhovuje specifikaci schválené oprávněnou autoritou.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Vakcína se, pokud je to třeba, rekonstituuje a titruje na přítomnost infekčního viru za použití nejméně tří obalů obsahujících vakcínu. K validaci každého stanovení se jeden obal vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titer se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každém obalu vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů pro tři obaly vakcíny nejsou menší, než 8,0 log pokotvorných jednotek v mililitru nebo validovaný ekvivalent v plakotvorných jednotkách nebo v CCID<sub>50</sub>, není-li klinickou studií zdůvodněn nižší titer.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,5$  log infekčních jednotek;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než 0,5 log infekčních jednotek od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,5$  log infekčních jednotek; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,5$  log infekčních jednotek.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- označení kmene viru vaccinie;
- minimální množství viru v mililitru;
- substrát použitý pro přípravu vakcíny;
- povaha a množství stabilizátoru, protimikrobní látky nebo přísad přítomných ve vakcíně a/nebo v rozpouštědle.

## VACCINUM ZONAE VIVUM

6.3:2418

### Vakcína proti pásovému oparu živá

#### DEFINICE

Je to lyofilizovaný přípravek připravený ze vhodného atenuovaného kmene lidského herpesviru 3. Vakcína se těsně před použitím rekonstituuje způsobem uvedeným v označení na obalu na čirou nebo slabě opalizující tekutinu, téměř bílou suspenzi nebo světle žlutou tekutinu, která může být zbarvena přítomným indikátorem pH. Vakcína je určena pro podání dospělým.

#### VÝROBA

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace viru a systému buněčné banky. Výrobní postup má prokazatelně poskytovat shodné živé vakcíny proti pásovému oparu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Virus v konečném přípravku nemá od původně izolovaného viru projít více než definovaným počtem pasáží v buněčných kulturách schválených oprávněnou autoritou.

V průběhu preklinického vývoje se bere v úvahu potenciální neurovirulence vakcinačního kmene, založená na dostupných epidemiologických údajích týkajících se neurovirulence a neurotropismu, především pro divoký kmen viru. Na základě toho se provede analýza rizik. Je-li třeba a je-li to možné, provede se zkouška vakcinačního kmene za použití zvířecího modelu, který odliší divoký kmen viru od atenuovaného viru; mohou být také potřebné zkoušky na středně atenuované kmeny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunosér a vakcín pro humánní použití (2.6.9).

#### SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

Virus se kultivuje v lidských diploidních buňkách (5.2.3).

#### VIROVÁ INOKULA

Použitý kmen lidského herpesviru 3 se má identifikovat vývojovými záznamy, které zahrnují informace o jeho původu a následném zacházení s ním. Virus se nikdy nemá pasážovat v kontinuálních buněčných liniích. Virová inokula se připraví na stejném druhu buněk, jaký se použije pro výrobu konečné vakcíny. Virová inokula se připraví ve velkém množství a uchovávají se lyofilizovaná při teplotě nižší než  $-20$  °C nebo, pokud nejsou lyofilizovaná, nižší než  $-60$  °C.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům se může použít pro kultivaci viru.

**Totožnost.** Matečná a pracovní inokula se identifikují jako lidský herpesvirus 3 sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula v živých virových vakcínách; pro zkoušku v buněčných kulturách se použije 50 ml.

#### KULTIVACE VIRU A SKLIZEŇ

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě médií při kultivaci se může přidat schválené zvířecí sérum (nikoliv lidské sérum). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a kultivačních médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Média pro kultivaci buněk mohou obsahovat indikátor pH, jako je červeně fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Jako neinfikované kultury (kontrolní buňky) se uchovává 5 % buněk použitých k výrobě vakcíny, nejméně však 50 ml. Infikované buňky tvořící jednotlivou sklizeň se promyjí, uvolní se z povrchu podložky a smíchají se. Buněčná suspenze se rozruší ultrazvukem.

Pouze jednotlivá sklizeň viru, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

**Totožnost.** Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se identifikuje jako lidský herpesvirus 3 sérum-neutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

**Koncentrace viru.** Pro sledování shodnosti výroby a k určení ředění pro konečnou várku vakcíny se stanoví koncentrace infekčního viru v jednotlivé sklizni postupem uvedeným v odstavci Stanovení účinnosti.

**Cizí agens (2.6.16).** Pro zkoušku v buněčných kulturách se použije 50 ml.

**Kontrolní buňky.** Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury, z níž se odvozuje jednotlivá sklizeň, vyhovují zkoušce Totožnost a požadavkům na Cizí agens (2.6.16).

#### KONEČNÁ VÁRKA VAKCÍNY

Sklizně viru, které vyhověly výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se zředí vhodným způsobem. Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné šarže.

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Provede se zkouška na sterilitu (2.6.1); na každou živnou půdu se použije 10 ml.

#### ŠARŽE

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu vakcíny. Obaly se potom uzavřou, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze konečná šarže, která vyhovuje požadavku na zkoušku Voda a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška Bovinní sérumalbumin provedena s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše množství prokazatelně zajišťující stabilitu vakcíny, které bylo schváleno oprávněnou autoritou.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů uvedených v označení na obalu smíchá se specifickými protilátkami proti lidskému herpesviru 3, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Bakteriální a houbová kontaminace.** Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (2.6.1).

**Bovinní sérumalbumin.** Nejvýše 0,65 µg v jedné lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Titrace infekčního viru vakcíny se provádí za použití nejméně tří lahvíček vakcíny. K validaci každého stanovení se jedna lahvíčka vhodného virového referenčního přípravku stanoví nejméně trojmo. Koncentrace viru referenčního přípravku se zaznamená za použití kontrolního diagramu a titer se stanoví na základě záznamů každé laboratoře. Za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) se vypočítá koncentrace viru v každé lahvíčce vakcíny a pro každou repliku referenčního přípravku. Provede se statistické porovnání. Titry virů ze tří lahvíček vakcíny nejsou menší, než je uvedeno v označení na obalu. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) stanovené koncentrace viru referenčního přípravku pro tři repliky je větší než  $\pm 0,3 \log$  PFU;
- koncentrace viru referenčního přípravku se liší o více než  $0,5 \log$  PFU od stanovené hodnoty.

Stanovení účinnosti se opakuje, jestliže interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru vakcíny je větší než  $\pm 0,3 \log$  PFU; pouze údaje získané z validovaného stanovení účinnosti se vyhodnocují za použití obvyklých statistických metod (např. 5.3) pro výpočet virové koncentrace ve vzorku. Interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) koncentrace viru není větší než  $\pm 0,3 \log$  PFU.

Pokud je to zdůvodněno a schváleno, může se použít odlišné stanovení účinnosti, které může vést k jiné platnosti a kritériím pro přijetí. Vakcína ovšem musí, bude-li zkoušena, vyhovět výše uvedenému stanovení.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny;
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny;
- minimální koncentrace viru;
- že je třeba zabránit styku vakcíny s dezinfekčními prostředky;
- že se vakcína nesmí podat těhotným ženám.

## VAKCÍNY PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ

### VACCINUM ACTINOBACILLOSIS INACTIVATUM AD SUEM

6.0:1360

#### Vakcína proti pleuropneumonii prasat inaktivovaná

##### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jednu nebo více následujících složek: jeden nebo více vhodných inaktivovaných kmenů *Actinobacillus pleuropneumoniae*; toxinů, bílkovin nebo polysacharidů odvozených ze vhodných kmenů *A. pleuropneumoniae* a ošetřených tak, aby byly neškodné při zachování přiměřené imunogenity; frakce toxinů odvozených ze vhodných kmenů *A. pleuropneumoniae*, je-li třeba ošetřených tak, aby byly neškodné při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat proti aktinobacilóze (pleuropneumonii prasat).

##### 2 VÝROBA

###### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě, každý kmen se pomnožuje odděleně. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je růstová křivka, obsah bílkoviny a množství příslušných antigenů; zjištěné hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný přípravek. U sklizně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální suspenze jednotlivých kmenů odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Mohou se detoxikovat, purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

###### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Výběr kmenů závisí na epidemiologické situaci. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít následující zkoušky: Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

###### 2-2-1 Bezpečnost

2-2-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání vakcíny a na každé kategorii prasat, pro která je vakcína určena. Použije se šarže, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-2-1-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně deset prasat, která nemají protilátky proti sérotypům *A. pleuropneumoniae* nebo jeho toxinům přítomným ve vakcíně. Každému praseti se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále, po doporučeném intervalu, jedna dávka vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2 h, 4 h a 6 h po vakcína-

ci a dále denně po 4 dny; u každého prasete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prasce nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C a u žádného prasete není vzestup vyšší než 2 °C.

2-2-1-1-2 *Bezpečnost na březích prasnic.* Pokud je vakcína určena k použití u březích prasnic, použije se nejméně deset prasnic v příslušném stadiu březosti. Každé prasnici se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále, po doporučeném intervalu, jedna dávka vakcíny. Prasnice se pozorují nejméně denně až do porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2 h, 4 h a 6 h po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každé prasnice se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce jestliže:

- žádná prasnice nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup teploty u všech prasnic nepřekročí 1,5 °C a u žádné z prasnic není vzestup vyšší než 2 °C,
- nezaznamenají se žádné nežádoucí vlivy na březost a potomstvo.

2-2-1-2 *Terénní studie.* Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na všech kategoriích prasat, pro které je vakcína určena. Použijí se nejméně tři skupiny zvířat, po nejméně dvacet prasatech, s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Místa vpichu se vyšetří na místní reakci po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, v časovém intervalu, po kterém byl zjištěn vzestup teploty ve zkoušce 2-2-1-1, pokud k němu došlo, a deně 2 dny po vakcinaci; u každého prasete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prasce nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C a u žádného prasete není vzestup vyšší než 2 °C.

###### 2-2-2 Imunogenita

Členní kmen pro následující zkoušku se vybere tak, aby se zajistila členě každým kmenem Ap toxinu<sup>1</sup> produkovaným sérotypy, uvedenými v označení na obalu; může být nezbytné provést více než jednu zkoušku s použitím různých členěných kmenů v každé zkoušce.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání vakcíny. Každému praseti se podá vakcína s minimální účinností.

Pro každou zkoušku se použije nejméně čtrnáct prasat, která nemají protilátky proti *A. pleuropneumoniae* a Ap toxinům. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně sedm prasat. Nejméně sedm prasat se ponechá jako kontroly. Za tři týdny po poslední vakcinaci se všechna prasata če-

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

<sup>1</sup> Nomenklaturu toxinů *A. pleuropneumoniae* popsali J. Frey et al., *Journal of General Microbiology*, 1993, 139, 1723–1728.



lenžují intranazálně nebo intratracheálně nebo aerosolem, dostatečným množstvím virulentního sérotypu *A. pleuropneumoniae*. Prasata se pozorují nejméně denně po 7 dnů; aby se zabránilo zbytečnému utrpení, těžce nemocná kontrolní prasata se šetrně utratí a považují se za uhynulá v důsledku onemocnění. Na konci pozorovací doby se šetrně utratí všechna přežívající prasata. Všechna prasata se vyšetří pitvou. Na přítomnost *A. pleuropneumoniae* se vyšetří plíce, tracheobronchiální mizní uzliny a mandle. Při pitvě se vyhodnotí rozsah plicních lézí. Každému ze sedmi plicních laloků se přidělí bodová hodnota lézí podle pětibodové stupnice hodnocení<sup>1</sup>. Oblast vykazující pneumonii a nebo pleuritidu v každém laloku se zhodnotí a vyjádří bodovou hodnotou od 0 do 5 a dává stupeň pneumonie na lalok (nejvyšší možná bodová hodnota (skóre) lézí pro každé celé plíce je 35). Odděleně se vypočítá celková bodová hodnota (skóre) lézí pro vakcinovaná a kontrolní prasata (nejvyšší bodová hodnota (skóre) pro skupinu je 245, pokud se ve skupině použilo sedm prasat).

Vakcína vyhovuje zkoušce jestliže vakcinovaná prasata vykazují při srovnání s kontrolami nižší výskyt: mortality; typických příznaků (ztížené dýchání, kašel a zvracení); typických plicních lézí; zpětných izolací *A. pleuropneumoniae* z plic, tracheobronchiálních mizních uzlin a mandlí. Kde je to možné jsou nálezy vyhodnoceny statisticky a jsou významně nižší u vakcinovaných prasat.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se pět myší o hmotnosti 18 g až 20 g, které nemají protilátky proti sérotypům *A. pleuropneumoniae* nebo jeho toxinům přítomným ve vakcíně. Každá myš se vakcinuje subkutánně vhodnou dávkou. Pokud doporučené schéma požaduje revakcinaci, může se v této zkoušce také provést, jestliže se prokázalo, že tato zkouška stále poskytuje vhodně citlivý zkušební systém. Před vakcinací a v daném období mezi 14 až 21 dny po posledním podání se každé myši odebere krev a připraví se vzorky séra. U jednotlivých sér se stanoví titer specifických protilátek proti všem antigenům složkám uvedeným na obalu; použijí se vhodné validované zkoušky – např. enzymově imunisorbentové stanovení (2.7.1). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladiny protilátek nejsou významně nižší než hladiny protilátek získané se šarží, která vyhověla ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provádí u várky vakcíny, nebo, kde povaha adjuvans brání uspokojivému provedení zkoušky, u várky antigenu nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je takové, jaké bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla ve zkoušce Bezpečnost 2-2-1-1 popsa-

né v části Výběr složení vakcíny nebo ve zkoušce Bezpečnost popsané v části Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti prasat. Kde se použije posledně uvedená zkouška, zaznamenaná se maximální vzestup teploty u každého zvířete. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup tělesné teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarží vakcíny, použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinu, se následně použije pro zkoušení šarží.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti antigenům složkám *A. pleuropneumoniae* uvedeným v označení na obalu, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě prasata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti sérotypům *A. pleuropneumoniae* nebo jejich toxinům přítomným ve vakcíně. Doporučeným způsobem se každému prasati podá dvojnásobná dávka vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2 h, 4 h a 6 h po vakcinaci a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM ADENOVIRUSIS CANINAE INACTIVATUM

6.0:1298

### Vakcína proti adenoviroze psů inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů psího adenoviru 1 (virus infekční hepatitidy psů) a/nebo psího adenoviru 2, inaktivovaných tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti infekční hepatitidě vyvolané psím adenovirem.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Sklizení virus se inaktivuje. Vakcína může obsahovat adjuvans.

<sup>1</sup> Systém hodnocení popsal P.C.T Hannan, B.S. Bhogal, J.P.Fish, *Research in veterinary Science*, 1982, 33, 76–88.

## 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2)

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-3-1-1 **Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset psů nejnižšího doporučeného stáří, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru 1 nebo 2. Každému psu se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kde doporučované schéma požaduje revakcinaci, podá se po doporučené době ještě jedna dávka. Psi se pozorují nejméně denně 14 dnů po posledním podání vakcíny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-2 **Bezpečnost na březích fenách.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích fen, použije se nejméně deset fen ve stadiu nebo stadiích březosti, podle doporučeného schématu. Každé feně se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže doporučené schéma požaduje revakcinaci, podá se po doporučené době ještě jedna dávka. Feny se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fena nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zaznamenán nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

2-3-2 **Imunogenita.** U vakcín určených k ochraně proti hepatitidě je pro prokázání imunogenity vhodná následující zkouška. Jestliže je vakcína určena k ochraně proti respiračním příznakům, je nezbytné provést ještě další zkoušku k prokázání imunogenity u této indikace.

Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího doporučeného stáří. Každému psu se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně sedm psů, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět psů. Nejméně dva psi se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se všichni psi čelenují intravenózně dostatečným množstvím suspenze patogenního psího adenoviru. Psi se pozorují nejméně denně po 21 dnů po čelení. Psi, kteří mají typické příznaky těžké infekce psím adenovirem, se šetrně utratí, aby se zabránilo zbytečnému utrpení.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovacího období po čelení uhne nebo má typické příznaky těžké infekce psím adenovirem méně než 100% kontrolních psů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období všichni vakcinovaní psi přežijí a nemají příznaky onemocnění.

### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede s množstvím inaktivované sklizně viru, které odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny, pomocí dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě, nebo v buněčných kulturách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria přijatelnosti se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína podaná zvířatům, která nemají specifické protilátky proti typu nebo typům psího adenoviru uvedeným v označení na obalu, vyvolá tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dva psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, přednostně, kteří nemají protilátky neutralizující psí adenovirus nebo, kde je to odůvodněné, psi s nízkou hladinou těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinováni proti psímu adenoviru a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému psu podá dvojnásobná dávka vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový psí adenovirus se provede inokulací do citlivých buněčných kultur s použitím deseti dávek vakcíny. Za 6 až 8 dnů se provede pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, oddělí se adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus nebo jinak nebrání zjištění živého viru.

3-5 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje zkoušce uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM ADENOVIRUSIS CANINAE VIVUM

6.0:1951

### Vakcína proti adenoviróze psů živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů psího adenoviru 2. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti infekční hepatitidě psů a/nebo respiračnímu onemocnění vyvolanému psím adenovirem.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně pět psů nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Každému psu se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce jestliže žádný pes nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březích fenách.** Pokud je vakcína určena pro použití nebo může se použít u březích fen, použije se nejméně pět fen v doporučeném stadiu březosti nebo stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé feně se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Feny se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fena nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a jestliže se nezjistí žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma psům, 5 až 7 týdnů starým, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Přijmou se opatření aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučovaným způsobem se každému psu podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá způsobem doporučeným pro vakcinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvrátu virulence. Za 4 až 6 dnů se připraví suspenze z nosní a hltanové sliznice, mandlí, plic, sleziny a pokud je pravděpodobné že obsahují virus, i z jater a ledvin každého psa a vzorky se spojí. 1 ml směsného vzorku se podá vhodným způsobem, např. intranazálně, dalším dvěma psům stejného stáří. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-3-1) s použitím nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují. V každém případě se použijí psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému psu není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

**2-3-3-1 Vakcíny určené k ochraně proti hepatitidě.** Pro zkoušku se použije nejméně sedm psů, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět psů. Nejméně dva psi se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se každý pes čelí intravenózně dostatečným množstvím suspenze virulentního psího adenoviru 1 (virus infekční hepatitidy psů). Psi se pozorují nejméně denně po 21 dnů po čelení. Psi, kteří mají typické závažné příznaky infekce psím adenovirem se šetrně utratí, aby se zabránilo zbytečnému utrpení zvířat.

Zkoušku nelze hodnotit pokud během pozorovacího období po čelení uhynie nebo má závažné příznaky psí adenovirózy méně než 100 % kontrolních psů. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení všichni vakcinovaní psi přežijí a nemají příznaky onemocnění s výjimkou možného přechodného zvýšení rektální teploty.

**2-3-3-2 Vakcíny určené k ochraně proti respiračním příznakům.** Pro zkoušku se použije nejméně dvacet psů, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Podle doporučeného

schématu se vakcinuje nejméně deset psů. Nejméně deset psů se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každý pes čelenuje intranazálně množstvím suspenze virulentního psího adenoviru 2 dostačujícím k vyvolání typických příznaků respiračního onemocnění u psů, kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Psi se pozorují nejméně denně po 10 dnů po čelení. U každého psa se zaznamená výskyt příznaků respiračního a celkového onemocnění (např. kýčání, kašel, výtok z nosu a spojivky, ztráta chuti). Od druhého do desátého dne po čelení se odebírají od každého psa nosní výtěry nebo výplachy a tyto vzorky se vyšetří na přítomnost a titer vylučovaného viru.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je zjištěn zřetelný pokles výskytu a závažnosti příznaků a vylučování viru u vakcinovaných psů při srovnání s kontrolami.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína po smíchání s monospecifickým antisérem proti psímu adenoviru 2 dále neifikuje citlivé buněčné kultury.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata (2.6.7).** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

3-4 **Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti psímu adenoviru 2 a inkuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro psy. Za 6 až 8 dnů se provede pasáž a kultury se udržují celkem 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

3-5 **Bezpečnost.** Použijí se dva psi, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a kteří nemají protilátky proti psímu adenoviru. Doporučeným způsobem se každému psu podá deset dávek vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcína se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína po podání doporučeným způsobem a metodou vyhovuje jedné nebo oběma zkouškám uvedeným v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM ANAEMIAE INFECTIVAE PULLI VIVUM

6.5:2038

### Vakcína proti infekční anémii kuřat živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru anémie kuřat. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání chovným kuřatům k aktivní imunizaci pro prevenci vylučování viru, zábraně nebo snížení přenosu viru vejci a k pasivní ochraně jejich budoucího potomstva.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

2-4-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci na kuřatech, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a jsou z SPF chovu (5.2.2). Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

2-4-1-1 *Všeobecná zkouška.* Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a jsou z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinasobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Za 14 dnů po vakcinaci se polovíně kuřat odeberou vzorky krve a stanoví se hodnota hematokritu. Tato kuřata se šetrně utratí a provede se pitva. Zaznamenají se všechny patologické změny, které lze přisoudit viru anémie kuřat, jako je atrofie brzlíku a specifické léze kostní dřeně. Zbývající kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období nemá žádné

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

kuře zřetelné klinické příznaky anémie kuřat nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-4-1-2 Bezpečnost pro mladá kuřata.** Použije se nejméně dvacet jednodenních kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se okulonazálně podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně maximálnímu titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně. Zaznamená se výskyt všech klinických příznaků, které lze přisoudit vakcinačnímu viru, jako je deprese, a všechny úhyny. Za 14 dnů po vakcinaci se polovině kuřat odeberou vzorky krve a stanoví se hodnota hematokritu. Tato kuřata se šetrně utratí a provede se pitva. Zaznamenají se všechny patologické změny, které lze přisoudit viru anémie kuřat, jako je atrofie brzlíku a specifické léze kostní dřevě. Zbývající kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zhodnotí se rozsah, ve kterém je vakcinační kmen patogenní pro jednodenní vnímavá kuřata, a to na základě výsledků klinických pozorování, mortality, počtu kuřat vyšetřených ve 14 dnech, která mají anémii (hodnota hematokritu méně než 27 %), a příznaků infekční anémie kuřat při pitvě. Tyto výsledky se použijí pro informaci o bezpečnosti pro mladá kuřata, uvedenou v označení na obalu.

**2-4-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti jednodenních kuřat z SPF chovu (5.2.2); postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách jednodenních kuřat a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Intramuskulárně se podá takové množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 7 až 9 dnů po podání se připraví suspenze z jater každého kuřete a tyto vzorky se spojí. V závislosti na tropismu viru se mohou použít jiné tkáně, jako je slezina nebo kostní dřeň. Každému z pěti dalších kuřat stejného stáří a původu se intramuskulárně podá po 0,1 ml směšného vzorku. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provedou se zkoušky na bezpečnost (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného vakcinačního viru, který se získá.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání; použijí se kuřata z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Zkouška na prevenci vylučování viru je určena k prokázání snížení přenosu viru vejci během viremie a vylučování viru v trusu. Množství

vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

**2-4-3-1 Pasivní imunizace kuřat.** Vakcinuje se podle doporučeného návodu nejméně deset chovných kuřat, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a která jsou z SPF chovu (5.2.2). Nejméně deset nevakcinovaných chovných kuřat stejného původu a z SPF chovu (5.2.2) se ponechá jako kontrola. Ve vhodném období po zastavení vylučování vakcinačního viru se shromáždí fertilizovaná vejce od všech vakcinovaných i kontrolních chovných kuřat a inkubují se. Nejméně tři namátkově vybraná jednodenní kuřata ze skupiny vakcinovaných i kontrolních chovných kuřat se čelenují intramuskulárním podáním dostatečného množství virulentního viru anémie kuřat. Kuřata se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a přežívající kuřata, která mají klinické příznaky onemocnění. Na konci pozorovacího období se stanoví hodnota hematokritu všech přežívajících kuřat. Tato kuřata se šetrně utratí a provede se pitva. Zaznamenají se všechny patologické změny, které lze přisoudit viru anémie kuřat, jako je atrofie brzlíku a specifické léze kostní dřevě. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení uhynie méně než 90 % kontrolních chovných kuřat nebo má těžké klinické příznaky infekční anémie kuřat, včetně hodnoty hematokritu pod 27 % a/nebo zřetelné makroskopické léze kostní dřevě a brzlíku;
- a/nebo v období mezi vakcinací a sbíráním vajec má více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních chovných kuřat zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení nejméně 90 % kuřat od vakcinovaných matek přežije a nemá žádné zřetelné klinické příznaky onemocnění a/nebo makroskopické léze kostní dřevě a brzlíku.

**2-4-3-2 Prevence vylučování viru.** Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset kuřat, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci a jsou z SPF chovu (5.2.2). Jako kontroly se drží odděleně nejméně deset kuřat stejného stáří a původu. Ve vhodnou dobu po zastavení vylučování vakcinačního viru se všechna kuřata intramuskulárně čelenují dostatečným množstvím virulentního viru anémie kuřat. Třetí, pátý a sedmý den po čelení se odeberou vzorky krve a sedmý, čtrnáctý a jedenáctý den po čelení se odeberou vzorky trusu od kuřat a provede se zkouška na přítomnost viru, aby se stanovilo, zda kuřata jsou nebo nejsou viremická a zda vylučují virus. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- méně než 70 % kontrolních kuřat má viremii a vylučuje virus při jednom nebo více odběrech vzorků;
- a/nebo v období mezi vakcinací a čelením má více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kuřat abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 90 % vakcinovaných kuřat nemá viremii nebo nevylučuje virus.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína, v případě potřeby zředěná, po smíchání s monospécifickým antisérem proti viru anémie kuřat nadále neinfikuje citlivé buněčné kultury nebo vejce z SPF chovu (5.2.2), do kterých se inokuluje.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*. Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích hotového výrobku (2.6.25).

3-5 **Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a jsou z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do vhodných buněčných kultur (5.2.4) nebo vajec z SPF chovu (5.2.2). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušek na imunogenitu (odstavec 2-4-3-1 a odstavec 2-4-3-2). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, v jakém rozsahu vakcinační virus způsobuje onemocnění, jestliže se rozšíří na vnímavá mladá kuřata.

VACCINUM ANTHRACIS VIVUM AD  
USUM VETERINARIUM

7.0:0441

Vakcína proti sněti slezinné živá  
pro veterinární použitíVakcíny pro  
veterinární  
použití

## 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující živé spory vhodně atenuovaného neopouzdrženého kmene *Bacillus anthracis*. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat proti onemocnění vyvolanému *B. anthracis*.

## 2 VÝROBA

## 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

*B. anthracis* se pomnožuje ve vhodné živné půdě. Na konci růstu se spory suspendují ve stabilizačním roztoku a spočítají se. Vakcína může obsahovat adjuvans.

## 2-2 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Použitý kmen je:

- neletální pro morčata nebo myši;
- nebo letální pro morčata, ale neletální pro králíky;
- nebo letální pro některé králíky.

Vakcinační kmen prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určen.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-2-1).

2-2-1 **Imunogenita.** Jestliže kmen *B. anthracis* není letální pro morčata ani pro myši, může se zkouška provést na morčatech. U kmene, který je letální pro morčata, ale ne pro králíky, se zkouška může provést na králících. U kmene, který je letální pro některé králíky, se zkouška provede na ovcích.

Jestliže se provádí zkouška na morčatech nebo králících, použije se nejméně třináct zdravých zvířat (skupina a). Každému z nejméně deseti zvířat se subkutánně nebo intradermálně podá 1/10 nejnižší dávky vakcíny doporučené pro ovce. Jako kontrola se ponechají nejméně tři zvířata stejného druhu i původu. Zvířata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Pokud uhynou z nespécifických příčin více než dvě zvířata, zkouška se opakuje.

Jestliže se provádí zkouška na ovcích, použije se nejméně osm zdravých ovcí (skupina b). Každá z nejméně pěti ovcí se vakcinuje subkutánně nebo intradermálně 1/10 nejnižší dávky vakcíny uvedené v označení na obalu pro ovce. Jako kontrola se ponechají nejméně tři ovce stejného původu. Zvířata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Každé zvíře z vakcinované skupiny (a) či (b) se čelenžuje subkutánně nejméně 100 MLD a každé kontrolní zvíře subkutánně nejméně 10 MLD kmene *B. anthracis*, který je patogenní pro druh zvířat použitých ve zkoušce. Zvířata se pozorují nejméně denně po 10 dnů po čelenži.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži všechna vakcinovaná zvířata přežijí a všechna kontrolní zvířata uhynou na sněť slezinnou. Pokud vakcinované zvíře po čelenži uhne, zkouška se opakuje. Pokud vakcinované zvíře uhne i při opakované zkoušce, vakcína nevyhovuje.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** *B. anthracis* obsažený ve vakcíně se prokáže morfologicky, sérologickými zkouškami, kultivací a biochemickými zkouškami.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Zkouška se provede mikroskopickým vyšetřením a inokulací vhodných živných půd. Vakcína neobsahuje kontaminující bakterie ani houby.

3-3 **Bezpečnost.** Zkouška se provede na jednom z druhů zvířat, pro který je vakcína určena. Pokud je určena pro několik druhů zvířat, včetně koz, provede se zkouška na kozách. Použijí se dvě zvířata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti *B. anthracis*. Subkutánně nebo intradermálně se podá každému zvířeti dvojnásobek dávky uvedené pro použitý druh v označení na obalu. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. V místě podání může být lokální reakce. Rozsah lokální reakce může kolísat podle kmene spor a adjuvans použitých při přípravě, ale nesmí se vyskytnout nekróza.

3-4 **Živé spory.** Počet živých spor se stanoví počítáním na pevných půdách.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže počet živých spor je nejméně 80 % počtu uvedeného v označení na obalu.

3-5 **Účinnost.** Vakcína vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-1 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální počet živých spor uvedený v označení na obalu.

ním jednoho nebo více adjuvans. U daného antigenu není množství 146S antigenu smíchaného v každé šarži vakcíny nižší než množství 146S antigenu v šarži vakcíny, která vyhověla zkoušce na imunogenitu.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VALIDACE INAKTIVAČNÍHO POSTUPU

Během inaktivace se titr viru sleduje citlivou a reprodukovatelnou metodou. Postup inaktivace vyhovuje, pokud logaritmičsky vyjádřený pokles titru viru je lineární a extrapolace prokazuje, že na konci inaktivace je počet infekčních virových částic na 10<sup>4</sup> litrů tekutého přípravku menší než jedna.

#### 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro každý živočišný druh, pro který je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1) a Imunogenita (odstavec 2-4-2).

##### 2-4-1 Bezpečnost

2-4-1-1 *Obecná bezpečnost.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a na každém druhu zvířat, pro který je vakcína určena.

V každém případě se použijí zvířata nejnižšího doporučeného stáří. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset zvířat, která nemají protilátky proti viru slintavky a kulhavky. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-4-1-2 *Bezpečnost na březích zvířatech.* Pokud je vakcína určena k použití nebo se může použít u březích zvířat, provede se zkouška na nejméně deseti březích zvířatech na začátku každého trimestru, pro který není použití kontraindikováno. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně až do porodu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zaznamenán nežádoucí vliv na březost a potomstvo.

2-4-2 **Imunogenita.** Následující zkouška je vhodná pro prokázání imunogenity vakcíny u skotu. Účinnost vakcíny se vyjádří jako počet 50 % ochranných dávek pro skot (PD<sub>50</sub>) obsažených v dávce uvedené v označení na obalu. PD<sub>50</sub> se stanoví na skotu, který je primárně vakcinován a je čelenžován inokulací 10 000 ID<sub>50</sub> virulentního bovinního viru stejného sérotypu, jaký se použil při přípravě vakcíny, za dále popsanych podmínek. Vakcinační virus se může použít pro čelenž.

## VACCINUM APHTHARUM EPIZOOTICARUM INACTIVATUM AD RUMINANTES

6.0:0063

Vakcína proti slintavce a kulhavce přežvýkavců  
inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více sérotypů viru slintavky a kulhavky, inaktivovaných tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k ochraně přežvýkavců proti slintavce a kulhavce.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách a potom se oddělí od buněčného materiálu filtrační nebo jinými vhodnými postupy. Sklizený virus se inaktivuje ve vhodných podmínkách a může se koncentrovat a purifikovat. Použije se pro přípravu vakcíny ihned nebo po skladování při teplotě, při které se prokazatelně zachová stabilita antigenu. Vakcína se připraví z inaktivovaného viru přimíchá-

Zkouška na imunogenitu se provede pro každý sérotyp viru slintavky a kulhavky, přítomný ve vakcíně. Zkouška na imunogenitu provedená pro určitý sérotyp je platná pro další vakcíny s podmínkou, že tyto vakcíny mají stejné základní složení a že účinnost šarže vzhledem k tomuto určitému sérotypu není nižší než účinnost vakcíny, která měla vyhovující výsledky v dále popsané zkoušce.

Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci. V každém případě se použije skot nejméně 6 měsíců starý. Každému zvířeti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně sedmnáct kusů skotu, který se získá z oblastí prostých slintavky a kulhavky, který nebyl nikdy vakcinován proti slintavce a kulhavce a který nemá protilátky neutralizující různé sérotypy viru slintavky a kulhavky. Vakcinují se nejméně tři skupiny po nejméně pěti zvířatech ve skupině, různou dávkou vakcíny pro každou skupinu. Různé dávky vakcíny se podají injikováním různých objemů vakcíny, nikoliv ředěním vakcíny. Např. jestliže je v označení na obalu uvedeno, že injekce 2 ml odpovídá podání jedné dávky vakcíny, 1/4 dávky vakcíny se může získat podáním 0,5 ml a 1/10 dávky se může získat podáním 0,2 ml. Nejméně dva kusy skotu se ponechají jako kontroly. Za 3 týdny se všechna zvířata čelenují intradermálně do dvou míst na horním povrchu jazyka (0,1 ml do jednoho místa) dávkou odpovídající přibližně 10 000 ID<sub>50</sub> suspenze plně virulentního viru, získaného od skotu a stejného sérotypu jako sérotyp použitý při přípravě vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 8 dnů a potom se šetrně utrádí. Nechráněná zvířata mají léze na jiných místech než na jazyku. Chráněná zvířata mohou mít léze na jazyku.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže obě kontrolní zvířata nemají změny na nejméně třech končetinách. Z počtu ochráněných zvířat v každé skupině se vypočítá obsah PD<sub>50</sub> ve vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost není nižší než účinnost uvedená v označení na obalu. Minimální účinnost uváděná v označení na obalu je nejméně 3 PD<sub>50</sub> v jedné dávce pro skot.

## 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Totožnost.** Inaktivovaný antigen várky se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

**2-5-2 Zbytkový živý virus.** Limit detekce buněčných kultur, které se mají použít se zřetelem na zkoušený virus, se stanoví vymezením počtu CCID<sub>50</sub> a obsahem 146S antigenu vzorku živého viru. Buňky nejsou vhodné, jestliže množství viru odpovídající 1 µg 146S antigenu má méně než 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub>. Poměrná část každé šarže várky inaktivovaného antigenu, představující nejméně dvě sta dávek, se zkouší na nepřítomnost živého viru inokulací do vhodných buněčných kultur. Během kultivace buněk se provede pasáž. Aby se umožnilo zkoušení tak velkých vzorků v buněčných kulturách, může se vzorek inaktivovaného antigenu pro tento účel koncentrovat. Prokáže se, že zvolená koncentrace a metoda zkoušky neruší detekci infekčního viru ve zkoušeném vzorku a že koncentrovaný inaktivovaný antigen nebrání pomnožení viru, ani není příčinou toxických změn. Do každé zkoušky se zařadí pozitivní kontrola.

**2-5-3 Obsah antigenu.** Obsah antigenu 146S v každé šarži nerozplněné várky inaktivovaného antigenu se stanoví metodou *in vitro* (např. stanovením gradientu hustoty sacharosu odstředěním a spektrofotometrickým stanovením v ultrafialovém světle při 259 nm).

**2-5-4 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost a bylo prokázáno, že vyhovuje z hlediska imunogenity u cílového druhu zvířat.

Následující zkouška může být použita po určení vyhovující hladiny pro daný antigen. Stejná hladina pro daný antigen se může použít, když je tento antigen obsažen v kombinaci s jiným antigenem s podmínkou, že složení vakcíny se liší pouze v obsažených antigenech.

**2-5-4-1 Vakcíny pro použití u skotu.** Použije se skot nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, který pochází z oblastí prostých slintavky a kulhavky, nebyl nikdy vakcinován proti slintavce a kulhavce a nemá protilátky neutralizující různé sérotypy viru slintavky a kulhavky. Vakcinuje se nejméně pět kusů skotu způsobem doporučeným v označení na obalu. Pro každé zvíře se použije vhodná dávka vakcíny. Po stanovení době, která není delší než 28 dnů po vakcinaci, se odebere vzorek krve a validovaným pracovním postupem (např. sérumneutralizační zkouškou, ELISA), se stanoví jednotlivě v každém séru hladina protilátek proti každému sérotypu přítomnému ve vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně u 50 % zvířat jsou zjištěné titry odpovídající nejméně těm, které byly již dříve určené jako vyhovující hladina.

**2-5-4-2 Vakcíny pro použití u jiných přežvýkavců.** Účinnost každé šarže se prokáže vhodnou validovanou zkouškou. Může být vhodná zkouška na skotu provedená výše uvedenými postupy u vakcín pro použití u skotu.

## NOUZOVÉ POUŽITÍ

*V situacích mimořádné naléhavosti a se souhlasem oprávněné autority se může šarže vakcíny uvolnit před dokončením zkoušek a stanovením účinnosti, jestliže zkouška na sterilitu byla provedena s várkou inaktivovaného antigenu a všemi ostatními složkami vakcíny a jestliže zkoušky na bezpečnost a účinnost byly provedeny s reprezentativní šarží vakcíny připravené ze stejné várky inaktivovaného antigenu. V této souvislosti se šarže nepovažuje za reprezentativní, jestliže je připravená s větším množstvím antigenu nebo antigenů a nemá-li stejnou formulaci jako šarže, která se může uvolnit.*

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Sérum zvířete, které před imunizací vakcínou nemělo protilátky proti viru slintavky a kulhavky, neutralizuje při zkoušení vhodně citlivou metodou sérotypy viru použité při přípravě vakcíny.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na



sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě nevakcinovaná zvířata jednoho ze živočišných druhů, pro které je vakcína určená, která jsou nejméně 6 měsíců stará, nemají protilátky proti viru slintavky a kulhavky a jsou z oblastí prostých slintavky a kulhavky. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-4-2 Imunogenita.

## VACCINUM BRONCHITIDIS INFECTIVAE AVIARIAE INACTIVATUM

6.0:0959

### Vakcína proti infekční bronchitidě ptáků inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů jednoho nebo více sérotypů viru infekční bronchitidy ptáků, inaktivovaného tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k ochraně ptáků proti poklesu snášky nebo jakosti vajec. U vakcín určených také k ochraně proti respiračním příznakům se kromě zkoušky uvedené v odstavci Účinnost, požaduje také provedení dodatečné zkoušky na účinnost.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v fertilizovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-4-1).

**2-4-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání a pro každý sérotyp přítomný ve vakcíně. V každém případě se použijí kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2). Každému kuřeti se podá vakcína s minimální účinností.

Ve zkoušce se použijí čtyři skupiny po nejméně třiceti kuřatech a ošetří se následovně:

- skupina A: nevakcinované kontroly;
- skupina B: vakcinované inaktivovanou vakcínou proti infekční bronchitidě ptáků;
- skupina C: vakcinované živou vakcínou proti infekční bronchitidě ptáků a inaktivovanou vakcínou proti infekční bronchitidě ptáků podle doporučeného schématu;
- skupina D: vakcinované živou vakcínou proti infekční bronchitidě ptáků.

U všech ptáků se zaznamenává snáška a jakost vajec od počátku snášky až do nejméně čtyř týdnů po čelenži. Na vrcholu snášky se čelenžují všechny skupiny takovým množstvím virulentního viru ptačí infekční bronchitidy, které postačuje způsobit pokles snášky nebo jakosti vajec po tři po sobě následující týdny v průběhu čtyř týdnů po čelenži. Zkoušku lze hodnotit jestliže pokles snášky u skupiny A je při porovnání s normální úrovní zaznamenanou před čelenží, nejméně 35 %, v případě, že se čelenž provádí kmenem Massachusetts. Jestliže je nutné provést čelenž jiným sérotypem, u něhož je doloženo, že nezpůsobuje 35 % pokles snášky, musí čelenž vyvolat pokles snášky úměrný tomu, který je doložen, v každém případě však nejméně 15 %.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je snáška nebo jakost vajec u skupiny C významně lepší než u skupiny D a u skupiny B významně lepší než u skupiny A.

##### 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Zbytkový živý virus.** Pro zjištění zbytkového živého viru infekční bronchitidy ptáků se provádí kultivační zkouška u každé šarže antigenu těsně po inaktivaci a u várky vakcíny před rozplněním nebo, jestliže vakcína obsahuje adjuvans, u nerozplněné várky antigenu nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans; zkouška se provádí v embryonovaných slepičích vejcích z SPF chovu (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), vždy na těch, které jsou na vakcinační kmen nejcitlivější. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí živý virus.

**2-5-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Jedna dávka vakcíny se intramuskulárně podá každému z nejméně deseti kuřat, z SPF chovu (5.2.2), která jsou ve stáří mezi dvěma týdny a nejnižším stářím stanoveným pro vakcinaci. Pět kuřat ze stejného líhnutí se ponechá jako ne-

vakcinované kontroly. Vzorky séra od každého kuřete se připraví těsně před podáním vakcíny a po období vymezeném zkoušením porovnávací vakcíny. Vhodnou sérologickou metodou, např. sérumneutralizační, se v každém séru stanoví titr protilátek proti každému sérotypu obsaženému ve vakcíně. Zkoušku lze hodnotit, jestliže séra získaná od nevakcinovaných kontrol a od kuřat těsně před podáním vakcíny neobsahují zjištěitelné specifické protilátky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není významně nižší než hladina, získaná se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína podaná kuřatům, která nemají protilátky proti každému sérotypu viru přítomnému ve vakcíně, vyvolá tvorbu těchto protilátek prokazatelných neutralizací viru.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použije se deset kuřat, 14 až 28 dnů starých, která pocházejí z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pro potvrzení inaktivace viru ptačí infekční bronchitidy.

**A.** Pro vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na embrya se inokulují dvě pětiny dávky do alantoidní dutiny deseti kuřecích embryí 9 až 11 dnů starých z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2) a inkubuje se. Pozoruje se 5 až 6 dnů, odděleně se spojí vzorky alantoidních tekutin z vajec obsahujících živá embrya a z vajec obsahujících uhynulá embrya, kromě těch, která uhynula v průběhu prvních 24 h po inokulaci. Všechna embrya uhynulá po 24 h a ta, která přežívají 5 až 6 dnů po inokulaci, se vyšetří na přítomnost abnormalit. Nezjistí se úhyny ani abnormality, které lze přisoudit vakcinačnímu viru. Do alantoidní dutiny každého z deseti kuřecích embryí z SPF chovu (5.2.2) 9 až 11 dnů starých se inokuluje po 0,2 ml spojeného vzorku alantoidní tekutiny ze živých embryí a do deseti obdobných embryí se inokuluje po 0,2 ml spojeného vzorku alantoidní tekutiny z uhynulých embryí a inkubuje se 5 až 6 dnů. Všechna embrya uhynulá po 24 h a ta, která přežívají 5 až 6 dnů po inokulaci, se vyšetří na přítomnost abnormalit. Jestliže v jedné z etap uhynie více než 20 % embryí, zkouška se od této etapy opakuje.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevyskytne úhyn nebo abnormalita, kterou lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**B.** Pro vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na buněčné kultury se inokuluje deset dávek vakcíny do vhodné buněčné kultury. Pokud vakcína obsahuje olejové adjuvans, odstraní se vhodným způsobem. Inkubuje

se 7 dnů při (38 ± 1) °C. Proveďte se pasáž do další sady buněčných kultur a inkubuje se 7 dnů při (38 ± 1) °C.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná z kultur nejeví příznaky infekce.

**3-5 Cizí agens.** Použijí se kuřata ze zkoušky na bezpečnost. Každému kuřeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny a za 21 dnů stejným způsobem ještě jedna dávka. Po dvou týdnech se připraví vzorky séra každého kuřete a provedou se zkoušky na protilátky proti následujícím agens metodami předepsanými v obecné stati *Chovy kuřat prostě specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín (5.2.2)*: virus encefalomyelitidy ptáků, viry ptačí leukózy, virus syndromu poklesu snášky, virus infekční burzitidy ptáků, virus infekční laryngotracheitidy ptáků, virus chřipky A, virus Markovy choroby, virus newcastleské choroby. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti těmto agens.

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-4-1 Imunogenita.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda je vakcinační virus adaptovaný na embrya nebo na buněčné kultury.

## VACCINUM BRONCHITIDIS INFECTIVAE AVIARIAE VIVUM

6.1:0442

### Vakcína proti infekční bronchitidě ptáků živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů různých typů viru infekční bronchitidy ptáků. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům k aktivní imunizaci proti respiračním onemocněním vyvolaným virem infekční bronchitidy ptáků.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách ma-

tečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

## 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky na bezpečnost (odstavec 2-4-1), na zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a na imunogenitu (odstavec 2-4-3).

### 2-4-1 Bezpečnost

**2-4-1-1 Bezpečnost pro dýchací trakt a ledviny.** Zkouška se provede na kuřatech, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Použije se nejméně patnáct kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá okulonazálně množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. 5., 7. a 10. den po podání viru se šetrně utratí nejméně po pěti kuřatech, odeberou se vzorky průdušnice a ledviny. Vzorky ledviny se fixují pro histologické vyšetření. Odeberou se průdušnice a připraví se příčné řezy z průdušnice každého kuřete; tři z horní části, čtyři ze střední části a tři z dolní části. Všechny explantáty se malým zvětšením mikroskopu vyšetří co možná nejdříve a nejpozději 2 h po odebrání vzorků na aktivitu řasinek. Uvede se bodová hodnota (skóre) pro ciliostázu podle stupnice od 0 (100 % aktivity řasinek) do 4 (žádná aktivita, úplná ciliostáza); vypočítá se průměrná bodová hodnota (skóre) ciliostázy (maximum pro každou průdušnici je 40) pro pět kuřat utracených 5., 7. a 10. den. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky infekční bronchitidy ptáků nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru;
- histologickým vyšetřením ledvin se zjistí nejvýše střední zánětlivé léze.

Provede se analýza rizika/přínosu, přičemž se bere v úvahu průměr získané bodové hodnoty (skóre) ciliostázy proti očekávaným přínosům při použití vakcíny.

**2-4-1-2 Bezpečnost pro reprodukční trakt.** Jestliže doporučení pro použití konstatují nebo v sobě zahrnují, že vakcína se může použít u samic méně než 3 týdny starých, které jsou potom drženy do pohlavní dospělosti, má se prokázat, že nedojde k žádnému poškození vývoje reprodukčního traktu, když se vakcína podá kuřatům nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci.

Může se použít následující zkouška: použije se nejméně čtyřicet kuřat samičího pohlaví, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci a jsou z SPF chovu (5.2.2); použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarží vakcíny; každému kuřeti se doporučeným způsobem podá množství viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny; nejméně 10 týdnů po podání vakci-

načního viru se kuřata šetrně utratí a provede se makroskopické vyšetření vejcovodů. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nevyskytují abnormality u více než 5 % vejcovodů.

**2-4-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže viru, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti kuřat starých 2 týdny z SPF chovu (5.2.2); postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečného získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Přijmou se opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každému kuřeti se nakapáním do oka podá množství vakcinačního viru, které umožňují zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 2 až 4 dny po podání vakcinačního viru se připraví suspenze ze sliznice průdušnice každého kuřete a tyto vzorky se spojí. Nakapáním do oka se každému z pěti dalších kuřat starých dva týdny z SPF chovu (5.2.2) podá po 0,05 ml směsného vzorku. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška na bezpečnost pro dýchací trakt a ledviny (odstavec 2-4-1-1) a kde je to vhodné, zkouška na bezpečnost pro reprodukční trakt (odstavec 2-4-1-2) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Virus se podá způsobem doporučeným pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-3 Imunogenita.** Imunogenita se prokáže u každého kmene viru přítomného ve vakcíně. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší než minimální titr viru, uvedený v označení na obalu, a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže, která je v šarží vakcíny. Během prokazování imunogenity se může použít jedna nebo obě dále uvedené zkoušky.

**2-4-3-1 Aktivita řasinek explantátů průdušnice.** Použije se nejméně dvacet pět kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně pět kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se nakapáním do oka každé kuře čelenuje dostatečným množstvím virulentního viru ptačí infekční bronchitidy stejného typu, jako je vakcinační virus, který se zkouší. Kuřata se za 4 až 7 dnů po čelení šetrně utratí a připraví se příčné řezy z průdušnice každého kuřete; tři z horní části, čtyři ze střední části a tři z dolní části. Všechny explantáty se malým zvětšením mikroskopu vyšetří co

možná nejdříve a nejspíše 2 h po odebrání vzorků na aktivitu řasinek. Pro daný řez průdušnice se aktivita řasinek považuje za normální, když nejméně 50 % vnitřku prstence vykazuje silný pohyb řasinek. Kuře se pokládá za nepostiženou, jestliže nejméně devět z deseti prstenců vykazuje normální aktivitu řasinek.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud:

- méně než 80 % kontrolních kuřat má aktivitu řasinek zastavenou nebo mimořádně sníženou;
- a/nebo během doby mezi vakcinací a čelenží více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % vakcinovaných kuřat vykazuje normální aktivitu řasinek.

**2-4-3-2 Záchyt viru z výtěrů průdušnice.** Použije se nejméně třicet kuřat z SPF chovu (5.2.2) stejného původu. Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se nakapáním do oka čelenžuje každé kuře dostatečným množstvím virulentního viru ptačí infekční bronchitidy stejného typu, jako vakcinační virus, který se zkouší. Kuřata se šetrně utratí za 4 až 7 dnů po čelenži a připraví se suspenze z výtěrů sliznice průdušnice každého kuřete. Inokuluje se 0,2 ml suspenze do alantoidní dutiny každého z pěti kuřecích embryí, 9 až 11 dnů starých, z SPF chovu (5.2.2). Vejce se inkubují po 6 až 8 dnů po inokulaci. Vejce, která po prvním dnu inkubace neobsahují živé embryo, se vyřadí a považují se za nespecifické úhyny. Zaznamenají se další vejce obsahující mrtvé embryo a po 6 až 8 dnech inkubace se vyšetří každé vejce obsahující živé embryo na léze charakteristické pro infekční bronchitidu ptáků. Postupně se provedou tři takové pasáže. Jestliže jedno embryo z řady vajec uhynie nebo má charakteristické změny, inokulum se považuje za nosiče viru infekční bronchitidy ptáků. Vyšetření řady vajec se považuje za definitivně negativní, jestliže žádné zkoušené inokulum není nosičem viru.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud:

- čelenžní virus se reizoluje z méně než 80 % kontrolních kuřat;
- a/nebo během doby mezi vakcinací a čelenží více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně;
- a/nebo více než jedno vejce v jakékoliv skupině se vyřadí pro nespecifický úhyn embrya.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se čelenžní virus reizoluje z nevíce než 20 % vakcinovaných kuřat.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

#### 3-1 Totožnost

**3-1-1 Vakcíny obsahující jeden typ viru.** Vakcína, podle potřeby zředěná, smíchaná s antisérem viru infekční bronchitidy ptáků, specifickým pro typ viru, nadále neinfikuje kuřecí embrya z SPF chovu (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

**3-1-2 Vakcíny obsahující více než jeden typ viru.** Vakcína, podle potřeby zředěná, smíchaná s typově specifickými

antiséry proti každému kmenu přítomnému ve vakcíně, s výjimkou kmene, který se identifikuje, infikuje kuřecí embrya z chovu SPF (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje, zatímco po následném přidání typově specifického antiséra proti kmenu, který se identifikuje, nadále nevyvolá takovou infekci.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích hotových výrobků (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Jestliže vakcína obsahuje více než jeden kmen viru, titruje se každý kmen po neutralizaci ostatních kmenů viru typově specifickými antiséry infekční bronchitidy ptáků. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje pro každý vakcinační virus nejméně minimální titr uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná podle doporučeného schématu, doporučeným způsobem a metodou vyhovuje jedné ze zkoušek předepsaných v odstavci Imunogenita (2-4-3). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedená s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky, obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM BRUCELLOSIS (BRUCELLA MELITENSIS STIRPE REV. 1) VIVUM AD USUM VETERINARIUM

6.0:0793

Vakcína proti brucelóze (*Brucella melitensis* kmen Rev. 1) živá pro veterinární použití

*Synonyma.* Vaccinum brucellosis (*Brucella melitensis* stirpe Rev. 1) vivum cryodesiccatum ad usum veterinarium, Vakcína proti brucelóze (*Brucella melitensis* kmen Rev. 1) živá lyofilizovaná pro veterinární použití

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi živého kmene *Brucella melitensis* Rev. 1. Vakcína obsahuje nejméně  $0,5 \times 10^9$  a nejvíce  $4 \times 10^9$  živých bakterií v jedné dávce. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci ovcí a koz proti onemocnění vyvolanému *B. melitensis*.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Brucella melitensis* kmen Rev. 1 se pomnožuje ve vhodné živné půdě. Metoda pomnožení je taková, aby se předešlo bakteriální disociaci, a tak se udržela hladká (S) fáze kultury. Bakterie se suspendují v tlumivém roztoku, který může obsahovat vhodný stabilizátor. Suspenze se plní do obalů.

#### 2-2 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Vakcinační kmen prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ovce a kozy, pro které je určen. Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-2-1).

**2-2-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují. V každém případě se použijí ovce 4 až 5 měsíců staré. Každé ovci se podá množství vakcinačního kmene, které není větší než minimální titr živých bakterií uvedený v označení na obalu.

Pro zkoušku se použije nejméně čtyřicet ovcí (samic) z nevakuinovaného stáda, ve kterém se nevyskytuje brucelóza. Jako čelenžní kmen se použije 24hodinová kultura kmene *Brucella melitensis* H38 v tryptosovém agaru. Ke stanovení čelenžní dávky se provede předběžná zkouška, ve které se použijí ovce stejného plemene a stáří jako v hlavní zkoušce. Čelenžní dávka, která je mezi  $10^7$  až  $10^8$  jednotek tvořících kolonie, se vybírá tak, aby způsobila zmetání u všech nevakuinovaných ovcí. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně dvacet ovcí ve stáří 4 až 6 měsíců. Nejméně dvacet ovcí se ponechá jako kontroly. Synchronizuje se říje u čtyřiceti ovcí, které se ve stáří 10 až 12 měsíců inseminují. Dva až tři měsíce po inseminaci se zjišťuje březost a všechna zvířata, která nejsou březí, se ze zkoušky vyloučí. Všechna březí zvířata se čelenžují nakapáním dostatečné dávky kmene *Brucella melitensis* H38 do spojivkového vaku. Zaznamenaná se výskyt abortů a jejich příčina se potvrdí zkouškou na přítomnost čelenžního kmene u zmetaných plodů i u bahníc (použijí se selektivní půdy podle Kuzdase a Morse nebo podle Farrella). Zkoušky na přítomnost čelenžního kmene se u každého zvířete provedou při bahnění.

Zkoušky na přítomnost čelenžního kmene v přeskapulárních a retromamárních lymfatických uzlinách se provedou při porážce zvířat 4 až 6 týdnů po bahnění.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže se u nejméně 70 % nevakuinovaných zvířat:

- prokáže zmetání vyvolané čelenžním kmenem;
- prokáže infekce čelenžním kmenem při bahnění;
- prokáže infekce přeskapulárních a retromamárních lymfatických uzlin při porážce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se:

- zjistí zmetání vyvolané použitým čelenžním kmenem nejvýše u 30 % vakcinovaných ovcí;
- při bahnění prokáže použitý čelenžní kmen nejvýše u 50 % vakcinovaných ovcí;
- prokáže použitý čelenžní kmen při porážce nejvýše u 40 % vakcinovaných ovcí.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** *Brucella melitensis* přítomná ve vakcíně se prokáže vhodnými morfologickými, sérologickými a biochemickými zkouškami a kultivací. Kmen Rev. 1 se inhibuje přidáním 3 µg benzylpenicilinu sodné soli k mililitru vhodné živné půdy; kmen roste na agaru obsahujícím 2,5 µg streptomycinu v mililitru.

**3-2 Bezpečnost.** Použijí se dvě ovce, 4 až 6 měsíců staré, které nemají protilátky proti *B. melitensis*. Každé ovci se doporučeným způsobem podá jedna dávka vakcíny. Ovce se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-3 Určení disociační fáze.** Vhodnou technikou se prověří nejméně 200 kolonií. Vakcinační kmen při kultivaci roste v hladké (S) fázi.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 95 % kolonií je hladkého typu.

**3-4 Cizí mikroorganismy.** Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže neobsahuje cizí mikroorganismy. Nepřítomnost jiných mikroorganismů než kmene *Brucella melitensis* Rev. 1 se ověří zkouškou na sterilitu, předepsanou v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-5 Živé bakterie.** Na pevné půdě vhodné pro kultivaci kmene *Brucella melitensis* Rev. 1 se provede stanovení počtu živých bakterií. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže obsahuje nejméně  $0,5 \times 10^9$  a nejvíce  $4 \times 10^9$  živých bakterií v jedné dávce.

**3-6 Doba 50% perzistence.** Použijí se třicet dvě samice myši kmene CD 1 staré 5 až 6 týdnů. Každá myš se vakcinuje subkutánně suspenzí zkoušené vakcíny obsahující  $10^8$  živých bakterií. Za 3, 6, 9 a 12 týdnů se šetrně utratí náhodně vytvořené skupiny osmi myši. Vyjmou se sleziny a individuálně se asepticky homogenizují v deseti objemových dílech *tlumivého roztoku fosforečnanového s chlořidem sodným o pH 6,8*. Tato suspenze se naočkuje na misky se vhodnou živnou půdou. Použije se 0,4 ml na jednu misku a nejméně tři misky na jednu slezinu (dolní hranice detekce

je pět bakterií na slezinu). Současně se provede stejná zkouška s referenčním kmenem, kterým je *Brucella melitensis kmen Rev. 1 BRP*. Vypočítá se doba 50% perzistence obvyklými statistickými metodami (5.3) pomocí probitové analýzy.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže doba 50% perzistence vakcinačního kmene se významně neliší od doby 50% perzistence referenčního kmene.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, že:

- vakcína může být nebezpečná pro člověka;
- vakcína se nepodává zvířatům v období březosti a laktace;
- vakcína může být nebezpečná pro skot, který proto nemá přijít do styku s vakcinovanými zvířaty.

## VACCINUM BURSIDITIS INFECTIVAE AVIARIAE INACTIVATUM

6.0:0960

### Vakcína proti infekční burzitidě ptáků inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru infekční burzitidy ptáků typu 1, inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k podání chovné drůbeži k ochraně jejího potomstva proti infekční burzitidě ptáků.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určen. Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška na imunogenitu (odstavec 2-4-1).

2-4-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci (blízko období snášky). Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

Kde se provádí čelení zkouška, může se použít následující. Použijí se dvě skupiny po nejméně dvaceti slepicích, ošetřených takto:

- skupina A: nevakcinované kontroly;
- skupina B: vakcinovaná inaktivovanou vakcínou proti infekční burzitidě ptáků.

Vzorky séra se získají od každé z nevakcinovaných kontrolních slepic (skupina A), těsně před podáním vakcíny, dále za 4-6 týdnů a v období sběru vajec pro líhnutí. Jestliže se prokázání imunogenity provádí jiným způsobem, získají se vzorky sér také od každé vakcinované slepice (skupina B) v době sběru vajec pro líhnutí. Protilátková odpověď se zjišťuje sérumneutralizační zkouškou.

Vejce se sbírají pro líhnutí nejdříve 5 týdnů po vakcinaci a z tohoto sběru vajec se provádí dále popsaná zkouška na kuřatech nejméně 3 týdny starých.

Dvacet pět kuřat od vakcinovaných slepic (skupina B) a deset kontrolních kuřat téhož chovu a stáří od nevakcinovaných slepic (skupina A) se čelení nakapáním do oka takového množství virulentního kmene viru infekční ptačí burzitidy, které postačuje k vyvolání výrazných příznaků onemocnění, včetně změn ve Fabriciově burze, u všech nevakcinovaných kuřat. Tři až čtyři dny po čelení se všem kuřatům odebere Fabriciova burza. Burzy se vyšetří na příznaky infekce histologicky a také vhodnou metodou na přítomnost antigenu infekční ptačí burzitidy. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže tři nebo méně kuřat od slepic skupiny B mají příznaky infekční burzitidy ptáků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže příznaky infekční burzitidy ptáků mají všechna kuřata od slepic skupiny A.

Jestliže se doporučuje více způsobů podání, provede se současně s výše uvedenou zkouškou na imunogenitu zkouška popsána v odstavci Účinnost na různých skupinách ptáků pro každý doporučený způsob podání. Sérologická odpověď ptáků inokulovaných jiným způsobem než použitým ve zkoušce na imunogenitu není významně nižší než odpověď skupiny vakcinované tímto způsobem.

#### 2.5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-5-1 **Zbytkový živý virus.** Amplifikační zkouška na zbytkový živý virus infekční burzitidy ptáků se provede s každou šarží antigenu ihned po inaktivaci k potvrzení inaktivace; zkouška se provádí buď v embryonovaných slepičích vejcích, nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), podle toho, co je citlivější na vakcinační kmen; množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-5-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná

metoda; kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Doporučeným způsobem se jednou dávkou vakcíny vakcinuje každé z nejméně deseti kuřat 14 až 28 dní starých z SPF chovu (5.2.2). Za 4 až 6 týdnů se získají vzorky séra od každého ptáka a od deseti nevakcinovaných kontrolních ptáků stejného stáří a původu. Protilátková odpověď se vyšetří sérum-neutralizační zkouškou.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se vyskytnou specifické protilátky v sérech nevakcinovaných ptáků. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titr protilátek v sérech vakcinovaných ptáků je stejný nebo vyšší než titr získaný s šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci 2-4-1 Imunogenita.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Pokud se vakcína podá injekčně kuřatům, která nemají protilátky proti viru infekční ptačí burzitidy typu 1, vyvolá tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použije se deset kuřat starých 14 až 28 dnů z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po nejméně 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcině.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Provede se zkouška na zbytkový živý virus k potvrzení inaktivace viru infekční ptačí burzitidy typu 1.

**A.** U vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na embryo se inokulují dvě pětiny dávky do alantoidní dutiny nebo na chorioalantoidní membránu deseti 9 až 11 dnů starých kuřecích embryí z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF vejce) (5.2.2). Embrya se inkubují a pozorují nejméně denně po 6 dnů. Odděleně se spojí alantoidní tekutiny nebo membrány z vajec obsahujících živá embrya a z vajec obsahujících odumřelá embrya, kromě těch, která uhynula z nespecifických příčin do 24 h po podání.

Do alantoidní dutiny nebo na chorioalantoidní membránu každého z deseti 9 až 11 dnů starých SPF embryí se inokuluje po 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny nebo směsi rozdrčených chorioalantoidních membrán ze živých embryí, do každého z deseti dalších embryí po 0,2 ml směsi tekutin nebo membrán z uhynulých embryí a inkubuje se 6 dnů. Každé embryo se vyšetří na přítomnost lézí infekční burzitidy ptáků.

Jestliže více než 20 % embryí uhynie v jedné z etap, tato etapa se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se neobjeví léze infekční ptačí burzitidy a jestliže v žádné opakované zkoušce neuhyne z nespecifických příčin více než 20 % embryí.

K prevenci bakteriální infekce se mohou ve zkoušce použít antibiotika.

**B.** U vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na buněčnou kulturu se inokuluje deset dávek vakcíny do vhodné buněčné kultury. Pokud zkoušený přípravek obsahuje olejové adjuvans, odstraní se vhodným způsobem. Inkubuje se 7 dnů při  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Provede se pasáž na další sadu buněčných kultur a inkubuje se 7 dnů při  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže kultury nejeví příznaky infekce.

**3-5 Cizí agens.** Použije se deset kuřat starých 14 až 28 dnů, z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každé kuře vakcinuje dvojnásobnou dávkou vakcíny. Za 3 týdny se stejným způsobem podá jedna vakcinační dávka. Za další 2 týdny se získají vzorky séra každého kuřete a provedou se zkoušky na protilátky proti následujícím infekčním agens metodami předepsanými v obecné kapitole 5.2.2 *Chovy kuřat prosté specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín*: virus ptačí encefalomyelitidy, viry ptačí leukózy, hemaglutinační ptačí adenovirus, virus infekční bronchitidy ptáků, virus infekční laryngotracheitidy ptáků, virus chřivky A, virus Markovy choroby, virus newcastleské choroby.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolává tvorbu protilátek proti těmto agens.

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-4-1 Imunogenita.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda je vakcinační kmen adaptovaný na embryo nebo na buněčnou kulturu.

## VACCINUM BURSITIDIS INFECTIVAE AVIARIAE VIVUM

6.0:0587

Vakcína proti infekční burzitidě ptáků živá  
*Synonymum.* Vakcína proti infekční ptačí burzitidě (nemoci Gumboro) živá lyofilizovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru infekční burzitidy ptáků typu 1 (nemoci Gumboro). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům k aktivní imunizaci; vztahuje se na vakcíny obsahující kmene s nízkou virulencí, ale nevztahuje se na vakcíny obsahující kmene s vyšší virulencí, které mohou být potřebné k tlumení nákazy za určitých nálezových situací.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

## 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

## 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

## 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky na bezpečnost (odstavec 2-4-1), na poškození Fabriciovy burzy (odstavec 2-4-2), na imunosupresi (odstavec 2-4-3), na zvýšení virulence (odstavec 2-4-4) a na imunogenitu (odstavec 2-4-5).

2-4-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu vakcinace. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 10 % kuřat uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky infekční burzitidy ptáků nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-4-2 **Poškození Fabriciovy burzy.** Zkouška se provede pro ten způsob podání doporučený pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný; použijí se kuřata, která nejsou starší než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Použije se nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá desetinásobku maximálního titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Sedmý, čtrnáctý, jednadvacátý a osmadvacátý den po podání vakcinačního viru se šetrně utratí vždy nejméně pět kuřat a připraví se řez v místě největšího průměru Fabriciovy burzy každého kuřete. Provede se histologické vyšetření řezu a vyhodnotí se stupeň poškození burzy podle následující stupnice.

0 Žádná změna, normální burza.

- 1 1 % až 25 % folikulů má lymfoidní depleci (tj. méně než 50% deplece v jednom postiženém folikulu), infiltrace heterofily v lézích.
- 2 26 % až 50 % folikulů má téměř úplnou lymfoidní depleci (tj. více než 75% deplece v jednom postiženém folikulu), postižené folikuly nekrotizují a může být zjištěna silná infiltrace heterofily.
- 3 51 % až 75 % folikulů má lymfoidní depleci; postižené folikuly nekrotizují a je zjištěna silná infiltrace heterofily.
- 4 76 % až 100 % folikulů má téměř úplnou lymfoidní depleci, jsou zjištěny hyperplazie a cysty; postižené folikuly nekrotizují a je zjištěna silná infiltrace heterofily.
- 5 100 % folikulů má téměř úplnou lymfoidní depleci; úplná ztráta folikulární struktury, ztlustělý a zřasený epitel, fibróza tkáně burzy.

Pro každou skupinu kuřat se vypočítá průměrná hodnota poškození (skóre lézí). Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru;
- průměrná hodnota poškození (skóre lézí) burzy za 21 dnů po podání vakcinačního viru je menší nebo se rovná 2,0 a za 28 dnů po podání je menší nebo se rovná 0,6;
- během 21 dnů po podání dochází ke zřetelné repopulaci burzy lymfocyty.

2-4-3 **Imunosuprese.** Zkoušky se provedou pro způsob podání doporučený pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný; použijí se kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Použije se nejméně třicet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Kuřata se rozdělí namátkově do tří skupin, každá po nejméně deseti a skupiny se udržují odděleně. Nakapáním do oka se každému kuřeti první skupiny podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. V době po vakcinaci, kdy je pravděpodobně burza maximálně poškozena, jak lze usuzovat z výsledků získaných ve zkoušce na poškození Fabriciovy burzy (odstavec 2-4-2), se každému vakcinovanému kuřeti a každému kuřeti jiné skupiny podá jedna dávka vakcíny proti newcastleské chorobě (živé), obsahující kmen Hitchner B1. Za 14 dnů po podání se stanoví sérologická odpověď každého kuřete dvou skupin na virus newcastleské choroby. Všechna kuřata tří skupin se čelenují intramuskulárně nejméně  $10^5$  EID<sub>50</sub> virulentního viru newcastleské choroby a zaznamená se stupeň ochrany ve dvou skupinách vakcinovaných kmenem Hitchner B1 při srovnání s nevakcinovanou skupinou. Zkoušku lze hodnotit, pokud jedno nebo více z nevakcinovaných kuřat uhne během 7 dnů po čelení. Stupeň imunoprese se stanoví porovnaním sérologických odpovědí a stupňů ochrany dvou skupin vakcinovaných kmenem Hitchner B1. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže není průkazný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami.

2-4-4 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně



atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti kuřat z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Nakapáním do oka se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 3 až 4 dny po podání se připraví suspenze z Fabriciovy burzy každého kuřete a tyto vzorky se spojí. Každému z pěti dalších kuřat stejného stáří a původu se nakapáním do oka podá po 0,05 ml směsného vzorku. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška na poškození Fabriciovy burzy (odstavec 2-4-2) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Virus se podá způsobem doporučeným pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-5 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podaného každému kuřeti není větší, než minimální titr viru, uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny. Použije se nejméně třicet kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 14 dnů se nakapáním do oka čelenuje každé kuře dostatečným množstvím virulentního viru infekční ptačí burzitidy. Kuřata se pozorují nejméně denně po 10 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny způsobené infekční burzitidou a přežívající kuřata, která mají klinické příznaky onemocnění. Na konci pozorovací doby se šetrně utratí všechna přežívající kuřata a provede se histologické vyšetření na léze Fabriciovy burzy. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže platí jedno nebo více z následujících:

- během pozorovacího období po čelení má méně než 50 % kontrolních kuřat charakteristické příznaky infekční burzitidy ptáků;
- jedno nebo více z přežívajících kontrolních kuřat nemá 3. stupeň lézí Fabriciovy burzy;
- v období mezi vakcinací a čelením má více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat abnormální klinické příznaky nebo uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění ani 3. stupeň lézí Fabriciovy burzy.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína, podle potřeby zředěná a smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru infekční burzitidy typu 1, nadále neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo vyhovují následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému kuřeti se doporučeným způsobem a metodou podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Po podání doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje vakcína zkoušce na imunogenitu (odstavec 2-4-5). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM CALICIVIROSI FELINAE INACTIVATUM

6.0:1101

### Vakcína proti kaliciviróze koček inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů kočičího kaliciviru, inaktivovaných tak, že je zachována přiměřená imunogenita, nebo frakce jednoho nebo více kmenů kočičího kaliciviru s přiměřenou imunogenitou. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti kaliciviróze koček.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Sklizení viru se inaktivuje. Virus se může rozštěpit a frakce purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-3-1).

2-3-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý kmen kočičího kaliciviru přítomný ve vakcíně a pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Každé kočce se podá vakcína s minimální účinností.

Pozorované příznaky	Počet bodů
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota 39,5 °C a vyšší	1
teplota 37 °C a nižší	2
vředy (nosní nebo ústní):	
– malé a nečetné	1
– velké a četné	3
nosní výtok:	
– slabý	1
– hojný	2
výtok z očí	1
úbytek hmotnosti	2
vyučování viru (celkový počet dnů):	
– 4 dny a méně	1
– 5 dnů až 7 dnů	2
– více než 7 dnů	3

Ve zkoušce se použije nejméně dvacet koček, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset koček. Nejméně deset

koček se ponechá jako kontrola. Za 4 týdny se každá kočka čelenuje intranazálně dostatečným množstvím suspenze virulentního kočičího kaliciviru. Po čelení se kočky pozorují nejméně denně po 14 dnů. Od druhého do čtrnáctého dne se denně odebírají nosní výplachy ke zkoušce na vylučování viru. Denně se zaznamená tělesná teplota a příznaky onemocnění pomocí dále uvedeného bodového systému (skóre). Zkoušku lze hodnotit, jestliže během pozorovacího období po čelení má více než 80 % kontrolních koček zřetelné příznaky kočičí kalicivirózy (vysoká teplota, vředy na ústní sliznici, respirační příznaky). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení je součet bodů (skóre) vakcinovaných koček významně nižší než kontrol.

#### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede dvěma pasážemi v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při přípravě vakcíny, nebo v buněčných kulturách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Množství inaktivované sklizené viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná zkouška. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Pro zkoušku se použijí skupiny patnácti séronegativních myši. Každé myši se podá poloviční dávka vakcíny. Za 7 dnů se podání opakuje. Za 21 dnů po prvním podání se odeberou vzorky krve a stanoví se hladina protilátek proti kočičímu kaliciviru imunofluorescenční technikou. Použijí se spojené vzorky sér tří myši. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není významně nižší než hladina protilátek získaná se šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají specifické protilátky proti kočičímu kaliciviru, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky 8 až 12 týdnů staré, přednostně ty, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru, nebo, kde je to zdůvodněné, kočky, které mají nízké hladiny těchto protilátek, až do doby, než jsou vakcinované proti kočičímu kaliciviru a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každé kočce podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý kalicivirus se provede pomocí deseti dávek vakcíny a dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při přípravě vakcíny, nebo v buněčných kulturách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, které může ovlivnit zkoušku, oddělí se, pokud je to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus nebo jinak nebrání zjištění živého viru.

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-1 Imunogenita.

## VACCINUM CALICIVIROSI FELINAE VIVUM

6.0:1102

### Vakcína proti kalicivíroze koček živá

*Synonyma.* Vaccinum calicivirosi felinae vivum cryodesiccatum, Vakcína proti kalicivíroze koček živá lyofilizovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů kočičího kaliciviru. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti kalicivíroze koček.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) (včetně bezpečnosti pro březí kočky, pokud použití u nich není kontraindikováno) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky: Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset koček nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru. Každé kočce se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku

maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma kočkám, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát na podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučeným způsobem se každé kočce podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvratu virulence. Za 5 dnů se odeberou vzorky nosní sliznice, mandlí a průdušnice od každé kočky. Směs se homogenizuje v 10 ml tlumivého fyziologického roztoku a slije se. Supernatantní tekutina se podá intranazálně každé ze dvou dalších koček. Tento postup pasážování se provede pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška na bezpečnost (odstavec 2-3-1) s použitím nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nepozorují známky zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé sérii pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý kmen kočičího kaliciviru přítomný ve vakcíně a pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Množství vakcinačního viru podané každé kočce není vyšší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže, přítomné v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně dvacet koček, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset koček. Nejméně deset koček se ponechá jako kontroly. Za 4 týdny se každá kočka čelenžuje intranazálně dostatečným množstvím suspenze virulentního kočičího kaliciviru. Kočky se pozorují nejméně po 14 dnů po čelenži. Od druhého do čtrnáctého dne po čelenži se denně odebírají nosní výplachy pro zkoušku na vylučování viru. Denně se zaznamená tělesná teplota a příznaky onemocnění pomocí dále uvedeného bodového systému (skóre).

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovacího období po čelenži má zřetelné příznaky kalicivírozy koček (vysoká teplota, vředy na ústní sliznici, respirační příznaky)

méně než 80 % kontrolních koček. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po členění je součet bodů (skóre) vakcinovaných koček významně nižší než kontrol.

Pozorované příznaky	Počet bodů
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota 39,5 °C a vyšší	1
teplota 37 °C a nižší	2
vředy (nosní nebo ústní):	
– malé a nečetné	1
– velké a četné	3
nosní výtok:	
– slabý	1
– hojný	2
výtok z očí	1
úbytek hmotnosti	2
vylučování viru (celkový počet dnů):	
– 4 dny a méně	1
– 5 dnů až 7 dnů	2
– více než 7 dnů	3

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína po neutralizaci jedním nebo více monospecifickými antiséry dále neinfikuje citlivé buněčné kultury, do kterých se inokuluje.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje jedním nebo více nonospecifickými antiséry proti kočičímu kaliciviru a inokuluje se do buněčných kultur se známou citlivostí k virům patogenním pro kočky. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

3-5 **Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky 8 až 12 týdnů staré, které nemají protilátky proti kočičímu kaliciviru. Doporučeným způsobem se každé kočce podá deset dávek vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách při teplotě příznivé pro replikaci viru. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže

byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky, obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM CHLAMYDIOSIS FELINAE INACTIVATUM

6.0:2324

Vakcína proti chlamydióze koček inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Chlamydomphila felis* inaktivovaný vhodnou metodou. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Matečné inokulum se pomnožuje v embryonovaných slepičích vejcích ze zdravého hejna nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4). Jestliže vakcína obsahuje více než jeden bakteriální kmen, různé kmeny se pomnoží a sklízí odděleně. Bakteriální sklizně se inaktivují vhodnými a validovanými metodami. Suspenze se mohou ošetřit za účelem vytvoření fragmentů mikroorganismů a fragmenty se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určena. Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-2-1).

2-2-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky, které nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a které nemají protilátky proti *C. felis*. Podle doporučeného schématu se vakcinuje deset koček a deset koček se ponechá jako kontroly. Nejpозději 4 týdny po posledním podání vakcíny se podá vhodným způsobem každé kočce množství virulentního kmene *C. felis* postačující u vnímavých koček vyvolat typické příznaky onemocnění, jako jsou zánět spojivek a výtok z nosu. Kočky se pozorují po 28 dnů. Pokud se uvádí, že dochází ke snížení vylučování chlamydoofil, odeberou se nosní výplachy a/nebo spojivkové výtěry za 7, 14, 17, 21, 24 a 28 dnů po členění pro zkoušku na vylučování chlamydoofil. Délka vylučování u vakcinovaných zvířat je významně kratší než u kontrol. Denně se zaznamená tělesná teplota a příznaky onemocnění pomocí vhodného bodovacího systému (skóre). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je bodová hodnota (skóre) u vakcinovaných koček významně nižší než u kontrol.

#### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět s každou šarží vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost (3-5). Může se použít následující zkouška.

Vhodným způsobem se podá vhodná dávka každé z pěti séronegativních koček nebo jiného vhodného živočišného druhu. Kde doporučované schéma uvedené v označení na obalu požaduje revakcinaci, může se revakcinace v této zkoušce provést s podmínkou, že se prokázalo, že se stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. Před vakcinací a v daném intervalu, obvykle v rozmezí 14 až 21 dnů po posledním podání, se každému zvířeti odebere krev a připraví se vzorky séra. Individuálně se u každého séra stanoví titr protilátek proti každému kmenu uvedenému v označení na obalu, pomocí vhodné zkoušky, jako je enzymově-imunosorbentové stanovení (2.7.1). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladiny protilátek nejsou významně nižší než hladiny získané u šarže, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost (3-5).

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provede u konečné šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky, u konečné várky antigenu nebo směsi konečných várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je takové, jaké bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla ve zkoušce Bezpečnost (odstavec 3-4). Metoda vybraná pro stanovení maximální přijatelné hladiny bakteriálních endotoxinů se následně použije pro zkoušení každé šarže.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání séronegativním zvířatům vyvolá vakcína tvorbu protilátek proti každému z kmenů *C. felis* přítomnému ve vakcíně.

**3-2 Zbytková živá chlamydofila.** Vakcína vyhovuje vhodné zkoušce na zbytková živá chlamydofila.

**3-3 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-4 Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky, které nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a které nemají protilátky proti *C. felis*. Doporučeným způsobem se každé kočce podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po dobu 2 týdnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže kočky zůstávají v dobrém zdravotním stavu a nedojde k žádné abnormální místní nebo celkové reakci.

**3-5 Účinnost.** Vakcína vyhovuje zkoušce Imunogenita (odstavec 2-2-1).

## VACCINUM CHOLERAЕ AVIARIAE INACTIVATUM

6.0:1945

### Vakcína proti choleře drůbeže inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů jednoho nebo více sérovarů *Pasteurella multocida* inaktivovaných tak, že jsou zachovány přiměřené imunogenní vlastnosti. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci kuřat, krůt, kachen a hus proti akutní choleře drůbeže.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Inokulum se pomnoží ve vhodné živné půdě. Jestliže vakcína obsahuje více než jeden bakteriální kmen, každý kmen se pomnoží a sklídí odděleně. Bakteriální sklizně se inaktivují. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro živočišný druh, pro který je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

**2-2-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob podání doporučený pro vakcinaci a na každém ptačím druhu, pro který je vakcína určena. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet ptáků, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. V případě kuřat se použijí kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) a v případě krůt, kachen nebo hus se použijí ptáci, kteří nebyli vakcinováni a kteří nemají protilátky proti *P. multocida*. Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se každému ptáku podá dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se v doporučeném schématu požaduje revakcinace, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Ptáci se pozorují nejméně denně do 21 dnů po posledním podání vakcíny. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % ptáků má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá abnormální příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci, na každém druhu ptáků, pro který je vakcína určená a pro každý sérovar *P. multocida*, proti kterému se ochrana uvádí. Pro každou zkoušku se použije nejméně třicet ptáků, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použijí se ptáci, kteří nebyli vakcinováni a kteří nemají protilátky proti *P. multocida*. Pro každou zkoušku se podá každému z nejméně dvaceti ptáků množství vakcíny, které není větší než jedna dávka. Jestliže se doporučuje revakcinace, opakuje se tento postup po doporučené době. Nejméně deset ptáků se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů po posledním podání se každý pták v obou skupinách čelenuje intra-

muskulárně dostatečným množstvím virulentní *P. multocida*. Ptáci se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelenži. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovací doby po čelenži méně než 70 % kontrolních ptáků uhynie nebo má příznaky infekce (jako jsou klinické příznaky nebo reizolace bakterií z orgánů), nebo pokud během období před čelenží více než 10 % ptáků z kontrolní skupiny nebo z vakcinované skupiny má abnormální příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže na konci pozorovací doby po čelenži nejméně 70 % ptáků z vakcinované skupiny přežívá a nemá žádné příznaky onemocnění. Tolerují se mírné příznaky, které nepřetrvávají po pozorovací době.

### 2-3 ZKOUŠKY U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce na imunogenitu (odstavec 2-2-2). Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně patnáct SPF kuřat (5.2.2) 3 až 4 týdny starých. Odeberou se vzorky séra od každého vakcinovaného a kontrolního kuřete těsně před vakcinací a ověří se nepřítomnost protilátek proti každému sérovaru *P. multocida* ve vakcíně. Každému z deseti kuřat se podá subkutánně jedna dávka vakcíny. Pět kuřat se ponechá jako kontroly. Odeberou se vzorky séra za 5 týdnů po vakcinaci od každého vakcinovaného a kontrolního kuřete. Pomocí vhodné validované sérologické metody se zjistí titry protilátek séra proti každému sérovaru *P. multocida* uvedenému v označení na obalu. Vypočítají se průměrné titry pro skupinu vakcinovaných kuřat. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se specifické protilátky proti *P. multocida* zjistí před vakcinací v jednom nebo více sérech kuřat, která mají být vakcinována nebo v sérech kontrol; v jednom nebo více sérech kontrolních kuřat za 5 týdnů po podání vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměr titrů protilátek skupiny vakcinovaných kuřat je stejný nebo vyšší než titry získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provede u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky, u várky antigenů nebo směsi várek antigenů, těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je to, které se zjistilo u šarže vakcíny, která vyhověla zkoušce na bezpečnost (odstavec 2-2-1). Metoda vybraná pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinů se následně použije pro zkoušení každé šarže.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání kuřatům z SPF chovu (5.2.2) vyvolává vakcína tvorbu protilátek proti každému ze sérovarů *P. multocida* ve vakcíně.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Pro vakcíny doporučené k použití u kuřat se použije nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Pro vakcíny doporučené k použití pouze u krůt, kachen nebo hus se použije nejméně deset ptáků živočišného druhu, který je pravděpodobně nejcitlivější k choleře drůbeže, kteří nemají protilátky proti *P. multocida*, nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Doporučeným způsobem se každému ptáku podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 20 % ptáků má abnormální příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- sérovar (sérovary) použitý (použité) pro přípravu vakcíny;
- sérovar (sérovary), proti kterému (kterým) se poskytuje ochrana.

## VACCINUM CLOSTRIDII BOTULINI AD USUM VETERINARIUM

6.0:0360

### Vakcína proti *Clostridium botulinum* pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující tekuté kultury vhodných kmenů *Clostridium botulinum* typu C nebo typu D nebo směsi těchto typů. Kultura nebo její filtrát nebo směs obou se inaktivuje tak, že se odstraní toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat proti botulismu.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. botulinum* použité při výrobě se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě.

Přípravek se může adsorbovat, precipitovat nebo koncentrovat. Může se přidat vhodné adjuvans a přípravek se může lyofilizovat.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určená.

##### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

Následující zkoušky jsou určeny ke stanovení účinnosti tekutých přípravků a lyofilizovaných přípravků po rekonstrukci podle návodu na obalu.

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání zdravým zvířatům, která nemají protilátky proti typu nebo typům *Cl. Botulinum*, ze kterých je vakcína připravená, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína, a kde je to vhodné i tekutina s ní dodávaná, vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho ze živočišných druhů, pro který je vakcína určena a která nebyla vakcinovaná proti *Cl. botulinum*. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobek maximální doporučené dávky. Zvířata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytková toxicita.** Pět myšim o hmotnosti 17 g až 22 g se subkutánně podá po 0,5 ml vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-5 Účinnost.** Pro zkoušku se použijí zdravé bílé myši o hmotnosti 18 g až 20 g, stejného původu. K čelení se použije toxin *Cl. botulinum* toho typu, který se použil k přípravě vakcíny; jeho dávka odpovídá 25násobku 50% paralytické dávky. 50% paralytická dávka je dávka toxinu, která po intraperitoneálním podání způsobí během sedmidenního pozorovacího období paralýzu u 50 % myši. Jestliže se pro přípravu vakcíny použily dva typy *Cl. botulinum*, stanoví se účinnost pro oba typy. Zkoušená vakcína se ředí 1 : 8 roztokem *chloridu sodného R (9 g/l)*. Každé ze dvaceti myši se subkutánně podá 0,2 ml ředění. Za 21 dnů se intraperitoneálně podá čelení dávka každé z vakcinovaných myši a každé z deseti kontrolních myši. Myši se pozorují po 7 dnů. Zaznamená se počet zvířat, u kterých se projeví příznaky botulismu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže se u všech kontrolních myši projeví během pozorovací doby příznaky botulismu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je chráněno nejméně 80 % vakcinovaných myši.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- typ nebo typy *Cl. botulinum*, ze kterých byla vakcína připravená;
- zda je přípravek toxoid nebo byla vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo je směsí obou.

## VACCINUM CLOSTRIDII CHAUVOEI AD USUM VETERINARIUM

6.4:0361

### Vakcína proti *Clostridium chauvoei* pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující tekuté kultury jednoho nebo více vhodných kmenů *Clostridium chauvoei*. Celá kultura se inaktivuje tak, že se odstraní toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat proti onemocnění vyvolanému *Cl. chauvoei*.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. chauvoei* použité pro výrobu se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. K inaktivované kultuře se může přidat vhodné adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určena.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína chrání vnímavá zvířata proti infekci *Cl. chauvoei*. K prokázání totožnosti se může použít také zkouška Účinnost.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho z živočišných druhů, pro který je vakcína určena a která nebyla vakcinovaná proti *Cl. chauvoei*. Doporučeným způsobem se podá každému zvířeti na jedno místo dvojnásobek maximální doporučené dávky. Zvířata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Použije se nejméně deset zdravých morčat, každé o hmotnosti 350 g až 450 g. Subkutánně se každému morčeti podá množství vakcíny, které není vyšší než minimální dávka uvedená v označení na obalu jako první dávka. Za 28 dnů se těmto zvířatům podá množství, které není vyšší než minimální dávka uvedená v označení na obalu, jako druhá dávka. Za 14 dnů po druhé vakcinaci se všem vakcinovaným a pěti kontrolním morčatům podá intramuskulárně vhodné množství virulentní kultury nebo suspenze spor *Cl. chauvoei*, aktivovaných, je-li to nutné, aktivačním agens, jako je chlorid vápenatý.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pěti dnů uhynie na infekci *Cl. chauvoei* nejvýše 10 % z vakcinovaných morčat a všechna kontrolní zvířata uhynou na infekci *Cl. chauvoei* během 48 h po čelení nebo během 72 h, jestliže se čelení provádí suspenzí spor. Uhynie-li více než 10 %, ale méně než 20 % vakcinovaných morčat, zkouška se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže ve druhé skupině

vakcinovaných morčat uhynie během 5 dnů nejvýše 10 % a ze druhé skupiny kontrol uhynou všechna zvířata během 48 h po čelenži nebo během 72 h, jestliže se čelenžuje suspenzí spor. Aby se předešlo zbytečnému utrpení v důsledku virulentní čelenže, umírající zvířata se šetrně utratí a považují se za uhynulá na infekci *Cl. chauvoei*.

## VACCINUM CLOSTRIDII NOVIYI B AD USUM VETERINARIUM

6.6:0362

### Vakcína proti *Clostridium novyi* (typ B) pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující tekuté kultury vhodného kmene *Clostridium novyi* (typ B).

Celá kultura nebo její filtrát nebo směs obou se inaktivuje tak, že se odstraní toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat a/nebo k pasivní ochraně jejich potomstva proti onemocnění vyvolanému *Cl. novyi* (typ B).

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. novyi* (typ B) použité pro výrobu se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. K toxoidům a/nebo inaktivovaným kulturám se může po koncentraci přidat vhodné adjuvans, je-li to nutné.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určena. Účinek vakcíny pro každý cílový živočišný druh se má prokázat vyvoláním imunitní odpovědi (např. tvorby protilátek) shodné s požadavky na výrobek po podání podle doporučeného schématu.

##### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zbytková toxicita.** Zkouška na detoxikaci se provádí těsně po detoxikačním postupu. Je-li riziko návratu toxicity, provede se druhá zkouška v nejzazším možném stupni výrobního postupu. Zkoušku na zbytkovou toxicitu (odstavec 3-4) může výrobce vynechat.

2-3-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku uvedenou v odstavci Účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná zkouška. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat. Může se používat následující zkouška, prokáže-li se její uspokojivá shoda se zkouškou uvedenou v odstavci 3-5 Účinnost.

Králičí se vakcinují, jak je popsáno v odstavci Účinnost, a připraví se séra. V jednotlivých sérech se stanoví hladina protilátek proti alfa-toxinu *Cl. novyi* vhodnou metodou, např. imunochemicky (2.7.1) nebo neutralizací v buněčných

kulturách. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách alfa-antitoxinu *Cl. novyi*. *Antisérum proti rodu Clostridium (vicesložkové) králíci pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné pro použití jako referenční sérum.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže zjištěná hladina protilátek není nižší než hladina protilátek u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat.

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po injekčním podání zvířatům, která nemají alfa-antitoxin novyi, vyvolá vakcína tvorbu tohoto antitoxinu.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho z druhů, pro který je vakcína určena a která nebyla vakcinována proti *Cl. novyi* (typ B). Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobek maximální doporučené dávky vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytková toxicita.** Každé z pěti myší, každé o hmotnosti 17 g až 22 g, se subkutánně podá 0,5 ml vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

#### 3-5 Účinnost

Pro zkoušku se použije nejméně deset zdravých králíků, 3 až 6 měsíců starých. Každému se subkutánně podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu jako první dávka. Za 21 až 28 dnů se těmto zvířatům podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu jako druhá dávka. Za 10 až 14 dnů po podání druhé dávky se králíci vykrví a séra se spojí.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost směsného séra je nejméně 3,5 m. j./ml.

Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující alfa-toxin *Cl. novyi* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje určité množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláshuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost spojených sér králíků se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky alfa-toxinu *Cl. novyi* s množstvím referenčního přípravku alfa-antitoxinu *Cl. novyi* kalibrovaného v mezinárodních jednotkách nezbytným k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je třeba vhodný přípravek alfa-toxinu *Cl. novyi*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného séra



se stanoví porovnáním s referenčním přípravkem za použití zkušebního toxinu.

*Antisérum proti rodu Clostridium (vícesložkové) králíčí pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné k použití jako referenční sérum.

**3-5-1 Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu přibližně pětidenní kultury *Cl. novyi* typu B v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou. Zkušební toxin se vybírá stanovením L+/10 dávky a LD<sub>50</sub> pro myši. Pozorovací období je 72 h.

Vhodný alfa-toxin obsahuje nejméně jednu L+/10 dávku v 0,05 mg a nejméně 10 LD<sub>50</sub> v každé L+/10 dávce.

**3-5-2 Stanovení zkušební dávky toxinu.** Ve vhodné tekutině se připraví roztok referenčního přípravku tak, aby obsahoval 1 m. j./ml. Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby v 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 1 mg. Připraví se směs roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 2,0 ml a nechají se 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, každá o hmotnosti 17 g až 22 g, každé se intramuskulárně nebo subkutánně podá 0,2 ml a pozorují se 72 h. Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi nižší než zkušební dávka. Potom se připraví čerstvé směsi tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. V řadě sousedící objemy se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point). Směsi se nechají 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, každé se intramuskulárně nebo subkutánně podá 0,2 ml a pozorují se 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a sloučí se výsledky jednotlivých zkoušek provedených se směsí stejného složení. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí daného složení.

Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,2 ml směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž byla podána.

**3-5-3 Stanovení účinnosti sér získaných od králíků.**

**Předběžná zkouška.** Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 1,0 ml obsahoval desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se řada směsí roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady odstupňovaných objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 2,0 ml a nechají se 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, každé se intramuskulárně nebo subkutánně podá 0,2 ml a pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,2 ml směsi více než 0,1 m. j. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,2 ml směsi méně než 0,1 m. j.

**Konečná zkouška.** Připraví se řada směsí roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady odstupňovaných objemů zkoušeného séra. V řadě sousedící objemy se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point), stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směs roztoku zkušebního toxinu a roztoku referenčního přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, postupuje se tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m. j. v 0,2 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myši jako referenční směs, která obsahuje 0,1 m. j. v 0,2 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných stanovení. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20$  % očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- zda přípravek je toxoid nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo zda je to směs obou;
- vytvořený imunizační účinek pro každý cílový druh (např. tvorba protilátek, ochrana před příznaky nemoci nebo infekcí).

## VACCINUM CLOSTRIDII PERFRINGENTIS AD USUM VETERINARIUM

6.0:0363

### Vakcína proti *Clostridium perfringens* pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující tekuté kultury vhodných kmenů *Clostridium perfringens* typu B, *Clostridium perfringens* typu C nebo *Clostridium perfringens* typu D nebo ze směsi těchto typů.

Celé kultury nebo jejich filtráty nebo směs obou se inaktivují tak, že se odstraní toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat a/nebo k pasivní ochraně jejich potomstva proti onemocnění vyvolanému *Clostridium perfringens*.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. perfringens* použité pro výrobu se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. K toxoidům a/nebo inaktivovaným kulturám se může přidat vhodné adjuvans.

## 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určena. Účinek vakcíny pro každý cílový živočišný druh se má prokázat vyvoláním imunitní odpovědi (např. tvorba protilátek) shodně s požadavky na výrobek po podání podle doporučeného schématu.

## 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zbytková toxicita.** Zkouška na detoxikaci se provádí těsně po detoxikačním postupu. Je-li riziko návratu toxicity, provede se druhá zkouška v nejzazším možném stupni výrobního postupu. Zkoušku na zbytkovou toxicitu (odstavec 3-4) může výrobce vynechat.

**2-3-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška Účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná zkouška. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat. Může se použít následující zkouška, prokáže-li se její uspokojivá shoda se zkouškou popsanou v odstavci 3-5 Účinnost.

Králičí se vakcinují, jak je popsáno v odstavci Účinnost, a připraví se séra. V jednotlivých sérech se stanoví hladina protilátek proti beta-toxinu a/nebo epsilon-toxinu *Cl. Perfringens* vhodnou metodou, např. imunochemicky (2.7.1) nebo neutralizací v buněčných kulturách. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách beta-a/nebo epsilon-antitoxinu *Cl. perfringens*. *Antisérum proti rodu Clostridium (vicesložkové) králičí pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné k použití jako referenční sérum.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina (hladiny) protilátek není nižší než hladina protilátek u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

### 3-1 Zkouška totožnosti.

*Typ B.* Po injekčním podání zvířatům, která nemají beta- a epsilon-antitoxin, vyvolá vakcína tvorbu těchto antitoxinů.

*Typ C.* Po injekčním podání zvířatům, která nemají beta-antitoxin, vyvolá vakcína tvorbu tohoto antitoxinu.

*Typ D.* Po injekčním podání zvířatům, která nemají epsilon-antitoxin, vyvolá vakcína tvorbu tohoto antitoxinu.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína, a kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho ze živočišných druhů, pro které je vakcína určena a která nebyla vakcinována proti *Cl. perfringens*. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobek maximální doporučené dávky. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytková toxicita.** Každé z pěti myši o hmotnosti 17 g až 22 g se subkutánně podá 0,5 ml vakcíny. Myši se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

### 3-5 Účinnost

Ve zkoušce se použije nejméně deset zdravých králíků 3 až 6 měsíců starých. Každému se subkutánně podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu jako první dávka. Za 21 až 28 dnů se těmto zvířatům podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu jako druhá dávka. Za 10 až 14 dnů po podání druhé dávky se králíci vykrví a séra se spojí.

*Typ B.* Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost směsného séra je nejméně 10 m. j. beta-antitoxinu a nejméně 5 m. j. epsilon-antitoxinu v mililitru.

*Typ C.* Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost směsného séra je nejméně 10 m. j. beta-antitoxinu v mililitru.

*Typ D.* Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost směsného séra je nejméně 5 m. j. epsilon-antitoxinu v mililitru.

**3-5-1 Mezinárodní standard pro beta-antitoxin *Clostridium perfringens*.** Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující beta-toxin *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje určité množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

**3-5-2 Mezinárodní standard pro epsilon-antitoxin *Clostridium perfringens*.** Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující epsilon-toxin *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje určité množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost spojeného vzorku sér králíků se stanoví porovnaním dávek potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky beta-toxinu *Cl. perfringens* nebo epsilon-toxinu *Cl. perfringens* s množstvím referenčního přípravku beta-antitoxinu *Cl. perfringens* nebo epsilon-antitoxinu *Cl. perfringens* (podle toho, co je vhodné) kalibrovaného v mezinárodních jednotkách nezbytným k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je třeba vhodný přípravek beta- nebo epsilon-toxinu *Cl. perfringens*. Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti vhodnému referenčnímu přípravku; účinnost zkoušeného séra se stanoví porovnaním s referenčním přípravkem za použití vhodného zkušebního toxinu.

*Antisérum proti rodu Clostridium (vicesložkové) králičí pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné k použití jako referenční sérum.

3-5-3 *Příprava zkušebního toxinu.* Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Cl. perfringens* typu B, C nebo D v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou. Podle potřeby se použije beta- nebo epsilon-toxin. Zkušební toxin se vybírá podle stanovení L+ dávky a LD<sub>50</sub> u beta-toxinu a L+/10 dávky a LD<sub>50</sub> u epsilon-toxinu. Stanovení se provádí na myších a pozorovací období je 72 h. Vhodný beta-toxin obsahuje nejméně jednu L+ dávku v 0,2 mg a nejméně 25 LD<sub>50</sub> v jedné L+ dávce. Vhodný epsilon-toxin obsahuje nejméně jednu L+/10 dávku v 0,005 mg a nejméně 20 LD<sub>50</sub> v jedné L+/10 dávce.

3-5-4 *Stanovení zkušební dávky toxinu.* Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v 1 ml obsahoval 5 m. j. beta-antitoxinu *Cl. perfringens* a 0,5 m. j. epsilon-antitoxinu *Cl. perfringens*. Roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině se připraví tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg beta-toxinu a 1 mg epsilon-toxinu. Připraví se směs roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 30 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml; pozorují se 72 h. Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi nižší než zkušební dávka. Potom se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z řady stoupajících objemů zkušebního toxinu (objemy sousedící v řadě se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný konečný bod – end point). Směsi se nechají 30 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml; pozorují se 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a sloučí se výsledky jednotlivých zkoušek provedených se směsí stejného složení. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí daného složení. Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž se podala.

3-5-5 *Stanovení účinnosti sér získaných od králíků.*

*Předběžná zkouška.* Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se řada směsí roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 30 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml; pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,5 ml směsi více než 1 m. j. beta-antitoxinu nebo 0,1 m. j. epsilon-antitoxinu. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,5 ml směsi méně než 1 m. j. beta-antitoxinu nebo 0,1 m. j. epsilon-antitoxinu.

*Konečná zkouška.* Připraví se řada směsí roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný konečný bod – end point stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směs roztoku zkušebního toxinu a roztoku referenčního přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 30 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, přičemž se dále postupuje tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce.

*Beta-antitoxin.* Zkoušená směs, která obsahuje 1 m. j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 1 m. j. v 0,5 ml.

*Epsilon-antitoxin.* Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m. j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 0,1 m. j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20\%$  od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:  
 – 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;  
 – 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;  
 – 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- zda přípravek je toxoid nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo zda je to směs obou;
- vytvořený imunizační účinek pro každý cílový druh (např. tvorba protilátek, ochrana před příznaky nemoci nebo infekcí).

## VACCINUM CLOSTRIDII SEPTICI AD USUM VETERINARIUM

6.0:0364

### Vakcína proti *Clostridium septicum* pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující tekuté kultury vhodného kmene *Clostridium septicum*.

Celá kultura nebo její filtrát nebo směs obou se inaktivuje tak, že se odstraní toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat a/nebo k pasivní ochraně jejich potomstva proti onemocnění vyvolanému *Cl. septicum*.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. septicum* použité při výrobě se pomnožuje ve vhodné tekuté živné půdě. K toxoidu a/nebo inaktivovaným kulturám se může přidat vhodné adjuvans.

### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určena. Účinek vakcíny pro každý cílový živočišný druh se má prokázat vyvoláním imunitní odpovědi (např. tvorba protilátek) shodně s požadavky na výrobek po podání podle doporučeného schématu.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zbytková toxicita.** Zkouška na detoxikaci se provádí těsně po detoxikačním postupu. Je-li riziko návratu toxicity, provede se druhá zkouška v nejzazším možném stupni výrobního postupu. Zkoušku na zbytkovou toxicitu (odstavec 3-4) může výrobce vynechat.

**2-3-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná zkouška. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat. Může se použít následující zkouška, prokáže-li se její uspokojivá shoda se zkouškou popsanou v odstavci 3-5 Účinnost.

Králíci se vakcinují, jak je popsáno v odstavci Účinnost, a připraví se séra. V jednotlivých sérech se stanoví hladina protilátek proti toxinu *Cl. septicum* vhodnou metodou, např. imunochemicky (2.7.1) nebo neutralizací v buněčných kulturách. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách antitoxinu *Cl. septicum*. *Antisérum proti rodu Clostridium (vícesložkové) králíci pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné k použití jako referenční sérum.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není nižší než hladina protilátek u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost, a která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity pro cílové druhy zvířat.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání zvířatům, která nemají antitoxin proti *Cl. septicum*, vyvolá vakcína tvorbu tohoto antitoxinu.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho ze živočišných druhů, pro které je vakcína určena a která nebyla vakcinována proti *Cl. septicum*. Doporučeným způsobem se

každému zvířeti podá dvojnásobek maximální doporučené dávky. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytková toxicita.** Každé z pěti myši o hmotnosti 17 g až 22 g se subkutánně podá 0,5 ml vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

### 3-5 Účinnost

Ve zkoušce se použije nejméně deset zdravých králíků, 3 až 6 měsíců starých. Každému se subkutánně podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu, jako první dávka. Za 21 až 28 dnů se těmto zvířatům podá množství vakcíny, které není větší než minimální dávka uvedená v označení na obalu, jako druhá dávka. Za 10 až 14 dnů po podání druhé dávky se králíci vykrví a séra se spojí.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže účinnost směsného vzorku sér je nejméně 2,5 m.j./ml.

Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující toxin *Cl. septicum* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje určité množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Účinnost směsného séra králíků se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem dávky toxinu *Cl. septicum* s množstvím referenčního přípravku antitoxinu *Cl. septicum* kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, nezbytným k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je třeba vhodný přípravek toxinu *Cl. septicum*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného séra se stanoví porovnáním s referenčním přípravkem za použití zkušebního toxinu.

*Antisérum proti rodu Clostridium (vícesložkové) králíci pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné k použití jako referenční sérum.

**3-5-1 Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu jednodenní až třídní kultury *Cl. septicum* v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou. Zkušební toxin se vybírá podle stanovení L+/5 dávky a LD<sub>50</sub> pro myši. Pozorovací období je 72 h.

Vhodný toxin obsahuje nejméně jednu L+/5 dávku v 1,0 mg a nejméně 10 LD<sub>50</sub> v každé L+/5 dávce.

**3-5-2 Stanovení zkušební dávky toxinu.** Ve vhodné tekutině se připraví roztok referenčního přípravku tak, aby v 1 ml obsahoval 1,0 m. j. Roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině se připraví tak, aby v 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 4 mg. Připraví se směs roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (2 m. j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního

toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši o hmotnosti 17 g až 22 g a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml; pozorují se 72 h. Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi nižší než zkušební dávka. Připraví se čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (2 m. j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu (objemy sousedící v řadě se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný konečný bod – end point). Směsi se nechají 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml; pozorují se 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a sloučí se výsledky jednotlivých zkoušek provedených se směsí stejného složení. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí určitého složení.

Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž se podala.

### 3-5-3 Stanovení účinnosti sér získaných od králíků

**Předběžná zkouška.** Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se řada směsí roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml a pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,5 ml směsi více než 0,2 m. j. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,5 ml směsi méně než 0,2 m. j.

**Konečná zkouška.** Připraví se řada směsí roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 60 min stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, přičemž se dále postupuje tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,2 m. j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 0,2 m. j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20\%$  očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

## 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- zda přípravek je toxoid nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo zda je to směs obou;
- vytvořený imunizační účinek pro každý cílový druh (např. tvorba protilátek, ochrana před příznaky nemoci nebo infekcí).

## VACCINUM COCCIDIOSIS VIVUM AD PULLUM

6.2:2326

### Vakcína proti kokcidióze kura domácího živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující sporulované oocysty vhodné linie nebo linií druhů parazitujících kokcií (*Eimeria* spp). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuru domácímu k aktivní imunizaci.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Oocysty se produkují v kuřatech z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo v embryonovaných slepičích vejcích získaných z SPF chovu (5.2.2). Vejce se musí dezinfikovat a/nebo inkubovat za podmínek validovaných pro zaručení inaktivace všech eimerií, které mohou být na skořápkách. Vylíhnutá kuřata se potom musí odchovávat v dezinfikovaných zařízeních, v podmínkách izolace zaručujících, že nejsou infikována eimeriemi. Kuřata se nesmí ošetřovat kokcidiostatiky. Oocysty se získávají z trusu nebo z obsahů střevního traktu infikovaných kuřat během patentní periody. Oocysty různých linií eimerií se produkují odděleně. Oocysty se izolují, purifikují, dezinfikují, nechají se vysporulovat a spočítají se. Vakcína se vyrobí vmícháním definovaných počtů sporulovaných oocyst každé linie do vhodného média.

##### 2-2 INOKULA

**2-2-1 Totožnost.** Matečné inokulum každé z eimerií se identifikuje podle charakteristik z něho vyprodukovaných kokcií, na základě vhodného výběru z následujících charakteristik: velikost a tvar oocysty; lokalizace vývojových stadií ve střevě kura; patognomické léze (*E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* a *E. brunetti*) a chybění makroskopických lézí (*E. praecox* a *E. mitis*); velikost schizontů ve střevní sliznici; velikost gametocytů ve sliznici; rozdíly v elektroforetické pohyblivosti určitých izoenzymů, např. laktátdehydrogenasa a glukosofosfátisomerasa; a pomocí metod molekulární biologie. Uměle atenuované kmeny se mohou odlišit od rodičovských kmenů pomocí studia parametrů příslušných metodě oslabení.

2-2-2 **Cizí agens.** Provedou se zkoušky 1 až 6 obecné stati 2.6.24 *Ptačí virové vakcíny: zkoušky na cizí agens v inokulech.* Vhodná jsou také obecná ustanovení a až d, f, h a odstavec 7 této obecné stati (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula. Každé matečné inokulum vyhovuje požadavkům každé zkoušky.

### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

K přípravě vakcíny se mohou použít pouze linie kokcií, které prokazatelně vyhovují z hlediska zbytkové patogenity a zvýšení virulence. K prokázání se mohou použít dále popsané zkoušky (odstavec 2-3-2 a 2-3-3). Vakcína má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kura domácího, pro kterého je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Specifická zkouška na bezpečnost složení vakcíny (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-4).

#### 2-3-1 Specifická zkouška na bezpečnost složení vakcíny.

Zkouška se provede s přípravkem obsahujícím oocysty každého druhu na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny. Použije se nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Kuřata se musí líhnout a odchovávat, jak je popsáno v odstavci 2-1 a nesmí se ošetřit kokcidiostatiky. Použije se kategorie kura, o které se předpokládá, že je nejcitlivější, tj. kuřata stará 14 dnů. Během zkoušky jsou kuřata ustájena ve vhodných podmínkách s použitím ohrad s podlahou nebo klecí s pevnou podlahou, aby se umožnila reinfekce oocystami. Sondou nebo jiným vhodným způsobem se každému kuřeti podá množství vakcinačních oocyst odpovídající nejméně desetinásobku maximálního množství oocyst každého druhu kokcií, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 10 % vakcinovaných kuřat uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačním oocystám. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné vakcinované kuře nemá zřetelné klinické příznaky kokcidiózy nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-2 **Zkouška na zbytkovou patogenitu.** Pro každý druh a linii kokcií, které jsou ve vakcíně, se provede oddělená zkouška. V každém případě se použije přípravek, obsahující oocysty na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Kuřata se musí líhnout a odchovávat, jak je popsáno v odstavci 2-1, a nesmí být ošetřena kokcidiostatiky. Použije se kategorie kura, o které se předpokládá, že je nejcitlivější, tj. kuřata stará 14 dnů. Během zkoušky jsou kuřata ustájena v klecích (nebo jiném vhodném ustájení, které zabraňuje reinfekci a umožňuje sběr trusu). Sondou nebo jiným vhodným způsobem se každému kuřeti podá množství vakcinačních oocyst, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního množství, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 10 % kuřat uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačním oocystám. Trus se sbírá a stanoví se produkce oocyst denně od 3. do 14. dne. Některý den mezi 4. a 8. dnem, v závislosti na délce prepatentního období, kdy se očekávají maximální léze,

a 14. den, se šetrně utratí nejméně devět kuřat a střevní trakt se vyšetří na specifické léze, které svědčí pro infekci určitým druhem kokcií nebo u druhů, o kterých je známo, že nevyvolávají makroskopické léze (např. *E. mitis* a *E. praecox*), se provede mikroskopický důkaz infekce, jako je průkaz oocyst nebo vyvíjejících se oocyst ve střevním obsahu nebo v seškrabech střevní stěny. U druhů schopných vyvolat příslušné makroskopické patologické změny, nejsou-li atenuované, se použije pro zaznamenávání druhově specifických lézí viditelných ve střevě následující bodovací systém (skóre) podle stupnice od 0 do 4.

#### *Eimeria acervulina*

- 0 Žádné makroskopické léze.
- 1 Roztroušené bílé léze podobné plaku, obsahující vyvíjející se oocysty omezené na dvanácterník, tyto léze jsou podlouhlé, s podélnou osou umístěnou napříč střevem, podobně jako příčky žebříku. Mohou se zjistit při prohlížení jak ze strany serózy, tak ze strany sliznice střeva. Může být nejvýše pět lézí na čtvereční centimetr.
- 2 Léze jsou více nahloučené, ale nesplývají. U ptáků 3 týdny starých mohou léze zasahovat až 20 cm pod dvanácterník. Střevní stěny nejsou zesílené. Obsahy střevního traktu jsou normální.
- 3 Léze jsou natolik četné, že splývají a velikost lézí se snižuje a střevo vypadá jako povlečené. Střevní stěna je zesílená a obsahy jsou vodnaté. Změny mohou zasahovat až k divertikulu žloutkového vaku.
- 4 Sliznice střeva je naředlá, se zcela splývajícími koloniemi. Překrvení může být omezeno na drobné tečkovité krváceniny nebo, v případech mimořádně těžkých infekcí, celá sliznice může být jasně červená. V přední části střeva mohou být jednotlivé léze nerozlišitelné. Typické, žebříku podobné léze se objevují ve střední části střeva. Střevní stěna je značně zesílená a střevo je naplněno krémovitým exsudátem, který může obsahovat značné počty oocyst. Ptáci hynoucí na kokcidiózu se hodnotí čtyřmi body.

#### *Eimeria brunetti*

- 0 Žádné makroskopické léze.
- 1 Žádné makroskopické léze. V nepřítomnosti výrazných lézí nemusí být přítomnost parazitů zjištěná, pokud se seškraby z podezřelých okrsků nevyšetří mikroskopicky.
- 2 Střevní stěna může mít šedý vzhled. Dolní část může být zesílená a mohou se vyskytovat skvrny růžově zbarveného materiálu odloupaného ze střeva.
- 3 Střevní stěna je zesílená a vyskytuje se krvavě zbarvený katarální exsudát. Mohou se vyskytovat příčné červené pruhy v zadní části konečníku a léze v cékálních tonzilách, na kterých mohou být měkké slizniční nálepy.
- 4 Může se vyskytovat rozsáhlá koagulační nekróza ve slizničním povrchu dolní části střeva. U některých ptáků může střevo vystýlat suchá nekrotická membrána a vstup do slepého střeva může ucpávat sýrovitá hmota. Léze mohou zasahovat do střední nebo horní části střeva. Ptáci hynoucí na kokcidiózu se hodnotí čtyřmi body.

*Eimeria maxima*

- 0 Žádné makroskopické léze.
- 1 Na serózním povrchu střední části střeva mohou být drobné červené tečkovité krváceniny. Nevyskytuje se plynatost nebo zesílení střeva, ale může být přítomné malé množství oranžového hleny.
- 2 Serózní povrch může být posetý skvrnami četných červených tečkovitých krvácenin. Střevo může být naplněné oranžovým hlenem, ale nevyskytuje se žádná nebo pouze mírná plynatost střeva. Střevní stěna je zesílená.
- 3 Střevo je nafouklé a stěna zesílená. Slizniční povrch je zdrsňený. Střevní obsah tvoří malé sraženiny krve a hlen.
- 4 Střevo je nafouklé po většině délky. Obsahuje četné krevní sraženiny a natrávené červené krvinky, dodávající charakteristickou barvu a hnilobný zápach. Střevní stěna je značně zesílená. Ptáci hynoucí na kokcidiózu se hodnotí čtyřmi body.

*Eimeria necatrix*

- 0 Žádné makroskopické léze.
- 1 Malé roztroušené tečkovité krváceniny a bílé skvrny snadno viditelné na serózním povrchu. Jestliže je na slizničním povrchu zřejmé poškození, je mírné.
- 2 Četné tečkovité krváceniny na serózním povrchu. Může být mírná plynatost, omezená na střední část střeva.
- 3 Rozsáhlé krvácení do lumen střeva. Serózní povrch je pokrytý tečkovitými červenými krváceninami a/nebo bílými plaky. Serózní povrch je nerovný a zesílený, s četnými krváceninami velikosti špendlíkové hlavičky. Chybí normální střevní obsah. Plynatost zasahuje přes dolní polovinu tenkého střeva.
- 4 Rozsáhlé krvácení dává střevu tmavé zbarvení, střevní obsah tvoří červený nebo hnědý hlen. Nafouknutí může zasahovat většinu délky střeva. Ptáci hynoucí na kokcidiózu se hodnotí čtyřmi body.

*Eimeria tenella*

- 0 Žádné makroskopické léze.
- 1 Velmi málo roztroušených tečkovitých krvácenin ve stěně slepého střeva, žádné zesílení stěn slepého střeva. Obsah slepého střeva je normální.
- 2 Léze jsou čtenější se zjištěnou krví v obsahu slepého střeva a stěna slepého střeva je mírně zesílená. Obsah slepého střeva je normální.
- 3 Slepé střevo obsahuje velké množství krve nebo cékální odlitky, stěny slepého střeva jsou značně zesílené. Normálního fekálního obsahu je ve slepém střevě málo, je-li nějaký.
- 4 Slepá střeva jsou značně roztažená krví nebo velkými sýrovitými odlitky. Fekální materiál buď vůbec chybí, nebo je uvnitř odlítků. Ptáci hynoucí na kokcidiózu se hodnotí čtyřmi body.

Druhy a linie vyhovují zkoušce na oslabení, jestliže se pozorují pouze mírné kokcidiózní léze nebo omezené příznaky infekce; při použití příslušného výše popsaného bodovacího systému není průměrná bodová hodnota (skóre) lézí

v den odebrání vzorku mezi 4. a 8. dnem a 14. den větší než 1,5 bodu a žádná individuální bodová hodnota (skóre) lézí není větší než 3. Stanoví se množství a doba produkce oocyst.

**2-3-3 Zvýšení virulence.** Pro každý druh a linii kokciidií, která je ve vakcíně, se provede oddělená zkouška. Použije se přípravek, obsahující oocysty na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použijí 14 dnů stará kuřata z SPF chovu (5.2.2). Kuřata se musí líhnout a odchovávat, jak je popsáno v odstavci 2-1 a nesmí se ošetřit kokcidiostatiky. Během zkoušky jsou kuřata ustájená v klecích (nebo v jiném vhodném zařízení, které zabraňuje reinfekci a umožňuje sběr trusu). Sondou nebo jiným vhodným způsobem se každému z pěti kuřat podá množství oocyst, které umožní zpětné získání oocyst pro dále popsané pasážování. Trus se sbírá denně od 2. do 14. dne po infekci a připraví se směsná suspenze sporulovaných oocyst od pěti kuřat. Sondou nebo jiným vhodným způsobem se každému z pěti dalších kuřat podá vhodné množství. Tento postup pasážování se provede nejméně pětikrát. Přítomnost oocyst v každé pasáži se ověří. Opakuje se Zkouška na zbytkovou patogenitu (odstavec 2-3-2) s použitím maximálně pasážovaných oocyst, které se získají a s podáním podobného množství sporulovaných oocyst na kuře, jaké se použilo ve zkoušce s nepasážovanými oocystami. Porovnají se výsledky rozsahu lézí nebo příznaků infekce ve střevním traktu a vylučování oocyst, získané při podání pasážovaných a nepasážovaných oocyst. Linie vyhovuje zkoušce, jestliže se nepozoruje žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaných oocyst při srovnání s nepasážovanými oocystami. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se oocysty zpětně nezískají na úrovni každé pasáže.

**2-3-4 Imunogenita.** Účinek každého druhu a linie kokciidií obsažených ve vakcíně se stanoví v oddělené studii s příslušným čelenžním kmenem. Pro každou složku se zkouška provede s vakcínou podanou každým z doporučených způsobů a metod podání. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství každé složky v šarži vakcíny podané každému kuřeti není větší, než je minimální počet oocyst uvedený v označení na obalu a oocysty jsou na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny. Pro zkoušku se použije nejméně čtyřicet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Kuřata se musí líhnout a odchovávat, jak je popsáno v odstavci 2-1 a nesmí se ošetřit kokcidiostatiky. Vakcinuje se nejméně dvacet kuřat a nejméně dvacet kuřat se ponechá jako kontroly. Pro vyhodnocení váhového přírůstku u kmenů druhu *Eimeria*, které mají nízkou patogenitu, může být počet použitých kuřat vyšší. Zkouška může vyžadovat různé čelenžní dávky pro různé zkoušené parametry, a tak se mohou hodnotit jako oddělené čelenžní skupiny. Např. pro stanovení vlivu na výtěžek oocyst může být potřebná nižší čelenžní dávka, než je dávka potřebná pro stanovení vlivu na váhový přírůstek a bodovou hodnotu (skóre) lézí. Po vakcinaci se kuřata ustájí ve vhodných podmínkách s použitím ohrad s podlahou nebo v klecích s pevnou podlahou, aby se umožnila reinfekce oocystami. Ve vhodný den mezi 14. a 21. dnem po vakcinaci se každé kuře zváží, přesune do klecí (nebo jiného vhodného ustájení, které zabraňuje re-

infekci a umožňuje sběr trusu) a každé kuře se čelenuje sondou nebo jiným vhodným způsobem, množstvím virulentních kokcií, postačujícím vyvolat u nevakcinovaných kontrol charakteristické příznaky onemocnění čelenujícím druhem *Eimeria*. Ptáci se pozorují nejméně denně až do konce zkoušky. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění. Trus se sbírá a stanoví se produkce oocyst od 3. dne po čelenži až do konce zkoušky. Ve vhodný den mezi 4. a 8. dnem po čelenži, v závislosti na délce prepatentní periody čelenujícího druhu, se každé kuře zváží. Deset kuřat z každé skupiny se šetrně utratí a vyšetří na přítomnost lézí ve střevním traktu. Kde je to vhodné, zaznamenají se specifické léze, svědčící pro čelenující druh kokcie (s použitím bodovacího (skóre) systému popsaného v odstavci 2-3-2). U druhů známých tím, že nevyvolávají makroskopické změny (*E. mitis* a *E. praecox*), se kuřata vyšetří na mikroskopický důkaz infekce, jako je prokázání oocyst nebo vyvíjejících se oocyst v obsahu střev nebo v seškrabu střevní stěny. Čtrnáctý den po čelenži se zváží každé ze zbývajících kuřat.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během období mezi vakcinací a čelenží více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně;
- u čelenží druhů *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* nebo *E. brunetti* má při vyšetření post mortem charakteristické léze čelenující infekce (např. bodová hodnota (skóre) lézí nejméně 2) méně než 80 % kontrolních kuřat utracených mezi 4. a 8. dnem;
- u čelenží druhů *E. mitis* nebo *E. praecox* je infikováno méně než 80 % kontrolních kuřat utracených mezi 4. a 8. dnem.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- u všech čelenujících druhů *Eimeria* je produkce oocyst významně snížena u vakcinovaných kuřat při srovnání s kontrolami;
- u všech čelenujících druhů *Eimeria* žádné vakcinované kuře neuhne v důsledku čelenující infekce;
- u čelenží druhů *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* nebo *E. brunetti* nejméně 80 % vakcinovaných nemá více než mírné příznaky onemocnění a ty jsou méně výrazné než příznaky u kontrol;
- u čelenží druhů *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima* nebo *E. brunetti* nejméně 80 % vakcinovaných nemá žádné nebo jen minimální léze ve střevě (např. průměrná bodová hodnota (skóre) lézí ne více než 1) a žádný pták nemá skóre lézí 4;
- u čelenží druhů *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. mitis* nebo *E. praecox* jsou přírůstky u vakcinovaných kuřat významně vyšší než u kontrol.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zkouška na stupeň sporulace a počet oocyst ve výrobě.** Vzorek každé várky oocyst se po sporulaci a před smícháním vyšetří mikroskopicky, aby se stanovilo procento sporulovaných oocyst a počet oocyst. Získané hodnoty

jsou v rozmezí limitů prokazatelně umožňujících přípravu vyhovující vakcíny.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže každého druhu *Eimeria* ve vakcíně.** Není nutné provádět zkoušku na účinnost (odstavec 3-7) u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží nebo šaržemi vakcíny s minimální účinností a počtem sporulovaných oocyst. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria pro přijetí se u každé složky stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

**2-4-3 Cizí agens.** Dezinfekční metoda použitá během přípravy konečného produktu ze sklizených oocyst se může validovat, aby se prokázala účinná inaktivace určitých možných cizích agens. Kde jsou relevantní validační údaje k dispozici a kde je to zdůvodněné a schválené, mohou se některé nebo všechny zkoušky uvedené v odstavci 3-4 Cizí agens vypustit z běžného zkoušení každé šarže.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

### 3-1 Totožnost

**3-1-1** Pro potvrzení přítomnosti oocyst kokcií v šarži vakcíny se použije mikroskopické vyšetření.

**3-1-2** Pro potvrzení přítomnosti oocyst každého druhu *Eimeria* uvedeného v označení na obalu se použije zkouška na účinnost (nebo Zkouška účinnosti šarže).

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)* a vyhovují zkoušce v živné půdě selektivní pro *Campylobacter* spp.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Provedou se zkoušky 1 až 6 obecné stati 2.6.25 *Ptačí virové vakcíny: zkoušky na cizí agens v šaržích konečného přípravku*. Vhodná jsou také obecná ustanovení a až d, g a h této obecné stati. Vakcína vyhovuje požadavkům každé zkoušky.

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Kuřata se musí líhnout a odchovávat, jak je popsáno v odstavci 2-1 a nesmí se ošetřit kokcidiostatiky. Doporučeným způsobem a metodou se každému kuřeti podá přednostně deset dávek vakcíny. Jestliže je objem deseti dávek příliš velký, podá se největší možný objem. Po vakcinaci se kuřata ustájí ve vhodných podmínkách při použití ohrad s podlahou nebo klecí s pevnou podlahou, aby se umožnila reinfekce oocystami. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Počet sporulovaných oocyst.** Počet sporulovaných oocyst v dávce se stanoví spočítáním sporulovaných oocyst ve vhodné počítací komůrce pod mikroskopem. Počet není



menší než minimální a ne větší než maximální počet sporulovaných oocyst uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Po podání jedné dávky doporučeným způsobem, vyhovuje vakcína požadavkům zkoušky na imunogenitu (odstavec 2-3-4).

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede minimální a maximální počet sporulovaných oocyst v dávce.

## VACCINUM COLIBACILLOSIS FETUS A PARTU RECENTIS INACTIVATUM AD RUMINANTES

6.0:0961

### Vakcína proti neonatální kolibacilóze přežvýkavců inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující kultury jednoho nebo více vhodných kmenů *Escherichia coli* nesoucích jeden nebo více adhezínů nebo enterotoxinů. Tento článek se vztahuje na injekčně podávané vakcíny určené k aktivní imunizaci matek pro pasivní ochranu jejich novorozeného potomstva proti střevním formám kolibacilózy.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výrobní kmeny *E. coli* se pomnožují odděleně ve vhodné živné půdě. Buňky nebo toxiny se zpracují tak, že jsou bezpečné při zachování přiměřené imunogenity a pak se smíchají. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Kmeny *E. coli* použité při výrobě vakcíny prokazatelně vyhovují z hlediska exprese antigenů a vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6.) a účinku (5.2.7) pro přežvýkavce, pro které je určená.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Expresse antigenů (odstavec 2-2-1), Bezpečnost (odstavec 2-2-2) a Imunogenita (odstavec 2-2-3).

**2-2-1 Expresse antigenů.** Expresse antigenů, které vyvolávají ochrannou imunitní odpověď, se ověří vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) provedenou s antigeny získanými z každého vakcinačního kmene za podmínek použitých při výrobě vakcíny.

##### 2-2-2 Bezpečnost

**2-2-2-1 Laboratorní zkouška.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a na každém březím živočišném druhu, pro který je vakcína určená. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset březích zvířat, která nebyla vakcinována proti kolibacilóze. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny.

Jestliže se doporučovaným schématem požaduje druhé podání, podá se po doporučeném intervalu jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně až do porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 hodin po ní a dále denně po 4 dny; u každého zvířete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcině;
- průměrný vzestup teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C a žádné zvíře nemá vzestup vyšší než 2 °C;
- není zaznamenán žádný nežádoucí vliv na březost a potomstvo.

**2-2-2-2 Terénní studie.** V terénních studiích se prokáže bezpečnost na každém živočišném druhu, pro který je vakcína určena. Podle doporučeného schématu se doporučeným způsobem podá doporučená dávka nejméně šedesáti zvířatům ze tří různých chovů. Nejméně třicet zvířat ze stejných chovů se ponechá jako kontrolní skupiny. Zvířata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcině a jestliže nedojde ke vzestupu teploty o více než 1,5 °C během dvou dnů po podání každé dávky vakcíny.

**2-2-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pomocí čelenžního kmene, který představuje každý typ antigenu, proti kterému má vakcína chránit. Pokud není dosažitelný jediný kmen se všemi nezbytnými antigeny, opakuje se zkouška s různými čelenžními kmeny. Každá zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Každému zvířeti se podá vakcína s minimální účinností.

Pro každou zkoušku se použije nejméně patnáct zvířat, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu. Namátkově se vybere nejméně deset zvířat a ta se vakcinují v doporučeném stadiu březosti a podle doporučeného schématu. Nejméně pět zvířat se ponechá jako kontroly. Po porodu se odebere všem zvířatům mlezivo a vzorky se uchovávají jednotlivě v podmínkách, které udržují hladiny protilátek. Nejméně patnáct novorozených zvířat před sáním mleziva se ustájí v prostředí zaručujícím nepřítomnost střevních patogenů. Vzorek mleziva od nejméně deseti vakcinovaných matek a nejméně pěti kontrol se přidělí potomstvu. Po narození se krmí telata vzorkem mleziva jim přiděleným. Po nakrmení mlezivem a během 12 hodin po narození se zvířata perorálně čelenžují dostatečným množstvím virulentního kmene *E. coli* a pozorují se nejméně denně po 10 dnů. Použitý kmen nesmí být totožný s kmenem použitým při výrobě vakcíny.

Každý den se zaznamenají příznaky u každého zvířete a naleze se vyhodnotí pomocí dále uvedeného bodového systému:

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| 0 | žádné příznaky,                  |
| 1 | mírný průjem,                    |
| 2 | výrazný průjem (vodnaté výkaly), |
| 3 | úhyn.                            |

Pro každé zvíře se vypočítá součet bodů (skóre) za 10 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže méně než 80 % zvířat, která dostala mlezivo od kontrol uhne nebo má závažné pří-

znaky onemocnění. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je součet bodů (skóre) ve skupině zvířat, která dostala mlezivo od vakcinovaných matek, při srovnání se skupinou, která dostala mlezivo od nevakcinovaných kontrol, významně nižší.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

K dosažení platného stanovení může být nutné provést zkoušku s použitím několika skupin zvířat, z nichž každé se podá jiná dávka. S každou dávkou se provede následující zkouška. Použije se nejméně sedm zvířat (např. králíků, morčat, potkanů nebo myši), která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu. Podáním jedné vhodné dávky se vakcinuje nejméně pět zvířat. Dvě zvířata se ponechají jako kontroly. Kde se doporučeným schématem požaduje revakcinace, může se v této zkoušce použít s podmínkou, že bylo prokázáno, že se stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. V daném intervalu v rozmezí 14 až 21 dnů po posledním podání se všem zvířatům odebere krev a připraví se vzorky séra. K měření protilátkové odpovědi na každý ochranný antigen, který je uveden v označení na obalu, se použije vhodná validovaná zkouška, jako je enzymově imunisorbentové stanovení (2.7.1). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek u vakcinovaných zvířat není významně nižší než hladina u šarže, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost, a nezjistí se významný vzestup titru protilátek u kontrol.

Kde nejsou dostupná zvířata, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, mohou se ve výše uvedené zkoušce použít séropozitivní zvířata. Při provádění zkoušky se séropozitivními zvířaty je nutná zvláštní péče při validaci systému, aby se stanovilo, že zkouška je vhodně citlivá, a aby se určila kritéria pro přijetí, pro nepřijetí a pro opakování zkoušky. Je nezbytné vzít v úvahu rozmezí možných prevakcinačních títů a určit ve vztahu k nim minimální přijatelný vzestup titru po vakcinaci.

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provádí u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky, u várky antigenů nebo směsi várek antigenů, těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je takové, jaké bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla zkoušce na bezpečnost 2-2-2-1 popsané v části Výběr složení vakcíny, nebo zkoušce na bezpečnost popsané v odstavci Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti zvířat. Kde se použije posledně uvedená zkouška, zaznamená se u každého zvířete maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinů se dále použije pro zkoušení každé šarže.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě zvířata jednoho ze živočišných druhů, pro který je vakcína určena, přednostně ta, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, nebo, kde je to zdůvodněné, se použijí zvířata, která mají nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinována proti kolibacilóze a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 h po podání vakcíny a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcině; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-3 Imunogenita.

## VACCINUM COLIBACILLOSIS FETUS A PARTU RECENTIS INACTIVATUM AD SUEM

6.0:0962

### Vakcína proti neonatální kolibacilóze prasat inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující kultury jednoho nebo více vhodných kmenů *Escherichia coli* nesoucích jeden nebo více adhezínů nebo enterotoxinů. Tento článek se vztahuje na injekčně podávané vakcíny určené k aktivní imunizaci prasnic a prasniček pro pasivní ochranu jejich novorozeného potomstva proti střevním formám kolibacilózy.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výrobní kmeny *E. coli* se pomnožují odděleně ve vhodné živné půdě. Buňky nebo toxiny se zpracují tak, že jsou bezpečné při zachování přiměřené imunogenity a pak se smíchají. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Kmeny *E. coli* použité při výrobě vakcíny prokazatelně vyhovují z hlediska exprese antigenů a vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasnice a prasničky, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené

zkoušky Expresse antigenů (odstavec 2-2-1), Bezpečnost (odstavec 2-2-2) a Imunogenita (odstavec 2-2-3).

**2-2-1 Expresse antigenů.** Expresse antigenů, které vyvolávají ochrannou imunitní odpověď, se ověří vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) provedenou s antigeny získanými z každého vakcinačního kmene za podmínek použitých při výrobě vakcíny.

### 2-2-2 Bezpečnost

**2-2-2-1 Laboratorní zkouška.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset březích prasnic, které nebyly vakcinovány proti kolibacilóze. Každé prasnice se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále, po doporučeném intervalu, jedna dávka vakcíny. Prasnice se pozorují nejméně denně až do porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 h po ní a dále denně po 4 dny. U každé prasnice se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádná prasnice nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup teploty všech prasnic nepřekročí 1,5 °C a u žádné z prasnic není vzestup vyšší než 2 °C;
- a není zaznamenán žádný nežádoucí vliv na březost a potomstvo.

**2-2-2-2 Terénní studie.** Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Použijí se nejméně tři skupiny, každá po nejméně dvaceti prasatech, s odpovídajícími skupinami po nejméně deseti kontrolách. Místo vpichu se vyšetří na místní reakce po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, v časovém intervalu, po kterém se zjistí vzestup teploty ve zkoušce 2-2-2-1, pokud k němu došlo, a denně po 2 dny po vakcinaci; u každého prasete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, jestliže průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C a žádné prase nemá vzestup vyšší než 2 °C.

**2-2-3 Imunogenita.** Zkouška se provede s čelenžním kmenem, který představuje každý typ antigenu, proti kterému se uvádí ochrana; pokud není dosažitelný jediný kmen se všemi nezbytnými antigeny, opakuje se zkouška s různými čelenžními kmeny.

Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Každé prasničce se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně osm prasniček vnímavých k infekci *E. coli*, které nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu. Namátkově se z nich vyberou nejméně čtyři a ty se vakcinují v doporučeném stadiu březosti a podle schématu doporučeného pro vakcinaci. Nejméně čtyři prasničky se ponechají jako kontroly. Během 12 hodin po porodu se od vakcinovaných prasniček odebere nejméně patnáct zdravých selat a patnáct zdravých selat od nevakci-

novaných kontrol, přičemž se odeberou nejméně tři selata z každého vrhu. Každé sele se čelenžuje perorálně dostatečným množstvím virulentního kmene *E. coli* před nebo po nakrmení mlezivem. Stejně podmínky se použijí pro vakcinovaná selata i pro kontroly. Použitý kmen nesmí být totožný s kmenem použitým při výrobě vakcíny. Selata se navrátí jejich matkám a pozorují se 8 dnů. Každý den se u každého selete zjišťují příznaky a nález se vyhodnotí pomocí dále uvedeného bodového systému:

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| 0 | žádné příznaky,                  |
| 1 | mírný průjem,                    |
| 2 | výrazný průjem (vodnaté výkaly), |
| 3 | úhyn.                            |

Pro každé sele se vypočítá součet bodů (skóre) za 8 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže od kontrolních prasniček uhne méně než 40 % selat a více než 15 % selat nemá příznaky onemocnění. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže součet bodů (skóre) ve skupině selat od vakcinovaných prasniček je, ve srovnání se skupinou od nevakcinovaných kontrol, významně nižší.

Pro některé adhesiny (například F5 a F41) je publikován důkaz, že v experimentálních podmínkách se nemůže dosáhnout vysoké mortality. Pokud byla provedena čelenž kmenem, který má takové adhesiny, platí: zkoušku nelze hodnotit, pokud příznaky očekávané s čelenžním kmenem má méně než 70 % kontrolních selat; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže součet bodů (skóre) ve skupině selat od vakcinovaných prasniček je významně nižší při srovnání se skupinou od nevakcinovaných kontrol.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedená se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se sedm prasat, nejméně 3 týdny starých, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu. Každé z pěti selat se vakcinuje způsobem a podle schématu uvedeného v označení na obalu. Dvě selata se ponechají jako kontrola. Pokud povaha antigenů umožní získání reprodukovatelných výsledků, může se jako alternativa provést zkouška na laboratorních zvířatech (např. morčatech, myších, králících nebo potkanech). K dosažení platného stanovení může být nutné provést zkoušku na několika skupinách zvířat, z nichž každé se podá jiná dávka. S každou dávkou se provede následující zkouška. Podáním jedné vhodné dávky se vakcinuje nejméně pět zvířat. Nejméně dvě zvířata se ponechají jako kontroly. Kde se doporučeným schématem požaduje revakcinace, může se v této zkoušce použít s podmínkou, že bylo prokázáno, že se stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. V daném intervalu v rozmezí 14 až 21 dnů po posledním podání se všem zvířatům odebere krev a připraví se vzorky séra. K měření protilátkové odpovědi na každý antigen, který je uveden v označení na obalu, se použije vhodná validovaná zkouška, jako je enzymově imunosorbentové stanovení (2.7.1).

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek u vakcinovaných zvířat není významně nižší než u šarže, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost, a nezjistí se významný vzestup titru protilátek u kontrol.

Kde nejsou dostupná zvířata, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, mohou se ve výše uvedené zkoušce použít séropozitivní zvířata. Při provádění zkoušky se séropozitivními zvířaty je nutná zvláštní péče při validaci systému, aby se stanovilo, že zkouška je vhodně citlivá, a aby se určila kritéria pro přijetí, pro nepřijetí a pro opakování zkoušky. Je nezbytné vzít v úvahu rozmezí možných prevakcinačních titrů a určit ve vztahu k nim minimální přijatelný vzestup titru po vakcinaci.

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provede u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky, u várky antigenu nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je takové, jaké bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla ve zkoušce na bezpečnost 2-2-2-1 popsané v odstavci Výběr složení vakcíny, nebo ve zkoušce na bezpečnost popsané v části Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti selat. Kde se použije poslední uvedená zkouška, zaznamená se u každého selete maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup teploty u všech selat nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinů se dále použije pro zkoušení každé šarže.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě prasata, přednostně ta, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu nebo, kde je to zdůvodněné, prasata, která mají nízkou hladinou těchto protilátek, až do doby než jsou vakcinovaná proti kolibacilóze a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému praseti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 h po podání vakcíny a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prasce nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-3 Imunogenita.

## VACCINUM DIARRHOEAE VIRALIS BOVINAE INACTIVATUM

6.0:1952

### Vakcína proti slizniční nemoci skotu inaktivovaná

*Synonymum:* Vakcína proti virovému průjmu skotu inaktivovaná

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů viru slizniční nemoci skotu inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci jalovic a krav pro ochranu plodu proti transplacentární infekci.

#### VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Virové suspenze každého vakcinačního viru se sklídí odděleně a inaktivují se metodou, která zachovává imunogenitu. Virové suspenze se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skot, pro který je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít následující zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci, a na každé kategorii skotu, pro kterou je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může v šarži vakcíny očekávat.

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset kusů skotu nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, který je prostý viru slizniční nemoci skotu i protilátek proti tomuto viru. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březím skotu.** Pokud je vakcína určena pro použití u březího skotu, použije se nejméně deset kusů skotu na začátku každého trimestru, pro který není použití kontraindikováno. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce, nebo neuhyne z pří-

čin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zjištěn nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-3-1-3 Vliv na reprodukční užitkovost.** Pokud je vakcína určena k podání krátce před nebo při inseminaci, musí se prokázat, že nemá nežádoucí účinky na zabřezávání (conception rate).

**2-3-2 Imunogenita.** Pro prokázání imunogenity vakcíny vzhledem k viru slizniční nemoci skotu genotypu 1 je vhodná dále uvedená zkouška; pokud se požaduje ochrana proti viru slizniční nemoci skotu genotypu 2, provede se další zkouška, stejná jako dále uvedená zkouška, ale pro čelenž se použije virus slizniční nemoci skotu genotypu 2.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. Každé jalovici se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvacet jalovic, které jsou prosté viru i protilátek proti viru slizniční nemoci skotu. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně třináct jalovic. Nejméně sedm jalovic se ponechá jako kontroly. Všechna zvířata se drží jako jedna skupina. Jalovice se inseminují. Krátce před čelenží se odeberou vzorky krve od nevakcinovaných jalovic. Ve zkoušce se nepokračuje, jestliže je v době čelenže březích méně než deset vakcinovaných jalovic nebo pět nevakcinovaných jalovic. Každá jalovice se čelenžuje mezi 60. a 90. dnem březosti. U obou popsaných modelů zkoušky (pozorování až do porodu nebo sklizení plodů ve 28 dnech) se může čelenžovat intranazálním podáním vhodného množství necytopatogenního kmenového viru slizniční nemoci skotu, nebo alternativně, kde se jalovice pozorují až do porodu, se může čelenžovat stykem s trvale viremickými zvířaty. Po čelenží se jalovice pozorují nejméně denně buď až do konce březosti, nebo do sklizení plodů za 28 dnů. Jestliže dojde ke zmetání, vyšetří se abortované plody vhodnými metodami na virus slizniční nemoci skotu. Jestliže se zvířata pozorují až do porodu, vyšetří se všechna telata okamžitě po narození a před přijetím mleziva na viremii a protilátky proti viru slizniční nemoci skotu. Jestliže se plody sklízí 28 dnů po čelenží, vyšetří se plody vhodnými metodami na virus slizniční nemoci skotu. O transplacentární infekci se uvažuje, jestliže se virus zjisti v orgánech plodu nebo v krvi novorozených telat, nebo jestliže se zjisti protilátky v prekolostrálních sérech telat.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže některá z kontrolních jalovic má neutralizační protilátky před čelenží nebo jestliže k transplacentární infekci nedojde u více než 10 % kontrolních jalovic. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 90 % telat od vakcinovaných jalovic je chráněno proti transplacentární infekci.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Pro zkoušku se použije množství inaktivované sklizně viru, které odpovídá nejméně dvacet pět dávkám vakcíny na buňkách stejného typu, jaké se použily při výrobě vakcíny nebo prokazatelně nejméně stejně citlivé. Buňky se pasážují po 7 dnech a pozorují celkem nejméně 14 dnů. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít dále uvedená zkouška.

Pro zkoušku se použije sedm vhodných laboratorních zvířat nebo telat, která nemají protilátky proti viru slizniční nemoci skotu. Pět zvířatům se subkutánně podá vhodná dávka vakcíny. Dvě zvířata se ponechají jako kontroly. Druhá dávka vakcíny se může podat po vhodném časovém intervalu, jestliže její účinnost byla prokázána vhodným rozlišovacím systémem zkoušení. Vzorky krve se odeberou před první vakcinací a ve stanoveném intervalu mezi 14. a 21. dnem po poslední vakcinaci. Ve vhodných buněčných kulturách se stanoví séroneutralizační titry protilátky proti viru slizniční nemoci skotu.

Zkoušku nelze hodnotit pokud u kontrolních zvířat byly zjištěny protilátky proti viru slizniční nemoci skotu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek u vakcinovaných zvířat není nižší než hladina protilátek zjištěná se šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají specifické neutralizační protilátky proti viru slizniční nemoci skotu, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dva kusy skotu, který není starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci, a který je prostý viru i protilátek proti viru slizniční nemoci skotu. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Zkouška se provede inokulací nejméně deseti dávek do buněčných kultur známých citlivostí k viru slizniční nemoci skotu. Buňky se pasážují po 7 dnech a druhá kultura se pozoruje nejméně 7 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans oddělí se, je-li to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která nebrání zjištění možného živého viru.

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM DIARRHOEAE VITULI CORONAVIRO ILLATAE INACTIVATUM

6.0:1953

### Vakcína proti koronavirovému průjmu telat inaktivovaná

*Synonymum.* Vaccinum diarrhoeae vituli coronaviro illatae

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů bovinního koronaviru, inaktivovaných tak, že se zachová přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci matek k ochraně jejich potomstva proti koronavirovému průjmu během několika prvních týdnů života.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Každý virus vakcíny se kultivuje odděleně ve vhodných buněčných kulturách. Virové suspenze každého vakcinačního viru se sklídí odděleně a inaktivují se metodou, která zachovává imunogenitu. Virové suspenze se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro březí krávy, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí krávy, které nebyly vakcinované proti bovinnímu koronaviru. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset krav ve stadiu nebo stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé krávé se podá dvojnásobná dávka vakcíny a po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Po každém podání se měří tělesná teplota v den podání a po 4 následující dny. Krávy se pozorují nejméně denně až do otelení.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kráva nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže se nezaznamená žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

2-3-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Každé krávé se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně patnáct březích krav, přednostně ty, které nemají protilátky proti bovinnímu koronaviru. Kde takové krávy nejsou k dispozici, použijí se krávy, které nebyly vakcinovány proti bovinnímu koronaviru, kte-

ré pocházejí z farmy bez výskytu infekce bovinním koronavirem a které mají nízkou hladinu protilátek proti bovinnímu koronaviru, přičemž hladiny jsou u všech zvířat srovnatelné. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset březích krav. Nejméně pět březích krav se ponechá jako kontroly. Od otelení se každé krávé odebírá mlezivo a potom mléko a uchovávají se za vhodných podmínek. Individuálně se stanoví ochranný účinek mleziva a mléka od každé krávy tak, že se použijí telata narozená zdravým kravám, která se mohou získat císařským řezem a která jsou držena v prostředí, kde nejsou vystavena infekci bovinním koronavirem. Každému teleti se podává mlezivo a potom mléko každých 6 hodin nebo podle doporučeného schématu. Pátý až sedmý den po narození se každé tele čelenuje perorálně dostatečným množstvím virulentního kmene bovinního koronaviru. Telata se pozorují nejméně denně po 7 dnů a zaznamená se výskyt, závažnost a délka trvání průjmu, doba vylučování a množství vylučovaného viru.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se významně sníží průjem a vylučování viru u telat, která dostávala mlezivo a mléko od vakcinovaných krav, při srovnání s telaty, která dostávala mlezivo a mléko od kontrol.

##### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pomocí dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě, nebo v buňkách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Aby se získala platná zkouška může být nezbytné provést zkoušku na několika skupinách zvířat, z nichž každé se podá různá dávka. Pro každou požadovanou dávku se provede zkouška následujícím způsobem. Pro zkoušku se použije nejméně sedm zvířat vhodného druhu, která nemají specifické protilátky proti bovinnímu koronaviru. Vakcinuje se nejméně pět zvířat jedním injekčním podáním vhodné dávky. Nejméně dvě zvířata se ponechají jako kontroly. Kde požaduje doporučené schéma revakcinaci, může se revakcinace v této zkoušce provést s podmínkou, že se prokázalo, že stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. V daném intervalu, nejméně 14 dnů po posledním podání, se odebere krev od každého zvířete a připraví se vzorky séra. Pro změření protilátkové odpovědi se použije vhodná validovaná zkouška. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek u vakcinovaných zvířat není významně nižší než hladina získaná se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost a u kontrol nedošlo k žádnému významnému vzestupu titru protilátek.

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po injekčním podání zvířatům, která nemají specifické protilátky proti bovinnímu koronaviru, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dva kusy skotu, nejméně 6 měsíců starého, přednostně bez protilátek proti bovinnímu koronaviru, nebo, kde je to zdůvodněno, použije se skot, který má nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než je vakcinován proti bovinnímu koronaviru, a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobná dávka vakcíny a po 14 dnech ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus.** Proveďte se zkouška na zbytkový živý virus s použitím deseti dávek vakcíny a dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě vakcíny, nebo v jiných buněčných kulturách se vhodnou citlivostí. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, které interferuje se zkouškou, oddělí se, pokud je to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus, ani jinak nebrání zjištění živých virů.

3-5 **Cizí agens.** Zkoušky na protilátky se provedou u skotu použitého ve zkoušce na bezpečnost. Na konci druhého pozorovacího období se odebere vzorek krve. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti bovinnímu herpes viru 1 (BHV1), viru bovinní leukemie (BLV) a viru slizniční nemoci skotu (BVDV).

3-6 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede doporučené schéma pro podávání mleziva a mléka po porodu.

## VACCINUM DIARRHOEAE VITULI ROTAVIRO ILLATAE INACTIVATUM

6.0:1954

Vakcína proti rotavirovému průjmu telat  
inaktivovaná

*Synonymum.* Vaccinum inactivatum diarrhoeae vituli  
rotaviro illatae

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů bovinního rotaviru, inaktivovaných tak, že se zachová při-

měřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci matek pro ochranu jejich potomstva proti rotavirovému průjmu během několika prvních týdnů života.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Každý vakcinační virus se kultivuje odděleně v buněčných kulturách. Virové suspenze každého vakcinačního viru se sklídí odděleně a inaktivují se metodou, která zachovány imunogenitu. Virové suspenze se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4.).

#### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro březí krávy, pro které je určená. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí krávy, které nebyly vakcinovány proti bovinnímu rotaviru. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset krav ve stadiu nebo stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé krávi se podá dvojnásobná dávka vakcíny a po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Po každém podání se měří tělesná teplota v den podání a po 4 následující dny. Krávy se pozorují nejméně denně až do otelení.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kráva nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a jestliže se nezaznamenají žádné nepříznivé vlivy na březost nebo potomstvo.

2-3-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Každé krávi se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně patnáct březích krav, přednostně ty, které nemají protilátky proti bovinnímu rotaviru. Kde takové krávy nejsou k dispozici, použijí se krávy, které nebyly vakcinovány proti bovinnímu rotaviru, které pocházejí z farmy bez výskytu infekce bovinním rotavirem v nedávné době a které mají nízkou hladinu protilátek proti bovinnímu rotaviru, přičemž hladiny protilátek jsou u všech zvířat srovnatelné. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset březích krav. Nejméně pět březích krav se ponechá jako kontroly. Od otelení se každé krávi odeberá mlezivo a potom mléko a uchovávají se za vhodných podmínek. Individuálně se stanoví ochranný účinek mleziva a mléka od každé krávy tak, že se použijí telata narozená zdravým kravám, která se mohou získat císařským řezem a která jsou držena v prostředí, kde nejsou vystavena infekci bovinním rotavirem. Každému teleti se podává mlezivo

a potom mléko každých 6 hodin, nebo podle doporučeného schématu. Pátý až sedmý den po narození se každé tele čelenuje perorálně dostatečným množstvím virulentního kmene bovinního rotaviru. Telata se pozorují nejméně denně po 7 dnů. Zaznamená se výskyt, závažnost a délka trvání průjmu a doba vylučování a množství vylučovaného viru.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se významně sníží průjem a vylučování viru u telat, která dostávala mlezivo a mléko od vakcinovaných krav, při srovnání s telaty, která dostávala mlezivo a mléko od kontrol.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška se provede pomocí dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě, nebo v buňkách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně sto dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Aby se získala platná zkouška, může být nezbytné provést zkoušku na několika skupinách zvířat, z nichž každé se podá odlišná dávka. Pro každou požadovanou dávku se provede zkouška následujícím způsobem. Ve zkoušce se použije nejméně sedm zvířat vhodného druhu, která nemají specifické protilátky proti bovinnímu rotaviru. Vakcinuje se nejméně pět zvířat jedním injekčním podáním vhodné dávky. Nejméně dvě zvířata se ponechají jako kontroly. Kde požaduje doporučené schéma revakcinaci, může se revakcinace v této zkoušce provést s podmínkou, že se prokázalo, že stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. V daném intervalu, nejméně 14 dnů po posledním podání, se odebere krev od každého zvířete a připraví se vzorky séra. Pro změření protilátkové odpovědi se použije vhodná validovaná zkouška. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátky u vakcinovaných zvířat není významně nižší než hladina získaná se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost a jestliže u kontrol nedošlo k žádnému významnému vzestupu titru protilátky.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání zvířatům, která nemají specifické protilátky proti bovinnímu rotaviru, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dva kusy skotu, staré nejméně 6 měsíců a přednostně bez protilátek proti bovinnímu rotaviru nebo, kde je to zdůvodněno, použije se skot, který má nízkou hladinu těchto protilátek až do doby než je vakcinován proti bovinnímu rotaviru a podání vakcíny nevyvolá

anamnestickou odpověď. Každému zvířeti se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny a po 14 dnech ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pomocí deseti dávek vakcíny a dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě vakcíny, nebo v jiných buněčných kulturách se vhodnou citlivostí. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, které interferuje se zkouškou, oddělí se, pokud je to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus, ani jinak nebrání zjištění živých virů.

**3-5 Cizí agens.** Zkoušky na protilátky se provedou u skotu použitého ve zkoušce na bezpečnost. Na konci druhého pozorovacího období se odebere vzorek krve. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti bovinnímu herpes viru 1 (BHV1), viru bovinní leukemie (BLV) ani viru slizniční nemoci skotu (BVDV).

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede doporučené schéma pro podávání mleziva a mléka po porodu.

# VACCINUM ENCEPHALOMYELITIDIS INFECTIVAE AVIARIAE VIVUM

6.0:0588

## Vakcína proti infekční encefalomyelitidě ptáků živá

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru encefalomyelitidy ptáků. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání chovným kuřatům před snáškou pro pasivní ochranu jejich budoucího potomstva a/nebo pro prevenci vertikálního přenosu viru prostřednictvím vajec.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadav-

Vakcíny pro  
veterinární  
použití



kům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen. Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

**2-4-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu vakcinace. V každém případě se použijí nesnášející chovná kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky infekční encefalomyelitidy ptáků nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-4-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti jednodenních kuřat z SPF chovu (5.2.2), postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách jednodenních kuřat a zkoušení konečného získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se podá množství vakcinačního viru, které dovolí zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 5 až 7 dnů se připraví suspenze z mozku každého kuřete a vzorky se spojí. Každému z pěti dalších kuřat stejného stáří a původu se perorálně podá vhodný objem směsného vzorku. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného vakcinačního viru, který se získá. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus

nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-3 Imunogenita.** Jestliže se vakcína doporučuje pro pasivní ochranu budoucího potomstva, provede se zkouška 2-4-3-1. Jestliže se vakcína doporučuje pro prevenci vertikálního přenosu viru prostřednictvím vajec, provede se zkouška 2-4-3-2. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu vakcinace. V každém případě se použijí kuřata z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny.

**2-4-3-1 Pasivní imunita u kuřat.** Vakcinuje se nejméně dvacet chovných kuřat z SPF chovu (5.2.2). Nejméně deset chovných kuřat stejného stáří a původu se ponechá odděleně jako kontroly. Na vrcholu snášky se nechá vyvíjet nejméně dvacet pět kuřat z vajec od vakcinovaných chovných kuřat a deset kuřat od nevakcinovaných chovných kuřat. Ve dvou týdnech stáří se každé kuře čelenuje intracerebrálně dostatečným množstvím virulentního viru encefalomyelitidy ptáků. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud:

- během pozorovacího období po čelení méně než 80 % kontrolních kuřat uhne nebo má těžké klinické příznaky infekční encefalomyelitidy ptáků
- a/nebo během doby mezi vakcinací a čelením více než 15 % kontrolních nebo vakcinovaných kuřat má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelení nejméně 80 % potomstva vakcinovaných kuřat přežije a nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění.

**2-4-3-2 Pasivní imunita u embryí.** Vakcinuje se nejméně dvacet chovných kuřat z SPF chovu (5.2.2). Nejméně deset chovných kuřat stejného stáří a původu se ponechá odděleně jako kontroly. Na vrcholu snášky se inkubuje nejméně třicet šest vajec od dvou skupin, vakcinované a kontrolní, a provede se zkouška citlivosti embrya. Šestý den inkubace se inokuluje 100 EID<sub>50</sub> kmene Van Roekel viru encefalomyelitidy ptáků do žloutkových vaků vajec. 12 dnů po inokulaci se embrya vyšetří na specifické změny encefalomyelitidy ptáků (svalová atrofie). Úhyny během prvních 24 h se považují za nespecifické. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže méně než 80 % kontrolních embryí má změny encefalomyelitidy ptáků. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se může vyšetřit méně než 80 % embryí. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % embryí ve vakcinované skupině nemá žádné změny encefalomyelitidy ptáků.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína, podle potřeby zředěná a smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru encefalomyelitidy ptáků, nadále neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

Vakcíny neurčené pro injekční podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Jakákoliv tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

3-5 **Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se každému kuřeti podá podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Po podání doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje vakcína, v závislosti na indikacích, jedné nebo oběma zkouškám předepsaným v odstavci Imunogenita (2-4-3-1 a 2-4-3-2). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM ERYSIPELATIS SUILLAE INACTIVATUM

6.0:0064

Vakcína proti července prasat inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Erysipelothrix rhusiopathiae* inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat proti července prasat.

### 2 VÝROBA

Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-1 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-1-1).

2-1-1 **Imunogenita.** Dále popsána zkouška je vhodná k prokázání imunogenity vakcíny, pokud se týká sérotypu 1 a sérotypu 2 *E. rhusiopathiae*. Jestliže se uvádí ochrana proti dalšímu sérotypu, je nutná další zkouška k prokázání imunogenity proti tomuto sérotypu.

Jestliže vakcína obsahuje více než jeden sérotyp, může se provést zkouška pro dva sérotypy na jedné skupině zvířat podáním každého čelenžního sérotypu do rozdílných slabín. Validace a kritéria pro přijetí se použijí odděleně vzhledem k příslušným místům vpichu. Jestliže vakcína obsahuje více než jeden sérotyp, může se zkouška na imunogenitu také provést za použití oddělené skupiny pro každý sérotyp.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí prasata nejméně 12 týdnů stará o hmotnosti nejméně 20 kg. Každému prasati se podá vakcína s minimální účinností.

Pro každou zkoušku se použije nejméně patnáct prasat, která nemají protilátky proti *E. rhusiopathiae*. Zvířata se rozdělí do dvou skupin. Podle doporučeného schématu se vakcinuje skupina o počtu nejméně deseti prasat. Druhá skupina o počtu nejméně pěti prasat se ponechá jako kontrola. Tři týdny po vakcinaci se každé prase čelenžuje oddělenou intradermální injekcí 0,1 ml virulentního kmene sérotypu 1 a sérotypu 2 *E. rhusiopathiae*. Prasata se pozorují nejméně denně po 7 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže typické příznaky onemocnění, tj. romboidní kožní změny v místě vpichu, má méně než 80 % kontrolních prasat. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 90 % vakcinovaných prasat zůstává bez romboidních kožních lézí v místě vpichu

*Bakterie červenky prasat sérotyp 1 BRP a bakterie červenky prasat sérotyp 2 BRP* jsou vhodné k použití jako čelenžní kmeny.

#### 2-2 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-2-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít dále uvedená zkouška.

Použije se deset myši vhodného kmene (např. NMRI) o hmotnosti 17 g až 20 g, stejného původu, které nemají protilátky proti července prasat. Každá myš se vakcinuje subkutánně vhodnou dávkou (obvykle 1/10 dávky pro prase). V daném intervalu (např. 21 dnů až 28 dnů), v závislosti na zkoušené vakcíně, se myši v narkóze vykrví. Séra se spojí tak, že od každé myši se použije stejný objem. Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), např. enzymově-

-imunisorbentovým stanovením za použití *ELISA* s *navázaným červenkovým antigenem BRP* se stanoví hladina protilátek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není významně nižší než hladina, která se získala se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

## 2 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti *E. rhusiopathiae*, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dvě prasata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci a přednostně ta, která nemají protilátky proti července prasat, nebo, kde je to odůvodněno, použijí se prasata, která mají nízkou hladinu takových protilátek až do doby, než jsou vakcinována proti července prasat a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Každému z prasat se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-1-1 Imunogenita.

## VACCINUM FURUNCULOSIDIS AD SALMONIDEOS INACTIVATUM CUM ADIUVATIONE OLEOSA AD INIECTIONEM

6.2:1521

Vakcína proti furunkulóze lososovitých ryb (injekční) s olejovým adjuvans inaktivovaná

*Synonymum.* Vaccinum furunculosis inactivatum ad salmonidas cum adjuvacione oleosa ad iniectionem

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci lososovitých ryb proti furunkulóze.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Kmeny *A. salmonicida* se pomnožují a sklízí odděleně. Sklízí se inaktivují vhodnou metodou. Mohou se purifikovat a koncentrovat. Mohou se použít celé nebo dezintegrované buňky a vakcína může obsahovat extracelulární

produkty bakterií uvolněné do živné půdy. Vakcína obsahuje olejové adjuvans.

#### 2-2 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO KMENE

Do vakcíny se zařadí kmeny prokazatelně vhodné z hlediska tvorby imunologicky významných antigenů. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro druhy ryb, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky na bezpečnost (odstavec 2-2-1) a na imunogenitu (odstavec 2-2-2).

##### 2-2-1 Bezpečnost.

2-2-1-1 *Laboratorní zkouška.* Zkouška se provede na každém druhu ryb, pro který je vakcína určena. V každém případě se použijí ryby minimální tělesné hmotnosti doporučené pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny. Použije se nejméně padesát ryb z populace, která nemá specifické protilátky proti *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* a nebyla vakcinována proti furunkulóze ani jí vystavená. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny, při teplotě vody nejméně 10°C. Každé rybě se intraperitoneálně podá dvojnásobná dávka vakcíny na jednotku hmotnosti. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 6 % ryb uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-1-2 *Terénní studie.* Bezpečnost se prokazuje také v terénních zkouškách podáním doporučené dávky dostatečnému počtu ryb, nejméně ve dvou provozech. Ve třech obdobích (po vakcinaci, v polovině chovného období a při konečném výlovu) se odeberou vzorky od třiceti ryb a vyšetří se na přítomnost místních změn v tělní dutině. Jsou přípustné pouze mírné léze, včetně lokalizovaných srůstů mezi vnitřnostmi nebo mezi vnitřnostmi a stěnou břišní, a rovněž slabé zakalení a/nebo ojedinělé pigmentace na peritoneu. Nepříjemné jsou rozsáhlé léze, včetně srůstů větších částí břišních orgánů, masivní pigmentace a/nebo nápadné zesílení, a zakalení větších ploch peritonea, pokud se vyskytují u více než 10 % ryb z některého vzorku. Takové změny, včetně srůstů, dávají vnitřnostem vzhled jednoho orgánu a/nebo vedou k perforaci peritonea s následným vyřeznutím orgánů.

2-2-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede podle protokolu, který stanoví limity hmotnosti ryb, vodní zdroj, limity průtoku a teploty vody a přípravu standardizované čelenže. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Každé rybě se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvě sta ryb. Podle návodu k použití se vakcinuje nejméně sto ryb. Nejméně stu ryb v kontrolní skupině se podá placebo. Vakcinované i kontrolní ryby se pro identifikaci označí. Všechny ryby se drží v jedné nádrži, případně se do více nádrží nasadí po stejném počtu vakcinovaných a kontrolních ryb. Ve stanoveném časovém intervalu po vakcinaci, stanoveném podle údajů

o vývoji imunity, se všechny ryby čelenují injekcí dostatečného množství kultury *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* s ověřenou virulencí. Ryby se pozorují denně, dokud není dosaženo nejméně 60 % specifických úhynů v kontrolní skupině. Pro obě skupiny, vakcinovanou i kontrolní, se sestrojí křivka specifické mortality v závislosti na době po čelení a interpolací se stanoví čas odpovídající 60 % specifické mortality u kontrol.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v kontrolní skupině 21 dnů po prvním úhynu ryb je specifická mortalita nižší než 60 %. Z křivky se odečte mortalita (M) u vakcinovaných ryb v době odpovídající 60 % mortalitě u kontrol.

Vypočítá se relativní procento přežití (RPP) podle vzorce:

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \cdot 100.$$

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hodnota RPP je nejméně 80 %.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** U každé šarže vakcíny se může provést zkouška Účinnost (odstavec 3-4) za použití skupin nejméně třiceti ryb jednoho z druhů, pro který je vakcína určena. Kde se zkouška neprovádí, může se použít alternativní validovaná metoda založená na protilátkové odpovědi. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně třicet pět ryb z populace, která nemá specifické protilátky proti *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* a jejichž hmotnost splňuje stanovené limity. Zkouška se provádí při definované teplotě. Nejméně dvacet pět rybám se intraperitoneálně podá vakcína podle návodu k použití. Nejméně deseti rybám v kontrolní skupině se podá placebo. Ve stanoveném období po vakcinaci se odeberou vzorky krve. V každém vzorku se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) stanoví hladina specifických protilátek proti *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* v kontrolní skupině. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titer protilátek vakcinovaných není významně nižší než titer zjištěný u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání rybám, které nemají specifické protilátky proti *A. salmonicida*, stimuluje vakcína tvorbu takových protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset ryb jednoho z druhů, pro které je vakcína určena. Použité ryby mají, pokud je to možné, nejmenší tělesnou hmotnost doporučenou pro vakcinaci. Pokud nejsou ryby o této hmotnosti dostupné, použijí se ryby o hmotnosti nejvýše dvojnásobné. Použijí se ryby přednostně z populace, která nemá specifické

protilátky proti *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* nebo, kde je to zdůvodněno, se použijí ryby z populace, která má nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinovány proti furunkulóze, nebo vystavené této infekci a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny při teplotě vody nejméně 10 °C. Každé rybě se intraperitoneálně podá dvojnásobná dávka vakcíny na jednotku hmotnosti. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhynie více než 10 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci (2-2-2) Imunogenita.

## 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede informace o době potřebné pro vývoj imunity po vakcinaci v podmínkách odpovídajících doporučenému použití.

## VACCINUM HEPATITIDIS VIRALIS ANATIS STIRPE I VIVUM

6.0:1315

Vakcína proti virové hepatitidě kachen typu I živá

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru hepatitidy kachen typu I. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci chovných kachen, k pasivní ochraně jejich potomstva a/nebo k aktivní imunizaci kachňat.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

#### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kachny, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky na bezpečnost (odstavec 2-4-1), na zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a na imunogenitu (odstavec 2-4-3).

**2-4-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny. V každém případě se použijí kachny, které nejsou starší než nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet vnímavých domácích kachňat (*Anas platyrhynchos*), která nemají protilátky proti viru hepatitidy kachen typu I. Každému kachněti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinasobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kachňata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 10 % kachňat uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kachně nemá zřetelné klinické příznaky virové hepatitidy kachen nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-4-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti jednodenních domácích kachňat, která nemají protilátky proti viru hepatitidy kachen typu I, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách jednodenních kachňat a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Oronazálně se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 2 až 4 dny po podání se připraví suspenze z jater každého kachněte a tyto vzorky se spojí. Každému z pěti jednodenních séronegativních domácích kachňat se oronazálně podá 1 ml směsné suspenze jater. Tento postup pasážování se provede pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Kachňata, kterým byla podána poslední pasáž se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Porovnají se výsledky získané s nepasážovaným virem ve zkoušce na bezpečnost a výsledky získané s maximálně pasážovaným virem, aby se posoudil stupeň zvýšení virulence. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, zkoušení se uzavře tak, že nedošlo ke zvýšení virulence.

**2-4-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí domácí kachny, které nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému kachněti není větší než minimální titer viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže, která je v šarží vakcíny.

**2-4-3-1 Vakcíny k pasivní imunizaci kachňat.** Pro zkoušku se použije nejméně patnáct snášejících kachen nebo, pokud je to vhodné, kachen určených ke snášení, které jsou stejné-

ho původu a které nemají protilátky proti viru hepatitidy kachen typu I. Podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně deset kachen. Nejméně pět kachen se ponechá jako kontroly. Počínaje od čtyř týdnů po začátku snášky se sbírají embryonovaná vejce od vakcinovaných i kontrolních kachen a inkubují se. Nejméně dvacet jednodenních kachňat představujících vakcinovanou skupinu a nejméně deset z kontrolní skupiny se oronazálně čelenuje dostatečným množstvím virulentního viru hepatitidy kachen typu I. Kachňata se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kachňat, která mají klinické příznaky onemocnění.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení méně než 70 % čelenujovaných kachňat z kontrolní skupiny uhynie nebo má typické příznaky onemocnění
- a/nebo v období mezi vakcinací a sbíráním vajec více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kachen má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení procento relativní ochrany vypočítané pomocí následujícího vzorce není menší než 80 %:

$$\frac{V - C}{100 - C} \cdot 100,$$

v němž značí:

- V* – procento čelenujovaných kachňat od vakcinovaných kachen, která přežívají do konce pozorovací doby bez klinických příznaků onemocnění;
- C* – procento čelenujovaných kachňat od nevakcinovaných kontrolních kachen, která přežívají do konce pozorovací doby bez klinických příznaků onemocnění.

**2-4-3-2 Vakcíny k aktivní imunizaci kachňat.** Pro zkoušku se použije nejméně třicet kachňat stejného původu, která nemají protilátky proti viru hepatitidy kachen typu I. Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kachňat. Nejméně deset kachňat se ponechá jako kontroly. Každé kachně se po nejméně 5 dnech čelenuje oronazálně dostatečným množstvím virulentního viru hepatitidy kachen typu I. Kachňata se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kachňat, která mají klinické příznaky onemocnění.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení méně než 70 % kontrolních kachňat uhynie nebo má typické příznaky onemocnění
- a/nebo v pozorovacím období mezi vakcinací a čelení více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kachňat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení není procento relativní ochrany vypočítané pomocí následujícího vzorce menší než 80 %:

$$\frac{V - C}{100 - C} \cdot 100,$$

v němž značí:

- V* – procento čelenžovaných vakcinovaných kachňat, která přežijí do konce pozorovacího období bez klinických příznaků onemocnění;  
*C* – procento čelenžovaných nevakcinovaných kontrolních kachňat, která přežijí do konce pozorovacího období bez klinických příznaků onemocnění.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína, podle potřeby zředěná a smíchaná s monospécifickým antisérem proti viru hepatitidy kachen typu I, nadále neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*. Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Jakákoliv tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

3-5 **Bezpečnost.** Použije se nejméně deset domácích kachen, které nemají protilátky proti viru hepatitidy kachen typu I, nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. U vakcín doporučených pro použití u kachen starších více než 2 týdny, se mohou použít kachny 2 týdny staré. Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se každé kachně podá deset dávek vakcíny. Kachny se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 20 % kachen má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kachna nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje v závislosti na indikaci jedné nebo oběma zkouškám předepsaným v odstavci 2-4-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezen-

tativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

Jestliže se zjistí, že vakcína může vykazovat návrat k virulenci, uvedou se v označení na obalu nutná opatření pro zabránění přenosu virulentního viru na nevakcinovaná kachňata.

## VACCINUM HERPESVIRIS EQUINI INACTIVATUM

6.0:1613

Vakcína proti herpesvirům koní inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů koňského herpesviru 1 a/nebo koňského herpesviru 4 inaktivovaných tak, že je zachovaná přiměřená imunogenita, nebo suspenzi inaktivované frakce viru. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koní proti onemocnění vyvolanému koňským herpesvirem 1 a/nebo koňským herpesvirem 4.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Každý kmen viru se kultivuje odděleně v buněčných kulturách. Před inaktivací se mohou suspenze viru purifikovat a koncentrovat; mohou se zpracovat na fragmenty viru a tyto virové fragmenty se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro koně, pro které je určena. Pokud je některé plemeno koní známé zvláštní citlivostí k vakcíně, koně tohoto plemene se zahrnou do zkoušky na bezpečnost. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a na každé kategorii koní, pro kterou je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-3-1-1 **Obecná bezpečnost.** Pro zkoušku se použije nejméně deset koní, kteří předtím nebyli vakcinováni proti herpesvirům koní, kteří mají co nejnižší hladinu protilátek, což nesevřdí pro nedávno prodělanou infekci, a kteří nevylučují koňský herpesvirus. Každému koni se podá dvojnásobná dávka vakcíny a ještě jedna dávka za 14 dnů. Koně se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během 28 dnů zkoušky žádný kůň nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březích klisnách.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích zvířat, použije se pro zkoušku nejméně deset březích klislen v odpovídajícím trimestru nebo trimestrech březosti, podle doporučeného schématu. Každé klisně se podá dvojnásobná dávka vakcíny a za 14 dnů ještě jedna dávka. Klisny se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná klisna nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zjištěn nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-3-2 Imunogenita.** Typ zkoušky na imunogenitu závisí na účelu přípravku. U vakcín určených k ochraně proti onemocnění dýchacího traktu se provede zkouška 2-3-2-1 a použije se koňský herpesvirus 1 a/nebo koňský herpesvirus 4, v závislosti na požadované ochraně. U vakcín určených k ochraně proti zmetání se provede zkouška 2-3-2-2. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí koně, kteří nebyli vakcinováni proti herpesvirům koní, kteří mají co nejnižší hladinu protilátek, což nesvědčí pro nedávno prodělanou infekci, a kteří nevylučují koňský herpesvirus. Pro prokázání, že se bezprostředně před vakcinací nevyskytuje čerstvá infekce, se od každého koně odebere vzorek krve a vyšetří se jednotlivě na protilátky proti koňským herpesvirům 1 a 4; odebere se 10 ml heparinizované krve a proprané leukocyty se vyšetří na koňské herpesviry 1 a 4; odebere se výtěr z nosohltanu a vyšetří se na koňské herpesviry 1 a 4. Nezjistí se známky aktivní infekce. Bezprostředně před čelenží se odebere výtěr z nosohltanu a vyšetří na koňské herpesviry 1 a 4. Pokud se zjistí vylučování viru, vyřadí se kůň ze zkoušky. Koně se chovají v přísné izolaci. Každému koni se podá vakcína s minimální účinností.

**3-3-2-1 Vakcíny určené k ochraně proti onemocnění dýchacího traktu.** Pro zkoušku použije nejméně deset koní, nejméně 6 měsíců starých. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně šest koní. Nejméně čtyři nevakcinovaní koně se ponechají jako kontroly. Za nejméně 2 týdny po poslední vakcinaci se všichni koně čelenžují intranazálně koňským herpesvirem 1 nebo 4 v dávce, která je u vnímavých koní dostatečná k vyvolání charakteristických příznaků onemocnění, jako je horečka a vylučování viru (a případně výtok z nosu a kašláni). Koně se pozorují nejméně denně po 14 dnů. K izolaci viru se denně se odebere od každého jednotlivého koně výtěr z nosohltanu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se u vakcinovaných koní zjistí nejvýše mírné příznaky onemocnění; příznaky onemocnění u vakcinovaných zvířat jsou méně závažné než u kontrol. Průměrný počet dnů, ve kterých se vylučuje virus, a odpovídající titry viru jsou významně nižší u vakcinovaných koní než u kontrol.

**2-3-2-2 Vakcíny určené k ochraně proti zmetání.** Použije se nejméně deset březích klislen. Navíc, k výše popsanému zkoušení se v době 6, 4, 3, 2 a 1 měsíc před první vakcinací odebere vzorek krve od každé klisny a vyšetří se jednotlivě na protilátky proti koňskému herpesviru 1 a koňskému her-

pesviru 4. Nezjistí se známky nedávno prodělané infekce nebo vylučování viru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně šest klislen. Nejméně čtyři klisny se ponechají jako kontroly. Mezi 260. až 290. dnem březosti, ale ne dříve než 3 týdny po poslední vakcinaci, se všechny klisny čelenžují intranazálně koňským herpesvirem 1 v dávce, která je dostatečná k vyvolání zmetání u citlivých klislen. Klisny se pozorují nejméně denně až do porodu nebo do zmetání. Ze zmetaných plodů se odeberou vzorky fetálních plicních a jaterních tkání a v buněčných kulturách se provedou zkoušky na průkaz viru.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než jedna kontrolní klisna porodí zdravé hříbě a jestliže se čelenžní virus neizoluje z abortovaných plodů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nezmetá více než jedna vakcinovaná klisna.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pomocí dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě nebo v buněčných kulturách, prokazatelně nejméně stejně citlivých. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Vakcinuje se nejméně pět králíků, morčat nebo myši jedním podáním vhodné dávky. Kde vyžaduje doporučené schéma druhé podání, může se u laboratorních zvířat použít, s podmínkou že bylo prokázáno, že se stále zajistí vhodné citlivý zkušební systém. V daném intervalu, v rozmezí 14 až 21 dnů po posledním podání, se od každého zvířete odebere krev a připraví se vzorky séra. Ke stanovení odpovědi na každý antigen uvedený v označení na obalu se použije vhodná validovaná zkouška, jako je enzymově imunobentové stanovení (ELISA). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladiny protilátek nejsou významně nižší než hladiny protilátek získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti koňskému herpesviru 1 a koňskému herpesviru 4 nebo frakci těchto virů, vyvolá vakcína tvorbu specifických protilátek proti typu nebo typům viru obsaženým v přípravku. Použitá metoda musí rozlišit protilátky proti koňským herpesvirům 1 a 4.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se nejméně dva koně, kteří nebyli vakcinováni proti koňským herpesvirům 1 a 4. Doporučeným způsobem se každému koni podá dvojnásobná dávka vakcíny a po dvou týdnech ještě jedna dávka. Koně se pozorují nejméně denně do 10 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný kůň nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede inokulací nejméně dvaceti pěti dávek vakcíny do buněčné kultury citlivé ke koňským herpesvirům 1 a 4; pasáž se provede po 5 až 7 dnech a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, oddělí se adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus nebo jinak nebrání zjištění živého viru, nebo se provede zkouška inaktivace u směsi várek antigenů před přidáním adjuvans.

3-5 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM INFLUENZAE EQUI INACTIVATUM

6.0:0249

### Vakcína proti chřipce koní inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů koňského viru chřipky, inaktivovaných tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Vhodné kmeny obsahují hemaglutinin i neuraminidasu. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koní proti chřipce koní.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Každý kmen viru se kultivuje odděleně v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Virové suspenze se mohou purifikovat a koncentrovat. Obsah antigenu ve vakcíně je založen na obsahu hemaglutininu, jehož obsah ve virových suspenzích se stanoví způsobem popsaným v části Zkoušení u výrobce. Množství hemaglutininu u každého kmene není menší než množství ve vakcíně, která měla vyhovující výsledek ve zkoušce na účinnost. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Výběr kmenů použitých k přípravě vakcíny vychází z epizootologické (epidemiologické) situace. Mezinárodní úřad pro nákazy zvířat (Office international des épizooties) pravidelně posuzuje epizootologické údaje, a je-li třeba, doporučuje nové odpovídající kmeny, které převažují při epizootologických šetřeních. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými předpisy ve státech, které podepsaly Úmluvu o vypracování Evropského lékopisu.

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro koně, pro které je určena. Pokud je některé plemeno koní známé zvláštní citlivostí k této vakcíně, koně tohoto plemene se zahrnou do zkoušky na bezpečnost. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a na každé kategorii koní, pro kterou je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-3-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro zkoušku se použije nejméně deset koní, přednostně ti, kteří nemají protilátky proti viru chřipky koní nebo, kde je to zdůvodněno, použijí se koně, kteří mají nízkou hladinu těchto protilátek, až do doby, než jsou vakcinováni proti chřipce koní a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Každému koni se podá dvojnásobná dávka vakcíny a za čtrnáct dnů ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný kůň nemá během 28 dnů zkoušení abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-2 *Bezpečnost na březích klisnách.* Pokud je vakcína určena pro použití u březích klisen, použije se pro zkoušku nejméně deset březích klisen ve stadiu nebo různých stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé klisně se podá dvojnásobná dávka vakcíny a za 14 dnů ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná klisna nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zjištěn nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

2-3-2 **Imunogenita.** Pro prokázání imunogenity kmenů obsažených ve vakcíně je vhodná zkouška popsaná v odstavci 2-3-2-1.

Čelenž virulentním kmenem se provede nejméně pro jeden z kmenů obsažených ve vakcíně (viz zkoušku 2-3-2-1). Imunogenita ostatních kmenů obsažených ve vakcíně se může prokázat, kde je to zdůvodněné, na základě sérologické odpovědi vyvolané po vakcinaci koní (viz zkoušku 2-3-2-2). Zdůvodnění k ochraně proti těmto kmenům se může založit na publikovaných údajích o vztahu mezi titrem protilátek a ochranou proti kmenům antigenně příbuzným.

Kde se použije sérologie, provede se zkouška popsaná v odstavci 2-3-2-1, ale místo virulentní čelenže se za 2 týdny po poslední vakcinaci odeberou vzorky krve a vhodnými imunochemickými metodami (2.7.1), jako je jednoduchá radi-



ální hemolýza nebo hemaglutinačně-inhibiční zkouška, jak je uvedeno dále, se v každém séru stanoví titer protilátek. K validaci zkoušky se použije referenční sérum. Kritéria pro přijetí závisí na kmeni a jsou založena na dosažitelných údajích; pro kmen viru A/equi-2 jsou zpravidla vakcíny vyhovující, jestliže titer protilátek každého séra (při vyšetření jednoduchou radiální hemolýzou) není nižší než 85 mm<sup>2</sup>. Jestliže se použije hemaglutinačně-inhibiční zkouška, není titer nižší než 1 : 64 (před smícháním se suspenzí antigenu a erytrocytů).

*Antisérum koňské proti chřipce koní subtyp 1 BRP, antisérum koňské proti americkému typu chřipky koní subtyp 2 BRP a antisérum koňské proti evropskému typu chřipky koní subtyp 2 BRP* jsou vhodná pro použití jako referenční séra pro zkoušku Jednoduchá radiální hemolýza.

Požadavky na výrobek vyjadřují druh prokázané imunogenity (ochrana proti čelenži nebo tvorba protilátek).

2-3-2-1 Ochrana proti příznakům onemocnění a snížení vylučování viru. Proveďte se zkouška na imunogenitu pomocí čelenžního kmene, proti kterému se udává ochrana. Kde je to možné, použijte se čerstvý izolát.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí koně nejméně 6 měsíců staří. Každému koni se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně deset koní, kteří nemají protilátky proti viru chřipky koní. Každému zvířeti se odebere vzorek krve a jednotlivě se vyšetří na protilátky proti viru chřipky koní, aby se ověřila séronegativita. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně šest koní. Nejméně čtyři koně se ponechají jako kontroly. Za 7 dnů po první vakcinaci se u každého zvířete provede druhý odběr krve a vzorky krve se vyšetří jednotlivě na protilátky proti viru chřipky koní, aby se zjistila anamnestická sérologická odpověď. V tomto stadiu se séropozitivní zvířata vyřadí ze zkoušky. Nejméně za 2 týdny po poslední vakcinaci se všem zvířatům podá aerosolem virus chřipky koní v množství, které u vnímavých zvířat vyvolá charakteristické příznaky onemocnění, jako je horečka, výtok z nosu a kašel. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Denně se od každého zvířete odebírají výtěry z nosu k izolaci viru.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaná zvířata mají pouze mírné příznaky, zatímco kontrolní zvířata mají charakteristické příznaky onemocnění. Průměrný počet dnů, ve kterých je virus vylučován, jakož i titer viru jsou významně nižší u vakcinovaných koní než u kontrolních koní.

2-3-2-2 Přítomnost protilátek po vakcinaci.

2-3-2-2-1 *Jednoduchá radiální hemolýza.* Každé sérum se 30 min zahřívá při 56 °C. Zkouší se každé sérum s použitím antigenu nebo antigenů připravených z kmene nebo kmenů použitých při výrobě vakcíny. Smíchá se 1 ml suspenze ovčích erytrocytů v tlumivém roztoku barbitolovém (1 objemový díl erytrocytů v 10 objemových dílech konečné suspenze) s 1 ml vhodného ředění kmene viru chřipky v tlumivém roztoku barbitolovém. Směs se inkubuje 30 min při 4 °C. Ke 2 ml směsi viru a erytrocytů se přidá 1 ml roztoku *chloridu chromitého hexahydrátu R* (3 g/l), promíchá se a nechá 10 min stát. Senzibilizované erytrocyty se zahřejí na 47 °C ve vodní lázni. Smíchá se 15 ml roztoku *agarosy*

*pro elektroforézu R* (10 g/l) v tlumivém roztoku barbitolovém, 0,7 ml suspenze senzibilizovaných erytrocytů a vhodné množství ředěného morčecího komplementu v tlumivém roztoku barbitolovém při 47 °C. Směs se rozlije do Petriho misek a agar se nechá ztuhnout. Do vrstvy agaru se vykrojí jamky a do každé jamky se odpipetuje 5 µl nefeděného zkoušeného nebo kontrolního séra. Misky se inkubují 18 h při 37 °C. Měří se průměr zóny hemolýzy a vypočítá se její plocha, která vyjadřuje titer protilátek ve čtverečních milimetrech.

*Antisérum koňské proti chřipce koní subtyp 1 BRP, antisérum koňské proti americkému typu chřipky koní subtyp 2 BRP a antisérum koňské proti evropskému typu chřipky koní subtyp 2 BRP* jsou vhodná pro použití jako referenční séra pro zkoušku jednoduchá radiální hemolýza.

2-3-2-2-2 *Hemaglutinačně-inhibiční zkouška.* Každé sérum se 30 min inaktivuje při 56 °C. K jednomu objemovému dílu každého séra se přidají tři objemové díly *tlumivého roztoku fosforečnanového s chloridem sodným o pH 7,4* a čtyři objemové díly suspenze *kaolinu lehkého R* (250 g/l) ve stejném tlumivém roztoku. Každá směs se třepe 10 min, odstředí se, oddělí se supernatantní tekutina, která se smíchá s koncentrovanou suspenzí kuřecích erytrocytů. Nechá se stát 60 min při 37 °C a odstředí se. Dosáhne se tak ředění séra 1 : 8. Ke zkoušení sér se použije antigen připravený z kmenů použitých k výrobě vakcíny. Z každého zředěného séra se připraví řada dvojnásobných ředění. K 0,025 ml každého dalšího ředění séra se přidá 0,025 ml suspenze antigenu ošetřeného *etherem R* a obsahující čtyři hemaglutinační jednotky. Směs se nechá 30 min stát a přidá se 0,05 ml suspenze kuřecích erytrocytů obsahující  $2 \times 10^7$  erytrocytů v mililitru. Nechá se 1 h stát a zaznamená se poslední ředění séra, ve kterém ještě došlo k úplné inhibici hemaglutinace.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus chřipky se provede buď metodou 2-4-1-1, nebo metodou 2-4-1-2, podle toho, která je citlivější. Množství použitého inaktivovaného viru odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny.

2-4-1-1 *Zkouška v buněčných kulturách.* Vakcína se inokuluje do vhodné buněčné kultury a po osmidenní inkubaci se připraví subkultura. Inkubuje se dalších 6 až 8 dnů. Odebere se 0,1 ml supernatantní tekutiny a hemaglutinační zkouškou se zjišťuje přítomnost živého viru. Jestliže byla zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž v buněčné kultuře a hemaglutinační zkouška. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí hemaglutinace.

2-4-1-2 *Zkouška v embryonovaných vejících.* Do alantoidní dutiny každého z deseti kuřecích embryí se inokuluje 0,2 ml vakcíny. Inkubuje se 3 až 4 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm z deseti embryí. Z každého živého embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a vytvoří se směsný vzorek. Do dalších deseti kuřecích embryí se inokuluje po 0,2 ml směsné alantoidní tekutiny a inkubuje se 3 až 4 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, pokud přežije nejméně osm z deseti embryí. Od každého přežívajícího embrya se odebere

0,1 ml alantoidní tekutiny a každý jednotlivý odběr se vyšetří na živý virus hemaglutinační zkouškou. Jestliže byla zjištěna hemaglutinace u jakéhokoli vzorku alantoidní tekutiny, provede se další pasáž této alantoidní tekutiny ve vejcích a hemaglutinační zkouška. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí hemaglutinace.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se pět morčat, která nemají specifické protilátky. Každé morče se vakcinuje subkutánně jednou dávkou vakcíny. Za 21 dnů se odebere krev a připraví se vzorky séra. Provedou se zkoušky se sérem na přítomnost specifických protilátek vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), např. jednoduchou radiální hemolýzou nebo inhibicí hemaglutinace s použitím referenčního séra, k validaci zkoušky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže titry protilátek nejsou významně nižší než titry získané u morčat, kterým byla podána referenční šarže vakcíny s prokazatelně vyhovující účinností na koních.

**2-4-3 Bakteriální endotoxiny.** Obsah bakteriálních endotoxinů se pro sledování výroby u vakcín připravených na embryonovaných vejcích stanoví ve sklizni viru.

**2-4-4 Obsah hemaglutininu.** Obsah hemaglutininu se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je jednoduchá radiální imunodifuze, pomocí vhodného referenčního přípravku hemaglutininu, stanoví v suspenzi inaktivovaného viru, kde je to vhodné, po purifikaci a koncentraci. Suspenze inaktivovaného viru vyhovuje zkoušce, jestliže je obsah prokazatelně v rozmezí, u něhož se prokázalo, že umožňuje přípravu vyhovující vakcíny.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** U zvířat, která nemají protilátky proti viru chřipky koní, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se nejméně dva koně, přednostně ti, kteří nemají protilátky proti viru chřipky koní nebo, kde je to zdůvodněno, koně, kteří mají nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinováni proti chřipce koní, a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému koni podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále za 2 týdny jedna dávka. Koně se pozorují nejméně denně do 10 dnů po posledním podání. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný kůň nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Do alantoidní dutiny deseti kuřecích embryí se inokuluje po 0,2 ml vakcíny a vejce se inkubují 3 až 4 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze

hodnotit, jestliže přežije nejméně osm z deseti embryí. Od každého embrya, které přežilo, se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a připraví se směsný vzorek. Dalším deseti kuřecím embryím se inokuluje po 0,2 ml směsi alantoidních tekutin a inkubují se 3 až 4 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně osm z deseti embryí. Od každého embrya, které přežilo, se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a každý jednotlivý vzorek tekutiny se hemaglutinační zkouškou vyšetří na přítomnost živého viru. Jestliže se u některého vzorku zjistí hemaglutinace, provede se s tímto vzorkem tekutiny další pasáž ve vejcích a hemaglutinační zkouška; vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí hemaglutinace.

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušek uvedených v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM INFLUENZAE INACTIVATUM AD SUEM

6.0:0963

### Vakcína proti chřipce prasat inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů prasečího nebo lidského chřipkového viru, inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Vhodné kmeny obsahují hemaglutinin i neuraminidasu. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat proti chřipce prasat.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Každý virový kmen se kultivuje odděleně. Po kultivaci se jednotlivé virové suspenze odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Je-li třeba, mohou se purifikovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín. (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Výběr kmenů je založen na antigenních typech a subtypech zjištěných v Evropě. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (2-3-2).

### 2-3-1 Bezpečnost

2-3-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a, kde je to vhodné, na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použije se šarže vakcíny, která má ne méně než maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-3-1-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně deset prasat, která nemají protilátky proti viru chřipky prasat. Každému praseti se podá dvojnásobná dávka vakcíny a za 14 dnů ještě jedna dávka. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá během osmadvacetidenního zkoušení abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-1-2 *Bezpečnost u prasat použitých ve zkoušce na imunogenitu 2-3-2.* Pro hodnocení bezpečnosti se využijí také prasata použitá ve zkoušce na imunogenitu. U každého vakcinovaného prasete se zaznamená rektální teplota při vakcinaci za 24 h a za 48 h. Při porážce se vyšetří místo podání na místní reakce. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- abnormální tělesnou teplotu;
- další celkové reakce, např. anorexii;
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-2 *Terénní studie.* Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použijí se nejméně tři skupiny po nejméně dvaceti zvířatech, a to nejméně ve dvou lokalitách a s odpovídajícími skupinami po nejméně deseti kontrolních zvířatech. U každého vakcinovaného prasete se zaznamená rektální teplota v době vakcinace, za 24 h a za 48 h. Při porážce se vyšetří místo injekčního podání na místní reakce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- abnormální tělesnou teplotu;
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-2 *Imunogenita.* Následující zkouška provedená pomocí epizootologicky (epidemiologicky) odpovídajícího čelenžního kmene nebo kmenů je vhodná pro prokázání imunogenity vakcíny. Provede se pro každý subtyp použitý při přípravě vakcíny.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny. V každém případě se použijí prasata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému praseti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně dvacet prasat, která nemají protilátky proti viru chřipky prasat. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset prasat. Nejméně deset prasat se ponechá jako kontroly. Od všech kontrolních prasat se odebere krev těsně před čelenží. Tři týdny po posledním podání vakcíny se intratracheálně čelenžují všechna prasata vhodným množstvím virulentního terénního chřipkového viru. Polovina vakcinovaných i kontrolních prasat se šetrně utratí za 24 h po čelenží a zbývající polovina za 72 h po čelenží. U každého prasete se zjistí množství viru chřipky ve dvou

homogenátech plicní tkáně, jednoho z levého apikálního, kardiálního a diafragmatického laloku a druhého z odpovídajících pravých plicních laloků. Od každého zvířete se odeberou stejné vzorky.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti viru chřipky u některého kontrolního prasete těsně před čelenží. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v době obou vyšetření je průměrný titr viru ve směsných vzorcích plicní tkáně vakcinovaných prasat významně nižší než titr u kontrolních prasat při hodnocení pomocí vhodné statistické metody, jako je test Wilcoxon Mann-Whitney.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 *Zbytkový živý virus.* U každé šarže antigenu se ihned po inaktivaci provede pomnožovací zkouška na zbytkový živý virus pasážováním ve stejném typu substrátu, jaký se použil při výrobě (embryonovaná slepičí vejce nebo buněčné kultury) nebo v substrátu s prokazatelně nejméně stejnou citlivostí. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 *Zkouška účinnosti šarže.* Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se pět morčat starých pět až sedm týdnů, která nemají protilátky proti prasečímu chřipkovému viru. Každé morče se vakcinuje subkutánním podáním jedné čtvrtiny doporučené dávky. Před vakcinací a za 21 dnů po ní se zvířatům odebere krev. V každém vzorku se stanoví hladina specifických protilátek proti každému subtypu viru ve vakcíně buď hemaglutinačně-inhibiční, nebo jinou vhodnou zkouškou. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není nižší než hladina zjištěná u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce na účinnost na prasatech (viz odstavec Účinnost).

2.4.3 *Bakteriální endotoxiny.* Pro sledování výroby se u vakcín vyráběných ve vejcích stanoví při sklizni viru obsah bakteriálních endotoxinů.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 *Totožnost.* Po podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti subtypům chřipkového viru obsaženým ve vakcíně, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek. Protilátky se mohou zjistit vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1).

3-2 *Bakteriální a houbová kontaminace.* Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 *Bezpečnost.* Použijí se dvě prasata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a která nemají protilátky proti viru chřipky prasat. Doporučeným způsobem se každému praseti podá dvojnásobná dávka vak-

cíny a za 14 dnů ještě jedna dávka. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

### 3-4 Zbytkový živý virus.

3-4-1 *Vakcíny připravené ve vejcích.* Pokud se vakcína připravuje ve vejcích, inokuluje se 0,2 ml do alantoidní dutiny každého z deseti kuřecích embryí starých 9 až 11 dnů a inkubuje se 3 dny při vhodné teplotě. Úhyn embrya do 24 h po inokulaci se považuje za nespecifický a vejce se vyřadí. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežije nejméně 80 % embryí. Od každého embrya se odebere alantoidní tekutina, stejné objemové díly všech tekutin se spojí a stejným způsobem se na kuřecích embryích provede druhá pasáž. Inkubuje se 4 dny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže alantoidní tekutina z těchto kuřecích embryí nejeví žádnou hemaglutinační aktivitu.

3-4-2 *Vakcíny připravené v buněčných kulturách.* Jestliže se vakcína připravuje v buněčných kulturách, provede se vhodná zkouška na zbytkový živý virus pomocí dvou pasáží ve stejném typu buněčné kultury, jaký se použil při výrobě vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus. Jestliže vakcína obsahuje olejové adjuvans, které ruší zkoušku, oddělí se, pokud je to možné, vodná fáze vakcíny takovým způsobem, který nesníží schopnost zkoušky prokázat zbytkový infekční virus chřipky.

3-5 **Cizí agens.** U prasat použitých ve zkoušce na bezpečnost se provedou vyšetření na přítomnost protilátek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu jiných protilátek než proti viru chřipky. Zejména se nezjistí protilátky proti virům patogenním pro prasata nebo proti virům, které by mohly bránit diagnostice infekčních onemocnění prasat (včetně virů ze skupiny pestivirů).

3-6 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM LARYNGOTRACHEITIDIS INFECTIVAE AVIARIAE VIVUM

6.0:1068

### Vakcína proti infekční laryngotracheitidě ptáků živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru infekční laryngotracheitidy ptáků (herpesvirus 1 kurovitych). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům k aktivní imunizaci.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickými patogeny (SPF) (5.2.2).

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

#### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen. Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Index virulence pro dýchací trakt (odstavec 2-4-1), Bezpečnost (odstavec 2-4-2), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-3) a Imunogenita (odstavec 2-4-4).

2-4-1 **Index virulence pro dýchací trakt.** Pro zkoušku se použije nejméně šedesát kuřat z SPF chovu (5.2.2) starých 10 dnů. Namátkově se rozdělí do tří skupin ponechaných odděleně. Připraví se dvě desetinásobná sériová ředění počínající suspenzí vakcinačního viru o titru  $10^5$  EID<sub>50</sub> nebo  $10^5$  CCID<sub>50</sub> v 0,2 ml nebo, jestliže to není možné, která máji maximálně dosažitelný titr. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je přítomná v šarži vakcíny. Nefeděná suspenze viru a dvě ředění viru se přidělí jedné z různých skupin kuřat. Intratracheálně se podá každému kuřeti 0,2 ml suspenze viru přidělené jeho skupině. Kuřata se pozorují po 10 dnů po podání a zaznamenává se počet úhynů. Index virulence pro dýchací trakt je celkový počet úhynů ve třech skupinách dělený celkovým počtem kuřat. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže jeho index virulence pro dýchací trakt není větší než 0,33.

2-4-2 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky infekční laryngotracheitidy ptáků nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-4-3 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti kuřat z SPF chovu (5.2.2), která

nejsou starší než 2 týdny, postupném pasážování, kde je to možné pětikrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasáží, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Nakapáním do oka se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Po období, které prokazatelně odpovídá maximální replikaci viru, se připraví suspenze ze sliznice vhodných částí dýchacího traktu každého kuřete a vzorky se spojí. Každému z pěti dalších kuřat z SPF chovu (5.2.2), starých 2 týdny, se nakapáním do oka podá 0,05 ml směsného vzorku. Tento postup pasážování se provede nejméně pětikrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Stanoví se index virulence pro dýchací trakt (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá; jestliže titer maximálně pasážovaného viru je nižší než  $10^5$  EID<sub>50</sub> nebo  $10^5$  CCID<sub>50</sub>, připraví se desetinasobná sériová ředění za použití nejvyššího dostupného titru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáží v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-4 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší, než minimální titer viru uvedený v označení na obalu, a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny. Pro zkoušku se použije nejméně třicet kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé kuře čelenuje intratracheálně dostatečným množstvím virulentního viru infekční laryngotracheitidy. Kuřata se pozorují nejméně denně po 7 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyn a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění. Na konci pozorovacího období se všechna přežívající kuřata šetrně utratí a provede se vyšetření na makroskopické léze: katarální, hemoragický a pseudomembranózní zánět průdušnice a orbitálních sinusů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení méně než 90 % kontrolních kuřat uhynie nebo má těžké klinické příznaky infekční laryngotracheitidy ptáků nebo zřetelné makroskopické léze průdušnice a orbitálních sinusů
- nebo v období mezi vakcinací a čelením více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat má zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a nemá žádné zřetelné klinické příznaky onemocnění a/nebo makroskopické změny průdušnice a orbitálních sinusů.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína, podle potřeby zředěná a smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru infekční laryngotracheitidy, nadále neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2) nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Jakákoliv tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému kuřeti se podá nakapáním do oka deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná podle doporučeného schématu, doporučeným způsobem a metodou vyhovuje zkoušce Imunogenita (odstavec 2-4-4). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM LEPTOSPIROSIS BOVINAE INACTIVATUM

6.0:1939

### Vakcína proti leptospiróze skotu inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující suspenzi inaktivovaných celých mikroorganismů a/nebo antigenního extraktu (antigenních extraktů) jednoho nebo více vhodných kmenů jednoho nebo více sérovarů *Leptospira borgpetersenii* sérovar hardjo, *Leptospira interrogans* sérovar hardjo nebo jiných sérovarů *L. interrogans*, inaktivovaných tak, aby zůstala zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci skotu proti leptospiróze.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný výrobek. U sklizně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální sklizeň vhodnou metodou inaktivuje. Antigen se může koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skot, pro který je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

##### 2-2-1 Bezpečnost

2-2-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, doporučené pro vakcinaci a na každé kategorii skotu (např. mladých telatech, březích krávkách), pro které je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny jejíž účinnost je nejméně taková, jako maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-2-1-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně deset kusů skotu, který nemá protilátky proti *L. borgpetersenii* sérovar hardjo a hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis). Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se doporučeným schématem požaduje druhá dávka, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně nejméně 14 dnů po posledním podání. Tělesná teplota se zaznamená den před každou vakcinací, při vakcinaci, 4 h po ní a dále denně po 4 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce, nebo příznaky onemocnění, nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-1-1-2 *Bezpečnost na březím skotu.* Pokud je vakcína určena pro použití nebo se může použít u březího skotu, použije se nejméně deset krav v příslušných stadiích

březosti. Každé krávě se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se doporučeným schématem požaduje druhá dávka, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně do jednoho dne po porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před každou vakcinací, při vakcinaci, 4 h po ní a denně po 4 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kráva nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže není zaznamenán žádný nepříznivý vliv na březost a potomstvo.

2-2-1-2 *Terénní studie.* Zvířata použitá pro terénní ověřování se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Použijí se nejméně tři skupiny po dvaceti kusech skotu s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol ve třech různých lokalitách. Po vakcinaci se vyšetří místa vpichu na místní reakce. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci a po 2 dny po vakcinaci.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Navíc, jestliže je vakcína určena pro použití u březích zvířat, nejsou zaznamenány žádné nepříznivé vlivy na březost a potomstvo.

2-2-2 *Imunogenita.* Zkouška se provede odděleně pro každý sérovar, u kterého se má podpořit údaj o příznivém účinku na četnost výskytu infekce a vylučování močí. Jestliže se mají podpořit údaje o ochraně proti ztrátám při reprodukci nebo produkci, vyžadují se další specifické studie.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použije skot nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému zvířeti se podá vakcína s minimální účinností.

2-2-2-1 *Imunogenita proti L. borgpetersenii sérovar hardjo.* Použije se nejméně patnáct kusů skotu, který nemá protilátky proti *L. borgpetersenii* sérovar hardjo a hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis). Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset zvířat. Pět kusů skotu se ponechá jako kontroly. 21 dnů po poslední vakcinaci se všechna zvířata čelenžují vhodnou slizniční cestou dostatečným množstvím virulentního kmene příslušného sérovaru. Zvířata se pozorují nejméně denně po 35 následujících dnů. Vzorky moči se odebírají od každého zvířete ve dny 0, 14, 21, 28 a 35 po čelenži. Na konci pozorovací doby se přežívající zvířata šetrně utratí. Všechna uhynulá zvířata a všechna zvířata utracená na konci pozorovací doby se vyšetří pitvou. Zejména ledviny se vyšetří na přítomnost makroskopických a mikroskopických změn leptospirové infekce. Z každé ledviny se odebere vzorek a každý vzorek ledviny a moči se vyšetří na přítomnost čelenžních organismů reizolací nebo jinou vhodnou metodou.

U zkoušek prováděných s *L. borgpetersenii* sérovar hardjo se kontrolní zvířata považují za infikovaná, jestliže se čelenžní organismy reizolují z nejméně dvou vzorků. Zkoušce nelze hodnotit, pokud se infekce zjistí u méně než 80 % kontrol.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se čelenžní organismy reizolují z jakéhokoliv vzorku moče nebo ledviny od méně než 20 % vakcinovaných zvířat.

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

2-2-2-2 *Imunogenita proti ostatním druhům leptospir*. Pro jiný druh leptospir než *L. borgpetersenii* sérovar hardjo se provede zkouška, jak je popsáno v odstavci 2-2-2-1, ale vzorky moči se odebírají ve vhodných dnech stanovených podle vlastností čelenžního modelu.

Pro sérovary, u kterých je publikován důkaz, že sérovar má menší tropismus pro močové ústrojí, se může zdůvodnit nižší četnost výskytu infekce. V závislosti na jejich tkáňovém tropismu, se pro některé sérovary leptospir mohou použít vzorky jiných tkání nebo tělních tekutin, aby se zjistilo, zda jsou či nejsou zvířata infikována čelenžním mikroorganismem.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže**. Není nutné provádět zkoušku Účinnost (odstavec 3-5) u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Pro každý sérovar, pro který se uvádí ochrana, se zjišťuje protilátková odpověď u vakcinovaných zvířat. Použijí se morčata o hmotnosti 250 g až 350 g, která nemají protilátky proti *L. borgpetersenii* sérovar hardjo a hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroe, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis) a která byla získána z pravidelně kontrolovaného a certifikovaného leptospir prostého zdroje. Dávka podána morčatům, je frakcí dávky pro skot, se kterou se ve validačních studiích zajistila vhodně citlivá zkouška. Každé z deseti morčat se vakcinuje vhodnou dávkou. Nejméně dvě morčata se ponechají jako kontroly. Ve stanoveném intervalu v rozmezí 19 až 23 dnů po injekčním podání se každému morčeti odebere krev a připraví se vzorky séra. Pro měření protilátkových odpovědí se u každého vzorku použije vhodná validovaná metoda, jako je mikroaglutinační zkouška.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladiny protilátek jsou stejné nebo vyšší než hladiny, které se získaly u šarže, která vyhověla ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost a jestliže se nezjistí průkazný vzestup titru protilátek u kontrol.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost**. Po injekčním podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti sérovaru (sérovárům) leptospir, přítomnému (přítomným) ve vakcíně, vakcína vyvolá tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace**. Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost**. U vakcín doporučených pro použití u skotu staršího než 6 měsíců se použije skot, který není starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci a není mladší než 6 měsíců. U vakcín doporučených pro použití u skotu mladšího než 6 měsíců se použije skot nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Použijí se dvě zvířata, která nemají protilátky proti sérovaru (sérovárům) leptospir, přítomnému (přítomným) ve vakcíně. Doporučeným způsobem se každému zvířeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkové živé bakterie**. Provede se zkouška na živé leptospiry inokulací do specifické živné půdy. 1 ml vakcíny se inokuluje do 100 ml půdy. Inkubuje se 14 dnů při 30 °C, provede se subkultivace do dalšího množství půdy a obě půdy se inkubují 14 dnů při 30 °C. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v žádné půdě nedojde k pomnožení. Současně se provede kontrolní zkouška inokulací dalšího množství půdy vakcínou společně s kulturou obsahující přibližně sto leptospir a inkubuje se při 30 °C. Zkoušku nelze hodnotit, pokud během 14 dnů nedojde k pomnožení leptospir.

3-5 **Účinnost**. Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM LEPTOSPIROSIS CANINAE INACTIVATUM

6.0:0447

### Vakcína proti leptospiróze psů inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující inaktivované celé mikroorganismy a/nebo antigenní extrakt (antigenní extrakty) jednoho nebo více vhodných kmenů jednoho nebo více sérovarů *Leptospira interrogans* sérovar canicola, sérovar icterohaemorrhagiae nebo kterýkoliv jiný epidemiologicky vhodný sérovar inaktivovaný tak, aby zůstala zachovaná přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti leptospiróze.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný výrobek. U sklízně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální sklízně odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Antigen se může koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určená. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

2-2-1 **Bezpečnost**. Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci a na psech všech kategorií, pro které je vakcína určena. Použijí se šar-

že vakcíny, obsahující ne méně než maximální množství antigenu *a*/nebo, která má maximální účinnost, která se může v šarži vakcíny očekávat.

**2-2-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset psů, kteří nemají protilátky proti hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroae, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis). Každému psovi se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Pokud se doporučeným schématem požaduje druhá dávka, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Zvířata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání. Zaznamenají se tělesné teploty den před každou vakcinací, při vakcinaci, 4 h po ní a dále denně po 4 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-1-2 Bezpečnost na březích fenách.** Pokud je vakcína určena pro použití nebo se může použít u březích fen, použije se nejméně deset fen ve stadiu březosti v souladu s doporučeným schématem nebo v různých stadiích březosti. Každé feně se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se doporučeným schématem požaduje druhá dávka, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Feny se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fena nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění, nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a není zaznamenán žádný nepříznivý vliv na březost nebo potomstvo.

**2-2-2 Imunogenita.** Zkouška se provede odděleně pro každý sérovar, proti kterému se udává v označení na obalu ochranná imunita pomocí čelenžního kmene, který tento sérovar reprezentuje.

Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího doporučeného stáří. Každému psovi se podá vakcína s minimálním obsahem antigenu *a*/nebo s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvanáct psů, kteří nemají protilátky proti hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroae, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis). Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně šest psů. Nejméně šest psů se ponechá jako kontroly. Za 25 až 28 dnů po poslední vakcinaci se všichni psi čelenžují konjunktiválně *a*/nebo intraperitoneálně dostatečným množstvím suspenze odpovídajícího patogenního sérovaru *L. interrogans*. Psi se pozorují nejméně denně po 28 dnů po čelenži.

Psi se vyšetřují denně a zaznamenává se bodová hodnota (skóre) klinických příznaků pozorovaných po čelenži a všechny úhyny, které se vyskytnou. Psi, kteří mají zřetelné příznaky onemocnění, se šetrně utratí. V prvním týdnu po čelenži se denně zaznamenávají tělesné teploty. Odeberou se vzorky krve od každého psa ve dnech 0, 2, 3, 4, 5, 8 a 11 po čelenži. Odeberou se vzorky moči od každého psa ve dnech 0, 3, 5, 8, 11, 14, 21 a 28 po čelenži. Na konci pozorovacího období se přežívající psi šetrně utratí. Každý pes, který uhynie během pozorovacího období a psi utracení

na konci pozorovacího období se vyšetří pitvou. Zejména se vyšetří játra a ledviny na makroskopické a mikroskopické změny způsobené infekcí leptospirami. Odebere se vzorek z každé ledviny a každý vzorek krve, moči a ledviny se vyšetří na přítomnost čelenžních mikroorganismů reizolací nebo jinou vhodnou metodou. Provede se analýza vzorků krve, aby se zjistily biochemické a hematologické změny poukazující na infekci a tyto změny se také ohodnotí bodováním.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže jsou u vzorků pozitivní výsledky nultý den, čelenžní kmen sérovaru *L. interrogans* se reizoluje nebo se prokáže jinou vhodnou metodou, u méně než dvou vzorků v méně než dvou různých dnech a infekce se vyskytuje u méně než 80 % kontrolních psů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % vakcinovaných zvířat má nejvýše mírné příznaky onemocnění (např. přechodné zvýšení teploty) a jestliže se v závislosti na sérovaru *L. interrogans* použitým pro čelenž zjistí jedno nebo více z následujícího:

- kde má mít vakcína příznivý účinek proti klinickým příznakům je bodová hodnota (skóre) klinických, hematologických a biochemických údajů statisticky nižší u vakcinovaných zvířat než u kontrol;
- kde má mít vakcína příznivý účinek proti infekci, je počet dnů, ve kterých jsou mikroorganismy zjištěné v krvi, statisticky nižší u vakcinovaných zvířat než u kontrol;
- kde má mít vakcína příznivý účinek proti infekci močového ústrojí a vylučování, je počet dnů, ve kterých jsou mikroorganismy zjištěné v moči a počet vzorků ledvin, ve kterých byly zjištěné mikroorganismy, statisticky nižší u vakcinovaných zvířat než u kontrol.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška Účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Mohou se použít dále uvedené zkoušky.

**2-3-1-1 Pro vakcíny s adjuvans nebo bez adjuvans.** Jestliže se pro přípravu vakcíny použije více než jeden sérovar leptospir (např. *L. interrogans* sérovar icterohaemorrhagiae a sérovar canicola), provede se zkouška účinnosti šarže pro každý sérovar, proti kterému se v označení na obalu uvádí ochranná imunita. Použije se deset zdravých křečků, kteří nejsou starší než 3 měsíce, nemají protilátky proti hlavním sérovarům *L. interrogans* (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, sejroae, hardjo, hebdomonadis, pomona, australis a autumnalis) a kteří se získají z pravidelně vyšetřovaného a certifikovaného leptospir prostého zdroje. Pět křečků se subkutánně podá 1/40 dávky pro psy. Pět křečků se ponechá jako kontroly. Za 15 až 20 dnů se každý křeček čelenžuje intraperitoneálně dostatečným množstvím virulentní kultury leptospir toho sérovaru, proti kterému se v označení na obalu uvádí ochranná imunita. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně čtyři z pěti kontrolních křečků uhynou za typických příznaků leptospirové infekce během 14 dnů po podání čelenžní suspenze a jestliže nejméně



čtyři z pěti vakcinovaných křečků zůstávají v dobrém zdravotním stavu 14 dnů po úhynu čtyř kontrolních křečků.

2-3-1-2 *Pro vakcíny s adjuvans nebo bez adjuvans.* Může se provést vhodná validovaná zkouška na sérologickou odpověď. Každé zvíře v pokusné skupině se vakcinuje vhodnou dávkou. Po vhodné pevně stanovené době po vakcinaci se odeberou vzorky krve. Pro každý ze sérovarů přítomných ve vakcíně se s individuálními vzorky krve provede zkouška *in vitro*, aby se určila protilátková odpověď proti jedné nebo více antigenním složkám, které jsou indikátory ochrany a které jsou specifické pro daný sérovar. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

2-3-1-3 *Pro vakcíny bez adjuvans.* Pro každý ze sérovarů přítomných ve vakcíně se může provést vhodná validovaná zkouška *in vitro*, aby se určil obsah jedné nebo více antigenních složek, které jsou indikátory ochrany, a které jsou specifické pro daný sérovar. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po injekčním podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti sérovaru (sérovárům) leptospir, přítomnému (přítomným) ve vakcíně, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek. Jestliže se pro stanovení účinnosti šarže použije zkouška 2-3-1-3, slouží také jako zkouška totožnosti vakcíny.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dva psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti sérovaru (sérovárům) leptospir přítomnému (přítomným) ve vakcíně. Doporučeným způsobem se každému psu podá dvojnásobná dávka vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkové živé bakterie.** Zkouška na živé leptospiry se provede inokulací do specifické živné půdy. Inokuluje se 1 ml vakcíny do 100 ml půdy. Inkubuje se při 30 °C po 14 dnů, subkultivuje se do dalšího množství půdy a obě půdy se inkubují při 30 °C po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v žádné půdě nedojde k pomnožení. Současně se provede kontrolní zkouška inokulací dalšího množství půdy vakcínou, společně s kulturou obsahující přibližně sto leptospir a inkubuje se při 30 °C. Zkoušku nelze hodnotit pokud během 14 dnů nedojde k pomnožení leptospir.

3-5 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM LEUCOSIS FELINAE INACTIVATUM

6.0:1321

### Vakcína proti leukemii koček inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek, obsahující imunogeny vhodného kmene viru leukemie koček. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti leukemii koček.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Imunogeny sestávají buď ze vhodného kmene viru leukemie koček, inaktivovaného při zachování přiměřené imunogenity, nebo z frakce viru s přiměřenou imunogenitou. Imunogenní frakce se může vytvořit technologií rekombinantní DNA. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určena (včetně bezpečnosti pro březí kočky, pokud není takového použití kontraindikováno).

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

2-2-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí kočky, které nemají protilátky proti antigenu gp 70 viru leukemie koček a jsou bez projevu viremie nebo antigenemie v době zkoušky. Nepřítomnost protilátek a antigenu se prokazuje enzymově imunisorbentovým stanovením ELISA (2.7.1). Použije se šarže vakcíny s nejméně maximální účinností, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-2-1-1 *Jednorázové podání vakcíny.* Použije se nejméně patnáct koček nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně deset koček. Pět koček se ponechá jako kontroly. Den před vakcinací, v době vakcinace, 4 h a 8 h po vakcinaci a jednou denně po následující čtyři dny se zaznamená rektální teplota každé kočky. Kočky se pozorují nejméně denně po nejméně 4 týdny po poslední vakcinaci. Za 1, 2 a 4 týdny po poslední vakcinaci se kočky podrobí vhodným zkouškám na imunosupresivní účinek.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a jestliže ve zkouškách na imunosupresivní účinek není zjištěn významný rozdíl mezi vakcinovanými kočkami a kontrolami.

2-2-1-2 *Opakované podání vakcíny.* Použije se nejméně deset koček nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každá kočka se vakcinuje dvěma doporučenými dávkami vakcíny. Na konci časového období uvedeného v návodu na použití se každému zvířeti podá ještě jedna dávka vakcíny. Pokud se v návodu na použití doporučuje, podá se po uvedené době třetí injekce. Kočky se pozorují nejméně denně 14 dnů po posledním podání. Vakcína vyhovuje zkoušce,

jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-1-3 Zkouška na březích kočkách.** Pokud vakcína není pro březí kočky kontraindikována, použije se nejméně deset koček v různém stadiu březosti. Každé kočce se podají dvě dávky vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže se nezjistí žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-2-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kočky nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každé kočce se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně dvacet pět koček, které nemají protilátky proti antigenům viru leukemie koček a proti kočičímu onkogennímu membránovému antigenu (anti-FOCMA protilátky) a jsou v době zkoušky bez viremie nebo antigenemie. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně patnáct koček. Nejméně deset koček se ponechá jako kontroly. Kočky se pozorují nejméně denně 14 dnů po posledním podání. Každá kočka se čelenžuje intraperitoneálně nebo oronazálně jednou nebo vícekrát dostatečným množstvím suspenze epidemiologicky závažného virulentního kmene viru leukemie koček sestávajícího převážně z viru typu A. Kočky se pozorují nejméně denně po 15 týdnů a počínaje třetím týdnem se zkoušejí každý týden na viremii a antigenemii (p27 protein) vhodnými metodami, jako jsou imunofluorescence cirkulujících leukocytů nebo enzymově imunobentové stanovení ELISA. Kočky se považují za trvale infikované, jestliže mají pozitivní viremii nebo antigenemii po tři po sobě jdoucí týdny nebo v pěti případech mezi třetím až patnáctým týdnem.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovací doby po čelenži má příznaky trvalé viremie nebo antigenemie méně než 80 % kontrolních koček. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelenži nejméně 80 % vakcinovaných koček nemá trvalou infekci.

### 2-3 MEZIOPERAČNÍ ZKOUŠKY

Během výroby se provádějí vhodné imunochemické zkoušky pro hodnocení kvality a čistoty virových antigenů přítomných ve vakcíně. Zjištěné hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu.

### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Kde je to vhodné, provede se zkouška na zbytkový živý virus s množstvím inaktivované sklizně viru, které odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny a pomocí dvou pasáží v buněčných kulturách stejného typu, jaký se použil k výrobě vakcíny, nebo v buněčných kulturách, prokazatelně nejméně stejně citlivých. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

**2-4-3 Bakteriální endotoxiny.** U vakcín vyráběných technologií rekombinantní DNA na bakteriálních hostitelských buňkách, např. *Escherichia coli*, se zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) provede u každé šarže nebo tam, kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky, provede se zkouška u antigenu těsně před přidáním adjuvans. Zjištěná hodnota je v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu, které jsou prokazatelně bezpečné pro kočky.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína podaná zdravým kočkám, které nemají specifické protilátky proti antigenu nebo antigenům uvedeným v označení na obalu, vyvolá tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, které nemají protilátky proti viru leukemie koček. Doporučeným způsobem se každé kočce podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po čtrnáct dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Jestliže vakcína obsahuje inaktivovaný virus, provede se zkouška na zbytkový živý virus leukemie koček pomocí dvou pasáží v citlivých buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, oddělí se, pokud je to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus nebo jinak nebrání zjištění živého viru.

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky popsané v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM MANNHEIMIAE INACTIVATUM AD BOVIDAS

6.0:1944

### Vakcína proti mannheimióze pro skot inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Mannheimia haemolytica* (dříve *Pasteurella haemolytica*) inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro aktivní imunizaci skotu různého stáří k ochraně proti respiračním onemocněním vyvolaným *M. haemolytica*.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně a totožnost se ověří vhodnou metodou. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný výrobek. U sklizně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální suspenze odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Vakcína může obsahovat adjuvans.

### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Výběr složení a kmenů, které mají být obsaženy ve vakcíně, závisí na epidemiologických údajích o výskytu různých sérovarů *M. haemolytica* a na požadavcích na přípravek. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skotu, pro který je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

#### 2-2-1 Bezpečnost

**2-2-1-1 Laboratorní zkoušky.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které jsou doporučeny pro vakcinaci, na skotu všech kategorií, pro které je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny s nejméně maximální účinností, která se může očekávat v šarži vakcíny.

**2-2-1-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset kusů skotu, přednostně toho, který nemá protilátky proti sérovarům *M. haemolytica* nebo proti leukotoxinu přítomným ve vakcíně. Kde je to odůvodněno, mohou se použít zvířata, která nebyla vakcinována proti mannheimióze a která mají nízké titry protilátky (zjišťované citlivým vyšetřovacím systémem, jako je enzymově imunosorbentové stanovení ELISA). Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Požaduje-li se doporučeným schématem druhé podání, podá se po doporučeném intervalu ještě jedna dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně nejméně 14 dnů po posledním podání. Teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každého zvířete se zaznamená nejvyšší vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Průměrný vzestup teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C a u žádného zvířete není vzestup větší než 2 °C.

**2-2-1-1-2 Bezpečnost na březích kravách.** Pokud je vakcína určena pro použití nebo se může použít u březích krav, použije se nejméně deset krav v příslušných stadiích březosti. Každé krávi se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po doporučeném intervalu jedna dávka. Krávy se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu. Teplota se zaznamená den před každou vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každého zvířete se zaznamená nejvyšší vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádná kráva nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění, nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup teploty u všech krav nepřekročí 1,5 °C a u žádné krávy není vzestup vyšší než 2 °C;
- nezjistí se žádný nežádoucí vliv na březost a potomstvo.

**2-2-1-2 Terénní studie.** Skot použitý v terénních pokusech se využije také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede pro každou kategorii skotu, pro kterou je vakcína určena. Použijí se nejméně tři skupiny po dvaceti zvířatech s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol ve třech různých lokalitách. Vyšetří se místa vpichu na místní reakci po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci a po 2 dny po vakcinaci.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění, nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Průměrný vzestup tělesné teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C a žádné zvíře nemá vzestup vyšší než 2 °C. Navíc, jestliže je vakcína určena pro použití u březích krav, se nezaznamenají významné účinky na březost a potomstvo.

**2-2-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý sérovar, pro který se v označení na obalu uvádí ochrana.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použije skot nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému zvířeti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně šestnáct kusů skotu, který nemá protilátky proti *M. haemolytica* a proti leukotoxinu *M. haemolytica*. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně osm zvířat; nejméně osm zvířat se ponechá jako kontroly. 21 dnů po poslední vakcinaci se čelenzují všechna zvířata intratracheálně nebo jiným vhodným způsobem dostatečným množstvím nízkopasážního virulentního kmene sérovaru *M. haemolytica*. Zvířata se pozorují nejméně denně dalších 7 dnů; aby se předešlo zbytečnému utrpení, těžce nemocná zvířata se šetrně utratí a považují se za uhynulá v důsledku onemocnění. Během pozorovací doby se zvířata vyšetřují na příznaky onemocnění, např. vzestup tělesné teploty, otupělost, abnormální dýchání, a zaznamená se mortalita. Na konci pozorovacího období se přežívající zvířata šetrně utratí. Všechna zvířata, která uhynula, i ta, která byla utracena na konci pozorovacího období se vyšetří pitvou. Vyšetří se plíce a posoudí se rozsah plicních změn způsobených mannheimiózou. Odeberou se vzorky plicní tkáně pro reizolaci čelenních mikroorganismů. Spočítá se bodová hodnota (skóre) klinických nálezů i plicních změn a výsledky získané pro tyto parametry i výsledky reizolace bakterií u obou skupin se porovnají.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se příznaky infekce *M. haemolytica* vyskytnou u méně než 70 % kontrolního skotu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je významný rozdíl mezi bodovou hodnotou (skóre) klinických a pitevních nálezů u vakcinovaných zvířat ve srovnání s kontrolami. U vakcín, kde se požaduje zlepšující účinek na rozsah infekce daným sérovarem, jsou výsledky také významně lepší u vakcinovaných zvířat ve srovnání s kontrolami.

## 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Není nutné provádět zkoušku na účinnost u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci 3-4 Účinnost.

2-3-2 **Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provádí u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení zkoušky, u várky antigenu, nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je to, které bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla zkoušce na bezpečnost 2-2-1-1 uvedené v části Výběr složení vakcíny, nebo zkoušce na bezpečnost 3-3 uvedené v části Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti kusů skotu. Kde se použije poslední uvedená zkouška, zaznamenaná se u každého zvířete maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup tělesné teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny, použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinu, se následně použije pro zkoušení každé šarže.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti sérovarům *M. haemolytica* a/nebo proti leukotoxinu přítomným ve vakcíně, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dva kusy skotu nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, který nebyl vakcinovaný proti mannheimióze. Každému zvířeti se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 h po vakcinaci a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

VACCINUM MANNHEIMIAE  
INACTIVATUM AD OVEM

6.0:1946

Vakcína proti mannheimióze pro ovce  
inaktivovanáVakcíny pro  
veterinární  
použití

## 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Mannheimia haemolytica* (dříve *Pasteurella haemolytica*), inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci ovcí a/nebo k pasivní ochraně jejich potomstva proti onemocnění vyvolanému *M. haemolytica*.

## 2 VÝROBA

## 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně a totožnost se ověří vhodnou metodou. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný výrobek. U sklizně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální suspenze odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Vakcína může obsahovat adjuvans.

## 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Výběr složení a kmenů, které mají být obsaženy ve vakcíně, závisí na epidemiologických údajích o výskytu různých sérovarů *M. haemolytica* a na požadavcích na přípravek, např. pro aktivní a/nebo pasivní ochranu.

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ovce, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

## 2-2-1 Bezpečnost

2-2-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které jsou doporučené pro vakcinaci, na ovčích všech kategoriích (např. mladé ovce, březí ovce), pro které je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny s nejméně maximální účinností, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-2-1-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně deset ovcí, přednostně těch, které nemají protilátky proti sérovarům *M. haemolytica* nebo proti leukotoxinu přítomným ve vakcíně. Kde je to odůvodněno, mohou se použít ovce, které nebyly vakcinovány proti mannheimióze a které mají nízké titry protilátky (zjišťované citlivým vyšetřovacím systémem, jako je enzymově imunisorbentové stanovení ELISA).

Každé ovci se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Ovce se pozorují nejméně denně po nejméně 14 dnů po posledním podání. Teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každé ovce se zaznamená nejvyšší vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá abnormální místní reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Průměrný vzestup teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5 °C a u žádné ovce není vzestup vyšší než 2 °C.

**2-2-1-1-2 Bezpečnost na březích ovcích.** Pokud je vakcína určena pro použití nebo může být použita u březích ovcí, použije se nejméně deset březích ovcí v příslušných stadiích březosti. Každé ovci se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Ovce se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu. Teplota se zaznamená den před každou vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každé ovce se zaznamená nejvyšší vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádná ovce nemá abnormální místní reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C a u žádné ovce není vzestup vyšší než 2 °C;
- nezjistí se žádný nežádoucí vliv na březost a potomstvo.

**2-2-1-2 Terénní studie.** Ovce použité v terénních pokusech se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede pro každou kategorii ovcí, pro kterou je vakcína určena. Použijí se nejméně tři skupiny po dvaceti ovcích s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol ve třech různých lokalitách. Vyšetří se místa vpichu na místní reakci po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci a po 2 dny po vakcinaci.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá abnormální místní nebo celkové reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Průměrný vzestup tělesné teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C a žádné zvíře nemá vzestup vyšší než 2 °C. Navíc, pokud je vakcína určena pro použití u březích ovcí, se nezaznamenají žádné nežádoucí vlivy na březost a potomstvo.

## 2-2-2 Imunogenita

**2-2-2-1 Aktivní imunizace.** U vakcín určených k aktivní imunizaci proti *M. haemolytica* se provede zkouška pro každý sérovar *M. haemolytica*, pro který se v označení na obalu uvádí ochrana. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí jehňata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému jehněti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně dvacet jehňat, která nemají protilátky proti *M. haemolytica* a proti leukotoxinu *M. haemolytica*. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset jehňat. Nejméně deset jehňat se ponechá jako kontrola.

21 dnů po poslední vakcinaci se čelenžují všechna jehňata intratracheálně nebo jiným vhodným způsobem dostatečným množstvím nízkopasážního virulentního kmene sérovaru *M. haemolytica*. Kde je to nutné pro daný sérovar, provede se předčlenž virem parainfluenzy typ 3 (PI 3), nebo se může použít jiný vhodný patogen dýchacích cest. Jehňata se pozorují dalších 7 dnů; aby se předešlo zbytečnému utrpení, těžce nemocná jehňata se šetrně utratí a považují se za uhynulá v důsledku onemocnění. Během pozoro-

vací doby se jehňata vyšetřují na příznaky onemocnění (např. zvýšená tělesná teplota, otupělost, abnormální dýchání) a zaznamená se mortalita. Na konci pozorovací doby se přežívající zvířata utratí. Všechna jehňata, která uhynula i ta, která byla utracena na konci pozorovací doby se vyšetří pitvou. Vyšetří se plíce a posoudí se rozsah plicních změn způsobených mannheimiózou. Odeberou se vzorky plicní tkáně pro reizolaci čelenžních mikroorganismů. Spočítá se bodová hodnota (skóre) klinických nálezů i plicních lézí a výsledky získané pro tyto parametry i výsledky reizolace bakterií u obou skupin se porovnají.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se příznaky infekce *M. haemolytica* vyskytnou u méně než 70 % kontrolních jehňat.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je významný rozdíl mezi bodovou hodnotou (skóre) klinických a pitevních nálezů u vakcinovaných zvířat ve srovnání s kontrolami. U vakcín, kde se požaduje zlepšující účinek na rozsah infekce daným sérovarem, jsou výsledky také významně lepší u vakcinovaných zvířat ve srovnání s kontrolami.

**2-2-2-2 Pasivní ochrana.** U vakcín určených pro pasivní ochranu proti mannheimióze se provede zkouška pro každý sérovar *M. haemolytica*, pro který je ochrana uvedena v označení na obalu.

Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci. Každé ovci se podá vakcína o minimální účinnosti.

Použije se nejméně šest ovcí, přednostně těch, které nemají protilátky proti sérovarům *M. haemolytica* nebo proti leukotoxinu obsaženému ve vakcíně. Kde je to odůvodněno, mohou se použít ovce, které nebyly dříve vakcinované proti mannheimióze a které pocházejí ze zdroje s nízkým výskytem respiračních onemocnění a s nízkými titry protilátky (zjišťované citlivou vyšetřovací metodou, jako je enzymově imunosorbentové stanovení ELISA). Ovce se vakcinují v doporučených stadiích březosti a podle doporučeného schématu. Čelenžní studie se provede s dvaceti novorozenými jehňaty, která nepřijala mlezivo. Deset z těchto jehňat dostane mlezivo od vakcinovaných ovcí a deset kontrolních jehňat dostane mlezivo nebo náhražku mleziva bez zjištěných protilátek proti *M. haemolytica*. Když jehňata dosáhnou stáří uvedeného pro délku pasivní ochrany, čelenžují se intratracheálně vhodným množstvím nízkopasážního virulentního kmene sérovaru *M. haemolytica*. Jehňata se pozorují dalších 7 dnů; aby se předešlo zbytečnému utrpení, těžce nemocná jehňata se šetrně utratí a jsou považována za uhynulá v důsledku onemocnění. Jehňata se pozorují a hodnotí se účinek čelenže na potomstvo vakcinovaných a kontrol, jak je popsáno ve zkoušce Aktivní imunizace.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud se příznaky nebo léze infekce *M. haemolytica* vyskytnou u méně než 70 % kontrolních jehňat. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je významný rozdíl mezi bodovou hodnotou (skóre) klinických a pitevních nálezů u jehňat od vakcinovaných zvířat ve srovnání s jehňaty kontrol.

U vakcín, kde se požaduje zlepšující účinek na rozsah infekce daným sérovarem, jsou výsledky infekce také významně lepší u jehňat vakcinovaných ve srovnání s jehňaty kontrol.

## 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Není nutné provádět zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) u každé šarže vakcíny, jestliže tato byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci 3-4 Účinnost.

2-3-2 **Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provádí u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení zkoušky, u várky antigenu, nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je takové, jaké bylo zjištěno u šarže vakcíny, která vyhověla zkoušce na bezpečnost 2-2-1-1 uvedené v odstavci Výběr složení vakcíny nebo zkoušce na bezpečnost 3-3 popsané v části Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti ovcí. Kde se použije posledně uvedená zkouška, zaznamenaná se u každé ovce maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup tělesné teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny, použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinu, se použije následně pro zkoušení každé šarže.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zdravým zvířatům, která nemají specifické protilátky proti sérovarům *M. haemolytica* a/nebo proti leukotoxinu přítomnému ve vakcíně, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dvě ovce nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci nebo, jestliže nejsou k dispozici, které se co nejvíce blíží nejnižšímu doporučenému stáří, a které nebyly vakcinované proti mannheimiíze. Každé ovci se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 h po vakcinaci a dále denně po 2 dny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky (zkoušek) uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM MORBI AUJESZKYI AD SUEM INACTIVATUM

6.0:0744

### Vakcína proti Aujeszkyho chorobě prasat inaktivovaná

Vakcíny pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru Aujeszkyho choroby inaktivovaný při zachování přiměřené imunogenity, nebo přípravek obsahující inaktivovanou frakci tohoto viru, která má přiměřenou imunogenitu. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat a pro pasivní ochranu jejich potomstva proti Aujeszkyho chorobě.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Virová suspenze se sklídí a inaktivuje; může se zpracovat na fragmenty virů, které se purifikují a koncentrují. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

##### 2-3-1 Bezpečnost

2-3-1-1 **Laboratorní zkoušky.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a kde je to použitelné na všech kategoriích prasat, pro které je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-3-1-1-1 **Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset prasat, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Každému prasati se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po 14 dnech ještě jedna dávka. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během 28 dnů zkoušky nemá žádné prase abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-1-2 **Bezpečnost na březích prasníc.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích prasníc, použije se pro zkoušku nejméně deset březích prasníc ve stadiu nebo stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé prasnici se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po 14 dnech ještě jedna dávka. Prasnice se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná prasnice nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z pří-

čin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže se nezaznamená žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

2-3-1-1-3 *Bezpečnost na prasatech použitých ve zkoušce 2-3-2 na imunogenitu.* Prasata použitá ve zkoušce na imunogenitu se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. U každého vakcinovaného prasete se zaznamená rektální teplota v době vakcinace, za 6 h, 24 h a 48 h po ní. Při porážce se vyšetří místo podání na místní reakce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:  
– vzestup teploty vyšší než 1,5 °C a počet prasat, která mají teplotu vyšší než 41 °C, nepřekročí 10 % ze skupiny;  
– jiné celkové reakce (např. anorexii);  
– abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-1-4 *Terénní studie.* Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použijí se nejméně tři skupiny po nejméně dvaceti prasatech s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Rektální teplota se zaznamená u všech vakcinovaných prasat v době vakcinace, za 6 h, 24 h a 48 h po vakcinaci. Při porážce se vyšetří místo podání na místní reakce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:  
– vzestup teploty vyšší než 1,5 °C a počet zvířat, která mají teplotu vyšší než 41 °C, nepřekročí 25 % ze skupiny;  
– abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí prasata ve stáří, které se doporučuje pro vakcinaci. Každému prasati se podá vakcína s minimální účinností.

2-3-2-1 *Vakcíny určené k aktivní imunizaci.* Pro zkoušku se použije nejméně patnáct výkrmových prasat, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Tělesná hmotnost žádného prasete se neliší od průměru skupiny o více než 20 %. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset prasat. Nejméně pět prasat se ponechá jako kontroly. Na konci výkrmového období (80 kg až 90 kg) se každé prase zváží a čelenuje intranazálně dostatečným množstvím virulentního kmene viru Aujeszkyho choroby (čelenní materiál obsahující nejméně 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> virulentního kmene, který neprodělal více než tři pasáže a je podáván nejméně ve 4 ml vhodného rozpouštědla, se ukázal vhodným). Titr vylučovaného viru se stanoví z výtěrů nosní dutiny každého prasete odebíraných denně počínaje dnem před čelením až do doby, kdy virus už se nezjistí. Každé zvíře se váží 7 dnů po čelení nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, a průměrný denní přírůstek se vypočítá v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměrný denní přírůstek.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky Aujeszkyho choroby a jejich průměrný denní přírůstek je méně než –0,5 kg.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:  
– všechna vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměrnými denními přírůstky v obou skupinách je nejméně 1,5 kg;

– geometrické průměry titrů a délka vylučování čelenního viru jsou u vakcinovaných zvířat významně nižší než u kontrol.

2-3-2-2 *Vakcíny určené k pasivní imunizaci.* Jestliže je vakcína určena pro použití u prasnic k pasivní ochraně selat, může se vhodnost kmene pro tento účel prokázat následující metodou.

Pro zkoušku se použije nejméně dvanáct prasnic, které nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně osm prasnic. Nejméně čtyři prasnice se ponechají jako kontroly. Selata těchto prasnic se ve stáří 6 až 10 dnů čelenují dostatečným množstvím virulentního viru Aujeszkyho choroby. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže průměrný počet selat na jeden vrh je v každé skupině nejméně šest.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se u selat vakcinovaných prasnic prokáže nejméně 80% ochrana před úhynem při srovnání se selaty kontrolních prasnic.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pomocí dvou pasáží v buněčné kultuře stejného typu, jaká se použila při výrobě vakcíny, nebo v kulturách prokazatelně nejméně stejně citlivých. Množství inaktivovaného viru použitého ve zkoušce odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Zkouška popsaná v odstavci Účinnost se provede u dané vakcíny jednou nebo vícekrát podle souhlasu nebo rozhodnutí oprávněné autority. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** U zvířat, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru, vyvolá vakcína tvorbu specifických protilátek proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru použitých při výrobě vakcíny.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se nejméně dvě selata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem se každému selati podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále za 14 dnů ještě jedna dávka. Selata se pozorují nejméně denně do 14 dne po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus.** Kde je to možné, provede se vhodná zkouška na zbytkový živý virus Aujeszkyho choroby pomocí dvou pasáží v buněčné kultuře stejného typu jaká se použila při přípravě vakcíny nebo v kulturách, prokazatelně nejméně stejně citlivých. Jinak se subkutánně podá po jedné dávce vakcíny pěti zdravým neimunizovaným králíkům. Králíci se pozorují 14 dnů po podání. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádná abnormální reakce (zejména místní vyrážka). Jestliže vakcinační virus není patogenní pro králíka, provede se zkouška na dvou ovcích.

3-5 **Cizí agens.** U prasat použitých ve zkoušce na bezpečnost se provede vyšetření na protilátky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti jinému viru než proti viru Aujeszkyho choroby, proti virům patogenním pro prasata nebo proti virům, které by mohly bránit diagnostice infekčních onemocnění prasat (včetně virů ze skupiny pestivirů).

3-6 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům dále popsané zkoušky.

Pro zkoušku se použije nejméně deset prasat o hmotnosti 15 kg až 35 kg, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Tělesná hmotnost žádného prasete ve skupině se neliší o více než 25 % od průměrné hmotnosti. Nejméně pět prasat se vakcinuje jednou dávkou vakcíny. Nejméně pět prasat se ponechá jako kontroly. Za 3 týdny se prasata jednotlivě zváží a čelenují se intranazálně dostatečným množstvím virulentního viru Aujeszkyho choroby. Každé prase se zváží za 7 dnů po čelení nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, a vypočítá se průměrný denní přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměr průměrných denních přírůstků.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky Aujeszkyho choroby a průměr jejich denních přírůstků je méně než  $-0,5$  kg.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměry denních přírůstků obou skupin je nejméně 1,1 kg.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda je vakcinační virus patogenní pro králíky.

## VACCINUM MORBI AUJESZKYI AD SUEM VIVUM AD USUM PARENTERALEM

6.0:0745

### Vakcína proti Aujeszkyho chorobě prasat pro parenterální podání živá

*Synonyma.* Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem vivum cryodesiccatum ad usum parenterale, Vakcína proti Aujeszkyho chorobě prasat pro parenterální podání živá lyofilizovaná

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru Aujeszkyho choroby. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat a k pasivní ochraně jejich potomstva proti Aujeszkyho chorobě. Může se podávat po smíchání s adjuvans.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickými patogenů (SPF) (5.2.2).

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určen. Kmen může mít genetický marker.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Vylučování viru (odstavec 2-3-2), Přenosnost, včetně přenosu přes placentu a semenem (odstavec 2-3-3), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-4) a Imunogenita (odstavec 2-3-5).

##### 2-3-1 Bezpečnost

2-3-1-1 *Obecná bezpečnost.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí selata 3 až 4 týdny stará. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet selat, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Nejméně deseti selatům se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinasobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Nejméně deset selat se ponechá jako kontroly. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže hmotnostní křivka vakcinovaných selat se významně neliší od kontrol



a jestliže žádné sele nemá příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-2 Bezpečnost na prasatech použitých ve zkoušce 2-3-5 Imunogenita.** Prasata použitá ve zkoušce na imunogenitu se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Rektální teplota se u každého vakcinovaného zvířete zaznamená v době vakcinace a za 6 h, 24 h a 48 h po vakcinaci. Při porážce se vyšetří místo podání na místní reakce.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- vzestup teploty vyšší než 1,5 °C a počet prasat, která mají teplotu vyšší než 41 °C, nepřekročí 10 % ze skupiny;
- jiné celkové reakce (např. anorexii);
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-3 Bezpečnost v terénních studiích.** Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede pro každou kategorií prasat, pro které je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použijí se nejméně tři skupiny po nejméně dvaceti prasatech s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Rektální teplota se zaznamená u každého prasete v době vakcinace a za 6 h, 24 h a 48 h po vakcinaci. Při porážce se vyšetří místo podání na místní reakce.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- vzestup teploty vyšší než 1,5 °C a počet prasat, která mají teplotu vyšší než 41 °C, nepřekročí 25 % ze skupiny;
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-4 Neurologická bezpečnost.** Pro zkoušku se použije nejméně deset selat 3 až 5 dnů starých, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Každému seleti se intranazálně podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele neuhyne ani nemá příznaky neurologické poruchy, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-5 Neurologická bezpečnost pro jiné než gE-negativní kmeny.** Tato zkouška není nutná pro gE-negativní kmeny. Nejméně pěti selatům 3 až 5 dnů starým se intracerebrálně podá  $10^{4.5}$  CCID<sub>50</sub> vakcinačního viru.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele neuhyne ani nemá příznaky neurologické poruchy.

**2-3-1-6 Nepřítomnost latentních infekcí.** Pro zkoušku se použije nejméně deset selat 3 až 4 týdny starých, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Každému seleti se denně po 5 dnů podávají injekčně 2 mg prednisolonu na kilogram tělesné hmotnosti. Třetí den se každému seleti doporučeným způsobem podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Aby se předešlo nespecifickým příznakům,

mohou se podat protimikrobní látky. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele nemá příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-7 Bezpečnost na březích prasnicích a nepřítomnost přenosu přes placentu.** Pro zkoušku se použije nejméně patnáct březích prasnic, které nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem se nejméně pěti prasnicím ve 4. až 5. týdnu březosti podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Dalším nejméně pěti prasnicím se stejným způsobem podá stejné množství viru v 10. až 11. týdnu březosti. Nejméně pět dalších březích prasnic se ponechá jako kontroly.

U selat vakcinovaných prasnic se provedou zkoušky na sérové protilátky proti viru Aujeszkyho choroby; u zvířat vykazujících odchylky od normy a u čtvrtiny zbývajících zdravých selat se provedou zkoušky na izolaci virového antigenu z jater a plic.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- počet selat narozených vakcinovaným prasnicím, jakékoliv abnormality u selat ani délka březosti se významně neliší od kontrol;
- u selat narozených vakcinovaným prasnicím se nezjistí žádný antigen viru Aujeszkyho choroby;
- u selat vyšetřených před napitím kolostra se nezjistí protilátky proti viru Aujeszkyho choroby.

**2-3-2 Vylučování viru.** Pro zkoušku se použije nejméně osmnáct selat 3 až 4 týdny starých, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem a na doporučené místo se nejméně čtrnácti selatům podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně maximálnímu titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Nejméně čtyři selata se ponechají jako kontaktní kontroly. S nazálním a orálním sekretem jednotlivých zvířat se provedou vhodné citlivé zkoušky na přítomnost viru takto: nazální a orální výtěry se odebírají denně od jednoho dne před vakcinací až do deseti dnů po ní. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se z odebraných sekretů neizoluje virus.

**2-3-3 Přenosnost.** Zkouška se provede čtyřikrát nezávisle na sobě. Pokaždé se použijí nejméně čtyři selata 3 až 4 týdny stará, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem se každému seleti podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Jeden den po podání vakcíny se k vakcinovaným selatům přidají nejméně dvě selata stejného stáří, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Za 5 dnů se všechna zvířata vyšetří na přítomnost protilátek proti viru Aujeszkyho choroby.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže každé vakcinované sele vykáže protilátkovou odpověď. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nezjistí v žádné skupině kontaktních kontrol a jestliže

všechna vakcinovaná selata vykazují protilátkovou odpověď.

**2-3-4 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma selatům 3 až 5 dnů starým, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru, postupným pasážováním, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pasážuje se, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každému ze dvou selat 3 až 5 dnů starých, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru, se intranazálně podá množství viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 3 až 5 dnů se připraví suspenze z mozku, plic, mandlí a mízních uzlin každého selete a vzorky se spojí. Jeden mililitr směsného vzorku se podá intranazálně dalším dvěma selatům stejného stáří. Tento postup pasážování se opakuje nejméně pětkrát, naposledy nejméně na pěti selatech. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele neuhyne nebo nemá neurologické poruchy z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první ani ve druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-5 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Každému praseti se podá množství vakcinačního viru, které není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

**2-3-5-1 Vakcíny určené k aktivní imunizaci.** Pro zkoušku se použije nejméně patnáct výkrmových prasat ve stáří doporučeném pro vakcinaci, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Tělesná hmotnost žádného prasete se neliší od průměrné hmotnosti skupiny o více než 20 %. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset prasat. Nejméně pět prasat se ponechá jako kontroly. Na konci výkrmového období (80 kg až 90 kg) se prasata zváží a členžují se intranazálně dostatečným množstvím virulentního viru Aujeszkyho choroby (členžní materiál obsahující nejméně  $10^6$  CCID<sub>50</sub> virulentního kmene, který neprodělal více než tři pasáže a je podáván nejméně ve 4 ml rozpouštědla, se ukázal vhodným). Titr viru se stanoví z výtěrů nosní dutiny každého prasete odebíraných denně počínaje dnem před členžím až do doby, kdy už se virus nezjistí. Každé prasce se váží 7 dnů po členžím nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, a vypočítá se průměrný denní přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměr z průměrných denních přírůstků.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky Aujeszkyho choroby a průměr jejich průměrných denních přírůstků je méně než  $-0,5$  kg. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- všechna vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměry průměrných denních přírůstků obou skupin je nejméně 1,5 kg;
- geometrické průměry titrů a doba vylučování čelenžního viru jsou významně nižší u vakcinovaných zvířat než u kontrol.

**2-3-5-2 Vakcíny určené k pasivní ochraně.** Jestliže je vakcína určená pro použití u prasnic k pasivní ochraně selat, může se vhodnost vakcinačního viru pro tento účel prokázat následující metodou.

Pro zkoušku se použije nejméně dvanáct prasnic, které nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně osm prasnic. Nejméně čtyři prasnice se ponechají jako kontroly. Selata těchto prasnic se ve stáří 6 až 10 dnů členžují dostatečným množstvím virulentního viru Aujeszkyho choroby. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku lze hodnotit, pokud průměrný počet selat na jeden vrh v každé skupině je nejméně šest.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se u selat vakcinovaných prasnic prokáže nejméně 80% ochrana před úhynem při srovnání se selaty kontrolních prasnic.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-7) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu. Zkouška popsaná v odstavci 3-7 Účinnost se provede s danou šarží jednou nebo vícekrát podle dohody nebo rozhodnutí oprávněné autority. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** U zvířat, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru, vyvolá vakcína tvorbu specifických neutralizačních protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antiserem nebo monoklonálními protilátkami proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro prasata a k pestivirům. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří cytopatic-

ký efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens. Provede se specifická zkouška na pestiviry.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dvě prasata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem se každému prasati podá deset dávek vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve stejném substrátu, jaký se použil při výrobě (buněčná kultura nebo inokulace do alantoidní dutiny kuřecích embryí). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům dále uvedené zkoušky.

Použije se nejméně deset prasat o hmotnosti 15 kg až 35 kg, která nemají protilátky proti viru Aujeszkyho choroby nebo proti frakci tohoto viru. Tělesná hmotnost žádného prasete se neliší o více než 25 % od průměrné hmotnosti skupiny. Nejméně pět prasat se vakcinuje jednou dávkou vakcíny. Nejméně pět prasat se ponechá jako kontroly. Za 3 týdny se každé prase zváží a intranazálně čelenžuje dostatečným množstvím virulentního viru Aujeszkyho choroby. Každé prase se zváží 7 dnů po čelenži nebo v době úhynu, pokud k němu dojde dříve, a vypočítá se průměrný denní přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměr z průměrných denních přírůstků.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky onemocnění Aujeszkyho chorobou a rozdíl mezi průměry průměrných denních přírůstků je méně než -0,5 kg. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže všechna vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměry průměrných denních přírůstků obou skupin je nejméně 1,6 kg.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede substrát použitý při výrobě vakcíny (buněčné kultury nebo embryonovaná slepičí vejce).

## VACCINUM MORBI CARREI VIVUM AD CANEM

6.0:0448

### Vakcína proti psince pro psy živá

*Synonyma.* Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum ad canem, Vakcína proti psince živá lyofilizovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru psinky. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti psince.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifickovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně pět psů nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti viru psinky. Každému psovi se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 42 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březích fenách.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích fen, použije se nejméně pět fen v doporučeném stadiu březosti nebo v rozpětí stadií březosti podle doporučeného schématu. Každé feně se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Feny se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fena nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a jestliže se nezjistí žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma psům 5 až 7 týdnů starým, kteří nemají protilátky proti viru psinky, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zvýšení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožní postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít

tato metoda, jinak se pasáže, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Přijmou se opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučeným způsobem se každému psovi podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá způsobem doporučený pro vakcinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvratu virulence. Za 5 až 10 dnů se od každého psa připraví suspenze z nosní sliznice, mandlí, brzlíku, sleziny a plic s příslušnými mízními uzlinami a vzorky se spojí. 1 ml směsného vzorku se intranazálně podá každému ze dvou dalších psů stejného stáří. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-3-1) s použitím nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi 8 až 16 týdnů staří. Každému psovi se podá množství vakcinačního viru, které není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu, a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Použije se nejméně sedm psů, kteří nemají protilátky proti viru psinky. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět psů. Nejméně dva psi se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se každý pes čelenžuje intravenózně dostatečným množstvím suspenze virulentního viru psinky. Psi se pozorují nejméně denně po 21 dnů po čelenži. Psi s typickými příznaky těžké infekce virem psinky se šetrně utratí, aby se zabránilo zbytečnému utrpení.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže během pozorovací doby po čelenži všichni kontrolní psi uhynou nebo mají zřetelné příznaky psinky. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelenži vakcinovaní psi přežijí a nemají příznaky onemocnění.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru psinky již nevytvoří cytopatické efekty v citlivých buněčných kulturách.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti viru psinky a inokuluje se

do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogením pro psa. Za 6 až 8 dnů se provede pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří cytopatický efekt a nejsou žádné známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dva psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti viru psinky. Doporučeným způsobem se každému psovi podá deset dávek vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM MORBI CARREI VIVUM AD MUSTELIDAS

6.0:0449

### Vakcína proti psince lasicovitých živá

*Synonyma.* Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum ad mustelidas, Vakcína proti psince lasicovitých živá lyofilizovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru psinky atenuovaný pro fretky. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci fretek proti onemocnění vyvolanému virem psinky.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro fretky, pro které je určen. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Oslabení (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

**2-3-1 Oslabení.** Když se objem virové suspenze odpovídající pěti dávkám vakcíny podá intramuskulárně každé ze dvou fretek, které nemají protilátky proti viru psinky, nevyvolá během 21 dnů patogné změny.

**2-3-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí fretky nejnižšího stáří, které se doporučuje. Množství vakcinačního viru podané každé fretce není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže, přítomné v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně sedm fretek, které nemají protilátky proti viru psinky. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět fretek. Nejméně dvě fretky se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se všechny fretky intramuskulárně čelují množstvím suspenze virulentního viru psinky dostačujícím způsobit úhyn fretky. Zvířata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Fretky s typickými příznaky těžké infekce virem psinky se šetrně utratí, aby se předešlo zbytečnému utrpení.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže jedna nebo obě kontrolní fretky uhynou na psinku. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinované fretky zůstanou zdravé.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína smíchaná s psinkovým antiseptem již nevytvoří cytopatické efekty v citlivých buněčných kulturách nebo léze na chorioalantoidních membránách kuřecích embryí 9 až 11 dnů starých.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antiseptem proti viru psinky a inokuluje se do citlivých buněčných kultur. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemaglutinujících nebo hemadsorbujících agens.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dvě fretky, které nemají protilátky proti viru psinky. Doporučeným způsobem se každé fretce podá dvojnásobná dávka vakcíny. Fretky se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fretka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách nebo v embryonovaných slepičích vejcích 9 až 11 dnů starých.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-2 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM MORBI HAEMORRHAGICI CUNICULI INACTIVATUM

6.0:2325

### Vakcína proti hemoragickému onemocnění králíků inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru hemoragického onemocnění králíků (RHDV), inaktivovaný při zachování přiměřených imunogenních vlastností. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci králíků.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje na králících. Použijí se zdraví králíci, nevakcinovaní proti viru hemoragického onemocnění králíků, prostí protilátek proti tomuto viru, neošetření antibiotiky v průběhu nejméně 15 dnů jejich použití a pocházející ze zdravé a monitorované chovné jednotky. Z homogenizovaných vhodných vnitřních orgánů utracených králíků, nebo těch, kteří podlehnou infekci během 120 hodin po inokulaci, se připraví suspenze. Virus v suspenzi se může purifikovat a koncentrovat a vhodnou metodou se inaktivuje.

##### 2-2 INOKULA

**2-2-1 Cizí agens.** Každé matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech, předepsaným v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro králíky, pro které je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

##### 2-3-1 Bezpečnost

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. Použije se nejméně deset zdravých králíků ze stejného chovu, kteří nejsou starší než nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci a nemají protilátky proti viru hemoragického onemocnění králíků. Dupo-

ručeným způsobem a doporučenou metodou se každému králíkovi podají dvě dávky vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 4 h po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každého zvířete se zaznamená maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králík nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Průměrný vzestup teploty u všech zvířat nepřekročí 1,5°C a žádné zvíře nemá vzestup teploty vyšší než 2°C.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březích zvířatech.** Jestliže je vakcína určena pro použití u březích králíků, podá se podle doporučeného schématu nejméně deseti březím samicím. Pozorovací doba se prodlouží až do prvního dne po porodu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králík nemá výrazné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a nejsou zjištěny nežádoucí vlivy na březost nebo potomstvo.

**2-3-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Použije se nejméně patnáct zdravých a citlivých králíků, kteří nejsou starší než 10 týdnů, nemají protilátky proti viru hemoragického onemocnění králíků, pocházejí ze stejného zdravého stáda a jsou chováni ve vhodných izolačních podmínkách, aby byl vyloučen styk s virem hemoragického onemocnění králíků. Každému z nejméně deseti králíků se podle doporučeného schématu podá jedna dávka vakcíny. Nejméně pět králíků se ponechá jako kontroly. Nejméně 7 dnů po vakcinaci se každý králík čelí vhodným množstvím virulentního kmene viru hemoragického onemocnění králíků, postačujícím k vyvolání příznaků hemoragického onemocnění králíků (RHD) u citlivého králíka. Králíci se pozorují po dalších 14 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže méně než 80 % kontrolních králíků uhynie s typickými příznaky hemoragického onemocnění králíků během 120 h po čelení.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 90 % vakcinovaných králíků nemá žádné příznaky hemoragického onemocnění králíků.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede s konečnou sklizní každé šarže, aby se potvrdila inaktivace viru hemoragického onemocnění králíků. Pro zkoušku na inaktivaci se použijí zdraví, citliví králíci, nejméně 10 týdnů staří, prostí protilátek proti viru hemoragického onemocnění králíků, kteří pocházejí ze stejného zdravého stáda. Pět králíků se inokuluje vhodnou parenterální cestou (subkutánně nebo intramuskulárně) dávkou nejméně 5 ml suspenze. Králíci se pozorují nejméně 7 dnů. Na konci pozorovací doby se zvířata šetrně utratí a suspenze z jater se vyšetří vhodnou metodou na přítomnost viru hemoragického onemocnění králíků.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králík neuhyne a v játrech se nezjistí žádný antigen hemoragického onemocnění králíků.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností.

Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda; kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

Jako příklad se uvádí následující metoda. Jedna dávka vakcíny se intramuskulárně podá každému z pěti zdravých králíků, starých 10 týdnů, prostých protilátek proti viru hemoragického onemocnění králíků a ze stejného zdravého stáda. Dva králíci se ponechají jako nevakcinované kontroly. Odeberou se vzorky séra od každého králíka těsně před podáním vakcíny a po období stanoveném při zkoušení referenční vakcíny; titr protilátek každého séra se stanoví vhodnou imunologickou metodou, např. ELISA. Hladiny protilátek nejsou průkazně nižší než hladiny získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí specifické protilátky v sérech od nevakcinovaných kontrol a od králíků těsně před podáním vakcíny.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína podaná citlivým zvířatům stimuluje tvorbu specifických protilátek proti viru hemoragického onemocnění králíků, které lze zjistit zkouškou inhibice hemaglutinace nebo enzymoimunoanalýzou.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost a zbytkový živý virus.** Použijí se nejméně dva zdraví králíci, staří nejméně 10 týdnů, prostí protilátek proti viru hemoragického onemocnění králíků a pocházejí ze stejného zdravého chovu. Doporučeným způsobem se každému králíkovi podají dvě dávky vakcíny. Králíci se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králík nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky Imunogenita (odstavce 2-3-2).

## VACCINUM MORBI MAREK VIVUM

6.0:0589

### Vakcína proti Markově chorobě živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen nebo kmény viru Markovy choroby (herpesvirus 2 nebo 3 kura) a/nebo herpesviru krůt (herpesvirus 1 krůtí). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům a/nebo kuřecím embryím k aktivní imunizaci.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Jestliže vakcína obsahuje více než jeden typ viru, kultivují se různé typy viru odděleně. Vakcína se může lyofilizovat nebo uchovávat v tekutém dusíku.

### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata a/nebo kuřecí embrya, pro která je určen.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Zbytková patogenita kmene (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3). U plemen kuřat, o kterých je známo, že jsou mimořádně citlivá k viru Markovy choroby, mohou být nutné dodatečné zkoušky k prokázání bezpečnosti, pokud není vakcína kontraindikována.

**2-4-1 Zbytková patogenita kmene.** Zkouška se provede pro ten z doporučených způsobů podání vakcíny, který je pravděpodobně nejméně bezpečný, a na kategorii kuřat, která je z těch, pro které je vakcína určena, pravděpodobně nejcitlivější k Markově chorobě. Pokud je vakcína určena pro kuřata, provede se zkouška na kuřatech, pokud je vakcína určena pro kuřecí embrya, provede se zkouška na kuřecích embryích, pokud je vakcína určena pro obojí, provede se zkouška na kuřatech i na kuřecích embryích. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

*Vakcíny určené pro použití u kuřat.* Použije se nejméně osmdesát jednodenních kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2). Namátkově se rozdělí do dvou skupin po nejméně čtyřiceti kuřatech a skupiny se drží odděleně. Každému kuřeti jedné skupiny (I) se vhodným způsobem podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Vhodným způsobem se podá každému kuřeti další skupiny (II) množství virulentního viru Markovy choroby, které během 70 dnů způsobí úhyn a/nebo těžké makroskopické léze Markovy choroby u nejméně 70 % skutečného počtu kuřat (výchozí počet snížený o počet uhynulých kuřat během prvních 7 dnů zkoušky).

*Vakcíny určené pro použití u kuřecích embryí.* Použije se nejméně sto padesát embryonovaných vajec z SPF chovu (5.2.2). Namátkově se rozdělí do tří skupin po nejméně padesáti embryonovaných vejcích a skupiny se drží odděleně, ale za stejných podmínek inkubace. Nejpozději v doporučený den vakcinace se doporučenou metodou inokuluje každé

embryo první skupiny (I) množstvím vakcinačního viru odpovídajícím nejméně desetinásobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Vhodným způsobem se inokuluje každé embryo další skupiny (II) množstvím virulentního viru Markovy choroby, které v průběhu 70 dnů způsobí úhyn a/nebo těžké makroskopické léze Markovy choroby u nejméně 70 % skutečného počtu následně vylíhnutých kuřat (výchozí počet snížený o počet uhynulých kuřat v prvních sedmi dnech po vylíhnutí). Poslední skupina (III) se ponechá bez inokulace. Zkoušku nelze hodnotit, pokud je významný rozdíl v líhivosti mezi skupinami I a III a líhivost v kterékoliv ze tří skupin je nižší než 80 %.

Za předpokladu, že kuřata i kuřecí embrya pocházejí ze stejného chovu, může se použít společná kontrolní skupina pro *in ovo* i parenterální podání.

Bez ohledu na to, zda se vakcína podává kuřatům nebo kuřecím embryím, kuřata skupiny II se pozorují nejméně denně po 70 dnů a kuřata skupiny I nejméně denně po 120 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud platí:

- více než 10 % kuřat v kterékoliv ze tří skupin uhynie během prvních 7 dnů zkoušky;
- méně než 70 % skutečného počtu kuřat ve skupině II má makroskopické léze Markovy choroby.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádné kuře ve skupině I nemá zřetelné klinické příznaky nebo makroskopické léze Markovy choroby nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru;
- za 120 dnů počet přežívajících kuřat ve skupině I není menší než 80 % skutečného počtu.

**2-4-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence se vyžaduje pro vakcinační kmeny viru Markovy choroby, nikoliv pro vakcinační kmeny krůtího herpesviru, které jsou přirozeně nepatogenní. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

*Vakcíny určené pro použití u kuřat.* Každému z pěti jednodenních kuřat z SPF chovu (5.2.2) se intramuskulárně podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasážování.

*Vakcíny určené pro použití pouze u kuřecích embryí nebo u kuřat i kuřecích embryí.* Doporučenou metodou a ne později, než je doporučený den pro vakcinaci, se podá *in ovo* do každého z pěti embryonovaných vajec množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže.

Bez ohledu na to, zda se vakcína podává kuřatům nebo kuřecím embryím, připraví se za 5 až 7 dnů po podání vakcíny kuřatům, pokud je vakcína určena pro podání kuřatům, nebo za 5 až 7 dnů po vylíhnutí, pokud se vakcína podává *in ovo*, suspenze bílých krvinek od každého kuřete a tyto vzorky se spojí. Vhodný objem směsného vzorku se podá intraperitoneálně každému z pěti dalších jednodenních kuřat, která pocházejí z SPF chovu (5.2.2). Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Zkouška na zbytkovou patogenitu (odstavec 2-4-1) se

provede za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný pro kuřata nebo kuřecí embrya.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru ve srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci nebo kuřecí embrya. Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti nebo kuřecímu embryu není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

*Vakcíny určené pro použití u kuřat.* Použije se nejméně šedesát kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně třicet kuřat. Nejméně třicet kuřat se ponechá jako kontroly.

*Vakcíny určené pro použití u kuřecích embryí.* Použijí se kuřecí embrya stejného původu a z SPF chovu (5.2.2). Způsobem *in ovo* se doporučenou metodou vakcinuje 50 % embryonovaných vajec. 50 % embryonovaných vajec se ponechá jako kontroly. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže každá skupina má méně než třicet vylíhnutých kuřat.

Bez ohledu na to, zda se vakcína podává kuřatům nebo kuřecím embryím, se každé kuře čelenuje nejpozději 9 dnů po vakcinaci vhodným způsobem dostatečným množstvím virulentního viru Markovy choroby. Kuřata se pozorují nejméně denně 70 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění. Na konci pozorovací doby se šetrně utratí všechna přežívající kuřata a provede se vyšetření na makroskopické léze Markovy choroby. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže: – během pozorovacího období po čelení méně než 70 % kontrolních kuřat uhynie nebo má závažné klinické příznaky nebo makroskopické léze Markovy choroby – a/nebo během období mezi vakcinací a čelení více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže procento relativní ochrany vypočítané za použití následujícího vzorce není menší než 80 %:

$$\frac{V - C}{100 - C} \cdot 100,$$

v němž značí:

- V* – procento čelenujovaných vakcinovaných kuřat, která přežívají do konce pozorovacího období bez zřetelných klinických příznaků nebo makroskopických lézí Markovy choroby;
- C* – procento čelenujovaných kontrolních kuřat, která přežívají do konce pozorovacího období bez zřetelných klinických příznaků nebo makroskopických lézí Markovy choroby.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** K prokázání přítomnosti každého typu viru, který se uvádí v označení na obalu, se provede zkouška imunobarvením v buněčných kulturách pomocí monoklonálních protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se každému kuřeti nebo kuřecímu embryu podá deset dávek vakcíny.

*Vakcíny určené pro použití u kuřat.* Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci.

*Vakcíny určené pro použití pouze u kuřecích embryí nebo určené pro použití u kuřat i kuřecích embryí.* Použijí se embryonovaná vejce z SPF chovu (5.2.2), ne později než v den doporučený pro vakcinaci embryí. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže má skupina méně než deset vylíhnutých kuřat a líhivost je nižší než 80 %.

Bez ohledu na to, zda se vakcína podává kuřatům nebo embryím, pozorují se kuřata nejméně denně po dobu 21 dnů po vakcinaci nebo po vylíhnutí, podle toho, co je vhodné. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

#### 3-6 Titr viru

**3-6-1 Vakcíny obsahující jeden typ viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Jestliže se titr viru stanoví v plaketovných jednotkách (PFU), berou se v úvahu pouze primární plaky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-6-2 Vakcíny obsahující více než jeden typ viru.** U vakcín obsahujících více než jeden typ viru se titruje každý virus inokulací do vhodných buněčných kultur (5.2.4); výsledky se odečítají po imunobarvení za použití protilátek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje pro každý vakcinační virus nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná podle doporučeného schématu, doporučeným způsobem a metodou vyhovuje zkoušce na imunogenitu (odstavec 2-4-3). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.



## VACCINUM MORBI PARTUS DIMINUTIONIS MCMLXXVI INACTIVATUM AD PULLUM

6.0:1202

### Vakcína proti syndromu poklesu snášky vajec '76 inaktivovaná

*Synonymum.* Vakcína proti syndromu poklesu snášky '76  
inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru syndromu poklesu snášky vajec '76 (hemaglutinující ptačí adenovirus), inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita.

Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k ochraně nosnic proti poklesu snášky vajec a/nebo k prevenci ztráty kvality vajec.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační kmen se kultivuje v embryonovaných slepičích nebo kachních vejcích nebo v buněčných kulturách. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí nebo kachní vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích nebo kachních vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-4-1).

**2-4-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí slepice z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) a ve stáří, které se doporučuje pro vakcinaci. Každé slepici se podá vakcína s minimální účinností.

Vakcinují se dvě skupiny po třiceti slepicích. Dále se vytvoří dvě kontrolní skupiny, jedna o počtu deseti kusů, druhá o počtu třiceti kusů stejného stáří a původu, jako jsou vakcinovaná zvířata. Vedou se individuální záznamy produkce vajec od začátku snášky vajec až do 4 týdnů po členění. Ve stáří 30 týdnů se členějí všichni ptáci jedné skupiny třiceti vakcinovaných a skupiny deseti kontrolních

ptáků množstvím viru syndromu poklesu snášky vajec '76, dostatečným k vyvolání výrazného poklesu produkce a/nebo kvality vajec. Zkoušku lze hodnotit, jestliže u kontrolních ptáků je významný pokles v produkci vajec a/nebo v jejich jakosti. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaní ptáci nemají výrazný pokles produkce a/nebo jakosti vajec.

Druhá vakcinovaná skupina a skupina třiceti kontrol se členěje ke konci snáškového období. Zkoušku lze hodnotit, jestliže u kontrolních ptáků je významný pokles v produkci a/nebo jakosti vajec. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaní ptáci nemají výrazný pokles produkce a/nebo jakosti vajec.

Se vzorky séra, které se získají v době vakcinace, 4 týdny po vakcinaci a těsně před členěním se provedou sérologické zkoušky. Zkoušku lze hodnotit, jestliže se u žádného ze vzorků z kontrolní skupiny nezjistí protilátky proti viru syndromu poklesu snášky vajec '76.

##### 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede v embryonovaných kachních vejcích z chovu prostého infekce virem syndromu poklesu snášky vajec '76 nebo v embryonovaných slepičích vejcích z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2) nebo ve vhodných buněčných kulturách, které jsou nejcitlivější na vakcinační kmen. Množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-5-2 Zkouška účinnosti šarže.** Není nutné provádět zkoušku účinnosti (odstavec 3-6) s každou šarží vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Jestliže se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda, kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v části Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Vakcinuje se nejméně deset kuřat 14 až 28 dnů starých z SPF chovu (5.2.2) jednou dávkou vakcíny jedním z doporučených způsobů podání. Za čtyři týdny se odebere krev od každého ptáka a od pěti nevakcinovaných kontrol stejného stáří, pocházejících ze stejného zdroje. Stanoví se protilátková odpověď zkouškou inhibice hemaglutinace v každém vyšetřovaném séru za použití čtyř hemaglutinačních jednotek antigenu a kuřecích erytrocytů. Zkoušku lze hodnotit, jestliže se v séru nevakcinovaných ptáků nezjistí specifické protilátky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže střední hodnota titru vakcinované skupiny není nižší než titr zjištěný dříve se šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání kuřatům, která nemají protilátky proti viru syndromu poklesu snášky vajec '76, vakcína vyvolá tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použije se deset kuřat 14 až 28 dnů starých z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový virus se provádí, aby se potvrdila inaktivace viru syndromu poklesu snášky vajec '76.

**A.** U vakcín připravovaných ve vejcích se provede zkouška v kachních embryích z chovu prostého viru syndromu poklesu snášky vajec '76, nebo pokud je známo, že kuřecí embrya jsou citlivější, v kuřecích embryích z SPF chovu (5.2.2). Dvě pětiny dávky se injikují do alantoidní dutiny každého z deseti kuřecích embryí 10 až 14 dnů starých, která nemají mateřské protilátky proti viru syndromu poklesu snášky vajec '76. Vejce se inkubují a pozorují se 8 dnů. Odděleně se spojí alantoidní tekutiny z živých embryí a odděleně z mrtvých embryí. Embrya, která uhynula v důsledku nespecifických příčin do 24 h po injekci se vyloučí. Do alantoidní dutiny každého z deseti embryí 10 až 14 dnů starých, která nemají mateřské protilátky proti viru syndromu poklesu snášky vajec '76 se inokuluje 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z živých embryí a do dalších deseti obdobných embryí se inokuluje 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z uhynulých embryí; inkubuje se 8 dnů. Alantoidní tekutina každého embrya se vyšetří na hemaglutinační aktivitu pomocí kuřecích erytrocytů. Pokud více než 20 % embryí uhynie v jedné z obou etap zkoušky, tato etapa se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí hemaglutinační aktivita a jestliže v opakované zkoušce neuhyne z nespecifických důvodů více než 20 % embryí. K prevenci bakteriální infekce se mohou ve zkoušce použít antibiotika.

**B.** U vakcíny adaptované na buněčné kultury se inokuluje deset dávek do vhodných buněčných kultur. Pokud vakcína obsahuje olejové adjuvans, odstraní se vhodným způsobem. Kultury se inkubují 7 dnů při  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Provede se pasáž na další sadě buněčných kultur a inkubuje se 7 dnů při  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Kultury se pravidelně vyšetřují a na konci inkubačního období se vyšetří supernatantní tekutina na přítomnost hemaglutinační aktivity. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže buněčné kultury nejeví známky infekce a jestliže supernatantní tekutina nevykazuje hemaglutinační aktivitu.

3-5 **Cizí agens.** Použijí se kuřata ze zkoušky na bezpečnost. Každému kuřeti se za 21 dnů po podání dvojnásobné dávky vakcíny podá stejným způsobem ještě jedna dávka vakcíny. Za dva týdny se od každého kuřete odeberou vzorky séra a provedou se zkoušky na protilátky metodami předepsanými v obecné stati *Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín* (5.2.2) proti následujícím agens: viru encefalomyelitidy drůbeže, virům leukózy ptáků, viru infekční bronchitidy drůbeže, viru infekční burzitidy, viru infekční laryngotracheitidy drůbeže, viru influenzy A, viru Markovy choroby, viru newcastleské choroby a u vakcín vyráběných na kachních embryích též

na chlamydie (reakce vazby komplementu nebo precipitační zkouška v agarovém gelu), virus infekční hepatitidy kachen typu I (imuno-fluorescenční zkouška nebo sérum-neutralizační zkouška) a virus Derzsyho choroby (sérum-neutralizační zkouška). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti těmto agens.

3-6 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-4-1 Imunogenita.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda je vakcinační kmen adaptován na kuřecí nebo kachní embrya, nebo zda je adaptován na buněčnou kulturu.

## VACCINUM MYCOPLASMATIS GALLISEPTICI INACTIVATUM

6.0:1942

### Vakcína proti *Mycoplasma gallisepticum* inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Mycoplasma gallisepticum* inaktivovaných způsobem zachovávajícím přiměřenou imunogenitu. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci kurů domácích a/nebo krůt.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Inokulum se pomnožuje ve vhodné pevné a/nebo v tekuté půdě tak, aby byl zaručen optimální růst za zvolených inkubačních podmínek. Každý kmen se pomnožuje odděleně a totožnost se ověří vhodnou metodou. Během výroby se vhodnými metodami monitorují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu. Čistota a totožnost sklizně se ověří vhodnými metodami. Po pomnožení se suspenze mykoplazmat shromáždí odděleně a vhodnou metodou se inaktivují. Suspenze mykoplazmat se mohou ošetřit za účelem vytvoření fragmentů mykoplazmat a fragmenty se mohou purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro cílová zvířata. Během prokazování účinku se může použít následující zkouška Imunogenita (odstavec 2-2-1). Jestliže indikace vakcíny zahrnují ochranu proti poklesu snášky nebo ochranu proti infekční sinusitidě krůt, je nutné další vhodné zkoušení na imunogenitu.

2-2-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob podání a na každém ptačím druhu, pro který je vakcína určena. Pro každou zkoušku se použije nejméně čtyřicet ptáků, kteří nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Použijí se kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2) nebo krůty, které

nebyly vakcinovány a nemají protilátky proti *M. gallisepticum*. V každé zkoušce se podá každému z nejméně dvaceti ptáků množství vakcíny, které není větší než jedna dávka. Jestliže se doporučuje revakcinace, opakuje se tento postup po doporučeném intervalu. Nejméně dvacet ptáků se ponechá jako kontroly. Nejpozději za 28 dnů po posledním podání se vhodným způsobem čelenuje každý pták obou skupin dostatečným množstvím virulentní *M. gallisepticum* (R-kmen). Ptáci se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelení. Vyhodnocení se provede za 14 dnů po čelení, kdy se ptáci šetrně utratí. Zaznamenají se úhyny a počet přeživajících ptáků, kteří mají klinické příznaky onemocnění (např. poruchy dýchání, výtok z nosu) a zaznamenají se léze na vzdušných vacích. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení uhynie nebo má léze nebo klinické příznaky onemocnění méně než 70% kontrol
- a/nebo během období mezi vakcinací a čelením více než 10 % ptáků kontrolní skupiny nebo vakcinované skupiny má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Hrudní a břišní vzdušné vaky se posuzují individuálně na každé straně zvířete. Může se použít bodovací systém uvedený dále. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže bodová hodnota (skóre) u vakcinovaných ptáků je významně nižší než bodová hodnota (skóre) u kontrol a jestliže snížení není menší než 30 %.

- 0 Žádné změny na vzdušných vacích,
- 1 v limitované oblasti jednoho nebo dvou vzdušných vaků: zakalení s mírným zesílením stěny vzdušného vaku nebo vložky žlutavého exsudátu,
- 2 v jednom vzdušném vaku nebo částech dvou vzdušných vaků: šedý nebo žlutý, občas pěnový exsudát se zesílením stěny vzdušného vaku,
- 3 ve třech vzdušných vacích: rozsáhlý exsudát s jasným zesílením většiny vzdušných vaků,
- 4 těžký zánět vzdušných vaků se značným exsudátem a zesílením většiny vzdušných vaků.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda, a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost (odstavec 3-5). Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně patnáct kuřat z SPF chovu (5.2.2) ve stáří 3 až 4 týdnů nebo nejméně patnáct krůt ve stáří 3 až 4 týdnů, které nebyly vakcinovány proti *M. gallisepticum*, nemají protilátky proti *M. gallisepticum* a pocházejí ze zdravého chovu. Vzorky séra od každého vakcinovaného a kontrolního ptáka se získají bezprostředně před vakcinací a vyšetří se na nepřítomnost protilátek proti *M. gallisepticum*. Každému z nejméně deseti ptáků se podá doporučeným způsobem jedna dávka vakcíny. Nejméně pět ptáků se ponechá jako kontroly. Vzorky séra se získají 5 týdnů po vakcinaci od každého vakcinovaného a kontrolního ptáka. Vhodnou metodou se v séru stanoví titry protilátek proti *M. gallisepticum*. Vypočítají se průměrné titry pro skupinu

vakcinovaných ptáků. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí specifické protilátky *M. gallisepticum* v kterémkoliv vzorku séra kontrolních ptáků za 5 týdnů po podání vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrné titry protilátek u skupiny vakcinovaných ptáků jsou stejné nebo vyšší než titry získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce na účinnost (odstavec 3-5).

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína po podání kuřatům z SPF chovu (5.2.2) nebo krůtám ze zdravých chovů vyvolá tvorbu protilátek proti jednomu nebo více kmenům *M. gallisepticum*.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Zbytková živá mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje validované zkoušce na zbytkovou živou *M. gallisepticum* kulturační metodou (viz např. 2.6.7, při použití živých půd prokazatelně vhodných pro *M. gallisepticum*).

**3-4 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nebo, jestliže je vakcína určena pouze pro krůty, nejméně deset krůt nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci z nevakcinovaného chovu, které nemají protilátky proti *M. gallisepticum*. Doporučeným způsobem se každému ptákovi podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže všichni ptáci zůstávají v dobrém zdravotním stavu a nevyskytnou se žádná abnormální místní nebo celková reakce.

**3-5 Účinnost.** Vakcína vyhovuje zkoušce na imunogenitu (odstavec 2-2-1).

## VACCINUM MYXOMATOSIDIS VIVUM AD CUNICULUM

6.0:1943

### Vakcína proti myxomatóze pro králíky živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen buď myxomatózního viru, který je atenuovaný pro králíky, nebo virus Shopeho fibromu. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci králíků proti myxomatóze.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Virová suspenze se sklídí, titruje a může se smíchat s vhodným stabilizačním roztokem.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro králíky, pro které je určen. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí králíci nejnižšího doporučeného stáří. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset králíků, kteří nemají protilátky proti viru myxomatózy. Každému králíkovi se podá množství viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Králíci se pozorují nejméně denně po 28 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 4 h po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každého králíka se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králík nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru; průměrný vzestup teploty nepřekročí 1 °C a u žádného králíka není vzestup vyšší než 2 °C. Může se objevit místní reakce trvající méně než 28 dnů.

**2-3-1-2 Bezpečnost na březích králíciích.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích králíků, použije se nejméně deset březích samic. Podle doporučeného schématu se každé podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Králíci se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- králíci zůstávají v dobrém zdravotním stavu;
- žádný králík nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru;
- není zaznamenán žádný nežádoucí vliv na březost nebo potomstvo.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** (Tato zkouška se provede pouze u vakcín obsahujících atenuované kmene viru myxomatózy.) Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma králíkům 5 až 7 týdnů starým, kteří nemají protilátky proti viru myxomatózy, postupným pasážováním, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na vzestup virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru dovolují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučeným způsobem se každému králíkovi podá množství viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vak-

cinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvratu virulence. Králíci se šetrně utratí 5 až 10 dnů po inokulaci a z každého králíka se odeberou orgány nebo tkáň s dostatkem viru umožňujícím pasážování; orgány a tkáň se homogenizují ve vhodném tlumivém roztoku, suspenze se odstředí a supernatantní tekutina se použije k dalšímu pasážování. Supernatantní tekutina se inokuluje do vhodné buněčné kultury, aby se ověřila přítomnost viru. Každému ze dvou dalších králíků stejného stáří se vhodným způsobem podá vhodný objem supernatantní tekutiny ve vhodném poměru. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. V každé pasáži se ověří přítomnost viru. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-3-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé sérii pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí králíci nejnižšího doporučeného stáří. Množství vakcinačního viru podané každému králíkovi je nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

Použije se nejméně patnáct králíků, kteří nemají protilátky proti viru myxomatózy a jsou chováni ve vhodných izolačních podmínkách, aby byl vyloučen styk s virem myxomatózy. Každému z nejméně deseti králíků se podle doporučeného schématu podá jedna dávka vakcíny. Nejméně pět králíků se ponechá jako kontroly. Nejméně 21 dnů po poslední vakcinaci se každý králík čelenžuje množstvím virulentního kmene viru myxomatózy, postačujícím k vyvolání typických příznaků myxomatózy u králíka. Králíci se pozorují nejméně denně po dalších 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže typické příznaky myxomatózy má méně než 90 % kontrolních králíků. Vakcína obsahující virus myxomatózy vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži nemá nejméně 90 % vakcinovaných králíků žádné příznaky myxomatózy. Vakcína obsahující virus Shopeho fibromu vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži nemá nejméně 75 % vakcinovaných králíků žádné příznaky myxomatózy.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Provede se imunofluorescenční zkouška ve vhodných buněčných kulturách pomocí monospecifického antiséra.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Bezpečnost.** Použijí se nejméně dva králíci, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a kteří nemají protilátky proti viru myxomatózy a viru hemoragického onemocnění králíků a byli chováni ve vhodných izolačních podmínkách, aby se zabránilo styku s virem myxomatózy. Doporučeným způsobem se každému králíkovi podá deset dávek vakcíny. Králíci se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný králik nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-5 **Cizí agens.** Na konci čtrnáctidenního pozorovacího období zkoušky na bezpečnost se každému králíkovi podá doporučeným způsobem dalších deset dávek vakcíny. Za 14 dnů se každému králíkovi odebere vzorek krve a provede se zkouška na protilátky proti viru hemoragického onemocnění králíků. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádné protilátky.

3-6 **Titř viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně minimální titř viru, uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PANLEUCOPENIAE FELINAE INFECTIVAE INACTIVATUM

6.0:0794

Vakcína proti panleukopenii koček inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru panleukopenie koček nebo viru parvovirozy psů inaktivovaný při zachování přiměřené imunogenity. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti infekční enteritidě koček (panleukopenii koček).

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Virus se kultivuje v buněčných kulturách. Sklizený virus se inaktivuje. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-3-1).

2-3-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Každé kočce se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně deset koček, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček a parvovirozy psů. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět koček. Nejméně pět koček se ponechá jako kontroly. Osmý a čtvrtý den před čelenží se stanoví počet leukocytů a vypočítá se průměr ze dvou měření, který se použije jako počáteční hodnota. Za 20 až 22 dnů se každá kočka čelenžuje intraperitoneálně dostatečným množstvím suspenze virulentního viru panleukopenie koček. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelenží. Čtvrtý, šestý, osmý a desátý den po čelenží se stanoví počet leukocytů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovacího období po čelenží má v nejméně jednom stanovení snížený počet leukocytů o nejméně 75 % počáteční hodnoty nebo neuhyne na panleukopenii, méně než 100 % kontrolních koček.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenží všechny vakcinované kočky přežijí a nemají příznaky onemocnění ani leukopenii, tj. snížení počtu leukocytů nepřekročí v žádném ze čtyř stanovení 50 % počáteční hodnoty.

### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede s množstvím inaktivovaného viru odpovídajícím nejméně 100 dávkám vakcíny validovanou metodou, např. takto: vakcína se inokuluje na vhodnou nesplývající buněčnou kulturu; po osmidenní inkubaci se trypsinizací připraví subkultura. Po další osmidenní inkubaci se kultury vyšetří imunofluorescenční zkouškou na zbytkový živý parvovirus. Imunofluorescenční zkouška se může doplnit hemaglutinační zkouškou nebo jinými vhodnými zkouškami se supernatantní tekutinou buněčných kultur. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže.** Pro běžné zkoušení šarží vakcíny se může jako náhrada zkoušek 3-4-1 nebo 3-4-2 popsanych v odstavci Účinnost použít zkouška, která je založena na tvorbě hemaglutinačně-inhibičních protilátek u morčat, pokud je dokázána dostatečná korelace se zkouškou na imunogenitu.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zvířatům vyvolá vakcína tvorbu protilátek proti parvoviru přítomnému ve vakcíně.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci a přednostně ty, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček nebo proti parvoviru psů, nebo, kde je to odůvodněno, použijí se kočky, které mají nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinovány proti viru panleukopenie koček nebo proti parvoviru psů, a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Každé kočce se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Proveďte se zkouška 3-4-1 nebo 3-4-2.

3-4-1 *Zkouška na hemaglutinaci inhibující protilátky na kočkách.* Pro zkoušku se použijí nejméně čtyři kočky 8 až 12 týdnů staré, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček a psímu parvoviru. Nejméně dvě kočky se vakcinují jednou doporučenou dávkou vakcíny. Nejméně dvě kočky se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se odebere každé kočce krev a připraví se jednotlivé vzorky séra. Sérum se inaktivuje zahřátím na 56 °C po 30 min. K jednomu objemovému dílu každého séra se přidá devět objemových dílů suspenze kaolínu lehkého R (200 g/l) v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným o pH 7,4. Každá směs se třepe 20 min. Po odstředění se odebere supernatantní tekutina a smíchá se s jedním objemovým dílem koncentrované suspenze prasečích erytrocytů. Nechá se 60 min stát při 4 °C a odstředí se. Ředění získaného séra je 1 : 10. Od každého séra se připraví řada dvojnásobných ředění. Ke každému z těchto ředění o objemu 0,025 ml se přidá 0,025 ml suspenze antigenu psího parvoviru nebo antigenu viru panleukopenie koček obsahujícího čtyři hemaglutinační jednotky. Nechá se 30 min inkubovat při 37 °C a přidá se 0,05 ml suspenze prasečích erytrocytů o koncentraci  $30 \times 10^6$  buněk v mililitru. Nechá se stát 90 min při 4 °C a pak se zaznamená poslední ředění séra, kdy ještě došlo k úplné inhibici hemaglutinace.

Zkoušku nelze hodnotit pokud kontrolní kočky vytvoří protilátky buď proti psímu parvoviru, nebo viru panleukopenie koček. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže v sérech obou vakcinovaných koček se zaznamená titer nejméně 1 : 20.

3-4-2 *Zkouška na virus neutralizující protilátky na kočkách.* Pro zkoušku se použijí nejméně dvě kočky 8 až 12 týdnů staré, které mají při stanovení dále popsanou metodou titer protilátek nižší než 4 ND<sub>50</sub> v 0,1 ml séra. Každá kočka se vakcinuje podle doporučeného schématu. Za 14 dnů po vakcinaci se vyšetří sérum každé kočky následujícím postupem. Séra se 30 min zahřívají při 56 °C a pak se připraví sériová ředění v médiu vhodném pro kočičí buňky. Ke každému ředění se přidá stejný objem virové suspenze obsahující takové množství viru, které, je-li ve vhodné směsi séra a viru inokulováno na buněčnou kulturu, obsahuje asi  $10^4$  CCID<sub>50</sub>. Směsi se inkubují 1 h při 37 °C a vhodný objem každé směsi se inokuluje do čtyř kočičích buněčných kultur. Buněčné kultury se inkubují 7 dní při 37 °C a po následné pasáži dalších 7 dnů. Kultury se vyšetří na přítomnost specifických cytopatických efektů a vypočítá se titer protilátek.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titer je nejméně 32 ND<sub>50</sub> v 0,1 ml séra. Jestliže u jedné kočky nedojde k protilátkové odpovědi, zkouška se opakuje na dalších dvou kočkách a výsledek se vypočítá jako průměrná hodnota všech titrů naměřených u všech tří koček, u kterých došlo k protilátkové odpovědi.

## VACCINUM PANLEUCOPENIAE FELINAE INFECTIVAE VIVUM

6.0:0251

### Vakcína proti panleukopenii koček živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru panleukopenie koček. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti infekční enteritidě koček (panleukopenii koček).

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určen (včetně bezpečnosti pro březí kočky, jestliže toto použití není kontraindikováno nebo jestliže se virus vylučuje výkaly).

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně pět koček nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, které nemají specifické hemaglutinaci inhibující protilátky proti viru panleukopenie koček a parvoviru psů. V cirkulující krvi se stanoví počet leukocytů 8 dnů a 4 dny před podáním vakcinačního viru a ze dvou měření se vypočítá průměr, který se použije jako počáteční hodnota. Každé kočce se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Čtvrtý, šestý, osmý a desátý den po inokulaci se stanoví počty leukocytů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a jestliže u žádné kočky při každém

počítání neklesne počet leukocytů pod 50 % počáteční hodnoty.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny dvěma kočkám nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček a parvoviru psů, postupným pasážováním, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečného získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučeným způsobem se každé kočce podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Od druhého do desátého dne po podání viru se odebírají výkaly od jednotlivých koček a vyšetřují se na přítomnost viru. Výkaly obsahující virus se spojí. Dalším dvěma kočkám stejného stáří se oronazální cestou podá 1 ml suspenze směsného vzorku výkalů. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka neuhyne ani nemá příznaky, které lze přisoudit vakcinačnímu viru, a jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. V úvahu se vezmou zejména počty leukocytů, výsledky histologického vyšetření brzlíku a titr vyloučeného viru. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Množství vakcinačního viru podané každé kočce je nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně deset koček, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček a parvoviru psů. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět koček. Nejméně pět koček se ponechá jako kontroly. Osmý a čtvrtý den před čelenží se stanoví počet leukocytů, vypočítá se průměr z obou měření, který se použije jako počáteční hodnota. Za 20 až 22 dnů se každá kočka čelenžuje intraperitoneálně dostatečným množstvím suspenze virulentního viru panleukopenie koček. Kočky se pozorují nejméně denně 14 dnů po čelenží. Čtvrtý, šestý, osmý a desátý den po čelenží se stanoví počet leukocytů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže v průběhu pozorovacího období po čelenží

má v nejméně jednom stanovení snížený počet leukocytů o nejméně 75 % počáteční hodnoty nebo neuhyne na panleukopenii méně než 100 % kontrolních koček. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenží všechny vakcinované kočky přežijí a nemají příznaky onemocnění ani leukopenii, tedy snížení počtu leukocytů nepřekročí v žádném ze čtyř odběrů 50 % počáteční hodnoty.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcinační virus se kultivuje v citlivé buněčné linii v substrátu vhodném pro imunofluorescenční zkoušku nebo pro peroxidasovou zkoušku. Připraví se vhodné kontroly. Část buněk se vyšetří monoklonálními protilátkami specifickými pro virus panleukopenie koček a část buněk monoklonálními protilátkami specifickými pro psí parvovirus. V buňkách inokulovaných vakcínou se zjistí virus panleukopenie koček, ale psí parvovirus se nezjistí.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antiserem proti viru panleukopenie koček a inokuluje se do vhodné buněčné kultury známé citlivostí k virům patogenním pro kočku. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou žádné známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, které nemají protilátky proti viru panleukopenie koček nebo proti parvoviru psů. Doporučeným způsobem se každé kočce podá deset dávek vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje méně než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PARAINFLUENZAE VIRI BOVINI VIVUM

6.0:1176

### Vakcína proti viru parainfluenzy skotu živá

*Synonyma.* Vaccinum parainfluenzae viri bovine vivum cryodesiccatum, Vakcína proti parainfluenze skotu živá lyofilizovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru parainfluenzy skotu 3. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci proti infekci bovinním virem parainfluenzy.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skot, pro který je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně pět telat nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci a přednostně ta, která nemají protilátky proti viru parainfluenzy skotu 3 nebo, kde je to zdůvodněné, použijí se telata, která mají velmi nízkou hladinu těchto protilátek, až do doby než jsou vakcinována proti viru parainfluenzy skotu a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Každému teleti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. U všech telat se zaznamená rektální teplota den před vakcinací, v době vakcinace a 4 dny po vakcinaci.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí abnormální vliv na tělesnou teplotu a jestliže žádné tele nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-3-2 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny dvěma telatům, která nemají protilátky proti viru bovinní parainfluenzy, postupným pasážováním, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožní postupné pasážování na

pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každému teleti se intranazálně podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Od třetího do sedmého dne po podání viru se oběma telatům denně odebírá nosní výtěr, vloží se do nejvýše 5 ml vhodného média, které se dále použije k inokulaci buněčných kultur pro ověření přítomnosti viru. Dvěma dalším telatům stejného stáří se podá asi 1 ml suspenze z nosního výtěru, která podle výsledků titrace v buněčných kulturách obsahuje maximální množství viru. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá příznaky, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a není zjištěn žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. V úvahu se vezme titer vylučovaného viru v nosních výtěrech. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé sérii pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

2-3-3 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí telata nejnižšího doporučeného stáří. Množství vakcíny podané každému teleti není více než minimální titer viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny. Pro zkoušku se použije nejméně deset telat, která nemají protilátky proti viru parainfluenzy skotu 3. Telata s nízkými hladinami těchto protilátek se mohou použít, jestliže se prokáže, že za těchto podmínek se dosáhne hodnotitelných výsledků. Séra se získají od telat před vakcinací, sedmý a čtrnáctý den po vakcinaci a těsně před čelenží. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět telat. Nejméně pět telat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé tele čelenžuje do dýchacích cest vhodným množstvím suspenze virulentního viru parainfluenzy skotu 3 v nízké pasáži. Po čelenži se telata pozorují nejméně denně po 14 dnů a u každého se sledují zejména respirační příznaky a vylučování viru (nosními výtěry, tracheobronchiálními výplachy).

Zkoušku lze hodnotit, pokud bylo vyšetření sér na protilátky proti viru parainfluenzy skotu 3 zjištěno, že v průběhu zkoušení nedošlo k přidružené virové infekci, nebo pokud během pozorovacího období po čelenži více než dvě z pěti kontrolních zvířat vylučují čelenžní virus zjištěný vyšetřením nosních výtěrů nebo tracheobronchiálních výplachů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži dochází u vakcinovaných zvířat při srovnání s kontrolními k:

- významnému snížení průměrného titru a průměrné doby vylučování viru;
- zřetelnému snížení celkových a místních příznaků (pokud čelenžní virus tyto příznaky vyvolává).

Vakcíny pro veterinární použití



## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Provede se imunofluorescenční zkouška ve vhodných buněčných kulturách s použitím monospecifického antiséra.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti viru parainfluenzy skotu 3 a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro skot. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou žádné známky přítomnosti hemadsorbujících agens. Provede se specifická zkouška na pestiviry.

3-5 **Bezpečnost.** Použijí se dvě telata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci a přednostně ta, která nemají protilátky proti viru parainfluenzy skotu 3 nebo, kde je to zdůvodněné, telata s velmi nízkou hladinou těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinována proti viru bovinní parainfluenzy, a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému teleti podá deset dávek vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titř viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje ne méně než minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PARAINFLUENZAE VIRI CANINI VIVUM

6.0:1955

### Vakcína proti viru parainfluenzy psů živá

## 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru parainfluenzy psů. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti respiračním příznakům infekce virem parainfluenzy psiho původu.

## 2 VÝROBA

## 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

## 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

## 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

2-3-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

2-3-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně pět psů nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti viru parainfluenzy psů. Doporučeným způsobem se každému psovi podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-3-1-2 *Bezpečnost na březích fenách.* Pokud je vakcína určena pro použití u březích fen, použije se nejméně pět fen ve stadiu nebo stádiích březosti podle doporučeného schématu. Každé feně se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Feny se pozorují nejméně denně až do jednoho dne po porodu.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná fena nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru, a jestliže nejsou zaznamenány žádné nežádoucí vlivy na březost nebo potomstvo.

2-3-2 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma psům 5 až 7 týdnů starým, kteří nemají protilátky proti viru parainfluenzy psiho původu, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každému psovi se intranazálně a doporučeným způsobem podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětně

získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvratu virulence. Za 3 až 10 dnů se připraví suspenze z nosních výtěrů každého psa a 1 ml suspenze z nosních výtěrů, která obsahuje největší množství viru, se intranazálně podá každému ze dvou dalších psů stejného stáří. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-3-1) s použitím nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího doporučeného stáří. Množství vakcinačního viru podané každému psovi je nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně patnáct psů, kteří nemají protilátky proti viru parainfluenzy psů. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset psů. Nejméně pět psů se ponechá jako kontroly. Za nejméně 21 dnů se všichni psi čelenují intratracheálně nebo intranazálně vhodným množstvím suspenze virulentního viru parainfluenzy psů. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelenži. Od každého psa se mezi druhým a desátým dnem po čelenži odebírají nosní výtěry nebo výplachy a tyto vzorky se vyšetří na přítomnost vylučovaného viru. Pro zaznamenání výskytu kašle u každého psa se použije bodovací systém (skóre).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže nejméně čtyři z kontrolních psů buď mají kašel, nebo vylučují čelenžní virus. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže bodová hodnota (skóre) kašle nebo vylučování viru u vakcinovaných zvířat jsou významně nižší než u kontrol.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Provede se imunofluorescenční zkouška ve vhodných buněčných kulturách s použitím monospecifického antiséra.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata. (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti viru parainfluenzy psů a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro psa. Za 6 až 8 dnů se provede pasáž a kultury se udržují celkem 14 dnů. Vakcína vyhovuje

zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou žádné známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dva psi, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci, a kteří nemají protilátky proti viru parainfluenzy psů. Doporučeným způsobem se každému psovi podá deset dávek vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcině.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PARAMYXOVIRIS 3 AVIARII INACTIVATUM

6.0:1392

### Vakcína proti ptačímu paramyxoviru 3 inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen ptačího paramyxoviru 3 inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k ochraně krůt proti poklesu snášky a snížení jakosti vajec.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných vejících nebo v buněčných kulturách. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných vejících, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

## 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro všechny kategorie krůt, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-4-1).

**2-4-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují. V každém případě se použijí krůty nejnižšího doporučeného stáří. Každé krůtě se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použijí dvě skupiny po nejméně dvaceti krůtách, které nemají protilátky proti ptačímu paramyxoviru 3. Jedna skupina se vakcinuje podle doporučeného schématu uvedeného na obalu, druhá skupina se ponechá jako kontroly.

Zkoušku lze hodnotit, pokud se ve vzorcích sér odebraných v době první vakcinace neprokáže přítomnost protilátek proti ptačímu paramyxoviru 3 buď u vakcinovaných krůt nebo u kontrol, nebo pokud v době čelenže se přítomnost těchto protilátek neprokáže u kontrol.

V době vrcholící snášky vajec se obě skupiny čelenují okulonazálně dostatečným množstvím virulentního kmene ptačího paramyxoviru 3. Po dobu nejméně 6 týdnů po čelenži se zaznamenávají týdenní snášky v každé skupině a rozlišují se normální a abnormální vejce. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže produkce a jakost vajec ve vakcinované skupině je významně lepší než v kontrolní skupině.

## 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede v embryonovaných vejcích nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), podle toho, co je pro daný vakcinační kmen nejcitlivější. Množství inaktivované sklízně viru, použité ve zkoušce, odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-5-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti ptačímu paramyxoviru 3, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použije se deset krůt 14 až 28 dnů starých, které nemají protilátky proti ptačímu paramyxoviru 3.

Doporučeným způsobem se každé krůtě podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede pro potvrzení inaktivace ptačího paramyxoviru 3.

Do alantoidní dutiny každého z nejméně deseti kuřecích embryí z SPF chovu (5.2.2) 9 až 11 dnů starých se inokuluje po dvou pětinách dávky a inkubují se. Pozorují se 6 dnů a odděleně se shromáždí alantoidní tekutina z vajec obsahujících živá embrya a z vajec obsahujících mrtvá embrya, kromě těch, která uhynula do 24 h po injekci. Embrya, která uhynula do 24 h po injekci, se vyšetří na přítomnost ptačího paramyxoviru 3.

Pokud se ptačí paramyxovirus 3 zjistí, vakcína nevyhovuje zkoušce.

Do alantoidní dutiny každého z nejméně deseti 9 až 11 dnů starých SPF kuřecích embryí (5.2.2) se inokuluje 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z vajec se živými embryi a do každého z dalších deseti podobných embryí po 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z vajec s uhynulými embryi a inkubuje se 5 až 6 dnů. Alantoidní tekutina z každého vejce se zkouší na hemaglutinační aktivitu za použití kuřecích erytrocytů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí známky hemaglutinační aktivity a jestliže neuhyne více než 20 % embryí v některém stadiu. Pokud v jednom stadiu uhne více než 20 % embryí, toto stadium se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí známky hemaglutinační aktivity a jestliže neuhyne více než 20 % embryí v této etapě.

K prevenci bakteriální kontaminace se mohou ve zkoušce použít antibiotika.

**3-5 Cizí agens.** Použije se deset kuřat, 14 až 28 dnů starých z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2). Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Za 3 týdny se každému kuřeti stejným způsobem podá ještě jedna dávka. Za další 2 týdny se odeberou vzorky sér od každého kuřete a metodami předepsanými v obecné stati *Chovy kuřat prosté specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín* (5.2.2) se provedou zkoušky na přítomnost protilátek proti následujícím agens: virus encefalomyelitidy ptáků, virus infekční bronchitidy ptáků, viry ptačí leukózy, virus syndromu poklesu snášky vajec, virus burzitidy ptáků, virus infekční laryngotracheitidy ptáků, virus chřipky A, virus Markovy choroby. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek proti těmto agens.

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-4-1 Imunogenita.

## VACCINUM PARVOVIROSIS CANINAE INACTIVATUM

6.0:0795

### Vakcína proti parvoviróze psů inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen psiho parvoviru inaktivovaného tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti parvoviróze psů.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Sklizeň viru se inaktivuje. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určena.

Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-3-1).

2-3-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího doporučeného stáří. Každému psovi se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně sedm psů, kteří nemají protilátky proti psímu parvoviru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět psů. Nejméně dva psi se ponechají jako kontroly. Za 20 až 22 dnů se každý pes čelenžuje oronazálně dostatečným množstvím suspenze patogenního psiho parvoviru. Psi se pozorují nejméně denně 14 dnů po čelenži. Na konci pozorovacího období se provedou hemaglutinační zkoušky na přítomnost a titer viru ve výkalech.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všichni kontrolní psi mají zřetelné příznaky onemocnění nebo leukopenii a vylučují virus. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže všichni vakcinovaní psi přežijí a nemají příznaky onemocnění ani leukopenii a jestliže maximální titer viru vyloučeného výkaly je menší než 1/100 geometrického průměru maximálních titerů zjištěných u kontrol.

##### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede u nerozplněné sklizně každé šarže, aby se potvrdila inaktivace psiho parvoviru. Množství inaktivované sklizně viru použitého ve zkoušce odpovídá nejméně 100 dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru se inokuluje na vhodnou nesplyvající buněčnou kulturu; po osmidenní inkubaci se trypsinizací připraví subkultura. Po inkubaci dalších osm dnů se kultury vyšetří imunofluorescenční zkouškou na zbytkový živý parvovirus. Imunofluorescenční zkouška se může doplnit hemaglutinační zkouškou nebo jinou vhodnou zkouškou se supernatantní tekutinou buněč-

ných kultur. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti psímu parvoviru, vakcína vyvolá tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost.** Použijí se dva psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají protilátky proti psímu parvoviru nebo, kde je to zdůvodněné, s nízkou hladinou těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinováni proti psímu parvoviru, a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každému psovi podá dvojnásobná dávka vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Provede se zkouška 3-4-1 nebo 3-4-2.

3-4-1 **Zkouška na hemaglutinaci inhibující protilátky na morčatech.** Pro zkoušku se použije nejméně pět morčat, která nemají specifické protilátky. Každému morčeti se subkutánně podá polovina doporučené dávky. Po 14 dnech se opět podá polovina doporučené dávky. Za dalších 14 dnů se odeberou vzorky krve a oddělí se sérum. Každé sérum se 30 min inaktivuje zahřátím na 56 °C. K jednomu objemovému dílu každého séra se přidá devět objemových dílů suspenze kaolinu lehkého R (200 g/l) v tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným o pH 7,4. Každá směs se protřepává 20 min. Po odstředění se oddělí supernatantní tekutina a smíchá se s jedním objemovým dílem koncentrované suspenze prasečích erytrocytů. Nechá se stát 60 min při 4 °C a odstředí se. Ředění séra získané tímto postupem je 1 : 10. Každé sérum se dále ředí dvojnásobnou řadou. K 0,025 ml každého tohoto ředění se přidá 0,025 ml suspenze antigenu psiho parvoviru obsahující čtyři hemaglutinační jednotky. Nechá se stát 30 min při 37 °C, potom se přidá 0,05 ml suspenze prasečích erytrocytů obsahující 30 · 10<sup>6</sup> buněk v mililitru. Nechá se stát 90 min při 4 °C a zaznamená se poslední ředění séra, které ještě úplně inhibuje hemaglutinaci. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže střední hodnota titru v sérech odebraných po druhé vakcinaci je nejméně 1/80.

3-4-2 **Zkouška na virus neutralizující protilátky na psech.** Pro zkoušku se použijí nejméně dva zdraví psi 8 až 12 týdnů staří, kteří mají titer protilátek nižší než 4 ND<sub>50</sub> v 0,1 ml séra, při stanovení dále popsanou metodou. Každý pes se vakcinuje podle doporučeného schématu. Za 14 dnů po vakcinaci se sérum každého psa vyšetří následujícím způsobem. Sérum se 30 min zahřívá při 56 °C a připraví se sériová ředění v médiu vhodném pro psí buňky. Ke každému ředění se přidá stejný objem virové suspenze obsahující takové množství viru, že když se objem směsi séra a viru vhodný pro zkušební systém inokuluje do buněčných kul-

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

tur, je v každé kultuře asi  $10^4$  CCID<sub>50</sub>. Směsi se 1 h inkubují při 37 °C a potom se do čtyř kultur psích buněk inokuluje vhodný objem každé směsi. Buněčné kultury se 7 dnů inkubují při 37 °C. Potom se provede pasáž a subkultury se inkubují dalších 7 dnů. Kultury se vyšetří na specifické cytopatické efekty a stanoví se titr protilátky.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titr je nejméně 32 ND<sub>50</sub> v 0,1 ml séra. Jestliže jeden pes nejeví vzestup protilátek, opakuje se zkouška na dalších dvou psech a výsledek se stanoví z průměrného titru protilátek získaného u všech tří psů, kteří měli protilátkovou odpověď.

## VACCINUM PARVOVIROSIS CANINAE VIVUM

6.0:0964

### Vakcína proti parvoviróze psů živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen psího parvoviru. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci psů proti parvoviróze psů.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro psy, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího doporučeného stáří. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

**2-3-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně pět psů, kteří nemají hemaglutinaci inhibující protilátky proti psímu parvoviru. Počet leukocytů v cirkulující krvi se stanoví 4 a 2 dny před injekčním podáním a v den podání vakcinačního kmene. Každému psovi se doporučeným způsobem podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Počet leukocytů v cirkulující krvi se stanoví třetí, pátý, sedmý a desátý den po podání.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže pokles cirkulujících leukocytů nepřekročí 50 % původního počtu, který je průměrem tří hodnot zjištěných před podáním vakcinačního kmene. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá

abnormální místní nebo celkové reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-2 Účinky na brzlík.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset psů, kteří nemají hemaglutinaci inhibující protilátky proti psímu parvoviru. Každému z nejméně pěti psů se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku nejvyššího titru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Nejméně pět psů se ponechá jako kontroly. Psi se pozorují nejméně denně. Za 14 dnů se dva psi z každé skupiny šetrně utratí a zbývající tři z každé skupiny se šetrně utratí za 21 dnů. Provede se histologické vyšetření brzlíku všech psů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže po 14 dnech je zřejmá nejvýše mírná hypoplazie brzlíku a po 21 dnech není zjevně žádné poškození.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny dvěma psům nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají hemaglutinaci inhibující protilátky proti psímu parvoviru, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Doporučeným způsobem se každému psovi podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Od druhého do desátého dne po podání viru se denně odebírají výkaly od každého psa a vyšetří se na přítomnost viru. Výkaly obsahující virus se spojí.

1 ml suspenze směsného vzorku výkalů se podá oronálně každému ze dvou dalších psů stejného stáří. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. V úvahu se vezmou zejména počty leukocytů, výsledky histologického vyšetření brzlíku a titr vyloučeného viru.

Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému psovi je nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejméně atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně sedm psů, kteří nemají hemaglutinaci inhibující protilátky proti psímu parvoviru. Vakcinuje se nejméně pět psů. Nejméně dva psi se ponechají jako kontroly. Za 20 až 22 dnů se každý pes čelenžuje

oronazálně dostatečným množstvím suspenze virulentního psího parvoviru. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů po čelenži. Na konci pozorovacího období se provede hemaglutinační zkouška na přítomnost a titer viru ve výkalech. Zkoušku lze hodnotit, jestliže všichni kontrolní psi mají typické příznaky onemocnění a/nebo leukopenii a vylučují virus. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže všichni vakcinovaní psi přežijí a nemají žádné příznaky onemocnění ani leukopenii a jestliže maximální titer viru vyloučeného ve výkalech je nižší než 1/100 geometrického průměru maximálních titerů zjištěných u kontrol.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína se kultivuje v citlivé buněčné linii v substrátu vhodném pro imunofluorescenční nebo pro imunoperoxidasovou zkoušku. Zařadí se vhodné kontroly. Část buněk se vyšetří monoklonální protilátkou specifickou pro psí parvovirus a část buněk monoklonální protilátkou specifickou pro kočičí parvovirus. V buňkách inokulovaných vakcínou se zjistí antigen psího parvoviru, ale kočičí parvovirus se nezjistí.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti psímu parvoviru a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro psa. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemaglutinujících nebo hemadsorbujících agens ani jiné známky přítomnosti cizích virů.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dva psi nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, kteří nemají hemaglutinaci inhibující protilátky proti psímu parvoviru. Doporučeným způsobem se každému psovi podá deset dávek vakcíny. Psi se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pes nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do vhodných buněčných kultur. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje ne méně než minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titer viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PARVOVIROSIS INACTIVATUM AD SUEM

6.0:0965

### Vakcína proti parvoviroze prasat inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující buď vhodný kmen parvoviru prasat, inaktivovaný tak, že je zachována přiměřená imunogenita, nebo neinfekční frakci tohoto viru. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasnic a prasniček pro ochranu jejich potomstva proti transplacentární infekci.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Suspenze viru se sklídí, virus se inaktivuje vhodnou metodou, může se rozštěpit (může se inaktivovat rozštěpením). Virus nebo virové frakce se mohou purifikovat a koncentrovat ve vhodném stupni výrobního postupu. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) (včetně toho, že nemá nežádoucí vlivy na plodnost, březost, průběh porodu nebo potomstvo) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1) a Imunogenita (odstavec 2-3-2).

##### 2-3-1 Bezpečnost

**2-3-1-1 Laboratorní zkoušky.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci a, kde je to vhodné, na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena.

Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

**2-3-1-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset prasat, která nemají protilátky proti prasečímu parvoviru nebo proti frakci tohoto viru. Každému praseti se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále jedna dávka za 14 dnů. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže během 28 dnů zkoušky nemá žádné prase zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-3-1-1-2 Bezpečnost na březích prasnicích.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích prasnic, použije se pro zkoušku nejméně deset březích prasnic ve stadiu nebo různých stadiích březosti podle doporučeného schématu. Každé prasnici se podá dvojnásobná dávka vakcíny a ještě jed-

na dávka za 14 dnů. Prasnice se pozorují nejméně denně až do porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná prasnice nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a jestliže se nezjistí žádné nežádoucí vlivy na březost nebo potomstvo.

2-3-1-1-3 Bezpečnost na prasatech použitých ve zkoušce na imunogenitu (odstavec 2-3-2). Prasata použitá ve zkoušce na imunogenitu se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. U každého vakcinovaného prasete se zaznamená rektální teplota při vakcinaci a za 24 h a 48 h po ní. Po vakcinaci a při porážce se vyšetří místo injekčního podání na místní reakce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- abnormální tělesnou teplotu;
- jiné celkové reakce (např. anorexii);
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-1-2 *Terénní studie*. Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena (prasnice, prasničky). Použijí se nejméně tři skupiny, každá po nejméně dvaceti prasatech, s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Rektální teplota se zaznamená při vakcinaci a za 24 h a 48 h po vakcinaci. Po vakcinaci a při porážce se vyšetří místo injekčního podání na místní reakce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá:

- abnormální tělesnou teplotu;
- abnormální místní reakce, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-2 **Imunogenita**. Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí prasničky 5 až 6 měsíců staré. Každé prasničce se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvanáct prasniček, které nemají protilátky proti parvoviru prasat nebo proti frakci tohoto viru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně sedm prasniček. Nejméně pět nevakcinovaných prasniček stejného stáří se ponechá jako kontroly. Interval mezi vakcinací a připouštěním je podle doporučeného schématu. Okamžitě po projevu příznaků říje se prasničky připouštějí dva po sobě následující dny. Kolem čtyřicátého dne březosti se všechny prasničky čelenují vhodným množstvím virulentního kmene parvoviru prasat. Prasničky se asi v devadesátém dnu březosti šetrně utratí a jejich plody se vyšetří na infekci parvovirem prasat. Prokazuje se buď přítomnost viru, nebo protilátek.

Zkoušku lze hodnotit jestliže:

- bylo čelenužováno nejméně sedm vakcinovaných a pět kontrolních prasniček;
- infikováno je nejméně 90 % selat kontrolní skupiny;
- průměrný počet selat na jeden vrh od vakcinovaných prasniček je nejméně šest.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % z celkového počtu selat vakcinovaných prasniček je chráněno proti infekci.

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus**. Zkouška na zbytkový živý virus se provede u každé šarže antigenu těsně po inaktivaci. Množství inaktivované sklizeň viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně sto dávkám vakcíny. Nerozplněná sklizeň se inokuluje na vhodnou nesplyvající kulturu buněk; po sedmidenní inkubaci se trypsinizací připraví subkultura. Po další sedmidenní inkubaci se kultury vyšetří imunofluorescenční zkouškou na zbytkový živý parvovirus. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Zkouška účinnosti šarže**. Zkoušku na účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se vhodná validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně pět morčat, 5 až 7 týdnů starých, která nemají protilátky proti parvoviru prasat nebo proti frakci tohoto viru. Každé morče se vakcinuje subkutánně jednou čtvrtinou předepsaného objemu dávky. V době odpovídající maximální tvorbě protilátek se odeberou vzorky krve a provedou se zkoušky se sérem na specifické protilátky hemaglutinačně-inhibiční zkouškou nebo jinou vhodnou zkouškou.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladina protilátek není nižší než hladina získaná se šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci 3-6 Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost**. Po injekčním podání jednou nebo, je-li to nutné, vícekrát zvířatům, která nemají specifické protilátky proti parvoviru prasat nebo frakci tohoto viru použitým k přípravě vakcíny, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace**. Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Bezpečnost**. Použijí se dvě prasata 6 týdnů až 6 měsíců stará, která nemají protilátky proti parvoviru prasat nebo frakci tohoto viru. Doporučeným způsobem se každému prasati podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále jedna dávka za 14 dnů. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Zbytkový živý virus**. Použije se množství vakcíny odpovídající deseti dávkám. Jestliže vakcína obsahuje olejové adjuvans, emulze se rozloží a fáze se oddělí. Jestliže vakcína obsahuje minerální adjuvans, provede se eluce k uvolnění viru. Virová suspenze se stokrát koncentruje ultrafiltrací nebo ultracentrifugací. Žádný z výše uvedených postupů nesmí inaktivovat nebo jinak bránit detekci živého viru. Provede se zkouška na zbytkový živý virus na vhod-

ných nesplyvajících buňkách. Po sedmidenní inkubaci se po trypsinizaci připraví subkultura a po další sedmidenní inkubaci se kultury vyšetří na zbytkový živý parvovirus imuno-fluorescenční zkouškou. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**3-5 Cizí agens.** U prasat použitých ve zkoušce na bezpečnost se provede vyšetření na protilátky. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nevyvolá tvorbu protilátek, kromě těch proti parvoviru prasat, proti jiným virům patogenním pro prasata nebo proti virům, které mohou bránit diagnostice infekcí prasat (včetně virů skupiny pestivirů).

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM PASTEURILLAE INACTIVATUM AD OVEM

6.0:2072

Vakcína proti pasteurelóze pro ovce inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Pasteurella trehalosi*, inaktivovaných tak, že je zachována přiměřená imunogenita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci ovcí proti onemocnění vyvolanému *P. trehalosi*.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně a totožnost se ověří vhodnou metodou. Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako je rychlost růstu; hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro daný výrobek. U sklizně se vhodnými metodami ověří čistota a totožnost. Po pomnožení se bakteriální suspenze odděleně shromáždí a vhodnou metodou se inaktivují. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Výběr složení a kmenů, které mají být ve vakcíně obsaženy, závisí na epidemiologických údajích o výskytu různých sérovarů *P. trehalosi*.

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ovce, pro které je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

#### 2-2-1 Bezpečnost

**2-2-1-1 Laboratorní zkoušky.** Zkoušky se provedou pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci na ovčích každé kategorie (například mladé ovce, březí ovce), pro kterou je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny s ne méně než maximální účinností, která se může očekávat v šarži vakcíny.

**2-2-1-1-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně deset ovcí, přednostně těch, které nemají protilátky proti sérovarům *P. trehalosi* nebo proti leukotoxinu přítomnému ve vakcíně. Kde je to zdůvodněné, mohou se použít ovce, které nebyly vakcinované proti pasteurelóze a které mají nízké titry protilátky (zjišťované citlivým vyšetřovacím systémem, jako je enzymově imunosorbentové stanovení ELISA). Každé ovci se podá dvojnásobná dávka vakcíny a po doporučeném intervalu ještě jedna dávka vakcíny. Ovce se pozorují nejméně denně po nejméně 14 dnů po posledním podání. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny; u každé ovce se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá abnormální místní reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a jestliže průměrný vzestup teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C a u žádné ovce není vzestup vyšší než 2 °C.

**2-2-1-1-2 Bezpečnost na březích ovcích.** Pokud je vakcína určena pro použití nebo se může použít u březích ovcí, použije se nejméně deset březích ovcí v příslušných stadiích březosti. Každé ovci se podá dvojnásobná dávka vakcíny a po doporučeném intervalu ještě jedna dávka vakcíny. Ovce se pozorují nejméně denně až do prvního dne po porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, za 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 4 dny, u každé ovce se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádná ovce nemá abnormální místní reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C a u žádné ovce není vzestup vyšší než 2 °C;
- nezaznamenají se žádné nežádoucí vlivy na březost a potomstvo.

**2-2-1-2 Terénní studie.** Ovce použité v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na každé kategorii ovcí, pro kterou je vakcína určena. Použijí se nejméně tři skupiny po dvaceti ovcích, s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol ve třech různých lokalitách. Místa vpichu se vyšetří na místní reakce po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci a 2 dny následující po vakcinaci.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá abnormální místní nebo celkové reakce, zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Vzestup průměrné tělesné teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C a u žádné ovce není vzestup vyšší než 2 °C. Navíc, jestliže je vakcína určena pro použití u březích ovcí, nezaznamenají se žádné nežádoucí vlivy na březost a potomstvo.

**2-2-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý sérovar *P. trehalosi*, proti kterému se v označení na obalu uvádí ochrana.

Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí jehňata nejnižšího



stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému jehněti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně dvacet jehňat, která nemají protilátky proti *P. trehalosi* a proti leukotoxinu *P. trehalosi*. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset jehňat. Nejméně deset jehňat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů po poslední vakcinaci se všechna jehňata čelenžují subkutánně nebo jiným vhodným způsobem, dostatečným množstvím virulentního kmene sérovaru *P. trehalosi* v nízké pasáži. Jehňata se pozorují dalších 7 dnů; aby se předešlo zbytečnému utrpení, těžce nemocná jehňata se šetrně utratí a považují se za uhynulá v důsledku onemocnění. Během pozorovacího období se zvířata vyšetří na jakékoliv příznaky onemocnění (např. silná otupělost, nadměrné slinění) a zaznamená se mortalita. Na konci pozorovacího období se přežívající jehňata šetrně utratí. Všechna jehňata, která uhynula a ta, která byla utracena na konci pozorovacího období, se vyšetří pitvou. Plíce, pohrudnice, játra a slezina se vyšetří na krváceniny a vyhodnotí se rozsah konsolidace plic v důsledku pasteurelózy. Odeberou se vzorky tkáně plic, jater a sleziny pro reizolaci čelenžních mikroorganismů. Spočítá se bodová hodnota (skóre) mortality, klinických nálezů a postmortálních lézí a výsledky získané pro tyto parametry i výsledky reizolace bakterií u obou skupin se porovnají.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se klinické příznaky nebo léze způsobené infekcí *P. trehalosi* vyskytují u méně než 70 % kontrolních jehňat. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže je významný rozdíl mezi bodovou hodnotou (skóre) klinických a postmortálních nálezů u vakcinovaných zvířat ve srovnání s kontrolami. Výsledky rozsahu postižení pro daný sérovar jsou významně lepší u vakcinovaných zvířat při srovnání s kontrolami. U vakcín, u kterých se uvádí zlepšující se účinek na rozsah infekce příslušným sérovarem, jsou také výsledky významně lepší u vakcinovaných zvířat při srovnání s kontrolami.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria přijatelnosti se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

**2-3-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provádí u šarže nebo, kde povaha adjuvans brání provedení zkoušky, u várky antigenu, nebo směsí várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je to, které se zjistilo u šarže vakcíny, která vyhověla zkoušce na bezpečnost 2-2-1-1 uvedené v části Výběr složení vakcíny, nebo zkoušce na bezpečnost 3-3 uvedené v části Zkoušení šarže, provedené s deseti ovcemi. Kde se použije poslední uvedená zkouška, zaznamená se u každé ovce maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup tělesné teploty u všech ovcí nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny použítá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinu se následně použije pro zkoušení každé šarže.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína injekčně podaná zvířatům, která nemají specifické protilátky proti sérovarům *P. trehalosi* a/nebo leukotoxinu přítomnému ve vakcíně, vyvolá tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě ovce nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci nebo, jestliže nejsou k dispozici, které se co nejvíce blíží nejnižšímu doporučenému stáří a které nebyly vakcinované proti pasteurelóze. Každé ovci se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ovce se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 hodin po vakcinaci a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ovce nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM PESTIS ANATIS VIVUM

6.0:1938

### Vakcína proti moru kachen živá

*Synonyma.* Vaccinum enteritis anatis vivum, Vakcína proti virové enteritidě kachen živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru moru kachen (anatidní herpesvirus 1). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci kachen.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Vakcína může být lyofilizovaná.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

## 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

## 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kachny, pro které je vakcína určena.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

2-4-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kachny toho druhu, který se považuje za nejméně nebezpečnější z těch, pro které se vakcína doporučuje, a které nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus nejméně atenuované pasáže, která je přítomná v šarži vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet vnímavých kachen, které nemají protilátky proti viru moru kachen. Každé kachně se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kachny se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, pokud více než 10 % kachen uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kachna nemá zřetelné příznaky moru kachen nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-4-2 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti domácích kachen, které nemají protilátky proti viru moru kachen a jsou ve stáří vhodném pro pomnožení viru; postupným pasážováním, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách kachen ve stáří vhodném pro pomnožení viru a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru dovolují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence.

Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Doporučeným způsobem se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Za 2 až 4 dny se každé kachně odeberou vzorky jater a sleziny a všechny vzorky se spojí. Každé z pěti dalších domácích kachen stejného věku, které nemají protilátky proti viru moru kachen, se podá 0,1 ml směsné suspenze oronazálně nebo parenterálně. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného vakcinačního viru, který se získá. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení

virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

2-4-3 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny. V každém případě se použijí domácí kachny, které nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každé kachně není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně třicet kachen stejného původu, které nemají protilátky proti viru moru kachen. Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kachen. Nejméně deset kachen se ponechá jako kontroly. Za 5 dnů se každá kachna čelenuje vhodným způsobem dostatečným množstvím virulentního viru moru kachen. Kachny se pozorují denně nejméně 14 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kachen, které mají klinické příznaky onemocnění. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže během pozorovacího období po čelení méně než 80 % kontrolních kachen uhynie nebo má typické příznaky moru kachen a/nebo jestliže během období mezi vakcinací a čelení více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kachen má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení nejméně 80 % vakcinovaných kachen přežije a nejeví žádné zřetelné klinické příznaky moru kachen.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína, podle potřeby zředěná a smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru moru kachen, nadále neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2) nebo vnímavé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

3-5 **Bezpečnost.** Použije se nejméně deset domácích kachen, které nemají protilátky proti viru moru kachen a nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Doporučeným způsobem a doporučenou metodou se každé kachně podá deset dávek vakcíny v objemu vhodném pro zkoušku. Kachny se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kachen má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kachna nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titř viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje zkoušce předepsané v odstavci 2-4-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PESTIS CLASSICAE SUILLAE VIVUM EX CELLULIS

6.2:0065

Vakcína proti klasickému moru prasat  
(živá, připravená v buněčných kulturách)

*Synonyma.* Vaccinum pestis classicae suillae vivum cryodesiccatum, Vakcína proti klasickému moru prasat živá lyofilizovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující kmen viru klasického moru prasat, který ztratil svou patogenitu pro prase pasážováním *in vivo* nebo *in vitro* a byl adaptovaný pro kultivaci v buněčných kulturách.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prase, pro které je určen. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost na selatech (odstavec 2-3-1), Bezpečnost na březích prasnicích a transplacentální přenos (odstavec 2-3-2), Nepřenosnost (odstavec 2-3-3), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-4) a Imunogenita (odstavec 2-3-5).

2-3-1 **Bezpečnost na selatech.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob podání. V každém případě se použijí selata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny. Použije se nejméně deset zdravých selat bez protilátek proti pestivirům. Nejméně deseti selatům se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Selata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Tělesná teplota každého vakcinovaného selete se zaznamenává nejméně po 3 dny před vakcinací, při vakcinaci, 4 hodiny po vakcinaci a dále denně po nejméně 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup teploty u všech selat nepřekročí 1,5 °C a u žádného selete není vzestup teploty vyšší než 1,5 °C po dobu delší než 3 dny a žádné sele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-2 **Bezpečnost na březích prasnicích a transplacentální přenos.** Zkouška se provede doporučeným způsobem za použití nejméně deseti zdravých prasnic nebo prasniček stejného stáří a původu, mezi 55. a 80. dnem březosti, které nemají protilátky proti pestivirům. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny.

Nejméně deseti prasnicím nebo prasničkám se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Tělesná teplota se zaznamenává nejméně po 3 dny před vakcinací, při vakcinaci, za 4 h po vakcinaci a dále denně po nejméně 15 dnů. Pozorování se provádí až do porodu.

Provedou se zkoušky na protilátky v séru proti klasickému viru moru prasat. V sérech odebraných novorozeným selatům před požitím mleziva se nezjistí žádné protilátky proti klasickému viru moru prasat. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže vakcinované prasnice nesérokonvertují. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže nejsou zaznamenány žádné abnormality během březosti nebo u selat, u žádných prasnic nebo prasničky není zaznamenán vzestup teploty vyšší než 1,5 °C po období přesahující 5 dnů a žádná prasnice nebo prasnička nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-3-3 **Nepřenosnost.** Pro zkoušku se drží pohromadě nejméně dvanáct zdravých selat 6 až 10 týdnů starých a stejného původu, která nemají protilátky proti pestivirům. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Doporučeným způsobem se nejméně šesti selatům podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně maximálnímu titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Nejméně šest selat se ponechá jako kontaktní kontroly. Sloučení vakcinovaných selat s kontaktními selaty se provede za 24 hodin po vakcinaci.

Po 45 dnech se šetrně utratí všechna selata. U selat se provedou vhodné zkoušky na zjištění protilátek proti viru klasického moru prasat. U kontrolních selat se provedou vhodné zkoušky na zjištění viru klasického moru prasat v mandlích. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se protilátky zjisti u všech vakcinovaných selat a jestliže se žádné protilátky a žádný virus nezjistí u kontrolních selat.

2-3-4 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, selatům, která nemají protilátky proti pestivirům. Každému ze dvou zdravých selat starých 6 až 10 týdnů se doporučeným způsobem podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně maximálnímu titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Přiměřené množství

krve se odebere každému seleti denně mezi druhým a sedmým dnem po podání vakcinačního viru a vzorky odebrané ve stejný den se spojí. 2 ml směsného vzorku krve s nejvyšším titrem viru se doporučeným způsobem podají každému ze dvou dalších selat stejného stáří a původu. Jestliže se nezjistí žádný virus, zkouška se opakuje ještě jednou se dvěma dalšími selaty. Jestliže se virus zjistí, provede se druhá řada pasáží podáním 2 ml pozitivní krve doporučeným způsobem každému ze dvou dalších selat stejného stáří a původu. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

### 2-3-5 Imunogenita

2-3-5-1 *Ochranná dávka.* Účinek vakcíny se vyjádří počtem 50 % ochranných dávek ( $PD_{50}$ ) pro prasata obsažených v dávce vakcíny, jak se uvádí v označení na obalu. Vakcína obsahuje nejméně 100  $PD_{50}$  v dávce.

Použije se jedna nebo více skupin selat starých 6 až 10 týdnů, která nemají protilátky proti pestivirům, další skupina selat stejného stáří a původu se použije jako kontrolní. Každá skupina selat se vakcinuje jedním ředěním dávky vakcíny. 14 dnů po jedné injekci vakcíny se selata čelenžují vhodným způsobem vhodným kmenem virulentního viru a dávkou, která zabije nejméně 50 % nevakcinovaných selat v méně než 21 dnech. Selata se pozorují po 21 dnů. Tělesná teplota se zaznamenává po 3 dny před čelenžím a po čelenžím denně po 21 dnů.  $PD_{50}$  se vypočítá obvyklými statistickými metodami (například 5.3). V úvahu se vezmou přežívající selata, která nemají žádné klinické příznaky moru prasat, včetně kožních lézí a zvýšené tělesné teploty.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže méně než 50 % kontrolních selat má typické příznaky vážné infekce virem moru prasat, včetně kožních lézí nebo úhynu a pokud méně než 100 % kontrolních selat má klinické příznaky onemocnění do 21 dnů po čelenžím. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže minimální dávka uvedená v označení na obalu odpovídá nejméně 100  $PD_{50}$ .

2-3-5-2 *Ochrana proti transplacentální infekci.* Použije se osm prasnic, které nemají protilátky proti pestivirům, námtkově rozdělených buď do vakcinované skupiny ( $n = 6$ ), nebo kontrolní skupiny ( $n = 2$ ).

Mezi 40. a 50. dnem březosti se všechny prasnice vakcinované skupiny vakcinují jedenkrát jednou dávkou vakcíny obsahující nejméně minimální titr uvedený v označení na obalu. Šedesátý den březosti se všechny prasnice čelenžují doporučeným způsobem vhodným kmenem virulentního viru. Těsně před porodem a přibližně 5 až 6 týdnů po čelenžím se prasnice šetrně utratí a jejich plody se vyšetří na přítomnost viru klasického moru prasat. Vzorky séra prasnic

a plodů se vyšetří na přítomnost protilátek proti viru klasického moru prasat. Izolace viru klasického moru prasat se provede z krve prasnic odebrané 7. a 9. den po čelenžím a při usmrcení a ze zhomogenizovaného materiálu orgánů (slezina, ledviny, mízní uzliny) plodů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže jedna nebo více vakcinovaných prasnic nesérokonvertuje po vakcinaci a kontrolní prasnice nesérokonvertují po čelenžím nebo pokud se žádný virus nezjistí u více než 50 % plodů kontrolních prasnic (s výjimkou mumifikovaných plodů).

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se žádný virus nezjistí v krvi vakcinovaných prasnic a v plodech vakcinovaných prasnic a žádné protilátky proti viru klasického moru prasat se nezjistí v séru plodů vakcinovaných prasnic.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** K identifikaci vakcinačního kmene se použijí specifické monoklonální protilátky proti klasickému moru prasat.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

3-3 **Mykoplazmata (2.6.7).** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

3-4 **Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje za použití monoklonálních protilátek proti vakcinačnímu viru. Inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro prasata a k pestivirům. Kultury se udržují po nejméně 14 dnů a během tohoto období se provedou nejméně tři pasáže. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

Použijí se monoklonální protilátky, které mohou určit možnou kontaminaci pestiviry. Vhodnou metodou se nezjistí žádný virus.

3-5 **Bezpečnost.** Použijí se dvě zdravá selata stará 6 až 10 týdnů, která nemají protilátky proti pestivirům. Každému seleti se doporučeným způsobem podá deset dávek vakcíny. Selata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titř viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje ne méně než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky předepsané v odstavci 2-3-5 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží za použití vakcinační dávky obsahující nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM PNEUMONIAE ENZOOTICAE SUILLAE INACTIVATUM

6.5:2448

### Vakcína proti enzootické pneumonii prasat inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen *Mycoplasma hyopneumoniae* inaktivovaný tak, že jsou zachovány přiměřené imunogenní vlastnosti. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasat proti enzootické pneumonii způsobené *M. hyopneumoniae*.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Inokulum se pomnožuje ve vhodné pevné a/nebo tekuté živné půdě, aby se zajistil optimální růst za zvolených inkubačních podmínek. Totožnost kmene se ověřuje vhodnou metodou.

Během výroby se vhodnými metodami sledují různé parametry, jako růstová křivka; zjištěné hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu. U sklizně se vhodnou metodou ověří čistota.

Po pomnožení se suspenze mykoplazmat shromáždí a vhodnou metodou se inaktivuje. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasata, pro která je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít následující zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

##### 2-2-1 Bezpečnost.

2-2-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci, a u každé kategorie zvířat, pro kterou je vakcína určena. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

2-2-1-1-1 *Obecná bezpečnost.* Pro každou zkoušku se použije nejméně deset prasat, která nemají protilátky proti *M. hyopneumoniae*. Každému prasati se podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále, kde je to vhodné, jedna dávka po doporučeném intervalu. Prasata se pozorují nejméně denně do 14 dnů po posledním podání, zda se neobjeví příznaky abnormálních místních nebo celkových reakcí. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 4 h po ní a potom denně po 4 dny; pro každé prase se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a zejména, jestliže průměrná tělesná teplota nepřevyšuje v všech prasat 1,5 °C a u žádného prasete není vzestup teploty vyšší než 2 °C.

2-2-1-2 *Terénní studie.* Zvířata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provede na každé kategorii prasat, pro kterou je vakcína určena. Použijí se nejméně tři skupiny, každá po nejméně

dvaceti zvířatech, s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Místo podání se vyšetří na místní reakce po vakcinaci. Zaznamená se tělesná teplota den před vakcinací, při vakcinaci, v časovém intervalu, po kterém byl ve zkoušce 2-2-1-1 zjištěn vzestup teploty, pokud k němu došlo, a denně po dobu 2 dnů následujících po vakcinaci; zaznamená se maximální vzestup teploty pro každé zvíře.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- žádné zvíře nemá zjistitelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně;
- průměrný vzestup tělesné teploty všech zvířat nepřevyšil 1,5 °C;
- u žádného zvířete se tělesná teplota nezvýšila o více než 2 °C.

2-2-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání, v každém případě u prasat, která nejsou starší než je minimální věk doporučený pro vakcinaci. Každému prasati se podá vakcína, která má minimální účinnost. Použije se nejméně dvacet prasat, která nemají protilátky proti *M. hyopneumoniae* a která jsou ze stáda nebo stád, kde nejsou žádné příznaky enzootické pneumonie a která nebyla proti *M. hyopneumoniae* vakcinována. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně dvanáct prasat. Nejméně osm nevakcinovaných prasat se ponechá jako kontroly. Každé prase se čelenžuje nejméně 14 dnů po poslední vakcinaci intranazálně nebo intratracheálně nebo aerosolem dostatečným množstvím virulentního kmene *M. hyopneumoniae*. Použitý čelenžní kmen je jiný než vakcinační kmen. Za 21 až 30 dnů po čelenži se prasata šetrně utratí. U každého prasete se provede postmortální vyšetření, aby se vyhodnotil rozsah plicních změn pomocí validovaného systému hodnocení plicních lézí přízpusobného určité věkové skupině zvířat. Může se použít následující bodový systém (skóre).

Bodová hodnota (skóre) se připíše každému ze sedmi laloků plic, podle poměrné hmotnosti plicních laloků.

Laloky	Levý	Pravý
apikální	5	11
kardiální	6	10
diafragmatický	29	34
intermediální	5	

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaná prasata ve srovnání s kontrolami mají signifikantní snížení bodové hodnoty (skóre) plicních změn.

##### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku účinnosti (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena u šarže vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Stanovení množství antigenu (tj. zkouška *in vitro* za použití referenční vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost), společně se zkouškou stanovení množství adjuvans, se může použít jako alternativní metoda za předpokladu, že

změřený antigen je prokazatelně ochranný a/nebo imunologicky závažný.

Alternativně se může použít zkouška měřící indukcii protilátkové odpovědi na laboratorních zvířatech. Následující metoda je uvedena jako příklad.

Použije se nejméně pět myší o hmotnosti 18 g až 20 g, které nemají protilátky proti *M. hyopneumoniae*. Každá myš se subkutánně vakcinuje vhodnou dávkou. Nejméně pět myší se ponechá jako kontroly. Pokud se doporučuje provedení revakcinace, může se v této zkoušce provést také opakovaná vakcinace k zesílení imunitní reakce (booster vakcinace), aby se tím prokázalo, že zkouška poskytuje stále dostatečně citlivý systém. Před vakcinací a ve stanoveném intervalu v rozmezí 14 až 21 dnů po poslední injekci se každé myši odebere krev a připraví se vzorky séra. V každém séru se jednotlivě pomocí vhodné validované zkoušky, jako je enzymově imunisorbentové stanovení (2.7.1), stanoví titer specifických protilátek proti každé antigenní složce uvedené v označení na obalu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrné hladiny protilátky nejsou signifikantně nižší než hladiny získané u šarže, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zdravým zvířatům, která nemají protilátky proti *M. hyopneumoniae*, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek. Pro zkoušku totožnosti se také mohou použít vhodné molekulární metody, jako jsou techniky amplifikace nukleových kyselin (2.6.21).

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína, a kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě prasata minimálního stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti *M. hyopneumoniae*. Doporučeným způsobem se každému prasati podá dvojnásobná dávka vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Zaznamená se tělesná teplota den před vakcinací, při vakcinaci, za 4 h po ní a potom denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se vyskytnout přechodný vzestup tělesné teploty nepřevyšující 2°C.

**3-4 Zbytková živá mykoplazmata.** Zkouška se provede k potvrzení inaktivace *M. hyopneumoniae*. Vakcína vyhovuje validované zkoušce na zbytkové živé *M. hyopneumoniae* provedené kultivační metodou (viz např. 2.6.7, při použití média prokazatelně vhodného pro *M. hyopneumoniae*).

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

## VACCINUM PSEUDOPESTIS AVIARIAE INACTIVATUM

6.0:0870

### Vakcína proti pseudomoru ptáků inaktivovaná

*Synonyma.* Vakcína proti newcastleské chorobě inaktivovaná, Vakcína proti ptačímu paramyxoviru 1 inaktivovaná

Vakcíny pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

**Je to přípravek obsahující** vhodný kmen viru newcastleské choroby (ptačí paramyxovirus 1) inaktivovaného takovým způsobem, že je zachována jeho imunogenní aktivita. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci ptáků proti newcastleské chorobě.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách. Sklizeň viru se inaktivuje. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce ze zdravých chovů.

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro všechny druhy a kategorie ptáků, pro které je určena.

Během prokazování účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky uvedené v odstavci Imunogenita (2-3-1).

**2-4-1 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. Každému ptákovi se podá vakcína s minimální účinností. Pro kura domácího je k prokázání imunogenity vhodná zkouška 2-4-1-1. Pro ostatní druhy ptáků (např. holuby nebo krůty) je k prokázání imunogenity vhodná zkouška 2-4-1-2.

**2-4-1-1 Vakcíny určené pro kura domácího.** Použije se nejméně sedmdesát kuřat, 21 až 28 dnů starých, stejného původu z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2). Pro vakcinaci se použijí nejméně tři skupiny, každá po nejméně dvaceti kuřatech. Zvolí se takový počet různých objemů vakcíny, jaký je počet skupin: např. objemy odpovídají 1/25, 1/50 a 1/100 dávky. Každé vakcinované skupině se přiřadí odlišný objem. Každému kuřeti se intramuskulárně podá objem vakcíny zvolený pro danou skupinu.

Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 17 až 21 dnů se všechna kuřata čelenují intramuskulární injekcí  $6 \log_{10}$  LD<sub>50</sub>/embryo viru newcastleské choroby kmene Herts (Weybridge 33/56) ptačího paramyxoviru 1. Kuřata se pozorují nejméně denně 21 dnů po čelenži. Z počtu kuřat, která přežijí v každé vakcinované skupině v průběhu 21 dnů bez klinického projevu onemocnění newcastleskou chorobou, se vypočítá PD<sub>50</sub> standardními statistickými metodami. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže do 6 dnů po čelenži neuhynou všichni kontrolní ptáci. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejnižší dávka uvedená v označení na obalu odpovídá nejméně 50 PD<sub>50</sub> a dolní hranice spolehlivosti je nejméně 35 PD<sub>50</sub> na dávku. Je-li dolní hranice spolehlivosti méně než 35 PD<sub>50</sub> na dávku, zkouška se opakuje. Vakcína v opakované zkoušce musí obsahovat nejméně 50 PD<sub>50</sub>. Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechna kuřata v kontrolní skupině uhynou během 6 dnů po čelenži.

*2-4-1-2 Vakcíny určené pro použití u jiných druhů než u kura domácího.* Použije se nejméně třicet ptáků cílového druhu, stejného původu a stejného stáří, bez protilátek proti ptačímu paramyxoviru 1. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně dvacet ptáků. Nejméně deset ptáků se ponechá jako kontroly. Za 4 týdny se všichni ptáci čelenují intramuskulárním podáním dostatečného množství virulentního ptačího paramyxoviru 1. Zkoušku nelze hodnotit, pokud vzorky séra v době první vakcinace vykazují protilátky proti ptačímu paramyxoviru 1 u vakcinovaných nebo kontrolních ptáků nebo když zkoušky v době čelenže vykazují tyto protilátky u kontrolní skupiny. Zkoušku nelze hodnotit, pokud méně než 70 % ptáků kontrolní skupiny uhynie nebo má zřetelné příznaky newcastleské choroby. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 90 % vakcinovaných ptáků přežívá a nemá závažné příznaky infekce ptačím paramyxovirem 1.

## 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na inaktivaci se provádí v embryonovaných vejcích nebo ve vhodných buněčných kulturách (5.2.4), které jsou nejcitlivější k vakcinačnímu viru. Množství sklizeného inaktivovaného viru použitého ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Nejistí se žádný živý virus.

**2-5-2 Zkouška účinnosti šarže.** Účinnost (odstavec 3-6) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda, kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v části Účinnost. Mohou se použít dále uvedené zkoušky. Kdekoliv je to možné, provede se zkouška Obsah antigenu (odstavec 2-5-2-1) současně se zkouškou Adjuvans (odstavec 2-5-2-2).

*Vakcíny určené pro kura domácího.* Může se provést zkouška Obsah antigenu (odstavec 2-5-2-1) současně se zkouškou Adjuvans (odstavec 2-5-2-2); jestliže povaha výrobku neumožňuje získat s těmito zkouškami validní výsledky nebo jestliže vakcína nevyhovuje, může se provést zkouška Sérologické prokazování (odstavec 2-5-2-3). Jestliže vakcína nevyhovuje zkoušce Sérologické prokazování (odstavec 2-5-2-3), může se provést zkouška na kuřatech (odsta-

vec 2-4-1-1). Může se provést zkouška za použití méně než dvaceti ptáků ve skupině a s kratším pozorovacím obdobím po čelenži, pokud se prokázala jako validní zkouška na účinnost.

*Vakcíny určené pro použití u jiných druhů než u kura domácího.* Provede se vhodná zkouška, u které se zjistila vyhovující korelace se zkouškou popsanou v odstavci 2-4-1-2. Kritéria pro přijetí se stanoví v porovnání se šarží, se kterou se v této zkoušce získaly vyhovující výsledky. Může se použít zkouška na kuřatech z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2) založená na měření sérologické odpovědi na odstupňovaná množství vakcíny (např. 1/25, 1/50 a 1/100 dávky s odběrem séra za 17 až 21 dnů). Alternativně se může provést zkouška 2-5-2-1 Obsah antigenu současně se zkouškou 2-5-2-2 Adjuvans, pokud jsou prokazatelně validními zkouškami na účinnost.

*2-4-2-1 Obsah antigenu.* Poměrný obsah antigenu se stanoví enzymově imunisorbentovým stanovením (2.7.1) porovnáním obsahu hemaglutinin-neuraminidasového antigenu v dávce vakcíny s hemaglutinin-neuraminidasovým antigenem referenčního přípravku. Pro toto srovnání je vhodný referenční antigen viru newcastleské choroby BRP, kontrolní antigen viru newcastleské choroby BRP, virus newcastleské choroby potažený protilátkou BRP a konjugovaný virus newcastleské choroby detekující protilátku BRP. Před stanovením antigenu se může antigen extrahovat z emulze za použití isopropyl-myristátu R nebo jinou vhodnou metodou. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže stanovený obsah antigenu není významně nižší než obsah antigenu v šarži, která vyhověla z hlediska imunogenity (odstavec 2-4-1).

*2-5-2-2 Adjuvans.* Jestliže se provede imunochemická analýza (odstavec 2-5-2-1) a jestliže vakcína obsahuje adjuvans, zkouší se adjuvans vhodnými fyzikálními a chemickými metodami. U vakcín s olejovým adjuvans se adjuvans zkouší v souladu s článkem *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062). Jestliže se adjuvans nemůže dostatečně charakterizovat, nemůže se zkouška na obsah antigenu použít jako zkouška účinnosti šarže.

*2-5-2-3 Sérologické prokazování.* Použije se nejméně patnáct kuřat 21 až 28 dnů starých, stejného původu a z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2). Nejméně deseti kuřatům se intramuskulárně podá objem vakcíny, který odpovídá 1/50 dávky. Nejméně pět kuřat se ponechá jako kontroly. Za 17 až 21 dnů se získají vzorky séra od každého kuřete. Hladina protilátek v jednotlivých sérech se zjišťuje dále popsanou hemaglutinačně-inhibiční zkouškou (HI) nebo rovnocennou metodou se stejným počtem hemaglutinačních jednotek a erytrocytů. Použitý zkušební systém musí zahrnovat negativní a pozitivní kontrolní séra. Pozitivní kontrolní sérum má HI titr mezi 5,0 log<sub>2</sub> až 6,0 log<sub>2</sub>. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný HI titr vakcinované skupiny je stejný nebo vyšší než 4,0 log<sub>2</sub> a titr u nevakcinované skupiny je 2,0 log<sub>2</sub> nebo méně. Jestliže HI titry nevyhovují, provede se zkouška 2-4-1-1.

**Inhibice hemaglutinace.** Zkoušená séra se 30 min inaktivují zahřátím na 56 °C. Do první řady jamek mikrotitrační destičky se odpipetuje po 25 µl inaktivovaných sér. Do zbývajících jamek se odpipetuje 25 µl tlumivého roztoku

s chloridem sodným R (9 g/l) o pH 7,2 až 7,4. Připraví se dvojnásobná ředění sér na celé destičce. Do každé jamky se přidá 25 µl suspenze obsahující 4 hemaglutinační jednotky inaktivovaného viru newcastleské choroby. Destička se inkubuje 1 h při 4 °C. Přidá se 25 µl 1% (V/V) suspenze erytrocytů odebraných kuřatům 3 až 4 týdny starým, která nemají protilátky proti viru newcastleské choroby. Destička se inkubuje 1 h při 4 °C. HI titr odpovídá nejvyššímu ředění, ve kterém je úplná inhibice hemaglutinace.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína podaná zvířatům bez protilátek proti viru newcastleské choroby vyvolá tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a kde je to vhodné i tekutina s ní dodávaná, vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Cizí agens.** Použije se deset kuřat, 14 až 28 dnů starých, z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2). Každému kuřeti se doporučeným způsobem podá dvojnásobná dávka vakcíny. Po 3 týdnech se každému kuřeti stejným způsobem podá ještě jedna dávka. Za 2 týdny se získají vzorky sér od každého kuřete a provedou se zkoušky na přítomnost protilátek proti následujícím agens metodami předepsanými v obecné stati (5.2.2) *Chovy prosté specifikovaných patogenů pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín*: virus encefalomyelitidy ptáků, virus infekční bronchitidy ptáků, viry ptačí leukózy, virus poklesu snášky vajec, virus infekční burzitidy, virus infekční laryngotracheitidy ptáků, virus chřipky A, virus Markovy choroby. Vakcína nevyvolá tvorbu protilátek proti těmto agens.

**3-4 Bezpečnost.** Pokud je vakcína určena pro použití u kuřat kura domácího, použije se deset kuřat 14 až 28 dnů starých z chovu prostého specifikovaných patogenů (5.2.2). Pokud vakcína není určena pro kura domácího, použije se deset ptáků jednoho z druhů, pro který je vakcína určena, kteří nemají protilátky proti viru newcastleské choroby. Doporučeným způsobem se každému ptákovu podá dvojnásobná dávka vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-5 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provádí, aby se potvrdila inaktivace viru newcastleské choroby. Deseti kuřecím embryím z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF vejce) (5.2.2) starým 9 až 11 dnů se do alantoidní dutiny inokuluje po dvou pětinach dávky a inkubuje se. Pozorují se 6 dnů, pak se odděleně spojí alantoidní tekutina z vajec obsahujících živá embrya a z vajec obsahujících mrtvá embrya, z nichž se vyřadí ta, která uhynula do 24 h po injekci. Embrya, která uhynula do 24 h po inokulaci, se vyšetří na přítomnost viru newcastleské choroby. Vakcína nevyhovuje zkoušce, jestliže se zjistí virus newcastleské choroby.

Do alantoidní dutiny každého z deseti 9 až 11 dnů starých kuřecích embryí (SPF vejce) se inokuluje 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z vajec se živými embryi a do

každého z dalších deseti SPF vajec po 0,2 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny z vajec s uhynulými embryi a inkubuje se 5 až 6 dnů. Alantoidní tekutina z každého vejce se zkouší na přítomnost hemaglutininů za použití kuřecích erytrocytů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejsou známky přítomnosti hemaglutinující aktivity a jestliže v žádném stadiu neuhyne více než 20 % embryí. Pokud v jednom stadiu uhynie více než 20 % embryí, opakuje se zkouška v tomto stadiu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejsou známky přítomnosti hemaglutinující aktivity a jestliže neuhyne více než 20 % embryí v tomto stadiu.

K prevenci bakteriální infekce se mohou ve zkoušce použít antibiotika.

**3-6 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a metodou vyhovuje požadavkům zkoušky Imunogenita (odstavec 2-4-1).

## VACCINUM PSEUDOPESTIS AVIARIAE VIVUM

6.0:0450

### Vakcína proti pseudomoru ptáků živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru newcastleské choroby (ptačí paramyxovirus 1). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům a/nebo jiným druhům ptáků k aktivní imunizaci.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

**2-2-2 Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

**2-3-1 Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus má prokazatelně vyhovovat z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určen.

Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky: Index intracerebrální patoge-



nity (odstavec 2-4-1), Sekvence aminokyselin (odstavec 2-4-2), Bezpečnost (odstavec 2-4-3), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-4) a Imunogenita (odstavec 2-4-5).

**2-4-1 Index intracerebrální patogenity.** Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je v šarži vakcíny. Vakcinační virus se inokuluje do alantoidní dutiny kuřecích embryí starých 9 až 11 dnů z SPF chovu (5.2.2). Inokulovaná vejce se inkubují po vhodné období a alantoidní tekutiny se sklídí a spojí. Použije se nejméně deset jednodenních kuřat (tj. více než 24 h, ale méně než 40 h po vylíhnutí), z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se intracerebrálně podá 0,05 ml směsného vzorku alantoidní tekutiny, obsahujícího nejméně  $10^{8,0}$  EID<sub>50</sub> nebo, jestliže se nemůže dosáhnout toto množství viru, nejméně  $10^{7,0}$  EID<sub>50</sub>. Kuřata se pozorují nejméně denně po 8 dnů po podání a ohodnotí se (skóre) jednou každých 24 h. Stupněm 0 se hodnotí kuře, jestliže je klinicky normální, stupněm 1 jestliže má klinické příznaky onemocnění a stupněm 2 jestliže je mrtvé. Index intracerebrální patogenity je průměrem stupňů na kuře za osmidenní pozorovací období.

Pokud se použije inokulum, které má nejméně  $10^{8,0}$  EID<sub>50</sub>, vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže jeho index intracerebrální patogenity není větší než 0,5; pokud se použilo inokulum, které má nejméně  $10^{7,0}$  EID<sub>50</sub>, ale méně než  $10^{8,0}$  EID<sub>50</sub>, vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže jeho index intracerebrální patogenity není větší než 0,4.

**2-4-2 Sekvence aminokyselin.** Vhodnou metodou se stanoví sekvence fragmentu RNA z vakcinačního viru obsahujícího oblast kódující místo pro štěpení F0. Zakódovaná sekvence aminokyseliny je jednou z následujících (viz tabulku) nebo ekvivalent s leucinem na místě 117 a žádné zásadité aminokyseliny na místech 111, 112, 114 a 115.

**2-4-3 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny a na každém ptačím druhu, pro který je vakcína určena. V každém případě se použijí ptáci, kteří nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro zkoušky na kuřatech se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Pro jiný druh, než jsou kuřata, se použije nejméně dvacet ptáků, kteří nemají protilátky proti viru newcastleské choroby. Každému ptákovi se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % ptáků má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá zřetelné klinické příznaky newcastleské choroby nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit

vakcinačnímu viru.

**2-4-4 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti ptáků starých nejvýše 2 týdny; postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Zkouška se provede na cílovém druhu a použije se kuře, jestliže je jedním z cílových druhů. Pro zkoušení na kuřatech se použijí kuřata z SPF chovu (5.2.2). Pro ostatní druhy se zkouší na ptácích, kteří nemají protilátky proti viru newcastleské choroby. Nakapáním do oka se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Ptáci se pozorují po období, které prokazatelně odpovídá maximální replikaci vakcinačního viru; potom se šetrně utratí a připraví se suspenze z mozku každého ptáka a ze vhodného orgánu, v závislosti na tropismu kmene (např. sliznice celé průdušnice, střeva, slinivky) a vzorky se spojí. 0,05 ml směsného vzorku se nakapáním do oka podá každému z pěti dalších ptáků stejného druhu, stáří a původu. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

- Provede se zkouška Index intracerebrální patogenity (odstavec 2-4-1), za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.
- Provede se zkouška Sekvence aminokyselin (odstavec 2-4-2), za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.
- Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-4-3), za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný, druhu ptáků, který je z těch, pro které je vakcína určena, pravděpodobně nejcitlivější k newcastleské chorobě.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se ve zkouškách 2-4-4 A, 2-4-4 B a 2-4-4 C nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-5 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání a na každém druhu ptáků, pro

		F2						Místo štěpení	F1		
Místo		111	112	113	114	115	116	v	117	118	119
		Gly	Gly	Lys	Gln	Gly	Arg		Leu	Ile	Gly
	nebo	Gly	Gly	Arg	Gln	Gly	Arg		Leu	Ile	Gly
	nebo	Gly	Glu	Arg	Gln	Glu	Arg		Leu	Val	Gly

kteří je vakcína určena. V každém případě se použijí ptáci, kteří nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému ptákovi není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

**2-4-5-1 Vakcíny pro použití u kuřat.** Použije se nejméně třicet kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé kuře čelenžuje intramuskulárně nejméně dávkou  $10^{5,0}$  ELD<sub>50</sub> viru newcastleské choroby kmene Herts (Weybridge 33/56). Kuřata se pozorují nejméně denně 14 dnů po čelenži. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže 6 dnů po čelenži uhynulo méně než 100 % kontrolních kuřat nebo jestliže v období mezi vakcinací a čelenží mělo více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních kuřat abnormální klinické příznaky nebo uhynulo z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelenži nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a nemá zřetelné klinické příznaky newcastleské choroby.

**2-4-5-2 Vakcíny pro použití u jiných ptačích druhů než kur domácí.** Použije se nejméně třicet ptáků toho druhu, pro který je vakcína proti newcastleské chorobě určena, kteří jsou stejného původu a nemají protilátky proti ptačímu paramyxoviru 1. Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet ptáků. Nejméně deset ptáků se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každý pták čelenžuje intramuskulárně dostatečným množstvím virulentního ptačího paramyxoviru 1. Ptáci se pozorují nejméně denně 21 dnů po čelenži. Zaznamenají se úhyny a přežívající ptáci, kteří mají klinické příznaky onemocnění. Zkoušku nelze hodnotit jestliže:

- během pozorovacího období po čelenži méně než 90 % kontrolních ptáků uhynie nebo má některé klinické příznaky newcastleské choroby;
- nebo pokud v období mezi vakcinací a čelenží více než 10 % vakcinovaných nebo kontrolních ptáků má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži nejméně 90 % vakcinovaných ptáků přežije a nemá zřetelné klinické příznaky newcastleské choroby. Pro druh, u kterého je publikován důkaz, že není možné dosáhnout tohoto stupně ochrany, vyhovuje vakcína zkoušce, jestliže snížení morbidity a mortality vakcinovaných ptáků je při srovnání s kontrolními ptáky průkazné.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

#### 3-1 Totožnost

**3-1-1 Identifikace vakcinačního viru.** Vakcína, podle potřeby ředěná a smíchaná s monospecifickým antisérem proti viru newcastleské choroby, nevyvolá hemaglutinaci kuřecích erytrocytů nebo neinfikuje embryonovaná slepičí vejce z SPF chovu (5.2.2), nebo citlivé buněčné kultury (5.2.4), do kterých se inokuluje.

**3-1-2 Identifikace virového kmene.** Kmen vakcinačního viru se prokáže vhodnou metodou, např. použitím monoklonálních protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

Vakcíny neurčené k injekčnímu podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium*, nebo následující zkoušce. Provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** U vakcín doporučených pro použití u kuřat se použije nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) a nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. U vakcín doporučených pro použití pouze u jiného druhu ptáků, než je kur domácí, se použije nejméně deset ptáků druhu, který je pravděpodobně nejnímavější k newcastleské chorobě, tito ptáci nemají protilátky proti viru newcastleské choroby a jsou nejnižšího stáří, které se doporučuje pro vakcinaci. Každému ptákovi se podá nakapáním do oka nebo parenterálně, jestliže se doporučuje pouze parenterální podání, deset dávek vakcíny v objemu vhodném pro zkoušku. Ptáci se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % ptáků má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádný pták nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** V závislosti na indikaci vyhovuje vakcína jedné nebo oběma zkouškám předepsaným v odstavci Imunogenita (2-4-5), je-li podána podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem a metodou. Jestliže se provede zkouška *Vakcína pro použití u jiných druhů ptáků než u kura domácího* (odstavec 2-4-5-2) a vakcína se doporučuje pro použití u více než jednoho druhu ptáků, provede se zkouška na ptáčích toho druhu, pro který je vakcína doporučena a který je pravděpodobně nejcitlivější k ptačímu paramyxoviru 1. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM RABIEI INACTIVATUM AD USUM VETERINARIUM

6.8:0451

### Vakcína proti vzteklině pro veterinární použití inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný stabilní kmen viru vztekliny, inaktivovaný tak, aby se zachovaly přiměřené imunogenní vlastnosti. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci zvířat proti vzteklině.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcína se připravuje z viru kultivovaného buď ve vhodných buněčných liniích, nebo v primárních buněčných kulturách ze zdravých zvířat (5.2.4). Virová suspenze se sklídí jedenkrát nebo vícekrát během 28 dnů po inokulaci. Vícenásobné sklizně z jedné kultury produkčních buněk se mohou spojit a považovat se za jednu sklizeň.

Sklizeň viru se inaktivuje. K vakcíně se může přidat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro druhy, pro které je určen. K prokázání účinku u koček a psů se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-3-1).

Vhodnost vakcíny pro masožravce (kočky a psy) se z hlediska imunogenity (odstavec 2-3-1) prokáže přímou čelenží koček a psů. Pro ostatní druhy, jestliže se čelenžní zkouška pro vakcínu provedla na kočkách nebo na psech, se provede nepřímá zkouška stanovením hladiny protilátek po vakcinaci nejméně u dvaceti zvířat podle doporučeného schématu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže po době deklarované pro délku trvání ochrany, je střední hodnota hladiny protilátek proti viru vztekliny v séru zvířat nejméně 0,5 m. j./ml a jestliže nejvýše 10 % zvířat má hladinu protilátek nižší než 0,1 m. j./ml.

2-3-1 **Imunogenita.** Každá zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí zvířata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému zvířeti se podá vakcína s minimální účinností.

Použije se nejméně třicet pět zvířat. Každému zvířeti se odebere vzorek krve a pro zjištění vnímavosti se individuálně stanoví protilátky proti viru vztekliny. Každému z nejméně dvaceti pět zvířat se doporučeným způsobem podá vakcína. Nejméně deset zvířat se ponechá jako kontroly. Všechna zvířata se pozorují po dobu odpovídající délkou době deklarované imunity. Žádné zvíře nemá příznaky vztekliny. Poslední den deklarovaného období trvání imunity nebo později se všechna zvířata intramuskulárně čelenžují dostatečným množstvím virulentního viru vztekliny, jehož kmen je schválen oprávněnou autoritou. Zvířata se

pozorují nejméně denně po 90 dnů po čelenži. Úhyny zvířat, které nelze přisoudit vzteklině, se vyřadí. Zkoušku lze hodnotit, pokud počet takových úhynů nesníží stav vakcinovaných zvířat na méně než dvacet pět. Zkoušku lze hodnotit, pokud nejméně osm kontrolních zvířat (nebo statisticky odpovídající počet, když se čelenžovalo více než deset kontrol) má příznaky vztekliny a imunofluorescenční zkouškou nebo jinou vhodnou metodou se zjistí přítomnost viru vztekliny v jejich mozku. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše dvě zvířata z dvaceti pět vakcinovaných (nebo statisticky odpovídající počet, když se čelenžovalo více než dvacet pět vakcinovaných zvířat) mají příznaky vztekliny.

##### 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-4-1 **Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede inokulací inaktivovaného viru do stejného typu buněčné kultury, jaký se použil při výrobě vakcíny, nebo do buněčné kultury, která je prokazatelně nejméně stejně citlivá. Množství použité inaktivované sklizně viru není menší než dvacet pět dávek vakcíny. Po čtyřdenní inkubaci se kultury trypsinují a připraví se další subkultura; po inkubaci další 4 dny se kultur vyšetří na zbytkový živý virus vztekliny imunofluorescenční zkouškou. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

2-4-2 **Obsah antigenu sklizně.** Obsah glykoproteinu viru vztekliny se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1). Obsah je v rozmezí limitů schválených pro daný přípravek.

2-4-3 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku účinnosti (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena za použití šarže vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda; kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se pět myší, každá o hmotnosti 18 g až 20 g. Každá myš se vakcinuje subkutánně nebo intramuskulárně 1/5 doporučeného objemu dávky. Za 14 dnů po vakcinaci se odeberou vzorky krve, séra se jednotlivě vyšetří na protilátku proti vzteklině rychlou fluorescenční inhibiční zkouškou, která je popsána v článku *Immunoglobulinum humanum rabicum* (0723). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže titer protilátky není nižší než množství protilátky, vytvořené vakcínou, která vyhověla z hlediska imunogenity, jak je popsáno ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

2-4-4 **Obsah antigenu šarže.** Množství glykoproteinu viru vztekliny v dávce stanovené vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) není významně nižší než množství glykoproteinu v šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Účinnost.

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** Vakcína podaná zvířatům, která nemají protilátky proti viru vztekliny, vyvolá tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Zbytkový živý virus.** Zkouška se provede za použití směsi obsahující pěti obalů. U vakcín, které neobsahují adjuvans, se provede vhodná pomnožovací zkouška na zbytkový živý virus vztekliny. Použije se stejný typ buněčné kultury, který se použil při výrobě vakcíny nebo buněčná kultura, která je prokazatelně nejméně stejně citlivá. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

U vakcín, které obsahují adjuvans, se nejméně deseti myším, každé o hmotnosti 11 g až 15 g, podá intracerebrálně po 0,03 ml směsi nejméně pěti nejmenších uvedených dávek. K vyloučení vzájemného rušení různých protimikrobiálních látek nebo adjuvancií se může vakcína před podáním ředit nejvýše desetkrát. V tomto případě nebo jestliže je vakcinační kmen patogenní pouze pro sající myši, provede se zkouška na myších ve stáří 1 až 4 dny. Zvířata se pozorují 21 dnů. Jestliže více než dvě zvířata uhynou během prvních 48 h, zkouška se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže od třetího do jednadvacátého dne po podání nemají zvířata příznaky vztekliny a imunofluorescenční zkoušky provedené na jejich mozcích neukazují známky přítomnosti viru vztekliny.

**3-4 Bezpečnost.** Jestliže je vakcína určena pro více než jeden živočišný druh, včetně toho, který patří do řádu Carnivora, provede se zkouška na psech. Jinak se použije jeden ze živočišných druhů, pro které je vakcína určena. Doporučeným způsobem se podá dvojnásobná dávka vakcíny každému ze dvou zvířat, která nemají protilátky proti viru vztekliny. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-5 Účinnost.** Účinnost se stanoví porovnáním intracerebrálně podané dávky vakcíny nezbytné k ochraně myši proti klinickým účinkům dále uvedené dávky viru vztekliny s dávkou referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách potřebnou k zajištění stejné ochrany.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

*Vakcína proti vzteklině inaktivovaná pro veterinární použití BRP* se kalibruje v mezinárodních jednotkách proti mezinárodnímu standardu.

Dále popsaná zkouška využívá model rovnoběžnosti z nejméně tří bodů pro zkoušenou vakcínu a pro referenční přípravek. Jestliže má analytik zkušenosti s touto metodou pro danou vakcínu, je možné provést zjednodušenou zkoušku s jedním ředěním zkoušené vakcíny. Tato zkouška umožňuje stanovit, že vakcína má významně vyšší účinnost, než je předepsané minimum, nedá však úplnou informaci o platnosti jednotlivého stanovení účinnosti. Umožňuje však výrazné omezení počtu zvířat potřebných pro zkoušku a měla by být každou laboratoří zvažována v souladu s ustanoveními Evropské úmluvy o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely.

*Výběr a rozřídění pokusných zvířat.* Pro zkoušku se použijí zdravé myši samice staré 4 týdny a stejného původu. Myši se rozdělí do nejméně deseti skupin po nejméně deseti zvířatech.

*Příprava čelenžní suspenze.* Virus vztekliny kmene CVS se podá intracerebrálně skupině myši. Myši, u kterých se objeví příznaky vztekliny, se šetrně utratí před uhynutím, odeberou se jim mozky a ve vhodné tekutině se připraví homogenní suspenze mozkové tkáně. Odstředěním se odstraní hrubé částičky tkáně a supernatantní tekutina se používá jako čelenžní suspenze. Malá množství suspenze se rozplní do ampulí, uzavřou se a skladují se při teplotě nižší než  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jedna ampule suspenze se rozmrazí a připraví se sériová ředění ve vhodné tekutině. Každé ředění se přidělí jedné skupině myši. Každé myši se intracerebrálně podá 0,03 ml příslušného ředění přiděleného skupině. Zvířata se pozorují nejméně denně po 14 dnů a zaznamenávají se počty zvířat v jednotlivých skupinách, u kterých došlo mezi pátým až čtrnáctým dnem k vývoji příznaků vztekliny. Vypočítá se  $ID_{50}$  neředěné suspenze.

*Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny.* Připraví se nejméně tři sériová ředění zkoušené vakcíny a tři obdobná ředění referenčního přípravku. Ředění se připraví tak, aby ve skupině, která obsahuje největší množství vakcíny, bylo možno očekávat ochranu u více než 50 % zvířat, kterým byla podána, a ve skupině, která obsahuje nejmenší množství vakcíny, bylo možno očekávat ochranu u méně než 50 % očkovaných zvířat. Pro jednotlivá ředění se připraví skupiny myši a intraperitoneálně se každé myši podá po 0,5 ml příslušného ředění. Za 14 dnů po injekci se připraví suspenze čelenžního viru na základě předběžné titrace tak, aby v 0,03 ml obsahovala asi 50  $ID_{50}$ . Každé vakcinované myši se intracerebrálně podá 0,03 ml této suspenze. Kromě toho se připraví tři vhodná sériová ředění čelenžní suspenze. Vytvoří se čtyři skupiny po deseti nevakcinovaných myších a každé skupině se přiřadí jedno ředění. Každé myši ze tří skupin se intracerebrálně podá 0,03 ml příslušného ředění suspenze. Myším ve čtvrté skupině se podá po 0,03 ml neředěné čelenžní suspenze. Zvířata všech skupin se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Zkoušku lze hodnotit, pokud neuhynou více než dvě myši v kterékoliv skupině v průběhu prvních 4 dnů po čelenži. V období pátého až čtrnáctého dne po čelenži se v jednotlivých skupinách zaznamenávají počty zvířat s příznaky vztekliny.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže:

- 50% ochranná dávka zkoušeného i referenčního přípravku se nachází mezi největší a nejmenší dávkou podanou myším;
- titrace čelenžní suspenze prokazuje, že dávka 0,03 ml suspenze obsahuje nejméně 10  $ID_{50}$ ;
- interval spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) je v rozmezí 25 % až 400 % stanovené účinnosti; pokud tato validační kritéria nejsou splněna, nižší limit stanovené účinnosti musí být nejméně 1 m. j. v nejmenší předepsané dávce;
- statistická analýza vykazuje významný vzestup ( $P = 0,95$ ) a nevýznamné odchylky od linearitě nebo rovnoběžnosti závislosti dávka-odpověď ( $P = 0,99$ ).

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže stanovená účinnost v nejmenší předepsané dávce je nejméně 1 m. j.

*Využívání alternativních konečných bodů (end points).*

Jakmile jednou laboratoř stanovila výše uvedený pokus pro běžné použití, letální ukončení by se mělo nahradit pozorováním klinických příznaků a využitím ukončení dříve, než dojde k úhynu, aby se snížilo utrpení zvířat. Následující postup je uveden jako příklad.

Postup infekce vzteklinou u myši po intracerebrální infekci se může shrnout do pěti stadií definovaných typickými klinickými příznaky:

stadium 1: naježená srst, vyhrbení;

stadium 2: pomalé pohyby, ztráta ostražitosti (mohou se také pozorovat pohyby do kruhu);

stadium 3: nejisté pohyby, třes, křeče;

stadium 4: příznaky parézy nebo paralýzy;

stadium 5: moribundní stadium.

Myši se pozorují nejméně dvakrát denně od 4. dne po čelenži. Klinické příznaky se zaznamenají pomocí schématu uvedeného v tabulce 0451-1. Zkušenost ukázala, že při použití stadia 3 jako konečného bodu pokusu se získají stejné výsledky jako při použití úhynu jako konečného bodu (end point). To se musí v každé laboratoři ověřit stanovením bodování (skóre) přiměřeného počtu pokusů za použití jak klinických příznaků, tak úhynu jako konečného bodu.

**Tab. 1** Příklad protokolu pro záznam klinických příznaků ve stanovení účinnosti vakcíny proti vzteklině

Klinické příznaky	Dny po čelenži							
	4	5	6	7	8	9	10	11
naježená srst vyhrbení								
pomalé pohyby ztráta ostražitosti pohyby do kruhu								
nejisté pohyby třes křeče								
paréza paralýza								
moribundní stadium								

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- typ buněčné kultury použité k přípravě vakcíny a původ živočišného druhu;
- nejnižší počet mezinárodních jednotek v dávce;
- nejkratší doba, po kterou vakcína poskytuje ochranu.

## VACCINUM RABIEI PERORALE VIVUM AD VULPEM

6.0:0746

Vakcína proti vzteklině perorální pro lišky živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující imunogenní kmen atenuovaného viru vztekliny. Vakcína se vloží do návnady tak, aby se dále popsané zkoušky mohly provést asepticky. Tento článek se

vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci lišek proti vzteklině.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Virová suspenze se sklízí jedenkrát nebo vícekrát během 14 dnů po inokulaci. Vícenásobně sklizně z jedné buněčné kultury se mohou spojit a považovat za jednu sklizeň. Virová suspenze se může smíchat se vhodným stabilizátorem.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4); v případě, že buněčné kultury jsou savčího původu, jsou prokazatelně prosté viru vztekliny.

##### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro lišky, pro které je určen. Během prokazování bezpečnosti se mohou využít dále uvedené Charakteristiky (odstavec 2-3-1) a během prokazování účinku následující zkouška na imunogenitu (odstavec 2-3-2).

**2-3-1 Charakteristiky kmene viru.** Pro přípravu vakcíny se může použít pouze kmen viru, který prokazatelně vyhovuje z hlediska následujících charakteristik:

- po perorálním podání doporučené dávky doporučenou metodou čtyřiceti liškám nevyvolá v průběhu 180 dnů po podání žádný příznak vztekliny;
- po perorálním podání desetinásobné doporučené dávky každé z deseti lišek nevyvolá v průběhu 180 dnů po podání žádný příznak vztekliny;
- po perorálním podání desetinásobné doporučené dávky každému z deseti psů nevyvolá v průběhu 180 dnů po podání žádný příznak vztekliny;
- po perorálním podání desetinásobné doporučené dávky každé z deseti koček nevyvolá v průběhu 180 dnů po podání žádný příznak vztekliny;
- v přirozených a experimentálních podmínkách nedojde u divoce žijících hlodavců k rozšíření kmene viru z jednoho zvířete na druhé;
- kmen viru má jeden nebo více stabilních genetických markerů, kterými se může odlišit vakcinační kmen od jiných kmenů viru vztekliny.

**2-3-2 Imunogenita.** Zkouška se provede na liškách pro perorální podání pomocí návnady uvedené v označení na obalu. Každé lišce se podá množství vakcinačního viru, které není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarži vakcíny.

Použije se nejméně třicet pět lišek, nejméně 3 měsíce starých, které nemají protilátky proti viru vztekliny. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně dvacet pět lišek. Nejméně deset lišek se ponechá jako kontroly. Lišky se pozorují 180 dnů. Žádná liška nemá příznaky vztekliny. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže pozorovací dobu přežije méně než dvacet pět vakcinovaných lišek. Za 180 dnů po vakcinaci se všechny lišky intramuskulárně čelenžují viru-

lentním kmenem viru vztekliny schváleným oprávněnou autoritou. Lišky se pozorují nejméně denně 90 dnů po čelenži. Lišky, které uhynuly z příčin, které nelze přisoudit vzteklině, se vyloučí.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se počet vakcinovaných zvířat ve zkoušce těmito úhyny sníží na méně než dvacet pět. Zkoušku lze hodnotit, jestliže nejméně devět kontrolních lišek (nebo statisticky odpovídající počet, když bylo čelenžováno více než deset kontrolních lišek) má příznaky vztekliny a v mozku těchto zvířat se imunofluorescenční zkouškou nebo jinou spolehlivou metodou prokáže přítomnost viru vztekliny. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše dvě z dvaceti pěti vakcinovaných lišek (nebo statisticky odpovídající počet, když bylo čelenžováno více než dvacet pět vakcinovaných lišek) mají příznaky vztekliny.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

#### 3-1 Totožnost

3-1-1 Vakcína smíchaná s monospecifickým vzteklinovým antisérem již není schopná infikovat citlivé buněčné kultury, do nichž se inokuluje.

3-1-2 Provede se zkouška na prokázání přítomnosti genetického markeru.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Mykoplazmata** (2.6.7). Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

#### 3-4 Cizí agens

3-4-1 Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým neutralizačním vzteklinovým antisérem a inokuluje se do citlivých buněčných kultur. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže již nevyvolá cytopatické efekty v citlivých buněčných kulturách a nejsou známky přítomnosti hemaglutinujících nebo hemadsorbujících agens.

3-4-2 Do citlivých buněčných kultur se inokulují ředění vakcíny 1 : 10 a 1 : 1000 a kultury se inkubují při 37 °C. Za 2, 4 a 6 dnů se buňky obarví různými typy monoklonálních protilátek, které nereagují s vakcinačním kmenem, ale reagují s jinými kmeny viru vztekliny (např. uliční virus, Pasteurův kmen). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže není kontaminovaná jiným virem vztekliny.

3-5 **Titř viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

3-6 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-2 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titř viru uvedený v označení na obalu.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede povaha genetického markeru kmene viru.

## VACCINUM RHINITIDIS ATROPHICANTIS INGRAVESCENTIS SUILLAE INACTIVATUM

6.0:1361

Vakcína proti sípavce prasat inaktivovaná  
*Synonymum.* Vakcína proti atrofické rinitidě prasat inaktivovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující buď dermonekrotický exotoxin *Pasteurella multocida* upravený tak, že je neškodný při zachování přiměřené imunogenity, nebo geneticky upravenou formu exotoxinu s přiměřenou imunogenitou a bez toxických vlastností. Vakcína může rovněž obsahovat buňky a/nebo antigenní součásti jednoho či více vhodných kmenů *P. multocida* a/nebo *Bordetella bronchiseptica*. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci prasnic a prasníček pro pasivní ochranu jejich potomstva proti sípavce prasat.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Bakteriální kmeny použité pro výrobu se pomnožují odděleně ve vhodných živných půdách. Toxiny a/nebo buňky se upraví tak, že jsou bezpečné. Vakcína může obsahovat adjuvans.

#### 2-2 DETOXIKACE

Zkouška na detoxikaci dermonekrotického exotoxinu *P. multocida* se provede těsně po detoxikaci. Koncentrace detoxikovaného exotoxinu použitého ve zkoušce není menší než jeho koncentrace ve vakcíně. Suspenze vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný toxický dermonekrotický exotoxin. Zkouška na detoxikaci se nepožaduje v případě, že se vakcína připravuje z toxinu podobné bílkoviny prosté toxických vlastností připravené expresí modifikované formy odpovídajícího genu.

#### 2-3 OBSAH ANTIGENU

Obsah dermonekrotického exotoxinu *P. multocida* v detoxikované suspenzi nebo toxinu podobné bílkoviny ve sklizni, se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1), jako je enzymově imunosorbentové stanovení ELISA, a zjištěná hodnota se použije při formulaci vakcíny. Stanoví se také obsah ostatních antigenů uvedených v označení na obalu (2.7.1).

#### 2-4 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Kmeny použité pro přípravu vakcíny prokazatelně vyhovují z hlediska tvorby dermonekrotického exotoxinu a dalších antigenů považovaných za ochranné. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro prasnice a prasníčky, pro které je určena.

Vakcíny pro  
veterinární  
použití

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Výroba antigenů (odstavec 2-4-1), Bezpečnost (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

**2-4-1 Výroba antigenů.** Výroba antigenů považovaných za ochranné se ověřuje vhodnou biologickou nebo imunochémickou metodou (2.7.1). Provádí se u antigenů získaných z každého kmene vakcíny za stejných podmínek, jaké se použily při výrobě vakcíny.

#### 2-4-2 Bezpečnost

**2-4-2-1 Laboratorní zkouška.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání doporučené pro vakcinaci. Použije se šarže, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat u vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně deset březích prasnic nebo prasniček, které nemají protilátky proti složkám vakcíny, ze stáda nebo ze stád, kde se nevyskytují žádné příznaky sípavky a které nebyly proti sípavce vakcinovány. Každému praseti se v doporučeném stadiu březosti podá dvojnásobná dávka vakcíny a dále po doporučeném intervalu ještě jedna dávka. Prasata se pozorují nejméně denně až do porodu. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 h po vakcinaci a dále denně po 4 dny. U každého prasete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá abnormální místní nebo celkové reakce, nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C a u žádného prasete není vzestup vyšší než 2 °C a jestliže se nezaznamenají nežádoucí vlivy na březost a potomstvo.

**2-4-2-2 Terénní studie.** Prasata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení bezpečnosti. Použijí se nejméně tři skupiny po nejméně dvaceti prasatech, s odpovídajícími skupinami nejméně deseti kontrol. Místo vpichu se vyšetří na místní reakce po vakcinaci. Tělesná teplota se zaznamená den před vakcinací, při vakcinaci, v časovém intervalu, ve kterém byl vzestup teploty zjištěn ve zkoušce 2-4-2-1 (pokud byl zjištěn) a denně po 2 dny po vakcinaci; u každého prasete se zaznamená maximální vzestup teploty.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prase nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C a u žádného prasete není vzestup vyšší než 2 °C.

**2-4-3 Imunogenita.** Každá zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. V každém případě se použijí prasata, která nemají protilátky proti složkám vakcíny, pocházejí ze stáda nebo stád, kde se nevyskytují žádné příznaky sípavky a která nebyla proti sípavce vakcinována. Každému praseti se podá vakcína s minimální účinností.

**2-4-3-1 Vakcíny obsahující dermonekrotický exotoxin *P. multocida* (s buňkami nebo bez buněk *P. multocida*).**

Použije se nejméně dvanáct chovných prasat. Nejméně šest namátkově vybraných březích nebo nebřezích prasat se vakcinuje podle doporučeného schématu. Nejméně šest prasat se ponechá jako kontroly. Všem selatům vakcinovaných i nevakcinovaných chovných prasat se od narození zajistí krmení pouze od vlastních matek.

Z mláďat se vytvoří dvě členění skupiny, v každé je nejméně třicet náhodně vybraných selat; z každého vrhu se

zařadí nejméně tři selata. Dva po sobě následující dny před čelení se může sliznice nosní dutiny selat ošetřit nakapáním 0,5 ml roztoku kyseliny octové (10 g C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>/l) v izotonickém tlumivém roztoku chloridu sodného o pH 7,2.

Každé sele se ve stáří deseti dnů intranazálně čelenžuje dostatečným množstvím toxinogenního kmene *P. multocida*. Ve stáří 42 dnů se selata obou skupin šetrně utratí a u všech se provede pitva příčným řezem rypáku v úrovni prvního premoláru. Vyšetří se dorzální a ventrální nosní skořepky a nosní přepážka na výskyt atrofie a deformace. Zjištěný výsledek se hodnotí bodováním (skóre) podle následující stupnice.

*Skořepky:*

- |   |                                                        |
|---|--------------------------------------------------------|
| 0 | bez atrofie,                                           |
| 1 | mírná atrofie,                                         |
| 2 | střední atrofie,                                       |
| 3 | těžká atrofie,                                         |
| 4 | velmi těžká atrofie s téměř úplným vymizením skořepky. |

Čtyři je nejvyšší bodová hodnota (skóre) pro jednotlivou skořepku, šestnáct je nejvyšší suma pro dvě dorzální a dvě ventrální skořepky.

*Nosní přepážka:*

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| 0 | bez vybočení,         |
| 1 | velmi mírné vybočení, |
| 2 | vybočení přepážky.    |

Nejvyšší celková bodová hodnota (skóre) pro skořepky a nosní přepážku je osmnáct.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud méně než 80 % potomstva z každého vrhu nevakcinovaných chovných prasat má celkovou bodovou hodnotu (skóre) nejméně deset. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže ve skupině vakcinovaných chovných prasat se při porovnání se skupinou nevakcinovanou zjistí významné snížení celkové bodové hodnoty (skóre).

**2-4-3-2 Vakcíny obsahující dermonekrotický exotoxin *P. multocida* (s buňkami nebo bez buněk *P. multocida*) a buňky a/nebo antigenní složky *B. bronchiseptica*.**

Použije se nejméně dvacet čtyři chovných prasat. Nejméně dvanáct namátkově vybraných březích nebo nebřezích prasat se vakcinuje podle doporučeného schématu. Nejméně dvanáct prasat se ponechá jako kontroly. Všem selatům vakcinovaných i nevakcinovaných chovných prasat se od narození zajistí krmení pouze od vlastních matek.

Použijí se skupiny po nejméně šesti prasatech. Z jejich potomstva se vytvoří dvě členění skupiny vakcinovaných prasat a dvě skupiny od kontrolních prasat. Každou skupinu tvoří nejméně třicet namátkově vybraných selat. Z každého vrhu se zařadí nejméně tři selata. Dva po sobě následující dny před čelení se může sliznice dutiny nosní selat ošetřit nakapáním 0,5 ml roztoku kyseliny octové (10 g C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>/l) v izotonickém tlumivém roztoku chloridu sodného o pH 7,2. Ve skupině selat od nejméně šesti vakcinovaných prasat a skupině od nejméně šesti kontrol se každé sele ve stáří 10 dnů intranazálně čelenžuje dostatečným množstvím toxinogenního kmene *P. multocida*. V další skupině selat od nejméně šesti vakcinovaných prasat a druhé skupině od nejméně šesti kontrol se každé sele ve stáří 7 dnů intranazálně čelenžuje dostatečným množstvím *B. bronchiseptica*. Navíc se ve stáří 10 dnů každé sele intranazálně čelenžuje

dostatečným množstvím toxinogenního kmene *P. multocida*. Ve stáří 42 dnů se selata všech čtyř skupin šetrně utratí a provede se pitva příčným řezem rypáku v úrovni prvního premoláru. Vyšetří se dorzální a ventrální nosní skořepky a nosní přepážka na výskyt atrofie nebo deformace. Zjištěný výsledek se hodnotí podle výše uvedené stupnice.

Zkoušku nelze hodnotit, pokud méně než 80 % potomstva z každého vrhu nevakcinovaných chovných prasat má celkovou bodovou hodnotu (skóre) nejméně deset. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže ve skupinách od vakcinovaných chovných prasat se při porovnání s odpovídající skupinou od nevakcinovaných chovných prasat zjistí významné snížení celkové bodové hodnoty (skóre).

## 2-5 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-5-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně sedm prasat nejméně 3 týdny starých, která nemají protilátky proti složkám vakcíny. Doporučeným způsobem a podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět prasat. Nejméně dvě prasata stejného původu se ponechají jako kontroly za stejných podmínek.

Alternativně, jestliže povaha antigenů umožňuje získat reprodokovatelné výsledky, může se provést zkouška na laboratorních zvířatech, která nemají protilátky proti složkám vakcíny. Aby bylo stanovení platné, může být nutné provést zkoušku na několika skupinách zvířat, z nichž každá dostane jiné množství vakcíny. S každým množstvím vakcíny se provede následující zkouška. Vhodným množstvím vakcíny se vakcinuje nejméně pět zvířat. Nejméně dvě zvířata stejného druhu a původu se ponechají jako kontroly. Pokud se doporučeným schématem požaduje revakcinace, může se provést revakcinace také v této zkoušce s podmínkou, že se prokáže vhodná citlivost zkušebnímu systému. V daném intervalu v rozmezí 14 až 21 dnů po posledním podání se každému zvířeti odebere krev a připraví se vzorky séra. Pro stanovení protilátkové odpovědi na každý z antigenů uvedených v označení na obalu se použije validovaná zkouška, např. enzymově imunosorbentové stanovení ELISA.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se u kontrolních zvířat zjistí významný titer protilátek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže protilátkové odpovědi u vakcinovaných zvířat nejsou významně menší než protilátkové odpovědi na šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce nebo ve zkouškách (podle toho, co je vhodné) uvedených v odstavci Účinnost.

Pokud nejsou dostupná zvířata, která nemají protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, mohou se k výše uvedené zkoušce použít zvířata séropozitivní. Během vývoje zkoušky se séropozitivními zvířaty se vyžaduje věnovat zvláštní péči validaci zkušebnímu systému, aby se zajistila dostatečná citlivost a specifikovala se kritéria pro přijetí, zamítnutí nebo opakování zkoušky. Je nezbytné vzít v úvahu rozmezí titerů protilátek před vakcinací a v návaznosti na

to stanovit přijatelné minimum vzestupu titru protilátek po vakcinaci.

**2-5-2 Bakteriální endotoxiny.** Zkouška na bakteriální endotoxiny (2.6.14) se provede u šarže nebo (kde povaha adjuvans brání provedení vyhovující zkoušky) u várky antigenu nebo směsi várek antigenů těsně před přidáním adjuvans. Maximální přijatelné množství bakteriálních endotoxinů je to, které bylo zjištěno u šarže vakcíny, která prokazatelně vyhověla ve zkoušce na bezpečnost 2-4-2-1 uvedené v části Výběr složení vakcíny nebo ve zkoušce na bezpečnost uvedené v části Zkoušení šarže, provedené s použitím deseti prasat. Kde se použije posledně uvedená zkouška, zaznamená se u každého prasete maximální vzestup teploty. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný vzestup teploty u všech prasat nepřekročí 1,5 °C. Metoda vybraná pro stanovení množství bakteriálního endotoxinu přítomného v šarži vakcíny použitá ve zkoušce na bezpečnost pro stanovení maximální přijatelné hladiny endotoxinu se následně použije pro zkoušení každé šarže.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** U zvířat, která nemají specifické protilátky proti antigenům uvedeným v označení na obalu, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se nejméně dvě prasata, která nemají protilátky proti *P. multocida* a přednostně i protilátky proti *B. bronchiseptica*. Doporučeným způsobem se každému praseti podá dvojnásobná dávka vakcíny. Prasata se pozorují nejméně denně po 14 dnů. Zaznamená se tělesná teplota den před vakcinací, při vakcinaci, 2, 4 a 6 h po vakcinaci a dále denně po 2 dny.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné prasce nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně; může se objevit přechodný vzestup teploty nepřevyšující 2 °C.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušek uvedených v odstavci 2-4-3 Imunogenita.

## VACCINUM RHINOTRACHEITIDIS INFECTIVAE BOVINAE VIVUM

6.0:0696

Vakcína proti infekční rinotracheitidě skotu živá  
*Synonyma.* Vaccinum rhinotracheitidis infectivae bovinae vivum cryodesiccatum, Vakcína proti infekční rinotracheitidě skotu živá lyofilizovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů viru infekční rinotracheitidy skotu (bovinní herpesvirus 1). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imu-



nizaci skotu proti infekční rinotracheitidě skotu vyvolané boviním herpesvirem 1.

## 2 VÝROBA

### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skot, pro který je určen.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Schopnost vyvolat zmetání a průchod placentou (odstavec 2-3-2), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-3) a Imunogenita (odstavec 2-3-4).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně oslabené pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně pět telat 3 měsíce starých nebo nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, pokud je to méně než 3 měsíce, která nemají protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu. Každému teleti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

### 2-3-2 Schopnost vyvolat zmetání a průchod placentou.

Pro zkoušku se použije nejméně dvacet čtyři březích krav, které nemají protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu. Z toho je osm krav ve čtvrtém měsíci březosti, osm krav v pátém měsíci březosti, osm krav v šestém nebo v sedmém měsíci březosti. Doporučeným způsobem se každé krávě podá množství vakcinačního viru, které odpovídá desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Krávy se pozorují nejméně denně až do konce březosti.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže:

- při zmetání se vyšetřením nezjistí v plodu ani v placentě přítomnost viru ani virových antigenů;
- u telat narozených v termínu se vyšetřením nezjistí protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu před napitím kolostra.

**2-3-3 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, pěti telatům použitým ve zkoušce na bezpečnost; postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Použijí se telata 3 měsíce stará nebo

nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, pokud je to méně než 3 měsíce, a která nemají protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasázuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Od pěti telat použitých ve zkoušce na bezpečnost se v době, kdy může být vakcinační virus snadno prokázán, odeberou vhodné vzorky a vyšetří se na přítomnost a titer viru. Vzorky se potom smíchají a podají se intranazálně dvěma dalším telatům stejného stáří, která nemají protilátky proti viru boviní rinotracheitidy. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Pokud se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá příznaky, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a nezjistí se žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-4 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí telata 2 až 3 měsíce stará. Množství vakcíny podané každému teleti není větší než minimální titer viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce oslabené pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně sedm telat, která nemají protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět telat. Nejméně dvě telata se ponechají jako kontroly. Za 21 dnů se každé tele intranazálně čelenuje dostatečným množstvím virulentního viru infekční rinotracheitidy skotu. Po čelení se telata pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže kontroly jsou bez typických příznaků onemocnění, jako je horečka, oční a nosní výtok a ulcerace nosní sliznice.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelení:

- vakcinovaná telata mají nejvýše mírné příznaky;
- u nejméně čtyř z pěti vakcinovaných telat je maximální titer viru, zjištěný v nosním hlenu, nejméně stokrát nižší než průměr maximálních titrů zjištěných u kontrolních telat;
- průměrný počet dnů, kdy je virus vylučován, je nejméně o tři dny kratší u vakcinovaných telat než u telat kontrolních.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

### 3-1 Totožnost

**3-1-1** Po smíchání se vhodným množstvím monospecifického antiséra, vakcína již není schopna infikovat vnímavé buněčné kultury, do nichž se inokuluje.

**3-1-2** Ověří se markery kmene.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

3-4 **Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti viru infekční rinotracheitidy skotu a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro skot. Po 7 dnech se provede pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

3-5 **Bezpečnost.** Použijí se dvě telata 3 měsíce stará nebo nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, pokud je to méně než 3 měsíce, a která nemají protilátky proti viru infekční rinotracheitidy skotu. Doporučeným způsobem se každému teleti podá deset dávek vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-6 **Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách při teplotě příznivé pro replikaci viru. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje ne méně než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

3-7 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-4 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM RHINOTRACHEITIDIS VIRALIS FELINAE INACTIVATUM

6.0:1207

### Vakcína proti virové rinotracheitidě koček inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru rinotracheitidy koček (kočičí herpesvirus 1), inaktivovaný při zachování přiměřené imunogenity, nebo inaktivovaná frakce tohoto viru s přiměřenou imunogenitou. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti virové rinotracheitidě koček.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách. Skližen viru se inaktivuje; virus se může rozštěpit a fragmenty

purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určena. Během prokazování účinku se může použít dále uvedená zkouška Imunogenita (odstavec 2-3-1).

2-3-1 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Každé kočce se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvacet koček, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1 nebo proti frakci tohoto viru. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset koček. Nejméně deset koček se ponechá jako kontroly. Za 4 týdny se každá kočka čelenuje intranazálně množstvím suspenze virulentního kočičího herpesviru 1 dostatečným vyvolat typické příznaky onemocnění, jako je horečka, výtok z nosu a kašel, u koček, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1 nebo proti frakci tohoto viru. Kočky se pozorují nejméně denně 14 dnů po čelení. Od druhého do čtrnáctého dne po čelení se denně odebírají nosní výplachy a vyšetří se na vylučování viru. Denně se zaznamená tělesná teplota a příznaky onemocnění podle dále uvedeného bodovacího systému.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže bodová hodnota (skóre) u vakcinovaných koček je významně nižší než u kontrol.

Příznaky	Bodová hodnota (skóre)
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota:	
39,5 °C až 40,0 °C	1
40,0 °C a vyšší	2
37,0 °C a nižší	3
zánět jazyka (glossitis)	3
nosní výtok – mírný	1
nosní výtok – hojný	2
kašel	2
kýchání	1
kýchání záchvatovitě	2
oční výtok – mírný	1
oční výtok – závažný	2
zánět spojivek	2
úbytek hmotnosti 5,0 % a vyšší	5
vylučování viru (celkový počet dnů):	
4 dny a méně	1
5 dnů až 7 dnů	2
více než 7 dnů	3

## 2-4 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-4-1 Zbytkový živý virus.** Zkouška na zbytkový živý virus se provede dvěma pasážemi v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily při výrobě vakcíny, nebo v buněčných kulturách prokazatelně nejméně stejně citlivých; množství inaktivované sklizně viru použité ve zkoušce odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Inaktivovaná sklizeň viru vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus.

**2-4-2 Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku na účinnost (odstavec 3-5) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Pro zkoušku se použije skupina patnácti séronegativních myší. Každé myši se podá polovina doporučené dávky vakcíny a za 7 dnů se podání opakuje. Za 21 dnů po prvním podání se odeberou vzorky krve a stanoví se hladina protilátek proti kočičímu herpesviru 1. Použije se vhodná imunochemická metoda (2.7.1), jako je imunofluorescenční technika s použitím spojených sér od skupin po třech myších. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hladiny protilátek nejsou významně nižší než hladiny protilátek získané se šarží vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost.

## 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po podání zvířatům, která nemají specifické protilátky proti kočičímu herpesviru 1 nebo proti frakci tohoto viru použité k výrobě vakcíny, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky 8 až 12 týdnů staré, přednostně ty, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1 nebo proti frakci tohoto viru, nebo, kde je to zdůvodněné, použijí se kočky, které mají nízkou hladinu těchto protilátek až do doby, než jsou vakcinovány proti rinotracheitidě koček a podání vakcíny nevyvolá anamnestickou odpověď. Doporučeným způsobem se každé kočce podá dvojnásobná dávka vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Zbytkový živý virus.** Provede se zkouška na zbytkový živý kočičí herpesvirus 1. Použije se deset dávek vakcíny a dvě pasáže v buněčných kulturách stejného typu, jaké se použily pro přípravu vakcíny, nebo v jiných vhodně citlivých buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, které může interferovat se zkouškou, oddělí se,

kde je to možné, adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje virus ani jinak nebrání zjištění živého viru.

**3-5 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky popsané v odstavci 2-3-1 Imunogenita.

## VACCINUM RHINOTRACHEITIDIS VIRALIS FELINAE VIVUM

6.0:1206

Vakcína proti virové rinotracheitidě koček živá

*Synonyma.* Vaccinum rhinotracheitidis viralis felinae vivum cryodesiccatum, Vakcína proti virové rinotracheitidě koček živá lyofilizovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru rinotracheitidy koček (kočičí herpesvirus 1). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci koček proti virové rinotracheitidě koček.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kočky, pro které je určen (včetně bezpečnosti pro březí kočky, pokud není takové použití kontraindikováno).

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které jsou doporučené pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky nejnižšího doporučeného stáří. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

Pro každou zkoušku se použije nejméně deset koček, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1. Každé kočce se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinasobku maximálního titru viru, které se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá abnormální místní nebo celkové reakce, příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, přítomné mezi matečným inokulem a šarží

vakcíny, dvěma kočkám, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážíje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každé kočce se doporučeným způsobem podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který může nejpravděpodobněji vést ke zvratu virulence. Za 2 až 4 dny se odeberou vzorky nosní sliznice, mandlí a příslušných mízních uzlin a průdušnice každé kočky. Smíchají se, homogenizují se v 10 ml tlumivého roztoku s chloridem sodným a slijí se. 1 ml supernatantní tekutiny se intranazálně podá každé ze dvou dalších koček. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží.

Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-3-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí kočky 8 až 12 týdnů staré. Každé kočce se podá množství vakcinačního viru, které není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu, a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně dvacet koček, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně deset koček. Nejméně deset koček se ponechá jako kontroly. Za 4 týdny se každá kočka čelenuje intranazálně množstvím suspenze virulentního kočičího herpesviru 1 dostatečným pro vyvolání typických příznaků onemocnění, jakými jsou horečka, výtok z nosu a kašel. Kočky se pozorují nejméně denně 14 dnů po čelení. Od druhého do čtrnáctého dne po čelení se denně odebírají nosní výplachy a vyšetří se na vylučování viru. Denně se zaznamená tělesná teplota a příznaky onemocnění podle dále uvedeného bodovacího systému.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovací doby po čelení je bodová hodnota (skóre) vakcinovaných koček významně nižší než u kontrol.

Příznaky	Bodová hodnota (skóre)
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota:	
39,5 °C až 40,0 °C	1

40,0 °C a vyšší	2
37,0 °C a nižší	3
zánět jazyka (glossitis)	3
nosní výtok – mírný	1
nosní výtok – hojný	2
kašel	2
kýchání	1
kýchání záchvatovitě	2
oční výtok – mírný	1
oční výtok – závažný	2
zánět spojivek	2
úbytek hmotnosti 5,0 % a vyšší	5
vylučování viru (celkový počet dnů):	
4 dny a méně	1
5 dnů až 7 dnů	2
více než 7 dnů	3

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Vakcína smíchaná s monospecifickým antisérem již neinfikuje vnímavé buněčné kultury, do kterých se inokuluje.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti kočičímu herpesviru 1 a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro kočku. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují po 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dvě kočky 8 až 12 týdnů staré, které nemají protilátky proti kočičímu herpesviru 1. Doporučeným způsobem se každé kočce podá deset dávek vakcíny. Kočky se pozorují nejméně denně po 14 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná kočka nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje ve vhodných buněčných kulturách a při teplotě příznivé pro replikaci viru. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM SALMONELLAE ENTERITIDIS AD PULLUM INACTIVATUM

6.0:1947

### Vakcína proti Salmonella Enteritidis pro kuřata inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Salmonella enterica* Enteritidis inaktivovaný při zachování přiměřených imunogenních vlastností. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům ke snížení kolonizace *S. enterica* Enteritidis a snížení vylučování *S. enterica* Enteritidis trusem.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Inokulum se pomnožuje ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnožuje odděleně. Během výroby se vhodnými metodami monitorují různé parametry, jako je rychlost růstu; zjištěné hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu. Čistota a totožnost kultur se ověřují u sklizně pomocí vhodných metod. Po pomnožení se sklizně bakterií odděleně shromáždí, inaktivují se vhodnou metodou a spojí se. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

**2-2-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob podání doporučený pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně deset kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Doporučeným způsobem a metodou se podá každému kuřeti dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se doporučeným schématem požaduje revakcinace, podá se každému kuřeti po nejméně 14 dnech jedna další dávka. Kuřata se pozorují nejméně denně do nejméně 21 dnů po posledním podání vakcíny.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-2 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Každému kuřeti se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně šedesát SPF kuřat (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnížší stáří doporučené pro vakcinaci. Nejméně třicet kuřat se vakcinuje ne více než minimálním doporučeným počtem dávek vakcíny. Pro každou

skupinu vakcinovaných kuřat se ponechá nejméně třicet kuřat jako kontroly. Obě skupiny se čelenují za 4 týdny po posledním podání vakcíny; perorálně se podá každému kuřeti dostatečné množství kmene *S. enterica* Enteritidis schopné kolonizovat kuřata. Den před čelení se odeberou vzorky krve kontrolním kuřatům. Kuřata se pozorují nejméně denně po 4 týdny. Individuálně se odeberou čerstvé vzorky trusu první den po čelení a nejméně dvakrát týdně (včetně sedmého dne) až do čtrnáctého dne po čelení. Čerstvé vzorky trusu se vyšetří na přítomnost *S. enterica* Enteritidis přímým vyočkováním na pevné půdy. Všechna přežívající kuřata se na konci pozorovacího období šetrně utráť, odeberou se vzorky jater a sleziny a vyšetří se vhodnou metodou na přítomnost *S. enterica* Enteritidis.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti *S. enterica* Enteritidis u některého kontrolního kuřete před čelení.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- počet *S. enterica* Enteritidis v čerstvých vzorcích trusu vakcinovaných kuřat odebraných v různých dnech po čelení je významně nižší než u kontrol a zůstává nižší až do konce zkoušky;
- počet pozitivních vzorků jater a sleziny je u vakcinovaných kuřat významně nižší než u kontrol.

##### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška Účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně patnáct SPF kuřat (5.2.2). Nejméně pět SPF kuřat se ponechá jako kontroly. Každému z deseti kuřat se doporučeným způsobem podá jedna dávka vakcíny. Kde je doporučeným schématem požadována revakcinace, může se revakcinace v této zkoušce provést s podmínkou, že se prokázalo, že se stále zajistí vhodné citlivý zkušební systém. V daném intervalu po posledním injekčním podání se odebere krev každému vakcinovanému a kontrolnímu kuřeti a připraví se vzorky séra. Vhodnou validovanou sérologickou metodou se stanoví titer protilátek proti *S. enterica* Enteritidis v každém vzorku séra. Vypočítá se titer pro vakcinovanou skupinu.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže specifické protilátky proti *S. enterica* Enteritidis se zjistí v jednom nebo více sérech kontrolních kuřat v daném intervalu po době podání vakcíny vakcinované skupině.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže titry protilátek skupiny vakcinovaných kuřat v daném intervalu po každé vakcinaci, kde je to vhodné, nejsou významně nižší než titry získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost (odstavec 3-4).

#### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** U zvířat bez protilátek proti *S. enterica* Enteritidis vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Dvojnásobná dávka vakcíny se podá doporučeným způsobem každému z nejméně deseti SPF kuřat (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří, doporučené pro vakcinaci. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky Imunogenita (odstavec 2-2-2).

## VACCINUM SALMONELLAE TYPHIMURIUM AD PULLUM INACTIVATUM

6.0:2361

### Vakcína proti Salmonella Typhimurium pro kuřata inaktivovaná

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující jeden nebo více vhodných kmenů *Salmonella enterica* Typhimurium inaktivovaný při zachování přiměřených imunogenních vlastností. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům ke snížení kolonizace *S. enterica* Typhimurium a snížení vylučování *S. enterica* Typhimurium trusem.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Inokulum se pomnoží ve vhodné živné půdě; každý kmen se pomnoží odděleně. Během výroby se vhodnými metodami monitorují různé parametry, jako je rychlost růstu; zjištěné hodnoty jsou v rozmezí limitů schválených pro danou vakcínu. Čistota a totožnost kultur se ověřují u sklizně pomocí vhodných metod. Po pomnožení se sklizně bakterií odděleně shromáždí, inaktivují se vhodnou metodou a spojí se. Vakcína může obsahovat adjuvans.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍN

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ptáky, pro které je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

2-2-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob podání doporučený pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně deset kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Do-

poručeným způsobem a metodou se podá každému kuřeti dvojnásobná dávka vakcíny. Jestliže se doporučeným schématem požaduje revakcinace, podá se každému kuřeti po nejméně 14 dnech jedna další dávka. Kuřata se pozorují nejméně denně do nejméně 21 dnů po posledním podání vakcíny.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat má abnormální klinické příznaky onemocnění nebo uhyne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá abnormální místní nebo celkovou reakci nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-2 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. Každému kuřeti se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně šedesát SPF kuřat (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Nejméně třicet kuřat se vakcinuje ne více než minimálním doporučeným počtem dávek vakcíny. Pro každou skupinu vakcinovaných kuřat se ponechá nejméně třicet kuřat jako kontroly. Obě skupiny se čelenují za 4 týdny po posledním podání vakcíny. Perorálně se podá každému kuřeti dostatečné množství kmene *S. enterica* Typhimurium, schopné kolonizovat kuřata. Den před čelení se odeberou kontrolním kuřatům vzorky krve. Kuřata se pozorují nejméně denně po 4 týdny. Individuálně se odeberou čerstvé vzorky trusu první den po čelení a nejméně dvakrát týdně (včetně sedmého dne) až do čtrnáctého dne po čelení. Čerstvé vzorky trusu se vyšetří na přítomnost *S. enterica* Typhimurium přímým vyočkováním na pevné půdy. Všechna přežívající kuřata se na konci pozorovacího období šetrně utratí, odeberou se vzorky jater a sleziny a vyšetří se vhodnou metodou na přítomnost *S. enterica* Typhimurium. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti *S. enterica* Typhimurium u některého kontrolního kuřete před čelení.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- počet *S. enterica* Typhimurium v čerstvých vzorcích trusu vakcinovaných kuřat odebraných v různých dnech po čelení je významně nižší než u kontrol a zůstává nižší až do konce zkoušky;
- počet pozitivních vzorků jater a sleziny je u vakcinovaných kuřat významně nižší než u kontrol.

##### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

2-3-1 **Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku Účinnost (odstavec 3-4) není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží vakcíny s minimální účinností. Kde se zkouška neprovádí, použije se alternativní validovaná metoda a kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně patnáct SPF kuřat (5.2.2). Nejméně pět SPF kuřat se ponechá jako kontroly. Každému z deseti kuřat se doporučeným způsobem podá jedna dávka vakcíny. Kde je doporučeným schématem požadována revakcinace, může se revakcinace v této zkoušce provést s podmínkou, že se prokázalo, že se stále zajistí vhodně citlivý zkušební systém. V daném intervalu po posledním injekčním podání

se odebere krev každému vakcinovanému a kontrolnímu kuřeti a připraví se vzorky séra. Vhodnou validovanou sérologickou metodou se stanoví titer protilátek proti *S. enterica* Typhimurium v každém vzorku séra. Vypočítá se titer pro vakcinovanou skupinu.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže specifické protilátky proti *S. enterica* Typhimurium se zjistí v jednom nebo více sérech kontrolních kuřat v daném intervalu po době podání vakcíny vakcinované skupině.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže titry protilátek skupiny vakcinovaných kuřat v daném intervalu po každé vakcinaci, kde je to vhodné, nejsou významně nižší než titry získané se šarží, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost (odstavec 3-4).

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

3-1 **Totožnost.** U zvířat bez protilátek proti *S. enterica* Typhimurium vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

3-2 **Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

3-3 **Bezpečnost.** Dvojnásobná dávka vakcíny se podá doporučeným způsobem každému z nejméně deseti SPF kuřat (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky Imunogenita (odstavec 2-2-2).

## VACCINUM TENOSYNOVITIDIS VIRALIS AVIARIAE VIVUM

6.0:1956

Vakcína proti virové tenosynovitidě ptáků živá

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru ptačí tenosynovitidy (ptačí orthoreovirus). Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům k aktivní imunizaci.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

### 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

2-4-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání vakcíny. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru, které odpovídá nejméně desetinasobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Na konci pozorovací doby se provede histologické vyšetření kloubů a šlachových pochev nohou a běháků (jako základ pro srovnání ve zkoušce na zvýšení virulence). Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky virové tenosynovitidy ptáků nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-4-2 **Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, skupině pěti jednodenních kuřat z SPF chovu (5.2.2), postupném pasážování, kde je to možné pětkrát, na dalších skupinách jednodenních kuřat a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Jestliže vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda; jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Vhodným způsobem se podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Kuřata se šetrně utratí v době, kdy je virus dostatečně koncentrován v nejvhodnějším materiálu (např. ve šlachách, ve šlachových pochvách a v tekutých exsudátech hlezňových kloubů, ve slezině). Z tohoto materiálu od každého kuřete se připraví suspenze a vzorky se spojí. Každému z pěti dalších kuřat stejného stáří a původu se podá po 0,1 ml směsného vzorku způsobem, který může nejpravděpodobněji vést ke zvýšení virulence. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného vakcinačního viru, který se získá. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvý-

šení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-4-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podané každému kuřeti není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny. Použije se nejméně třicet kuřat stejného původu z SPF chovu (5.2.2). Vakcína se podá doporučeným způsobem nejméně dvaceti kuřatům. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé kuře čelenuje vhodným způsobem dostatečným množstvím virulentního viru tenosynovitidy ptáků. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů po čelení. Zaznamenají se úhyny a přežívající kuřata, která mají klinické příznaky onemocnění. Jestliže se čelení provádí do polštářku běháku, může se přechodný otok polštářku během prvních pěti dnů po čelení považovat za nespecifický. Na konci pozorovacího období se šetrně utratí všechna přežívající kuřata a provede se makroskopické a/nebo mikroskopické vyšetření kloubů a šlachových pochv běháků a nohou, např. exsudát a otok. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelení méně než 80 % kontrolních kuřat uhynie nebo má buď závažné klinické příznaky virové tenosynovitidy ptáků, nebo má makroskopické a/nebo mikroskopické změny v kloubech a šlachových pochvách běháků a nohou;
- nebo v období mezi vakcinací a čelením více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelení nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a buď nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění, nebo nemá makroskopické a/nebo mikroskopické změny v kloubech a šlachových pochvách běháků a nohou.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** K prokázání vakcinačního viru se provede imunobarvení v buněčných kulturách.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k injekčnímu podání vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*. Vakcíny neurčené pro injekční podání buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2) nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Každému kuřeti se doporučeným způsobem a metodou podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky Imunogenita (odstavec 2-4-3). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedená s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM TETANI AD USUM VETERINARIUM

6.0:0697

### Vakcína proti tetanu pro veterinární použití

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující neurotoxin *Clostridium tetani* inaktivovaný tak, že je odstraněna toxicita při zachování přiměřené imunogenity. Vakcína se může použít pro vyvolání aktivní a/nebo pasivní imunity.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

*Cl. tetani* použité pro výrobu se pomnoží ve vhodné tekuté půdě. Toxin se purifikuje a potom detoxikuje, nebo se může detoxikovat před purifikací. Antigenní čistota se stanoví v Lf jednotkách tetanového toxoidu na miligram bílkoviny a prokazatelně není nižší než hodnota schválená pro daný výrobek.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro zvířata, pro která je určena. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Tvorba antigenů (odstavec 2-2-1), Bezpečnost (odstavec 2-2-2) a Imunogenita (odstavec 2-2-3). Kmen *Cl. tetani* použitý při přípravě vakcíny prokazatelně vyhovuje z hlediska tvorby neurotoxinu.



**2-2-1 Tvorba antigenů.** Tvorba neurotoxinu *Cl. tetani* se ověřit vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) provedenou s neurotoxinem získaným z vakcinačního kmene za podmínek použitých pro výrobu vakcíny.

**2-2-2 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání a na každém druhu zvířat, pro který je vakcína určena; použijí se zvířata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci a nejcitlivější kategorie druhu. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny.

**2-2-2-1 Obecná bezpečnost.** Pro každou zkoušku se použije nejméně patnáct zvířat, která nemají antitoxické protilátky. Každému zvířeti se podá dvojnásobná dávka vakcíny. Po doporučeném intervalu se každému zvířeti podá ještě jedna dávka vakcíny. Zvířata se pozorují nejméně denně do čtrnáctého dne po posledním podání. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-2-2 Bezpečnost na březích zvířatech.** Pokud je vakcína určena pro použití u březích zvířat, vakcinují se zvířata ve stadiu březosti a podle schématu uvedeného v označení na obalu a doba pozorování se prodlouží nad dobu požadovanou u obecné bezpečnosti až do jednoho dne po porodu.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně a jestliže se nezjistí žádné nežádoucí vlivy na březost nebo potomstvo.

### 2-2-3 Imunogenita

**2-2-3-1 Zkouška na imunogenitu na cílových druzích zvířat.** Pro každý cílový druh se má prokázat, že vakcína po podání podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem vyvolá imunitní odpověď shodnou s požadavky na výrobek (např. vznik antitoxických protilátek nebo vznik ochranných hladin antitoxických protilátek).

**2-2-3-2 Zkouška na imunogenitu na morčatech.** Každému z nejméně pěti morčat, která nemají protilátky proti neurotoxinu *Cl. tetani* se subkutánně podá jedna dávka vakcíny. Za 28 dnů se opět subkutánně podá jedna dávka každému morčeti. Za 14 dnů po druhé dávce se odebere každému morčeti krev a připraví se vzorky séra. U každého séra se stanoví titer protilátky proti neurotoxinu *Cl. tetani* za použití vhodné imunochemické metody (2.7.1), jako je toxinvazující inhibiční test (ToBI test), a homologního referenčního séra. Stanoví se průměrný titer protilátek u vzorků sér.

*Antisérum proti Clostridium tetani morčecí pro vakcíny pro veterinární použití BRP* je vhodné jako referenční sérum.

Vakcína proti tetanu určená k použití u jiných zvířat než u koní vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titer protilátek u morčat je nejméně 7,5 m. j. v mililitru.

Vakcína proti tetanu určená k použití u koní vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titer protilátek u morčat je nejméně 30 m. j. v mililitru.

U vakcíny proti tetanu uvedené jako kombinovaná vakcína pro použití u jiných zvířat než u koní se může výše uvedená zkouška provést místo na morčatech na vnímavých králících. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titer pro-

tilátek u vakcinovaných králíků je nejméně 2,5 m. j. v mililitru.

*Antisérum proti rodu Clostridium (vícesložkové) králíci pro vakcíny pro veterinární použití BRP a Antisérum proti Clostridium tetani králíci pro veterinární použití BRP* jsou vhodné jako referenční séra.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Nepřítomnost toxinu a nevratnost toxoidu.** Provede se zkouška na vratnost k toxicitě s detoxikovanou sklizní za použití dvou skupin po pěti morčatech, každé o hmotnosti 350 g až 450 g; jestliže je vakcína adsorbovaná, provede se zkouška v co možná nejkratším proveditelném časovém intervalu před adsorpcí. Připraví se ředění detoxikované sklizně tak, že každé morče obdrží desetnásobek množství toxoidu (měřeno v Lf jednotkách), které je v dávce vakcíny. Ředění se rozdělí do dvou stejných částí. Jedna část se uchovává při  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  a druhá při  $37^\circ\text{C}$  po 6 týdnů. Každé ředění se přidělí jedné skupině morčat a každému morčeti se podá ředění přidělené jeho skupině. Zvířata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže žádné morče nemá příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit neurotoxinu *Cl. tetani*.

**2-3-2 Zkouška účinnosti šarže.** Není nutné provádět zkoušku Účinnost (odstavec 3-4) u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena se šarží s minimální účinností. Pokud se zkouška uvedená v odstavci Účinnost použije jako Zkouška účinnosti šarže, vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže titer protilátek v mezinárodních jednotkách není nižší než titer zjištěný u šarže vakcíny, která prokazatelně vyhověla z hlediska imunogenity u cílového druhu zvířat.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Jestliže to umožňuje povaha adjuvans, provede se zkouška A. Jinak se provede zkouška B.

**A.** Ve vakcíně se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby vznikl roztok 100 g/l. Roztok se uchovává při  $37^\circ\text{C}$  asi 16 h a odstředí se, až se získá čirá supernatantní tekutina, která reaguje se vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku sraženiny.

**B.** Po podání zvířatům, která nemají protilátky proti neurotoxinu *Cl. tetani*, vyvolává vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína, a kde je to vhodné i tekutina s ní dodávaná, vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Bezpečnost.** Každému z pěti zdravých morčat o hmotnosti 350 g až 450 g, která předtím nebyla ošetřena žádnou látkou ovlivňující zkoušku, se na dvě oddělená místa subkutánně podá 5 ml vakcíny rozdělené do dvou stejných dávek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně. Jestliže během 21 dnů po injekčním podání dojde u některého ze zvířat ke vzniku příznaků tetanu nebo k úhynu v důsledku tetanu, vakcína nevyhovuje zkoušce. Jestliže z nespecifických příčin uhynie více než

jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže ve druhé zkoušce uhynie některé zvíře, vakcína nevyhovuje zkoušce.

3-3 **Účinnost.** Vakcína vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-3-2 Imunogenita.

## VACCINUM VARIOLAE GALLINACEAE VIVUM

6.0:0649

### Vakcína proti neštovicím drůbeže živá

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen viru neštovic ptácků. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené pro podání kuřatům k aktivní imunizaci.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích nebo v buněčných kulturách.

##### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

2-2-1 **Embryonovaná slepičí vejce.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v embryonovaných slepičích vejcích, získají se tato vejce z chovů prostých specifikovaných patogenů (SPF) (5.2.2).

2-2-2 **Buněčné kultury.** Jestliže se vakcinační virus kultivuje v buněčných kulturách, vyhovují tyto kultury požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

##### 2-3 INOKULA

2-3-1 **Cizí agens.** Matečné inokulum vyhovuje zkouškám na cizí agens v inokulech (2.6.24). V těchto zkouškách matečného inokula neprošly použité organismy při zahájení zkoušek více než pěti pasážemi od matečného inokula.

##### 2-4 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro kuřata, pro která je určen. Během prokazování bezpečnosti a imunogenity se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-4-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-4-2) a Imunogenita (odstavec 2-4-3).

2-4-1 **Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu vakcinace. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Pro každou zkoušku se použije nejméně dvacet kuřat z SPF chovu (5.2.2). Každému kuřeti se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 10 % kuřat uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcinačnímu viru. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže

žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky neštovic drůbeže nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

2-4-2 **Zvýšení virulence.** Každému z pěti kuřat z SPF chovu (5.2.2) se vhodným způsobem podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Kuřata nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny. Za 4 až 7 dnů po podání se připraví suspenze z vyvolaných kožních lézí každého kuřete a vzorky se spojí. 0,2 ml směsného vzorku se podá skarifikací kůže hřebínku nebo jiné neopeřené části těla nebo jinou vhodnou metodou každému z pěti dalších kuřat z SPF chovu (5.2.2), která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát; ověří se přítomnost viru v každé pasáži. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Provede se zkouška Bezpečnost (odstavec 2-4-1) za použití nepasážovaného vakcinačního viru a maximálně pasážovaného viru, který se získá. Virus se podá tím způsobem doporučeným pro vakcinaci, který je pravděpodobně nejméně bezpečný. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

2-4-3 **Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý doporučený způsob a doporučenou metodu podání. V každém případě se použijí kuřata, která nejsou starší, než je nejnižší stáří doporučené pro vakcinaci. Množství vakcinačního viru podaného každému kuřeti není větší než minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomné v šarží vakcíny. Použije se nejméně třicet kuřat stejného původu a z SPF chovu (5.2.2). Doporučeným způsobem se vakcinuje nejméně dvacet kuřat. Nejméně deset kuřat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé kuře čelenžuje do pérovných folikulů dostatečným množstvím virulentního viru neštovic drůbeže. Kuřata se pozorují nejméně denně 21 dnů po čelenži. Zaznamenají se úhyny a počet přežívajících kuřat, která mají klinické příznaky onemocnění. Každé přežívající kuře se vyšetří na makroskopické změny: kožní léze hřebínku, lalůček a dalších neopeřených částí kůže a difterické léze sliznic orofaryngeální oblasti.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže:

- během pozorovacího období po čelenži méně než 90 % kontrolních kuřat uhynie nebo má některé klinické příznaky neštovic, včetně zřetelných makroskopických změn kůže nebo sliznic orofaryngeální oblasti
- a/nebo v období mezi vakcinací a čelenží více než 10 % kontrolních nebo vakcinovaných kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhynie z příčin, které nelze přisoudit vakcíně.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže během pozorovacího období po čelenži nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a nemá žádné zřetelné klinické příznaky one-

mocnění, včetně makroskopických lézí kůže a sliznic orofaryngeální oblasti.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** K prokázání vakcinačního viru se provede imunobarvení v buněčných kulturách. U kmenů adaptovaných na vejce se inokuluje vakcína do vajec a zaznamenávají se charakteristické změny.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcíny určené k podání injekčnímu, skarifikačnímu nebo probodnutím křídlelní kožní řasy vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

Vakcíny neurčené k podání injekčnímu, skarifikačnímu nebo probodnutím křídlelní kožní řasy buď vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*, nebo následující zkoušce: provede se kvantitativní zkouška na kontaminaci bakteriemi a houbami a provedou se identifikační zkoušky mikroorganismů zjištěných ve vakcíně; vakcína neobsahuje patogenní mikroorganismy a obsahuje nejvýše jeden nepatogenní mikroorganismus v dávce.

Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata.** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (2.6.7).

**3-4 Cizí agens.** Vakcína vyhovuje zkouškám na cizí agens v šaržích konečného výrobku (2.6.25).

**3-5 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset kuřat z SPF chovu (5.2.2), nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci. Pro vakcíny doporučené k použití u kuřat starších než 6 týdnů se mohou použít kuřata 6 týdnů stará. Doporučeným způsobem se každému kuřeti podá deset dávek vakcíny. Kuřata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže více než 20 % kuřat má abnormální klinické příznaky nebo uhne z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá zřetelné klinické příznaky onemocnění nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcinační virus se titruje inokulací do embryonovaných slepičích vajec z SPF chovu (5.2.2) nebo do vhodných buněčných kultur (5.2.4). Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka obsahuje ne méně než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná podle doporučeného schématu, doporučeným způsobem a metodou vyhovuje zkoušce Imunogenita (odstavec 2-4-3). Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a za použití vakcinační dávky obsahující nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## VACCINUM VIBRIOSIDIS AD SALMONIDEOS INACTIVATUM

6.8:1581

### Vakcína proti vibrióze lososovitých ryb inaktivovaná

*Synonymum.* Vaccinum vibriosidis inactivatum ad salmonidas

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující kultury jednoho nebo více vhodných kmenů nebo sérovarů *Listonella anguillarum (Vibrio anguillarum)*, inaktivované při zachování přiměřených imunogenních vlastností; vakcína může obsahovat také *Vibrio ordalii*. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci lososovitých ryb proti vibrióze.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Kmeny *L. anguillarum* a *V. ordalii* se pomnožují a sklízí odděleně. Sklizeň se inaktivují vhodnou metodou a mohou se purifikovat a koncentrovat. Mohou se použít celé nebo rozrušené buňky a vakcína může obsahovat extracelulární produkty bakterií uvolněné do živné půdy.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Kmeny *L. anguillarum* a *V. ordalii* obsažené ve vakcíně prokazatelně vyhovují z hlediska schopnosti tvorby antigenů majících význam pro ochranu. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ty druhy ryb, pro které je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

##### 2-2-1 Bezpečnost

**2-2-1-1 Laboratorní zkoušky.** Bezpečnost se ověřuje pomocí zkoušek uvedených v odstavcích 2-2-1-1-1, 2-2-1-1-2 nebo v obou, v závislosti na doporučeném schématu pro použití.

Zkouška se provede na každém druhu ryb, pro který je vakcína určena; použijí se ryby nejnižší tělesné hmotnosti doporučené pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny, při teplotě vody nejméně 10 °C.

**2-2-1-1-1 Vakcíny určené pro injekční podání.** Použije se nejméně padesát ryb z populace prostě specifických protilátek proti *L. anguillarum* nebo případně *V. ordalii*, která nebyla vakcinována proti vibrióze a ani jí nebyla vystavena. Každé rybě se intraperitoneálně podá množství vakcíny odpovídající dvojnásobku dávky. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhne více než 6 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-1-1-2 Vakcíny určené k podání koupelí.** Použije se nejméně padesát ryb z populace prostě protilátek proti

*L. anguillarum* nebo případně *V. ordalii*, která nebyla vakcinována proti vibrióze a ani jí nebyla vystavena. Připraví se lázeň o dvojnásobné koncentraci, než se doporučuje. Ryby se v lázni drží po dvojnásobnou dobu, než se doporučuje. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhne více než 6 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-1-2 Terénní studie.** Bezpečnost se prokazuje navíc také terénními zkouškami podáním doporučené dávky dostatečného počtu ryb umístěných nejméně ve dvou provozech.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální reakce nebo neuhne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**2-2-2 Imunogenita.** Proveďte se samostatná zkouška pro každý druh a každý sérovar obsažený ve vakcíně podle schématu určujícího zdroj vody, její průtok a limity teploty a přípravu standardizované čelenže. Každá zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. Každé rybě se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvě stě ryb nejnižší tělesné hmotnosti doporučené pro vakcinaci z populace prosté specifických protilátek proti *L. anguillarum* nebo případně *V. ordalii*, která nebyla vakcinována proti vibrióze ani jí nebyla vystavena. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně sto ryb. Nejméně stu ryb v kontrolní skupině se podá placebo. Vakcinované a kontrolní ryby se pro identifikaci označí. Obě skupiny ryb se drží v jedné nádrži nebo se do více nádrží nasadí po stejném počtu vakcinovaných a kontrolních ryb. Kde je to zdůvodněno a jestliže ryby nemohou být označeny, mohou se použít neoznačené ryby. Vakcinované i kontrolní ryby se potom mohou držet ve stejné nádrži, ale fyzicky oddělené (např. sítěmi na ryby). Ve stanoveném časovém intervalu po vakcinaci, odpovídajícím údajům o začátku imunity, se všechny ryby vhodným způsobem čelenžují dostatečným množstvím kultur *L. anguillarum* nebo *V. ordalii* s ověřenou virulencí. Ryby se pozorují nejméně denně, dokud není dosaženo nejméně 60 % specifických úhynů v kontrolní skupině. Pro obě skupiny, vakcinovanou i kontrolní, se sestrojí křivka specifické mortality od čelenže. Interpolací se stanoví doba odpovídající 60 % specifické mortality kontrol.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže je 21 dnů po prvním úhynu ryb specifická mortalita v kontrolní skupině nižší než 60 %. Z křivky se odečte mortalita (*M*) vakcinovaných ryb v době odpovídající 60% mortality u kontrol. Relativní procento přežití (RPP) se vypočítá podle vzorce:

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \cdot 100.$$

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hodnota relativního procenta přežití je nejméně 60 % pro vakcíny určené k podání koupelí a 75 % pro vakcíny podávané injekčně.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška účinnosti (odstavec 3-4) se může provádět pro každou šarži vakcíny za po-

užití skupin nejméně třiceti ryb jednoho z druhů, pro který je vakcína určena. Všechny ryby se drží ve stejné nádrži nebo se smíchají stejné počty kontrolních a vakcinovaných ryb v každé nádrži, jestliže se použije více než jedna nádrž. Kde je to zdůvodněno a jestliže ryby nemohou být označeny, mohou se použít neoznačené ryby. Vakcinované i kontrolní ryby se mohou držet ve stejné nádrži, ale fyzicky oddělené (např. sítěmi na ryby). Kde se zkouška neprovádí, může se použít alternativní validovaná zkouška založená na protilátkové odpovědi. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně třicet pět ryb, jejichž hmotnost odpovídá stanoveným limitům tělesné hmotnosti, z populace prosté specifických protilátek proti odpovídajícím sérovarům *L. anguillarum* nebo, kde je to vhodné, proti *V. ordalii*. Zkouška se provede při definované teplotě. Podle doporučeného schématu se ve skupině nejméně dvaceti pěti ryb injekčně podá každé z ryb jedna dávka vakcíny. Nejméně deseti rybám v kontrolní skupině se podá placebo. V určené době po vakcinaci se odeberou vzorky krve. V každém vzorku se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) stanoví hladina specifických protilátek proti různým sérovarům *L. anguillarum*, případně proti *V. ordalii* obsaženým ve vakcíně. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti odpovídajícím sérovarům *L. anguillarum*, případně proti *V. ordalii* v kontrolní skupině. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrná hladina protilátek vakcinovaných ryb není významně nižší než hladina zjištěná u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání rybám prostým specifických protilátek proti *L. anguillarum*, případně proti *V. ordalii*, vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset ryb jednoho z druhů, pro který je vakcína určena. Použité ryby mají, pokud je to možné, nejmenší tělesnou hmotnost doporučenou pro vakcinaci; pokud nejsou ryby o této minimální hmotnosti dostupné, použijí se ryby o hmotnosti nejvýše dvojnásobné. Použijí se ryby z populace, která nemá specifické protilátky proti *L. anguillarum* případně *V. ordalii* a která nebyla vakcinována proti vibrióze ani jí nebyla vystavena. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny při teplotě vody nejméně 10 °C. Pro vakcíny určené k podání injekcí nebo koupelí se každé rybě intraperitoneálně podá množství vakcíny odpovídající dvojnásobku doporučené dávky. Pro vakcíny určené jen k podání koupelí se připraví lázeň s dvojnásobkem doporučené koncentrace vakcíny a ryby se v ní drží po dvojnásobnou dobu, než je doba doporučená. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhne více než 10 % ryb z důvodů, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá zře-

telné příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

3-4 **Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

#### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvedou informace o době potřebné pro vývoj imunity po vakcinaci v rámci podmínek odpovídajících doporučenému použití.

## VACCINUM VIBRIOSIDIS AQUAE FRIGIDAE AD SALMONIDEOS INACTIVATUM

6.8:1580

Vakcína proti vibrióze lososovitých ryb  
v chladných vodách inaktivovaná

*Synonymum.* Vaccinum vibriosidis aquae frigidae  
inactivatum ad salmonidas

#### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující kultury jednoho nebo více vhodných kmenů *Vibrio salmonicida*, inaktivované při zachování přiměřených imunogenních vlastností. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci lososovitých ryb proti vibrióze v chladných vodách.

#### 2 VÝROBA

##### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Kmeny *V. salmonicida* se pomnožují a sklízí odděleně. Získané sklizně se inaktivují vhodnou metodou a mohou se purifikovat a koncentrovat. Mohou se použít celé nebo rozrušené buňky a vakcína může obsahovat extracelulární produkty bakterií uvolněné do živné půdy.

##### 2-2 VÝBĚR SLOŽENÍ VAKCÍNY

Kmen nebo kmeny *V. salmonicida* obsažené ve vakcíně prokazatelně vyhovují z hlediska schopnosti tvorby antigenů majících význam pro ochranu. Vakcína prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro ty druhy ryb, pro které je určena.

Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-2-1) a Imunogenita (odstavec 2-2-2).

##### 2-2-1 Bezpečnost

2-2-1-1 *Laboratorní zkoušky.* Bezpečnost se ověřuje pomocí zkoušek uvedených v odstavcích 2-2-1-1-1, 2-2-1-1-2 nebo v obou, v závislosti na doporučeném schématu pro použití.

Zkouška se provede na každém druhu ryb, pro který je vakcína určena; použijí se ryby nejnižší tělesné hmotnosti doporučené pro vakcinaci. Použije se šarže vakcíny, která má nejméně maximální účinnost, která se může očekávat v šarži vakcíny. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny, při teplotě vody nejméně 10 °C.

2-2-1-1-1 *Vakcíny určené pro injekční podání.* Použije se nejméně padesát ryb z populace prosté specifických protilá-

tek proti *V. salmonicida*, která nebyla vakcinována proti vibrióze v chladných vodách a ani jí nebyla vystavena. Každé rybě se intraperitoneálně podá množství vakcíny odpovídající dvojnásobku dávky. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhynie více než 6 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-1-1-2 *Vakcíny určené k podání koupelí.* Použije se nejméně padesát ryb z populace prosté specifických protilátek proti *V. salmonicida*, která nebyla vakcinována proti vibrióze v chladných vodách a ani jí nebyla vystavena. Připraví se lázeň o dvojnásobné koncentraci, než se doporučuje. Ryby se v lázni drží po dvojnásobnou dobu, než se doporučuje. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhynie více než 6 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-1-2 *Terénní studie.* Bezpečnost se prokazuje navíc také terénními zkouškami podáním doporučené dávky dostatečného počtu ryb umístěných nejméně ve dvou provozech. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá abnormální reakce nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

2-2-2 **Imunogenita.** Provede se samostatná zkouška pro každý druh ryb a každý kmen obsažený ve vakcíně podle schématu určujícího zdroj vody, její průtok a limity teploty a přípravu standardizované čelenže. Každá zkouška se provede pro každý doporučený způsob a metodu podání. Každé rybě se podá vakcína s minimální účinností.

Pro zkoušku se použije nejméně dvě stě ryb nejnižší tělesné hmotnosti doporučené pro vakcinaci z populace prosté specifických protilátek proti *V. salmonicida*, která nebyla vakcinována proti vibrióze v chladných vodách ani jí nebyla vystavena. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně sto ryb. Nejméně stu ryb v kontrolní skupině se podá placebo. Vakcinované a kontrolní ryby se pro identifikaci označí. Všechny ryby se drží v jedné nádrži nebo se do více nádrží nasadí po stejném počtu vakcinovaných a kontrolních ryb, jestliže se použije více než jedna nádrž. Kde je to zdůvodněno a jestliže ryby nemohou být označeny, mohou se použít neoznačené ryby. Vakcinované i kontrolní ryby se potom mohou držet ve stejné nádrži, ale fyzicky oddělené (např. sítěmi na ryby). Ve stanoveném časovém intervalu po vakcinaci se všechny ryby čelenžují, v závislosti na úda-ji o počátku imunity, a to vhodným způsobem a dostatečným množstvím kultury *V. salmonicida* s ověřenou virulencí. Ryby se pozorují nejméně denně, dokud není dosaženo nejméně 60 % specifických úhynů v kontrolní skupině. Pro obě skupiny, vakcinovanou i kontrolní, se sestrojí křivka specifické mortality od čelenže. Interpolací se stanoví doba odpovídající 60 % specifické mortality kontrol.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže je 21 dnů po prvním úhynu ryb specifická mortalita v kontrolní skupině nižší než 60 %. Z křivky se odečte mortalita (*M*) u vakcinovaných ryb

v době odpovídající 60% mortality u kontrol. Relativní procento přežití (RPP) se vypočítá podle vzorce:

$$\left(1 - \frac{M}{60}\right) \cdot 100.$$

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže hodnota relativního procenta přežití je nejméně 60 % u vakcín určených k podání koupelí a nejméně 90 % u vakcín podávaných injekčně.

### 2-3 ZKOUŠENÍ U VÝROBCE

**2-3-1 Zkouška účinnosti šarže.** Zkouška Účinnost (odstavec 3-4) se může provádět pro každou šarži vakcíny za použití skupin nejméně třiceti ryb jednoho z druhů, pro který je vakcína určena. Všechny ryby se drží ve stejné nádrži nebo se smíchají stejné počty kontrolních a vakcinovaných ryb v každé nádrži, jestliže se použije více než jedna nádrž. Kde je to zdůvodněno a jestliže ryby nemohou být označeny, mohou se použít neoznačené ryby. Vakcinované i kontrolní ryby se potom mohou držet ve stejné nádrži, ale fyzicky oddělené (např. sítěmi na ryby). Kde se zkouška neprovádí, může se použít alternativní validovaná metoda založená na protilátkové odpovědi. Kritéria pro přijetí se stanoví vzhledem k šarži vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce uvedené v odstavci Účinnost. Může se použít následující zkouška.

Použije se nejméně třicet pět ryb, jejichž hmotnost odpovídá stanoveným limitům tělesné hmotnosti, z populace prosté specifických protilátek proti *V. salmonicida*. Zkouška se provede při definované teplotě. Podle doporučeného schématu se ve skupině nejméně dvaceti pěti ryb injekčně podá jedna dávka vakcíny každé z ryb. Nejméně deseti rybám v kontrolní skupině se podá placebo. V určené době po vakcinaci se odeberou vzorky krve. V každém vzorku se vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) stanoví hladina specifických protilátek proti *V. salmonicida*. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže se zjistí protilátky proti *V. salmonicida* v kontrolní skupině. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrná hladina protilátek vakcinovaných ryb není významně nižší než hladina zjištěná u šarže vakcíny, která měla vyhovující výsledky ve zkoušce Účinnost.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Po injekčním podání rybám prostým specifických protilátek proti *V. salmonicida* vyvolá vakcína tvorbu těchto protilátek.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium* (0062).

**3-3 Bezpečnost.** Použije se nejméně deset ryb jednoho z druhů, pro který je vakcína určena. Použité ryby mají, pokud je to možné nejmenší tělesnou hmotnost doporučenou pro vakcinaci; pokud nejsou ryby o této minimální hmotnosti dostupné, použijí se ryby o hmotnosti nejvýše dvojnásobné. Použijí se ryby z populace, která nemá specifické protilátky proti *V. salmonicida* a která nebyla vakcinována proti vibrióze v chladných vodách, ani jí nebyla vystavena. Zkouška se provede v podmínkách doporučených pro použití vakcíny při teplotě vody nejméně 10 °C. Pro vakcíny určené k podání injekcí nebo koupelí se každé

rybě intraperitoneálně podá množství odpovídající dvojnásobku dávky. Pro vakcíny určené jen k podání koupelí se připraví lázeň s dvojnásobkem doporučené koncentrace vakcíny a ryby se v ní drží po dvojnásobnou dobu, než je doba doporučená. Ryby se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže uhynie více než 10 % ryb z příčin, které nelze přisoudit vakcíně. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádná ryba nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhynie z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-4 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-2-2 Imunogenita.

### 4 OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvedou informace o době potřebné pro vývoj imunity po vakcinaci v rámci podmínek odpovídajících doporučenému použití.

## VACCINUM VIRI SYNCYTIALIS MEATUS SPIRITUS BOVINI VIVUM

6.0:1177

Vakcína proti respiračnímu onemocnění vyvolanému respiračním syncyotiálním virem skotu živá  
*Synonyma.* Vaccinum viri syncyotialis meatus spiritus bovinivivum cryodesiccatum, Vakcína proti respiračnímu onemocnění vyvolanému respiračním syncyotiálním virem skotu živá lyofilizovaná

### 1 DEFINICE

Je to přípravek obsahující vhodný kmen bovinního respiračního syncyotiálního viru. Tento článek se vztahuje na vakcíny určené k aktivní imunizaci skotu proti infekci bovinním respiračním syncyotiálním virem.

### 2 VÝROBA

#### 2-1 PŘÍPRAVA VAKCÍN

Vakcinační virus se kultivuje v buněčných kulturách.

#### 2-2 SUBSTRÁT PRO POMNOŽENÍ VIRU

**2-2-1 Buněčné kultury.** Buněčné kultury vyhovují požadavkům na buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín (5.2.4).

#### 2-3 VÝBĚR VAKCINAČNÍHO VIRU

Vakcinační virus prokazatelně vyhovuje z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7) pro skot, pro který je určen. Během prokazování bezpečnosti a účinku se mohou použít dále uvedené zkoušky Bezpečnost (odstavec 2-3-1), Zvýšení virulence (odstavec 2-3-2) a Imunogenita (odstavec 2-3-3).

**2-3-1 Bezpečnost.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí telata nejnižšího doporučeného stáří. Použije se vakcinační virus na úrovni nejméně atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny.

**2-3-1-1 Laboratorní zkoušky.** Pro každou zkoušku se použije nejméně pět telat, která nemají protilátky proti respirač-

nímu syncytiálnímu viru skotu. Každému teleti se podá množství vakcinačního viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat v jedné dávce vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů. U všech telat se zaznamená rektální teplota den před vakcinací, v den vakcinace a denně následujících 7 dnů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí abnormální vliv na tělesnou teplotu a jestliže žádné tele nemá abnormální místní nebo celkové reakce nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

**2-3-1-2 Terénní studie.** Telata použitá v terénních studiích se využijí také pro hodnocení výskytu reakcí přecitlivělosti vakcinovaných telat následně vystavených vakcíně nebo terénnímu (divokému) viru. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže není spojená s abnormálním výskytem časných reakcí přecitlivělosti.

**2-3-2 Zvýšení virulence.** Zkouška na zvýšení virulence spočívá v podání vakcinačního viru na úrovni nejvíce atenuované pasáže, která je mezi matečným inokulem a šarží vakcíny, dvěma telatům, která nemají protilátky proti bovinímu respiračnímu syncytiálnímu viru, postupném pasážování, kde je to možné pětkrát na dalších podobných skupinách a zkoušení konečně získaného viru na zvýšení virulence. Pokud vlastnosti vakcinačního viru umožňují postupné pasážování na pěti skupinách cestou přirozeného šíření, může se použít tato metoda, jinak se pasážuje, jak je uvedeno dále, a maximálně pasážovaný virus, který se získá, se zkouší na zvýšení virulence. Musí se přijmout opatření, aby se zabránilo kontaminaci virem z předchozích pasáží.

Každému teleti se intranazálně podá množství vakcinačního viru, které umožní zpětné získání viru pro dále popsané pasáže. Od třetího do sedmého dne po podání viru se denně oběma telatům provádí nosní výtěr, ten se převede do nejvýše 5 ml vhodného média, které se pak použije k inokulaci buněčných kultur pro ověření přítomnosti viru. Dvěma dalším telatům stejného stáří se podá asi 1 ml suspenze z nosního výtěru, která podle výsledku titrace v buněčných kulturách, obsahuje největší množství viru. Tento postup pasážování se provede nejméně pětkrát. Přítomnost viru v každé pasáži se ověří. Jestliže se virus na úrovni některé pasáže nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá příznaky, které lze přisoudit vakcinačnímu viru a jestliže se nezjistí žádný náznak zvýšení virulence maximálně pasážovaného viru při srovnání s nepasážovaným virem. V úvahu se vezmou zejména titry vylučovaného viru v nosních výtěrech. Jestliže se virus zpětně nezíská na úrovni žádné pasáže v první i druhé řadě pasáží, vakcinační virus také vyhovuje zkoušce.

**2-3-3 Imunogenita.** Zkouška se provede pro každý způsob a metodu podání, které se doporučují pro vakcinaci. V každém případě se použijí telata nejnižšího doporučeného stáří. Množství vakcinačního viru, podané každému teleti, je nejvýše minimální titr viru uvedený v označení na obalu a virus je na úrovni nejvíce atenuované pasáže přítomný v šarži vakcíny.

Pro zkoušku se použije nejméně deset telat, která nemají protilátky proti bovinímu respiračnímu syncytiálnímu viru. Séra se získávají od zvířat před vakcinací, sedmý a čtrnáctý den

po vakcinaci a bezprostředně před čelenzí. Podle doporučeného schématu se vakcinuje nejméně pět telat. Pět telat se ponechá jako kontroly. Za 21 dnů se každé tele čelenžuje do dýchacích cest vhodným množstvím virulentního boviního respiračního syncytiálního viru v nízké pasáži. Po čelenží se telata pozorují nejméně denně 14 dnů a sledují se klinické příznaky, zejména respirační, a vylučování viru (nosními výtěry, tracheobronchiálními výplachy).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže protilátky proti respiračnímu syncytiálnímu viru skotu se nezjistí v žádném vzorku u kontrolních zvířat před čelenží a jestliže více než dvě z pěti kontrolních zvířat vylučují čelenžní virus při vyšetření nosních výtěrů nebo tracheobronchiálních výplachů.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže se během pozorovacího období po čelenží zjistí:

- významné snížení průměrného titru a doby vylučování viru u vakcinovaných při srovnání s kontrolami;
- zřetelné omezení výskytu celkových a místních příznaků (pokud čelenžní virus tyto příznaky vyvolává) u vakcinovaných telat.

### 3 ZKOUŠENÍ ŠARŽE

**3-1 Totožnost.** Totožnost vakcíny se prokáže imunobarvením pomocí monospecifického séra ve vhodných buněčných kulturách.

**3-2 Bakteriální a houbová kontaminace.** Vakcína a, kde je to vhodné, i tekutina s ní dodávaná vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccinae ad usum veterinarium (0062)*.

**3-3 Mykoplazmata (2.6.7).** Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

**3-4 Cizí agens.** Vakcinační virus se neutralizuje vhodným monospecifickým antisérem proti bovinímu respiračnímu syncytiálnímu viru a inokuluje se do buněčných kultur známých citlivostí k virům patogenním pro skot. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže se nevytvoří žádný cytopatický efekt a nejsou známky přítomnosti hemadsorbujících agens. Provede se specifická zkouška na pestiviry.

**3-5 Bezpečnost.** Použijí se dvě telata nejnižšího stáří doporučeného pro vakcinaci, která nemají protilátky proti bovinímu respiračnímu syncytiálnímu viru. Doporučeným způsobem se každému teleti podá deset dávek vakcíny. Telata se pozorují nejméně denně po 21 dnů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné tele nemá zřetelné příznaky onemocnění nebo neuhýne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

**3-6 Titr viru.** Vakcína se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

**3-7 Účinnost.** Vakcína podaná doporučeným způsobem a doporučenou metodou vyhovuje požadavkům zkoušky uvedené v odstavci 2-3-3 Imunogenita. Zkoušku na účinnost není nutné provádět u každé šarže vakcíny, jestliže byla provedena s reprezentativní šarží a s použitím vakcinační dávky obsahující ne více než minimální titr viru uvedený v označení na obalu.

## IMUNOSÉRA PRO HUMÁNNÍ POUŽITÍ

### IMMUNOSERUM BOTULINICUM

6.0:0085

Imunosérum proti botulinickému toxinu

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat toxiny, které vytváří *Clostridium botulinum* typu A, typu B nebo typu E, nebo jejich směsi.

#### VÝROBA

Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti toxinům *Cl. botulinum* typu A, typu B nebo typu E.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Specificky neutralizuje toxiny typů *Cl. botulinum* uvedené v označení na obalu a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Nejméně 500 m. j. antitoxinu v mililitru pro typy A a B a nejméně 50 m. j. antitoxinu v mililitru pro typ E.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné na ochranu myši před letálním účinkem neměnné zkušební dávky botulinického toxinu s dávkou referenčního přípravku botulinického antitoxinu potřebnou k dosažení stejné ochrany. Pro toto srovnání je třeba referenční přípravek každého typu botulinického antitoxinu kalibrovat v mezinárodních jednotkách a vhodné přípravky botulinických toxinů, které se používají jako zkušební toxiny. Účinnost každého zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu ke specifickému referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebních toxinů.

Mezinárodní jednotky antitoxinu jsou specifické neutralizační účinnosti proti botulinickému toxinu typu A, typu B a typu E obsažené v deklarovaných množstvích mezinárodních standardů tvořené sušenými koňskými imunoséry proti typům A, B a E. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

*Výběr zvířat.* Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl v hmotnosti mezi nejlehčí a nejtěžší nepřesáhl 5 g.

*Příprava zkušebních toxinů. Varování:* Botulinický toxin je extrémně toxický; při jakékoliv manipulaci se musí zachovávat mimořádná opatrnost. Připraví se toxiny typu A, typu B a typu E ze sterilních filtrátů asi sedmidenních kultur *Cl. botulinum* typu A, typu B a typu E v tekuté živné půdě. K filtrátům se přidávají dva objemy glycerolu, je-li třeba, zahustí se dialýzou proti glycerolu a skladují se při nebo mírně pod 0 °C.

*Výběr zkušebních toxinů.* Zkušební toxiny každého typu se vyberou podle stanovení dávek L+/10 a LD<sub>50</sub>; doba pozorování je 96 h. Zkušební toxiny obsahují nejméně 1000 LD<sub>50</sub> v jedné L+/10 dávce.

*Stanovení zkušebních dávek toxinů (L+/10 dávka).* Připraví se roztoky referenčních přípravků ve vhodné tekutině tak,

aby každý obsahoval 0,25 m. j. antitoxinu v 1 ml. Postupně se pomocí připravených roztoků stanoví zkušební dávky odpovídajících zkušebních toxinů.

Připraví se směsi roztoků referenčních přípravků a zkušebních toxinů tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku, jeden z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti, chráněné před světlem. Z každé směsi se intraperitoneálně podá čtyřem myším po 1,0 ml a myši se pozorují 96 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 1,0 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, které přes jeho částečnou neutralizaci referenčním přípravkem je ještě schopné vyvolat smrt všech čtyř myši v průběhu pozorovací doby.

*Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.* Připraví se roztoky referenčních přípravků ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,25 m. j. antitoxinu. Připraví se roztoky všech zkušebních toxinů ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 2,5 zkušebních dávek.

Účinnost zkoušeného přípravku se určí postupným použitím každého roztoku toxinu a odpovídajícího referenčního přípravku. Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z odstupňovaných objemů zkoušeného přípravku a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Podobně se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a referenčního přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, dále jeden z odstupňovaných objemů roztoku referenčního přípravku s tím, že uprostřed řady je objem (2,0 ml), který obsahuje 0,5 m. j., a zbytek do 5 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Z každé směsi se intraperitoneálně podá čtyřem myším po 1,0 ml a myši se pozorují 96 h. Směs obsahující největší objem antitoxinu, který nestačí ochránit myši před uhynutím, obsahuje 0,5 m. j. Toto množství se použije k vypočítání účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, pokud uhynou všechny myši, kterým byly podány směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, a přežijí ty, kterým byly podány směsi obsahující více referenčního přípravku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede typ *Cl. botulinum*, jehož toxin se přípravkem neutralizuje.

### IMMUNOSERUM CONTRA VENENA VIPERARUM EUROPAEARUM

6.0:0145

Imunosérum proti jedu zmijí evropských

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné neutralizovat jed jednoho nebo více druhů zmijí. Získává se

Imunoséra  
pro humánní  
použití



frakcionací sér zvířat imunizovaných proti jedu nebo jedům zmijí.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Přípravek neutralizuje jed druhů *Vipera ammodytes* nebo *Vipera aspis* nebo *Vipera berus* nebo *Vipera ursinii*, nebo směs těchto jedů uvedenou v označení na obalu, a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Zkoušený přípravek obsahuje v mililitru dostatek antitoxických globulinů k neutralizaci nejméně 100 myších LD<sub>50</sub> jedu *Vipera ammodytes* nebo *Vipera aspis* a nejméně 50 myších LD<sub>50</sub> jedů ostatních druhů zmijí.

Účinnost se určí odhadem dávky nutné k ochraně myši před letálními účinky neměnné zkušební dávky jedu příslušného druhu zmije.

*Výběr zkušebních jedů.* Používají se jedy, které mají normální fyzikálně-chemické, toxikologické a imunologické vlastnosti jedů jednotlivých druhů zmijí. Pokud možno se lyofilizují a skladují v temnu při (5 ± 3) °C.

Zkušební jed se vybere podle stanovení LD<sub>50</sub> pro myši, doba pozorování je 48 h.

*Stanovení zkušební dávky jedu.* Připraví se řada postupných ředění rozpuštěného jedu v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) nebo v jiném izotonickém roztoku tak, aby prostřední ředění obsahovalo předpokládanou LD<sub>50</sub> v 0,25 ml. Naředí se dále stejným objemem téhož ředidla. Použijí se nejméně čtyři myši hmotnosti 18 g až 20 g pro každé ředění a každé z nich se intravenózně podá 0,5 ml. Myši se pozorují 48 h a zaznamenává se počet uhynulých zvířat. LD<sub>50</sub> se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

*Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.* Rozpuštěný zkušební toxin se naředí tak, aby v 0,25 ml byla obsažena zkušební dávka 5 LD<sub>50</sub>.

Připraví se sériové ředění zkoušeného přípravku v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) nebo jiném izotonickém roztoku geometrickou řadou s faktorem 1,5 až 2,5. Použije se dostatečný počet a rozptyl ředění tak, aby bylo možné vytvořit křivku úmrtnosti mezi 20% a 80% úmrtností a provést odhad statistické odchylky.

Směsi se připraví tak, aby 5 ml každé směsi obsahovalo 2,5 ml jednoho z ředění zkoušeného přípravku a 2,5 ml roztoku zkušebního jedu. Směsi se 30 min inkubují ve vodní lázni při 37 °C. Pak se intravenózně podá z každé směsi po 0,5 ml nejméně šesti myším o hmotnosti 18 g až 20 g. Myši se pozorují 48 h a zaznamenává se počet uhynulých zvířat. Obvyklými statistickými metodami se vypočítá PD<sub>50</sub>. Zároveň se výše uvedenou metodou ověří hodnota LD<sub>50</sub> ve zkušební dávce jedu. Účinnost antiséra se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(T_v - 1)}{PD_{50}}$$

v němž značí:

$T_v$  – počet LD<sub>50</sub> ve zkušební dávce jedu.

V každé myši dávce směsi jedu s antisérem je v konečném bodu (end point) obsažena jedna LD<sub>50</sub> jedu nezneutralizovaná antisérem a ta způsobí úhyn 50 % myši, kterým byla

směs podána. Množství jedu neutralizované antisérem je tedy o jednu LD<sub>50</sub> menší než celkové množství obsažené v každé myši dávce. Protože je účinnost antiséra definována spíše jako hodnota LD<sub>50</sub> jedu, která je antisérem neutralizována, než jako hodnota LD<sub>50</sub> v jedné myši dávce, je i ve výrazu pro výpočet účinnosti vhodnější  $T_v - 1$  než  $T_v$ .

Alternativně je možné vypočítat počet miligramů zkušebního jedu, který se neutralizoval 1 ml nebo jiným určeným objemem zkoušeného přípravku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede jed nebo jedy, proti kterým je antisérum účinné.

*Varování:* Z důvodu alergenních vlastností zmijích jedů je třeba vhodnými opatřeními zabránit inhalaci jedu v práškové formě.

## IMMUNOSERUM DIPHTHERICUM

6.0:0086

### Imunosérum proti difterickému toxinu

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat toxin, který vytváří *Corynebacterium diphtheriae*.

#### VÝROBA

Získává se frakcionací séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti difterickému toxinu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Specificky neutralizuje toxin vytvořený *C. diphtheriae* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Nejméně 1000 m. j. antitoxinu v mililitru přípravku získaného z koňského séra a nejméně 500 m. j. antitoxinu v mililitru přípravku získaného ze séra jiných savců.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat nebo králíků před erytrogenním účinkem neměnné zkušební dávky difterického toxinu s dávkou referenčního přípravku difterického antitoxinu potřebnou k dosažení stejné ochrany. Pro toto srovnání je třeba referenční přípravek kalibrovaný v mezinárodních jednotkách a vhodný přípravek difterického toxinu, který se používá jako zkušební toxin. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka antitoxinu je specifická neutralizační účinnost proti difterickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu tvořeným určitým množstvím sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

*Příprava zkušebního toxinu.* Zkušební toxin se připraví z kultur *C. diphtheriae* v tekuté živné půdě. Filtrací kultury se získá sterilní toxický filtrát, který se skladuje při 4 °C.

**Výběr zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávky Lr/100 a minimální reakční dávky u morčat a králíků; doba pozorování je 48 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje nejméně 200 minimálních reakčních dávek v jedné Lr/100 dávce.

**Minimální reakční dávka.** Je to nejmenší množství toxinu, které po intrakutánním podání morčatům nebo králíkům vyvolá do 48 h malou charakteristickou reakci v místě vpichu.

Zkušební toxin se před stanovením antitoxinu nechá stát několik měsíců. Během této doby se snižuje jeho toxicita a může se zvýšit Lr/100 dávka. V častých intervalech se zjišťuje minimální reakční dávka a Lr/100 dávka. Když se pokusně prokáže, že Lr/100 dávka je konstantní, je zkušební toxin připraven k použití a může se používat po dlouhou dobu. Skladuje se ve tmě při 0 °C až 5 °C. Jeho sterilita se zajistí přidáním toluenu nebo jiné protimikrobní látky, která nepůsobí rychlý pokles specifické toxicity.

**Stanovení zkušební dávky toxinu (Lr/100 dávka).** Referenční přípravek se ve vhodné tekutině zředí tak, aby 1 ml obsahoval 0,1 m. j. antitoxinu.

Připraví se směsí roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se ponechají 15 min až 60 min při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použijí dvě zvířata, z nichž se každému intrakutánně podá 0,2 ml do oholeného nebo depilovaného boku, a pozorují se 48 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, které přes jeho částečnou neutralizaci referenčním přípravkem, je schopné vyvolat malou, ale charakteristickou erytematózní lézi v místě vpichu.

**Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.** Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 0,125 m. j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 zkušební dávky.

Připraví se směsí roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. K doplnění se použije vhodná tekutina. Dále se připraví směsí roztoků zkušebního toxinu a roztoku referenčního přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 0,8 ml obsahující 0,1 m. j., a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 15 min až 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použijí dvě zvířata, z nichž každému se intrakutánně podá 0,2 ml do oholeného nebo depilovaného boku, a pozorují se 48 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání morčata před erytematózním účinkem toxinu, obsahuje 0,1 m. j. Toto množství se použije pro vypočítání účinnosti v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na všech místech vpichu po podání směsi obsahující 0,8 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku jsou erytematózní léze a všechna místa vpi-

chu, do nichž byly podány směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, jsou bez lézí.

## IMMUNOSERUM GANGRAENICUM (CLOSTRIDIUM NOVI)

6.0:0087

### Imunosérum proti plynaté sněti (Clostridium novyi)

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium novyi* (dřívější název: *Clostridium oedematiens*). Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. novyi*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. novyi* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Nejméně 3750 m. j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. novyi* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je třeba referenční přípravek proti plynaté sněti (*Cl. novyi*) kalibrovat v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. novyi*, který se používá jako zkušební toxin. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. novyi* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu tvořeným určitým množstvím sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

**Výběr zvířat.** Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlhčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

**Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. novyi* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se *síranem amonným R*, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a skladuje se v suchu.

**Výběr zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD<sub>50</sub> u myši, doba pozorování je 72 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku v 0,5 mg nebo v menším množství a nejméně 25 LD<sub>50</sub> v každé L+ dávce.

**Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka).** Referenční přípravek se zředí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 m. j. antitoxinu.

Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg.

Připraví se směsí roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 0,8 ml

Imunoséra  
pro humánní  
použití

roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušební toxinu, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intramuskulárně podá po 0,2 ml, a pozorují se 72 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi připravené s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem úhyn všech šesti myší během sledované doby.

**Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.** Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 m. j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušební toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušební toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušební toxinu, jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušební toxinu a referenčního přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušební toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 0,8 ml, který obsahuje 10 m. j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 2,0 ml. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intramuskulárně podá po 0,2 ml, a pozorují se 72 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhytním, obsahuje 10 m. j. Toto množství se použije pro vypočítání účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechny myši, kterým byly podány směsi obsahující 0,8 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly podány směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

## IMMUNOSERUM GANGRAENICUM (CLOSTRIDIUM PERFRINGENS)

6.0:0088

### Imunosérum proti plynatě sněti (Clostridium perfringens)

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium perfringens*. Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. perfringens*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. perfringens* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Nejméně 1500 m. j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. perfringens* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je třeba referenční přípravek proti plynatě sněti (*Cl. perfringens*) kalibrovat v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. perfringens*, který se používá jako zkušební toxin. Účinnost zkušební toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušební toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu tvořeným určitým množstvím sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhledává Světová zdravotnická organizace.

**Výběr zvířat.** Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlehčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

**Příprava zkušební toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. perfringens* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se *síranem amonovým R*, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a skladuje se v suchu.

**Výběr zkušební toxinu.** Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD<sub>50</sub> u myší, doba pozorování je 48 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku ve 4 mg nebo v menším množství a nejméně 20 LD<sub>50</sub> v každé L+ dávce.

**Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka).** Referenční přípravek se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m. j. antitoxinu.

Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg.

Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušební toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušební toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intravenózně podá po 0,5 ml, a pozorují se 48 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi připravené s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem úhyn všech šesti myší během sledované doby.

**Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.** Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m. j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušební toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval pět zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušební toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušební toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkoušeného přípravku, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušební toxinu a referenčního přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušební toxinu

a jeden z řady stoupajících objemů referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 2,0 ml, který obsahuje 10 m. j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 5,0 ml. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intravenózně podá po 0,5 ml, a pozorují se 48 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhynutím, obsahuje 10 m. j. Toto množství se použije pro vypočítání účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechny myši, kterým byly podány směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly podány směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

## IMMUNOSERUM GANGRAENICUM (CLOSTRIDIUM SEPTICUM)

6.0:0089

### Imunosérum proti plynaté sněti (Clostridium septicum)

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium septicum*. Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. septicum*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. septicum* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Nejméně 1500 m. j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. septicum* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je třeba referenční přípravek proti plynaté sněti (*Cl. septicum*) kalibrovat v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. septicum*, který se používá jako zkušební toxin. Účinnost zkušební dávky toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušební dávky toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. septicum* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, tvořeným určitým množstvím sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

*Výběr zvířat.* Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlehčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

*Příprava zkušební dávky toxinu.* Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. septicum* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se *síranem amonným R*, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a skladuje se v suchu.

*Výběr zkušební dávky toxinu.* Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD<sub>50</sub> u myši, doba pozorování je 72 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku v 0,5 mg nebo v menším množství a nejméně 25 LD<sub>50</sub> v každé L+ dávce.

*Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka).* Referenční přípravek se zředí ve vhodné tekutině tak, aby v 1 ml obsahoval 5 m. j. antitoxinu. Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 20 mg. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušební dávky toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušební dávky toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intravenózně podá po 0,5 ml, a pozorují se 72 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi připravené s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem úhyn všech šesti myší během sledované doby.

*Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.* Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m. j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušební dávky toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval pět zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušební dávky toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušební dávky toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkoušeného přípravku, a zbytek do 5 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušební dávky toxinu a referenčního přípravku tak, aby 5 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušební dávky toxinu a jeden z řady stoupajících objemů referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 2,0 ml, který obsahuje 10 m. j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 5,0 ml. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intravenózně podá po 0,5 ml, a pozorují se 72 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhynutím, obsahuje 10 m. j. Toto množství se použije pro vypočítání účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechny myši, kterým byly podány směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly podány směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

## IMMUNOSERUM GANGRAENICUM MIXTUM

6.0:0090

### Imunosérum proti plynaté sněti směsné

#### DEFINICE

Připravuje se smícháním imunosér proti toxinu *Cl. novyi*, *Cl. perfringens* a *Cl. septicum* ve vhodných poměrech.

Imunoséra  
pro humánní  
použití

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Specificky neutralizuje alfa-toxiny vytvořené mikroorganismy *Clostridium novyi* (dřívější název: *Clostridium oedematiens*), *Clostridium perfringens* a *Clostridium septicum* a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

**STANOVENÍ ÚČINNOSTI**

Nejméně 1000 m. j. antitoxinu novyi v mililitru, nejméně 1000 m. j. antitoxinu perfringens v mililitru, nejméně 500 m. j. antitoxinu septicum v mililitru.

Účinnost jednotlivých složek se stanoví biologickou zkouškou, která je předepsána v člancích *Immunoserum gangraenicum (Clostridium novyi) (0087)*, *Immunoserum gangraenicum (Clostridium perfringens) (0088)* a *Immunoserum gangraenicum (Clostridium septicum) (0089)*.

## IMMUNOSERUM TETANICUM AD USUM HUMANUM

**6.0:0091****Imunosérum proti tetanu pro humánní použití****DEFINICE**

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny, které mají schopnost specificky neutralizovat toxin vytvářený mikroorganismem *Clostridium tetani*.

**VÝROBA**

Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti tetanickému toxinu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Specificky neutralizuje toxin vytvářený *Cl. tetani* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

**STANOVENÍ ÚČINNOSTI**

Profylaktický přípravek obsahuje nejméně 1000 m. j. antitoxinu v mililitru. Terapeutický přípravek obsahuje nejméně 3000 m. j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat nebo myši před paralytickým účinkem neměnné dávky tetanického toxinu s dávkou standardního přípravku tetanického antitoxinu potřebnou k dosažení stejné ochrany. Pokud není běžné použití paralytické metody, může se použít letální metoda. Pro tuto metodu je počet zvířat a postup stejný jako u paralytické metody, ale konečným bodem (end point) je počet uhynulých zvířat a místo dávky Lp/10 se používá dávka L+/10. Pro toto porovnání je třeba referenční přípravek tetanického antitoxinu kalibrovaný v mezinárodních jednotkách a vhodný přípravek tetanického toxinu, který se použije jako zkušební toxin. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkušebního tetanického antitoxinu se stanoví ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu stejnou metodou.

Mezinárodní jednotka antitoxinu je specifická neutralizační účinnost proti tetanickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu tvořeným určitým množstvím suchého koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

*Výběr zvířat.* Jestliže se použijí myši, není rozdíl hmotnosti mezi nejlehčí a nejtěžší větší než 5 g.

*Příprava zkušebního toxinu.* Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu asi devítidenní kultury *Cl. tetani* v tekuté živné půdě. K filtrátu se přidají 1 až 2 objemové díly *glycerolu R* a směs se skladuje těsně pod 0 °C. Alternativně se k filtrátu přidá *síran amonný R*, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a skladuje se suchá buď v zatavených ampulkách, nebo ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*.

*Stanovení zkušební dávky toxinu (Lp/10 dávka).* Připraví se roztok porovnávacího přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m. j. antitoxinu.

Jestliže se toxin skladuje jako suchý, rozpustí se ve vhodném rozpouštědle.

Připraví se směsi roztoků porovnávacího přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku porovnávacího přípravku, jeden z řady odstupňovaných objemů zkušebního toxinu a vhodnou tekutinu doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Z každé směsi se subkutánně podá šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou šetrně utratit.

Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,5 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, která je přes jeho částečnou neutralizaci ještě schopna způsobit paralýzu všech šesti myši v průběhu pozorovací doby.

*Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.* Připraví se roztok porovnávacího přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m. j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo pět zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady odstupňovaných objemů zkoušeného přípravku a vhodnou tekutinu doplňující směs na 5,0 ml.

Podobně se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a porovnávacího přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, dále jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku porovnávacího přípravku s tím, že uprostřed řady je objem (2,0 ml), který obsahuje 1 m. j. antitoxinu, a vhodnou tekutinu doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min ponechají při teplotě místnosti chráněné před světlem. Z každé směsi se subkutánně podá šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou šetrně utratit.

Směs obsahující největší objem antitoxinu, který nestačí ochránit myši před paralýzou, obsahuje 1 m. j. Toto množství se použije k výpočtu účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechny myši, kterým byla podána směs s obsahem více než 2,0 ml roztoku porovnávacího přípravku, nemají příznaky paralýzy a všechny myši, kterým byla podána směs s obsahem 2,0 ml nebo méně roztoku porovnávacího přípravku, mají příznaky paralýzy.

## IMUNOSÉRA PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ

### IMMUNOSERUM CLOSTRIDIÍ NOVYI ALPHA AD USUM VETERINARIUM

6.0:0339

Imunosérum proti toxinu alfa Clostridia novyi pro veterinární použití

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat toxin alfa, který produkuje *Clostridium novyi*. Je to sérum nebo přípravek získaný ze séra zvířat imunizovaných proti toxinu alfa *Cl. novyi*.

#### VÝROBA

##### VÝBĚR SLOŽENÍ IMUNOSÉRA

Antitoxin je prokazatelně vhodný z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7). Má se prokázat, že přípravek podaný v minimální doporučené dávce a podle doporučeného návodu, zajišťuje odpověď nebo odpovědi shodné s požadavky stanovenými pro přípravek u každého cílového druhu zvířat.

**Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku popsanou v odstavci Stanovení účinnosti není nezbytné provádět při běžném zkoušení šarží přípravku. Provede se jednou nebo vícekrát podle rozhodnutí nebo se souhlasem oprávněné autority. Kde není zkouška provedena, použije se vhodná validovaná alternativní zkouška; kritéria pro její přijetí se stanoví vzhledem k šarži antitoxinu, která vyhověla zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti a zkouška byla prokazatelně uspokojivá z hlediska imunogenity u cílových druhů zvířat. Následující zkouška se může použít po stanovení uspokojivé korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Vhodnou metodou, jako je imunochemická metoda (2.7.1) nebo neutralizace v buněčných kulturách, se stanoví hladina protilátka proti toxinu alfa *Cl. novyi* v šarži antitoxinu. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách antitoxinu alfa *Cl. novyi*.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační aktivita proti toxinu alfa *Cl. novyi*, obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který sestává z určitého množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální počet uvedený v označení na obalu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se prokáže, že antitoxin specificky reaguje s toxinem alfa produkovaným *Cl. novyi*.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky toxinu alfa *Cl. novyi* s množstvím referenčního přípravku imunoséra

proti toxinu alfa *Cl. novyi*, které je nezbytné k poskytnutí stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrovaný v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je třeba vhodný přípravek toxinu alfa *Cl. novyi*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se určí ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví jako relativní hodnota vztahovaná k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

**Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu asi pětidenní kultury *Cl. novyi* typ B v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Toxin se vybere podle stanovení dávek L+/10 a LD<sub>50</sub> na myších; doba pozorování je 72 h. Vhodný toxin alfa obsahuje nejméně jednu L+/10 dávku v 0,05 mg a nejméně 10 LD<sub>50</sub> v každé L+/10 dávce.

**Stanovení zkušební dávky toxinu.** Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 1 m. j. Zkušební toxin se rozpustí a zředí se vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 1 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se intramuskulárně nebo subkutánně podá dávka 0,2 ml a myši se pozorují 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,2 ml směsi nadbytek toxinu vztaženo ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,2 ml směsi nižší, než je zkušební dávka. Obdobně se připraví další čerstvé směsi tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi objemy stoupajícími v řadě vedle sebe jsou nejvýše 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point). Směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti.

Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intramuskulárně nebo subkutánně podá 0,2 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek směsí stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí daného složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž byla podána.

#### Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku

**Předběžná zkouška.** Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 1 ml obsahoval desetinašobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž každé se intramuskulárně nebo subkutánně podá 0,2 ml, a myši se pozorují 72 h.

Pokud žádná myš neuhyne, 0,2 ml směsi obsahuje více než 0,1 m. j. Pokud uhynou všechny myši, 0,2 ml směsi obsahuje méně než 0,1 m. j.

**Konečná zkouška.** Připraví se směsi roztoku zkušební toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušební toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku; objemy stoupající v řadě vedle sebe se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point) stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 2,0 ml každé směsi obsahují 1,0 ml roztoku zkušební toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která v 0,2 ml obsahuje 0,1 m. j., je směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myši jako směs referenčního přípravku obsahující 0,1 m. j. v 0,2 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20$  % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % a 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální hodnota uvedená v označení na obalu.

## IMMUNOSERUM CLOSTRIDII PERFRINGENTIS BETA AD USUM VETERINARIUM

6.0:0340

### Imunosérum proti toxinu beta Clostridia perfringens pro veterinární použití

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující hlavně globuliny schopné specificky neutralizovat toxin beta, který produkuje *Clostridium perfringens* (typ B a typ C). Je to sérum nebo přípravek získaný ze séra zvířat imunizovaných proti toxinu beta *Cl. perfringens*.

#### VÝROBA

##### VÝBĚR SLOŽENÍ IMUNOSÉRA

Antitoxin je prokazatelně vhodný z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7). Má se prokázat, že přípravek podaný v minimální doporučené dávce a podle doporučeného návodu zajišťuje odpověď nebo odpovědi shodné s požadavky stanovenými pro přípravek u každého cílového druhu zvířat.

**Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku popsanou v odstavci Stanovení účinnosti není nezbytné provádět při běžném zkoušení šarží přípravku. Provede se jednou nebo vícekrát podle rozhodnutí nebo se souhlasem oprávněné autority.

Kde není zkouška provedena, použije se vhodná validovaná alternativní zkouška; kritéria pro její přijetí se stanoví vzhledem k šarži antitoxinu, která vyhověla zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti, a zkouška byla prokazatelně uspokojivá z hlediska imunogenity u cílových druhů zvířat. Následující zkouška se může použít po stanovení uspokojivé korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Vhodnou metodou, jako je imunochemická metoda (2.7.1) nebo neutralizace v buněčných kulturách, se stanoví hladina protilátek proti toxinu beta *Cl. perfringens* v šarži antitoxinu. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách antitoxinu beta *Cl. perfringens*.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační aktivita proti toxinu beta *Cl. perfringens*, obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který sestává z určitého množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální počet uvedený v označení na obalu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se prokáže, že antitoxin specificky reaguje s toxinem beta produkovaným *Cl. perfringens*.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky toxinu beta *Cl. perfringens* s množstvím referenčního přípravku imunoséra proti toxinu beta *Cl. perfringens*, které je nezbytné k poskytnutí stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je třeba vhodný přípravek toxinu beta *Cl. perfringens*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušební toxinu se určí ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví jako relativní hodnota vztažená k referenčnímu přípravku za použití zkušební toxinu.

**Příprava zkušební toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Cl. perfringens* typu B nebo typu C v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávek  $L+$  a  $LD_{50}$  na myších, doba pozorování je 72 h. Vhodný toxin beta obsahuje nejméně jednu dávku  $L+$  v 0,2 mg a nejméně 25  $LD_{50}$  v každé dávce  $L+$ .

**Stanovení zkušební dávky toxinu.** Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 5 m. j. antitoxinu. Zkušební toxin se rozpustí a zředí tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušební toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (10 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušební toxinu, zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti.

Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se intravenózně nebo intraperito-

neálně podá dávka 0,5 ml a pozorují se 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,5 ml směsi nadbytek toxinu vztaženo ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,5 ml směsi nižší, než je zkušební dávka. Obdobně se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (10 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíl mezi objemy stoupajícími v řadě vedle sebe jsou nejvýše 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point). Směsi se 30 min nechají stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek směsí stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí daného složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myši, jimž byla podána.

#### Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku

**Předběžná zkouška.** Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se 30 min nechají stát při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž každé se intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml, myši se pozorují 72 h. Pokud žádná myš neuhyne, 0,5 ml směsi obsahuje více než 1 m. j. Pokud uhynou všechny myši, 0,5 ml směsi obsahuje méně než 1 m. j.

**Konečná zkouška.** Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku; objemy stoupající v řadě vedle sebe se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point) stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 5,0 ml obsahují 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 1 m. j. v 0,5 ml, je směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myši jako směs s referenčním přípravkem obsahující 1 m. j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20\%$  od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % a 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální hodnota uvedená v označení na obalu.

## IMMUNOSERUM CLOSTRIDII PERFRINGENTIS EPSILON AD USUM VETERINARIUM

6.0:0341

### Imunosérum proti toxinu epsilon Clostridia perfringens pro veterinární použití

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat toxin epsilon, který produkuje *Clostridium perfringens* typu D. Je to sérum nebo přípravek získaný ze séra zvířat imunizovaných proti toxinu epsilon *Cl. perfringens*.

#### VÝROBA

##### VÝBĚR SLOŽENÍ IMUNOSÉRA

Antitoxin je prokazatelně vhodný z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7). Má se prokázat, že přípravek podaný v minimální doporučené dávce a podle doporučeného návodu zajišťuje odpověď nebo odpovědi shodné s požadavky stanovenými pro přípravek u každého cílového druhu zvířat.

**Zkouška účinnosti šarže.** Zkoušku popsanou v odstavci Stanovení účinnosti není nezbytné provádět při běžném zkoušení šarží přípravku. Provede se jednou nebo vícekrát podle rozhodnutí nebo se souhlasem oprávněné autority. Kde není zkouška provedena, použije se vhodná validovaná alternativní zkouška; kritéria pro její přijetí se stanoví vzhledem k šarži antitoxinu, která vyhověla zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti a zkouška byla prokazatelně uspokojivá z hlediska imunogenity u cílových druhů zvířat. Následující zkouška se může použít po stanovení uspokojivé korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Vhodnou metodou, jako je imunochemická metoda (2.7.1) nebo neutralizace v buněčných kulturách, se stanoví hladina protilátke proti toxinu epsilon *Cl. perfringens* v šarži antitoxinu. Použije se homologní referenční sérum kalibrované v mezinárodních jednotkách antitoxinu epsilon *Cl. perfringens*.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační aktivita proti toxinu epsilon *Cl. perfringens*, obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který sestává z určitého množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhláší Světová zdravotnická organizace.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální počet uvedený v označení na obalu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se prokáže, že antitoxin specificky reaguje s toxinem epsilon produkovaným *Cl. perfringens*.

#### STANOVENÍ ÚČINNOSTI

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myši nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky toxinu epsilon



*Cl. perfringens* s množstvím referenčního přípravku imunoséra proti toxinu epsilon *Cl. perfringens*, které je nezbytné k poskytnutí stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je třeba vhodný přípravek toxinu epsilon *Cl. perfringens*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se určí ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví jako relativní hodnota vztážená k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

**Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Cl. perfringens* typu D v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávek L+/10 a LD<sub>50</sub> na myších, doba pozorování je 72 h. Vhodný toxin epsilon obsahuje nejméně jednu dávku L+/10 v 0,005 mg a nejméně 20 LD<sub>50</sub> v každé dávce L+/10.

**Stanovení zkušební dávky toxinu.** Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 0,5 m. j. antitoxinu. Zkušební toxin se rozpustí a zředí tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 1 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se intravenózně nebo intraperitoneálně podá dávka 0,5 ml a pozorují se 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,5 ml směsi nadbytek toxinu vztážen ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,5 ml směsi nižší, než je zkušební dávka.

Obdobně se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m. j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi objemy stoupajícími v řadě vedle sebe jsou nejvýše 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point). Směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek směsí stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí daného složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž byla podána.

#### Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku

**Předběžná zkouška.** Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně podá 0,5 ml, myši se pozorují 72 h. Pokud žádná myš neuhyne, 0,5 ml

směsi obsahuje více než 0,1 m. j. Pokud uhynou všechny myši, 0,5 ml směsi obsahuje méně než 0,1 m. j.

**Konečná zkouška.** Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku; objemy stoupající v řadě vedle sebe se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point) stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 5,0 ml obsahují 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se nechají stát 30 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m. j. v 0,5 ml, je směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myší jako směs s referenčním přípravkem obsahující 0,1 m. j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % a 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku;
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální hodnota uvedená v označení na obalu.

## IMMUNOSERUM TETANICUM AD USUM VETERINARIUM

6.0:0343

### Imunosérum proti tetanu pro veterinární použití

#### DEFINICE

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat neurotoxin, který produkuje *Clostridium tetani*. Je to sérum nebo přípravek získaný ze séra zvířat imunizovaných proti tetanickému toxinu.

#### VÝROBA

##### VÝBĚR SLOŽENÍ IMUNOSÉRA

Antitoxin je prokazatelně vhodný z hlediska bezpečnosti (5.2.6) a účinku (5.2.7). Má se prokázat, že přípravek podaný v minimální doporučené dávce a podle doporučeného návodu, zajišťuje odpověď nebo odpovědi shodné s požadavky stanovenými pro přípravek u každého cílového druhu zvířat. Musí se také prokázat schopnost přípravku neutralizovat neurotoxin produkovaný *Cl. tetani*, např. provedením zkoušky na myších, jak je popsáno dále.

**Prokázání neutralizace neurotoxinu.** Schopnost tetanického antitoxinu neutralizovat neurotoxin *Cl. tetani* se určí stanovením dávky nutné k ochraně myši (nebo morčat) proti toxickým účinkům neměnné dávky tetanického toxinu. Zkouška se musí provádět souběžně se zkoušením referenčního přípravku tetanického antitoxinu kalibrovaného v me-

zinárodních jednotkách za použití množství, u kterého se očekává, že poskytne stejnou ochranu. Schopnost zkoušeného antitoxinu neutralizovat neurotoxin (účinnost) se potom může vyjádřit v mezinárodních jednotkách. Pro tuto studii je třeba vhodný přípravek tetanického toxinu, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se určí ve vztahu k referenčnímu přípravku; účinnost zkoušeného přípravku se stanoví jako relativní hodnota vztažená k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

**Příprava zkušebního toxinu.** Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu osmidenní až desetidenní kultury *Cl. tetani* v tekuté živné půdě. Zkušební toxin se může připravit přidáním 1 objemového dílu tohoto filtrátu k 1 až 2 objemovým dílům *glycerolu R*. Roztok zkušebního toxinu se může uchovávat při nebo těsně pod 0 °C. Toxin se také může vhodnou metodou vysušit.

Zkušební toxin se vybere na základě stanovení dávky Lp/10 a 50% paralytické dávky pro myši. Vhodný toxin obsahuje nejméně tisícinásobek 50% paralytické dávky v jedné dávce Lp/10.

**Dávka Lp/10 (Limes paralyticum).** Je to nejmenší množství toxinu, které po smíchání s 0,1 m. j. antitoxinu způsobí u myši (nebo morčat) po subkutánním podání do 4 dnů tetanickou paralýzu.

**50% paralytická dávka.** Je to množství toxinu, které způsobí u myši (nebo morčat) po subkutánním podání do 4 dnů tetanickou paralýzu u poloviny pokusných zvířat.

**Stanovení zkušební dávky toxinu.** Referenční přípravek se rekonstituuje nebo zředí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 0,5 m. j. Zkušební toxin se odměří nebo odváží a rozpustí se ve vhodné tekutině nebo se zředí. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala v jedné injekční dávce 0,1 m. j. antitoxinu a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi objemy stoupajícími v řadě vedle sebe jsou nejvýše 20 % a řada ředění zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point). Všechny směsi se zředí vhodnou tekutinou na stejný konečný objem (4,0 ml, pokud se používají ke zkoušce morčata, nebo na 0,4 ml až 0,6 ml, pokud se používají myši). Směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, z nichž se každému subkutánně podá výše uvedená dávka směsi. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a z průměru hodnot stanovených v jednotlivých zkouškách se vypočítá zkušební dávka. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené ve směsi, která způsobila tetanickou paralýzu u poloviny pokusných zvířat, jimž se tato směs podala.

#### **Stanovení neutralizační schopnosti zkoušeného přípravku**

**Předběžná zkouška.** Odměří nebo odváží se určité množství zkušebního toxinu a rozpustí se nebo se zředí ve vhodné tekutině tak, aby roztok v 1 ml obsahoval pět zkušebních dávek (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby objem zvolený k podání obsahoval v každé směsi zkušební

dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Všechny směsi se doplní vhodnou tekutinou na shodný konečný objem. Směsi se nechají stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, každému se subkutánně podá zvolený objem. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Podle výsledků se vyberou nejvhodnější směsi pro konečnou zkoušku.

**Konečná zkouška.** Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby objem zvolený k podání obsahoval v každé směsi zkušební dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku; objemy stoupající v řadě vedle sebe se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada zahrnuje předpokládaný konečný bod (end point) stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi stejného množství zkušebního toxinu a stoupajících objemů referenčního přípravku; uprostřed řady bude 0,1 m. j. v objemu zvoleném k podání. Všechny směsi se doplní vhodnou tekutinou na stejný konečný objem a nechají se stát 60 min při teplotě místnosti. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, z nichž každému se subkutánně podá zvolená dávka. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m. j. v podaném objemu, je směs, která způsobí tetanickou paralýzu u stejného nebo téměř stejného množství zvířat jako referenční směs obsahující 0,1 m. j. v podaném objemu.

Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné, jestliže výsledek referenčního přípravku je v rozmezí  $\pm 20$  % očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti ( $P = 0,95$ ) jsou stanoveny takto:

- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku;
- 91,5 % a 109 %, použila-li se tři zvířata na dávku;
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

#### **ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Vhodnou imunochemickou metodou (2.7.1) se prokáže, že antitoxin specificky reaguje s neurotoxinem produkovaným *Cl. tetani*. K identifikaci se také může použít zkouška Stanovení účinnosti.

#### **STANOVENÍ ÚČINNOSTI**

Stanoví se titer protilátek proti neurotoxinu produkovanému *Cl. tetani* pomocí vhodné imunochemické metody (2.7.1), jako je toxinvázající inhibiční zkouška (ToBI zkouška), a homologního referenčního séra kalibrovaného v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizující aktivita proti tetanickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který sestává z množství sušeného koňského imunoséra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlášeje Světová zdravotnická organizace.

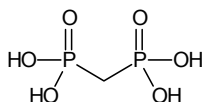
Účinnost konečného přípravku se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách v mililitru a není prokazatelně nižší než minimální hodnota uvedená v označení na obalu.

# RADIOFARMACEUTICKÉ PŘÍPRAVKY

## ACIDUM MEDRONICUM AD RADIOPHARMACEUTICA

Kyselina medronová pro radiofarmaceutické  
přípravky

6.5:2350



CH<sub>6</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>

M<sub>r</sub> 176,0

CAS 1984-15-2

### DEFINICE

Je to kyselina methylenbisfosfonová.

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 %, počítáno na vysušenou látku.

### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý, amorfní nebo krystalický, hygroskopický prášek.

*Rozpustnost.* Velmi snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu bezvodém, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: A.

2.: B.

**A.** Protonová nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (2.2.33).

*Příprava.* Roztok (100 g/l) v deuteriumoxidu R.

*Porovnání.* Roztok kyseliny medronové CRL (100 g/l) v deuteriumoxidu R.

**B.** Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

*Porovnání.* S kyselinou medronovou CRL.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nečistoty A a B.** Protonová nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (2.2.33).

*Zkoušený roztok.* K 1,0 g se přidá 10 ml deuterovaného chloroformu R. 1 h se třepe. Výsledný roztok se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla, aby se odstranila sraženina obsahující kyselinu medronovou. Filtrát se odpaří na asi 0,5 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10 µl kyseliny medronové nečistoty A CRL se smíchá s 1,0 ml deuterovaného chloroformu R.

*Porovnávací roztok (b).* 10 µl kyseliny medronové nečistoty B CRL se smíchá s 1,0 ml deuterovaného chloroformu R.

*Porovnávací roztok (c).* Po zaznamenání NMR spektra zkoušeného roztoku se ke zkoušenému roztoku přidá 10 µl kyseliny medronové nečistoty A CRL a 10 µl kyseliny medronové nečistoty B CRL.

*Přístroj.* NMR spektrometr pracující při nejméně 250 MHz.

Zaznamenají se protonová NMR spektra zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků, je-li třeba použije se *tetramethylsilan R* jako chemický vnitřní standard.

*Poloha signálů.* Deuterovaný chloroform asi 7,3 ppm; nečistota A asi 4,4 ppm a 1,3 ppm; nečistota B asi 4,7 ppm, 2,4 ppm a 1,3 ppm.

*Test způsobilosti:*

– polohy signálů odpovídající nečistotám A a B ve spektru porovnávacího roztoku (c) se významně neliší od poloh signálů ve spektrech porovnávacích roztoků (a) a (b).

*Limity:*

– *integrate:* k získání ploch píků použitých pro porovnání obsahů nečistot se ve spektru zkoušeného roztoku a ve spektru porovnávacího roztoku (c) integruje multiplet při 4,4 ppm odpovídající nečistotě A a multiplet při 2,4 ppm odpovídající nečistotě B;

– *nečistoty A a B:* pro každou nečistotu nejvýše polovina plochy odpovídajícího píku ve spektru porovnávacího roztoku (c) (1 %).

**Fosforečnaný (2.4.11).** Nejvýše 1,0 %; 0,100 g se rozpustí v 10 ml vody R a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou R na 100,0 ml.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 105 °C.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 2,0 m. j./mg.

### STANOVENÍ OBSAHU

75 mg se rozpustí ve vodě R, zředí se jí na 50 ml a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za použití 0,1 ml zelené bromkresolové RS jako indikátoru.

1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS odpovídá 8,80 mg CH<sub>6</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>.

### SKLADOVÁNÍ

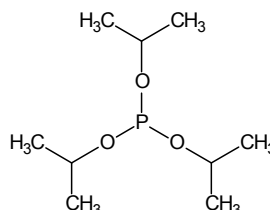
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

### OZNAČOVÁNÍ

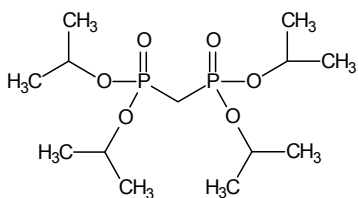
V označení na obalu se doporučuje provést provozní zkoušku před použitím látky ve výrobě radiofarmak. Tato zkouška zajistí, že látka poskytne při daných výrobních podmínkách radiofarmakum v požadovaném množství a odpovídající jakosti.

### NEČISTOTY

*Specifikované nečistoty: A a B.*



A. triisopropyl-fosfit,



B. tetraisopropyl-methylenbisfosfonát.

## ALBUMINI HUMANI IODINATI (<sup>125</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1922

Albumin lidský značený jodem-(<sup>125</sup>I)  
injekční roztok

*Synonymum.* Iodinati (<sup>125</sup>I) humani albuminati  
solutio iniectabilis

### DEFINICE

Je to sterilní roztok lidského albuminu značený jodem-125 prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu a protimikrobní látku. Použitý lidský albumin vyhovuje požadavkům v článku *Albumini humani solutio* (0255).

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-125 k datu uvedenému v označení na obalu.

#### Čistota:

- nejméně 99,0 % celkové aktivity odpovídá jodu-125;
- nejméně 80 % celkové aktivity je spojeno s albuminovými frakcemi II až V;
- nejvýše 5 % celkové aktivity odpovídá nenavázanému jodidu.

*Obsah albuminu.* 95 % až 105 % deklarovaného obsahu albuminu uvedeného v označení na obalu.

### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý až nažloutlý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-125.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem jodu-125, nebo se použije kalibrovaný přístroj. Referenční roztoky jodu-125 a/nebo kalibrace přístrojů se získávají od laboratoří uznaných oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-125, kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-126. Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,027 MeV odpovídající charakteristickému rtg záření telluru, fotony gama o energii 0,035 MeV jsou rovněž přítomny. Jod-126 má poločas přeměny 13,11 dnů a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,388 MeV a 0,666 MeV.

**B.** Proveďte se vhodná imunoelktroforetická metoda (2.7.1). Za použití antiséra proti normálnímu lidskému

séru se porovná normální lidské sérum a zkoušený přípravek, je-li třeba, oba vzorky se zředí. Hlavní složka zkoušeného přípravku odpovídá hlavní složce normálního lidského séra. Zředěný přípravek může obsahovat malá množství jiných plazmatických bílkovin.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,0 až 9,0.

### Albumin

*Porovnávací roztok.* Albumin lidský RS se zředí roztokem chloridu sodného R (9 g/l) na koncentraci 5 mg albuminu v mililitru.

K 1,0 ml zkoušeného přípravku a k 1,0 ml porovnávacího roztoku se přidají 4,0 ml *zkoumadla biuretového R* a promíchá se. Přesně po 30 min se změří absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) jako kontrolní kapaliny, připraveného stejným způsobem. Z naměřených absorbancí se vypočítá obsah albuminu ve zkoušeném přípravku v miligramech na mililitr.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125).

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-125.** Nejméně 99,0 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem jodu-125.

Stanoví se relativní množství jodu-125 a přítomného jodu-126.

### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Jod-125 v albuminových frakcích II až V, jod-125 ve formě nenavázaného jodidu.**

Vylučovací chromatografie (2.2.30).

*Zkoušený roztok.* 0,25 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 0,25 ml mobilní fáze. Použije se ihned po smíchání.

*Porovnávací roztok.* Albumin lidský R nebo jiný vhodný lidský albumin zředěný mobilní fází na vhodnou koncentraci albuminu.

#### Kolona:

- *rozměry:* délka 0,6 m, vnitřní průměr 7,5 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro vylučovací chromatografii R;
- *teplota:* 25 °C.

*Mobilní fáze.* 11,24 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R*, 42,0 g *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* a 11,7 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve 2000 ml vody R.

*Průtoková rychlost.* 0,6 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 280 nm a detektor radioaktivity pro jod-125 zapojené do série.

*Nástřik.* Injektorová smyčka.

*Retenční čas.* 85 min.

Retenční časy:

Pík č.	Frakce	Popis sloučeniny	Retenční čas (min)
1	I	sloučenina s vysokou molekulovou hmotností	18–20
2	II	poly III-albumin	23–24
3	III	poly II-albumin	25–26
4	IV	poly I-albumin	28
5	V	lidský sérový albumin	29–31
6	VI	jodid	43–45

Hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku odpovídá frakci V.

Limity:

- aktivita ve frakcích II až V: nejméně 80 % celkové aktivity nanesené na kolonu;
- jod-125 ve frakci VI: nejvýše 5 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem jodu-125 nebo se změní na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- množství albuminu;
- nejvyšší objem k podání.

## AMMONIAE (<sup>13</sup>N) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1492

Amoniak-(<sup>13</sup>N) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok [<sup>13</sup>N]amoniaku pro diagnostické použití. Dusík-13. 90 % až 110 % deklarované aktivity dusíku-13 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

Vzhled. Čirý bezbarvý roztok.

Poločas přeměny a druh záření dusíku-13. Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík o energii 1,022 MeV.

##### B. Zkouška A, Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

##### C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku má přibližně stejný retenční čas jako hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Hliník.** Nejvýše 2 µg Al/ml. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

*Zkoušený roztok.* Ve zkumavce o vnitřním průměru asi 12 mm se smíchá 1 ml *tlumivého roztoku acetátového o pH 4,6* a 2 ml zkoušeného přípravku zředěného 1 : 20 ve vodě R. Přidá se 0,05 ml roztoku *chromazurolu S R* (10 g/l).

*Porovnávací roztok.* Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití 2 ml základního roztoku *hliníku* (2 µg Al/ml) zředěného 1 : 20.

Po 3 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušek A a B.

##### A. Poločas přeměny. 9 min až 11 min.

##### B. Nečistoty emitující záření gama. Nejvýše 1,0 % celkové aktivity.

*Spektrometrie záření gama.* Vzorek zkoušeného přípravku se ponechá 2 h. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněného vzorku a určí se přítomnost radionuklidových nečistot, které se identifikují a kvantifikují, kde je to možné.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>13</sup>N]amoniak.** Kapalínová chromatografie (2.2.29).

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 1,0 ml amoniaku zředěného RS2 se zředí vodou R na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,04 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* *katex R* (10 µm);
- *teplota:* konstantní, při 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze.* *Kyselina dusičná* 0,002 mol/l RS.

*Průtoková rychlost.* 2 ml/min.

*Detekce.* Vhodný detektoru aktivity a detektor konduktivity.

*Test způsobilosti.* Chromatogram získaný s radioaktivním detektorem pro zkoušený roztok vykazuje hlavní pík s přibližně stejným retenčním časem jako pík na chromatogramu porovnávacího roztoku získaný s detektorem konduktivity.

*Limit:*

– [<sup>13</sup>N]amoniak. Nejméně 99 % celkové aktivity dusíku-13.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

- A. [<sup>13</sup>N]O<sub>2</sub><sup>-</sup>,
- B. [<sup>13</sup>N]O<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- C. [<sup>18</sup>F]<sup>-</sup>,
- D. H<sub>2</sub>[<sup>15</sup>O].

## AQUAE (<sup>15</sup>O) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1582

### Voda-(<sup>15</sup>O) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok [<sup>15</sup>O]vody pro diagnostické použití.

*Kyslík-15.* 90 % až 110 % deklarované aktivity kyslíku-15 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření kyslíku-15.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama [<sup>15</sup>O]vody mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pik o energii 1,022 MeV.

##### B. Zkouška Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

##### C. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu). Retenční čas druhého píku odpovídá aktivitě eluované v mrtvém objemu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,5 až 8,5.

**Amonium** (2.4.1). Nejvýše 10 µg/ml; stanoví se s 1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Dusičnany.** Nejvýše 10 µg/ml. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

*Zkoušený roztok.* K 1 ml se přidá 49 ml vody prosté dusičnanů R. K 5 ml tohoto roztoku ve zkumavce ponořené ve vodě s ledem se přidá 0,4 ml roztoku chloridu draselného R (100 g/l), 0,1 ml difenylaminu RS a po kapkách za stálého třepání 5 ml kyseliny sírové R. Zkumavka se umístí do vodní lázně zahřáté na 50 °C.

*Porovnávací roztok.* Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok ze směsi 4,5 ml vody prosté

dusičnanů R a 0,5 ml základního roztoku dusičnanu (2 µg NO<sub>3</sub>/ml).

Po 15 min není modré zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Kyslík-15.** Nejméně 99 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení:*

- spektrum získané s porovnávacím přípravkem se významně neliší od spektra získaného se standardizovaným přípravkem fluoru-18;
- poločas přeměny je 1,9 min až 2,2 min.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Kyslík-15 ve formě vody.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii aminopropylsilylovaný R (10 µm);
- *teplota:* konstantní, 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného R (10 g/l), jehož pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 3.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Detektor vhodný ke stanovení distribuce radioaktivity a vnitřní detekční systém, který je uspořádán tak, že smyčka chromatografické trubice vede mezi injektorem a kolonou přes detektor radioaktivity kalibrovaný na účinnost měření.

*Nástřík.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Identifikace píků.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá první pik nastříknuté aktivitě zkoušeného roztoku, druhý pik odpovídá množství aktivity ve formě [<sup>15</sup>O]vody.

*Limit:*

- *kyslík-15 ve formě vody:* nejméně 99 % celkové aktivity kyslíku-15.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## AQUAE TRITIATAE (<sup>3</sup>H) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0112

### Voda tritiovaná-(<sup>3</sup>H) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to voda na injekci, ve které obsahují některé molekuly vody atomy tritia místo atomů protia. Přípravek může být izotonizován přidávkem chloridu sodného.

*Tritium.* 90 % až 110 % deklarované aktivity tritia k datu uvedenému v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření kyslíku-15.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Spektrometrie záření beta způsobem uvedeným ve zkoušce A Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Nejvyšší energie záření beta je 0,019 MeV.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,5 až 7,0.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125).

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**A. Zkoušený roztok.** 100 µl vhodně zředěného zkoušeného přípravku se smíchá s 10 ml *směsi pro kapalinovou scintilaci R1*.

*Porovnávací roztok.* Standardizovaná voda tritiovaná-(<sup>3</sup>H), která má přibližně stejnou aktivitu jako zkoušený roztok.

Změří se aktivita zkoušeného roztoku kapalinovým scintilátorem s diskriminátorem. Při nejnižším nastavení diskriminátoru je četnost asi 5000 impulzů za sekundu. Změří se počet impulzů při různých nastaveních diskriminátoru. Při každém měření se použije minimálně 10 000 impulzů v časovém intervalu nejméně 1 min. Za stejných podmínek se ihned změří porovnávací roztok.

Na semilogaritmický papír se pro každé nastavení diskriminátoru (korigované na aktivitu pozadí) zaznamená počet impulzů. Nastavení diskriminátoru se určí přímo z osy souřadnic. Vertikální vzdálenost mezi dvěma křivkami je konstantní a odpovídá matematickému vztahu:

$$\frac{\frac{A_1}{B_1} - \frac{A_2}{B_2}}{\frac{A_1}{B_1}} \cdot 100 < 20,$$

v němž značí:

$A_1$  – aktivitu referenčního přípravku zaznamenanou při nejnižším nastavení diskriminátoru;

$B_1$  – aktivitu zkoušeného přípravku zaznamenanou při nejnižším nastavení diskriminátoru;

$A_2$  – aktivitu referenčního přípravku zaznamenanou při nastavení diskriminátoru  $A_2 \approx A_1 \times 10^{-3}$ ;

$B_2$  – aktivitu zkoušeného přípravku zaznamenanou při stejném nastavení diskriminátoru jako u  $A_2$ .

**B. Spektrometrie záření gama.** Přístroj zaznamená pouze aktivitu pozadí.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Do skleněné destilační aparatury pro stanovení destilačního rozmezí (2.2.11) se umístí množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 74 kBq zředěné *vodou R* na 50 ml. Stanoví se objemová aktivita. Destiluje se do získání asi 25 ml destilátu. Musí se přijmout vhodná opatření, aby se zabránilo kontaminaci vzduchu. Je-li zkouška prováděna v digestoři, musí se chránit před průvanem. Stanoví se objemová aktivita destilátu a kapaliny zbylé v destilační nádobě. Hodnota změřená po destilaci se neliší o více než 5 % od hodnoty objemové aktivity změřené před destilací.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

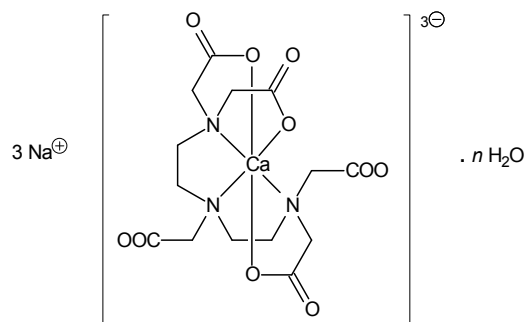
Aktivita se změří kapalinovým scintilátorem.

## CALCII TRINATRII PENTETAS AD RADIOPHARMACEUTICA

### Kalcium-trinatrium-pentetát pro radiofarmaceutické přípravky

6.3:2353

*Synonymum.* Natrii calcii pentetas ad radiopharmaceutica



$C_{14}H_{18}CaN_3Na_3O_{10} \cdot nH_2O$   $M_r$  497,36 (bezvodý)

#### DEFINICE

Je to (2,2',2'',2'''-[[karboxylatomethyl]imino]bis(ethylenitrilo)}tetraacetato)vápenatan(3-) sodný; výchozí látka pro přípravu injekčního roztoku pentetátu značeného techneciem-(<sup>99m</sup>Tc).

*Obsah.* 98,0 % až 102,0 %, počítáno na bezvodou látku.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek nebo krystaly.

*Rozpustnost.* Snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A. Infračervená absorpční spektrofotometrie** (2.2.24).

*Porovnání.* S kalcium-trinatrium-pentetátem CRL.

**B.** Zbytek po žihání vyhovuje zkoušce (b) na vápník (2.3.1).

**C.** Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (a) na sodík (2.3.1).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 5,0 g se rozpustí ve vodě prosté oxidu uhličitého R a zředí se jí na 25,0 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je čirý (2.2.1) a bezbarvý (2.2.2, Metoda II).

**Hodnota pH** (2.2.3). 8,0 až 9,5; měří se roztok S.

**Nečistota A.** Kapalinová chromatografie (2.2.29). Zkouška se provede za chránění před světlem.

**Rozpouštěcí směs.** 10 g síranu železitého pentahydrátu R se rozpustí ve 20 ml kyseliny sírové 0,5 mol/l RS a přidá se 780 ml vody R, pH se upraví hydroxidem sodným 1 mol/l RS na hodnotu 2,0 a zředí se vodou R na 1000 ml. **Zkoušený roztok.** 0,100 g se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 0,100 g dinatrium-kalcium-edetátu R se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 40,0 mg kyseliny nitrilotrioctové R (nečistota A) se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se rozpouštěcí směsí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí se rozpouštěcí směsí na 10,0 ml.

#### Kolona:

- **rozměry:** délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** sférický uhlík pro chromatografii grafitizovaný R1 (5 µm) se specifickým povrchem 120 m<sup>2</sup>/g a velikostí porů 25 nm.

**Mobilní fáze.** 50 mg síranu železitého pentahydrátu R se rozpustí v 50 ml kyseliny sírové 0,5 mol/l RS a přidá se 750 ml vody R, pH se upraví kyselinou sírovou 0,5 mol/l RS nebo hydroxidem sodným 1 mol/l RS na hodnotu 1,5, přidá se 20 ml ethylenglykolu R a zředí se vodou R na 1000 ml.

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 273 nm.

**Nástřik.** 20 µl; zkoušený roztok a porovnávací roztok (b); roztoky se zfiltrují a ihned se nastříkují.

**Doba záznamu.** Čtyřnásobek retenčního času komplexu železa a nečistoty A.

**Retenční čas.** Komplex železa a nečistoty A asi 5 min; komplex železa a kyseliny edetové asi 10 min; komplex železa a kyseliny pentetové se eluuje s mrtvým objemem.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

- **rozlišení:** nejméně 7 mezi píkem komplexu železa a nečistoty A a píkem komplexu železa a kyseliny edetové;
- **poměr signálu k šumu:** nejméně 50 pro pík odpovídající komplexu železa a nečistoty A.

#### Limit:

- **nečistota A:** nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

**Nečistota B.** Nejvýše 1,0 %; 5,0 g se rozpustí ve 250 ml vody R. Přidá se 10 ml tlumivého roztoku chloridu amonného o pH 10,0 a 50 mg černě eriochromové T s chloridem sodným R. Ke změně zbarvení indikátoru na fialové se spotřebuje nejvýše 1,3 ml chloridu hořečnatého 0,1 mol/l RS.

**Chloridy.** Nejvýše 0,1 %; 0,7 g se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 20 ml, přidá se 30 ml kyseliny dusičné zředěné RS, nechá se 30 min stát a zfiltruje se. 10 ml filtrátu se zředí vodou R na 50 ml. Tento roztok se použije jako zkoušený roztok. Porovnávací roztok se připraví za použití 0,40 ml kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS, přidá se 6 ml kyseliny dusičné zředěné RS a zředí se vodou R na 50 ml. Je-li třeba, oba roztoky se zfiltrují. Ke zkoušenému roztoku a k porovnávacímu roztoku se přidá po 1 ml dusičnanu stříbrného RS2, promíchá se a nechá se 5 min stát za chránění před světlem. Zkoušený roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok.

**Železo** (2.4.9). Nejvýše 20 µg/g; 2,5 ml roztoku S se zředí vodou R na 10 ml. Před přidáním kyseliny thioglykolové R se ke zkoušenému roztoku a porovnávacímu roztoku přidá po 0,25 g chloridu vápenatého R.

**Těžké kovy** (2.4.8). Nejvýše 20 µg/g; 1,0 g vyhovuje zkoušce F. Při mineralizaci se nahradí kyselina sírová R kyselinou dusičnou R. K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

**Voda** (2.5.12). Nejvýše 15,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 0,1 m. j./mg, pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu k odstranění bakteriálních endotoxinů.

#### STANOVENÍ OBSAHU

0,100 g se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 50,0 ml.

K 25,0 ml tohoto roztoku se přidá 80 ml vody R a pH se upraví kyselinou dusičnou zředěnou RS na hodnotu 2,3.

Titruje se dusičnanem bismutitým 0,01 mol/l VS za použití 0,1 ml roztoku oranže xylenolové R (1 g/l) jako indikátoru. Žluté zbarvení roztoku se změní na červené.

1 ml dusičnanu bismutitého 0,01 mol/l VS odpovídá 4,974 mg C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>CaN<sub>3</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>10</sub>.

#### SKLADOVÁNÍ

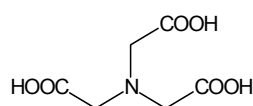
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se doporučuje provozní zkouška před použitím látky ve výrobě radiofarmak. Tato zkouška zajistí, že látka poskytne při daných výrobních podmínkách radiofarmakum v požadovaném množství a odpovídající jakosti.

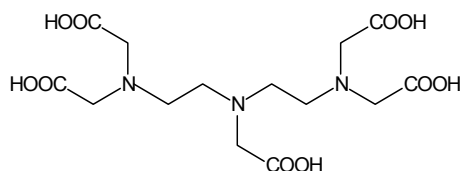
#### NEČISTOTY

Specifikované nečistoty: A a B.



A. kyselina 2,2',2''-nitrilotrioctová,





- B. kyselina 2,2',2'',2'''-[[[karboxymethyl]imino]bis-(ethylennitrilo)]tetraoctová (kyselina pentetová).

## CARBONEI OXIDUM (<sup>15</sup>O)

6.0:1607

### Oxid-(<sup>15</sup>O) uhelnatý

*Synonymum.* Carbonei monoxidum (<sup>15</sup>O)

#### DEFINICE

Je to směs [<sup>15</sup>O]oxidu uhelnatého v plynné fázi a vhodného vehikula, jako je *Aer medicinalis* (I238), pro diagnostické použití.

#### Čistota:

- nejméně 99 % celkové aktivity kyslíku-15;
- nejméně 97 % celkové aktivity kyslíku-15 ve formě oxidu uhelnatého (CO).

#### VÝROBA

##### VÝROBA RADIONUKLIDU

Kyslík-15 je radioaktivní izotop kyslíku, který se může vyrábět různými jadernými reakcemi, jako je ozařování dusíku-15 protony nebo ozařování dusíku-14 deuterony.

##### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

Aby se získal z terčového plynného dusíku molekulární kyslík-15, přidá se kyslík jako nosič v koncentraci obvykle 0,2% (V/V) až 1,0% (V/V). Po ozáření se terčový plyn obvykle nechá reagovat s aktivním uhlím při teplotě asi 950 °C. Aktivní uhlí se před použitím promývá nejméně 1 h inertním plynem při výrobní průtokové rychlosti a teplotě asi 950 °C. Získaný [<sup>15</sup>O]oxid uhelnatý se před smícháním s vehikulem čistí přechodem např. přes natronové vápno, přičemž se zbaví oxidu uhličitého.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvý plyn.

*Poločas přeměny a druh záření kyslíku-15.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pozorují se pouze fotony gama mající energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

- B. Zkouška Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

- C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních píků na chromatogramu zkoušeného plynu za použití detektoru radioaktivity odpovídají retenčním časům hlavních píků odpoví-

dajících oxidu uhelnatému na chromatogramu porovnávacího plynu (a) za použití tepelně vodivostního detektoru.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Následující zkoušky se vztahují na [<sup>15</sup>O]oxid uhelnatý před smícháním s vehikulem, jak je popsáno ve zkoušce Radiochemická syntéza.*

**Oxid uhelnatý.** Plynová chromatografie (2.2.28) uvedená ve zkoušce Radiochemická čistota.

Koncentrace oxidu uhelnatého ve zkoušeném vzorku se stanoví před podáním a vypočítá se množství oxidu uhelnatého, které se podá pacientovi.

*Nástřik.* Zkoušený vzorek, porovnávací plyn (b).

Hodnotí se chromatogramy získané pomocí tepelně vodivostního detektoru a vypočítá se obsah oxidu uhelnatého.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Kyslík-15.** Nejméně 99 % celkové aktivity.

- A. Spektrometrie záření gama.

*Porovnání.* S referenčním roztokem fluoru-18, nebo se změní přístrojem kalibrovaným tímto roztokem. Referenční roztok fluoru-18 a/nebo kalibrace přístroje se získají od laboratoří pověřených oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

- B. Poločas přeměny. 1,9 až 2,2 min.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>15</sup>O]Oxid uhelnatý.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený vzorek.* [<sup>15</sup>O]Oxid uhelnatý, jak je popsáno v části Radiochemická syntéza.

*Porovnávací plyn (a).* Směs plynů v dusíku R.

*Porovnávací plyn (b).* Dusík R obsahující 2,0 % (V/V) oxidu uhelnatého R1.

#### Kolona:

- *rozměry:* délka 1,8 m, 1. vnitřní průměr 6,3 mm, 2. vnitřní průměr 3,2 mm;
- *stacionární fáze:* koncentrická kolona pro plynovou chromatografii R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 65 ml/min.

#### Teplota:

- *kolona:* 40 °C;
- *nástřikový prostor:* 40 °C;
- *tepelně vodivostní detektor:* 70 °C.

*Detekce.* Tepelně vodivostní detektor a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Retenční časy:* kyslík, dusík a oxid uhelnatý eluující se z vnitřní kolony asi 0,4 min; oxid uhličitý eluující se z vnitřní kolony asi 0,8 min; kyslík eluující se z vnější kolony asi 2,1 min; dusík eluující se z vnější kolony asi 3,1 min; oxid uhelnatý eluující se z vnější kolony asi 6,2 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací plyn (a):

- pět zřetelně oddělených hlavních píků na chromatogramu získaném za použití tepelně vodivostního detektoru;
- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem oxidu uhličitého eluujícího se z vnitřní kolony a píkem kyslíku eluujícího se z vnější kolony na chromatogramu získaném za použití tepelně vodivostního detektoru.

*Limity,* hodnotí se chromatogram získaný detektorem radioaktivity, z ploch píků se vypočítá obsah kyslíku-15 v procentech:

- [<sup>15</sup>O]oxid uhelnatý: nejméně 97 % celkové aktivity;
- *limit zanedbatelnosti:* nepřihlíží se k prvnímu píku, který se eluuje společně se složkami z vnitřní kolony.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

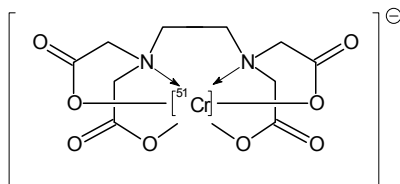
Objemová aktivita se stanoví před podáním.

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří na přístroji kalibrovaném tímto roztokem.

## CHROMII (<sup>51</sup>Cr) EDETATIS SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0266

Edetát značený chromem-(<sup>51</sup>Cr) injekční roztok



#### DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující chrom-51 ve formě komplexu chromitého iontu s kyselinou ethylendiamintetraoctovou, která je v přebytku. Může se izotonizovat přidávkem chloridu sodného a může obsahovat vhodné protimikrobní látky, jako je benzylalkohol.

*Chrom-51.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity chromu-51 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Chrom.* Nejvýše 1 mg/ml.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý fialový roztok.

*Poločas přeměny a druh záření chromu-51.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 6,5.

**Chrom.** Nejvýše 1 mg/ml. Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (2.2.25).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 0,96 g síranu draselno-chromitého R a 2,87 g dinatrium-edetátu R se rozpustí v 50 ml vody R, 10 min se vaří, ochladí se, pH se upraví hydroxidem sodným zředěným RS na hodnotu 3,5 až 6,5 a zředí se vodou R na 100,0 ml.

Měří se absorbance zkoušeného a porovnávacího roztoku v absorpčním maximu při 560 nm.

*Hodnocení.* Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Chrom-51.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,320 MeV.

**B.** Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství radionuklidových nečistot.

*Hodnocení.* Celková aktivita radionuklidových nečistot je nejvýše 0,1 %.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Edetát značený chromem-51.** Sestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* Použije se porovnávací roztok ze zkoušky Chrom.

*Chromanový nosný roztok.* 0,1 g chromanu draselného R se rozpustí v 1 ml amoniaku 32% R a zředí se vodou R na 100 ml.

*Papír.* Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů amoniaku 32% R, ethanolu 96% R a vody R (1 + 2 + 5).

*Nanášení.* Na proužek papíru se asi 4 cm od kraje nanese roztok octanu olovnatého R (50 g/l) a vysuší se v horkém vzduchu; do stejného bodu se nanese 10 µl chromanového nosného roztoku a 10 µl zkoušeného roztoku. Na jiný proužek papíru se opakuje výše uvedený postup s 10 µl porovnávacího roztoku místo zkoušeného roztoku.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 14 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodným detektorem radioaktivity se stanoví rozložení aktivity.

*Retardační faktory.* Nečistota A 0; nečistota B 0,2 až 0,4; edetát značený chromem-51 0,8 až 0,9.

*Test způsobilosti.* Proužek octanu olovnatého zežloutne reakcí s chromanovým nosným roztokem. Retardační faktor aktivní skvrny edetátu značeného chromem-51 na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru fialové skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Limit:*

– edetát značený chromem-51: nejméně 97,0 % celkové aktivity chromu-51.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>51</sup>Cr]chromitý iont,

B. [<sup>51</sup>Cr]chromanový iont.

## CYANOCOBALAMINI (<sup>57</sup>Co) CAPSULAE

7.0:0710

### Kyanokobalamin-(<sup>57</sup>Co) tobolka

#### DEFINICE

Je to tobolka obsahující [<sup>57</sup>Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamid-kyanid. Může obsahovat vhodné pomocné látky.

Tobolky vyhovují požadavkům na tvrdé tobolky uvedeným v článku *Capsulae* (0016), pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

*Kobalt-57.* Průměrně 90 % až 110 % deklarované aktivity kobaltu-57 k datu uvedenému v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tvrdé želatinové tobolky.

*Poločas přeměny a druh záření kobaltu-57.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama kobaltu-57 má energii 0,122 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz *Zkoušky na čistotu*).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozpadavost.** Tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (2.9.1) s tím rozdílem, že se použije pouze jedna tobolka místo šesti.

**Obsahová stejnoměrnost.** Měří se jednotlivě aktivita nejméně deseti tobolek za použití vhodného zařízení za stejných geometrických podmínek. Vypočítá se průměrná aktivita jedné tobolky. Aktivita žádné tobolky se neliší

o více než ±10 % od průměru. Relativní směrodatná odchylka je menší než 3,5 %.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Kobalt-57.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Zaznamená se relativní množství přítomného kobaltu-57, kobaltu-56 a kobaltu-58.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kobalt-57 přítomný jako kyanokobalamin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Obsah tobolky se rozpustí v 1,0 ml vody R a nechá se 10 min stát. Odstředí se 10 min při 2000 ot/min; použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 10 mg kyanokobalaminu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 100 ml. *Roztok se použije do 1 h od přípravy.*

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů methanolu R a roztoku hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R (10 g/l), jehož pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 3,5, (26,5 + 73,5). *Použije se do 2 dnů od přípravy.*

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity nastavený na kobalt-57 a spektrofotometrický detektor při 361 nm.

*Nástřik.* 100 μl.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času kyanokobalaminu pro zkoušený roztok; 30 min pro porovnávací roztok.

*Limit:*

– *kobalt-57 přítomný jako kyanokobalamin:* nejméně 90 % celkové aktivity kobaltu-57.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

#### NEČISTOTY

A. kobalt-56,

B. kobalt-58.

## CYANOCOBALAMINI (<sup>57</sup>Co) SOLUTIO

7.0:0269

### Kyanokobalamin-(<sup>57</sup>Co) roztok

#### DEFINICE

Je to roztok obsahující [<sup>57</sup>Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamid-kyanid. Může obsahovat stabilizační a protimikrobní látky.

*Kobalt-57.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity kobaltu-57 k datu uvedenému v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle růžový roztok.

*Poločas přeměny a druh záření kobaltu-57.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama kobaltu-57 má energii 0,122 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 6,0.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Kobalt-57.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Zaznamenaná se relativní množství přítomného kobaltu-57, kobaltu-56 a kobaltu-58.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kobalt-57 přítomný jako kyanokobalamin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 10 mg kyanokobalaminu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml. *Roztok se použije do 1 h od přípravy.*

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktysilylovaný R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,5, (26,5 + 73,5). *Použije se do 2 dnů od přípravy.*

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity nastavený na kobalt-57 a spektrofotometrický detektor při 361 nm.

*Nástřik.* 100 μl.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času kyanokobalaminu pro zkoušený roztok; 30 min pro porovnávací roztok.

*Limit:*

– *kobalt-57 přítomný jako kyanokobalamin:* nejméně 90 % celkové aktivity kobaltu-57.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

#### NEČISTOTY

A. kobalt-56,

B. kobalt-58.

## CYANOCOBALAMINI (<sup>58</sup>Co) CAPSULAE

7.0:1505

### Kyanokobalamin-(<sup>58</sup>Co) tobolka

#### DEFINICE

Je to tobolka obsahující [<sup>58</sup>Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamid-kyanid. Může obsahovat vhodné pomocné látky. Tobolky vyhovují požadavkům na tvrdé tobolky uvedeným v článku *Capsulae* (0016), pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

*Kobalt-58.* Průměrně 90 % až 110 % deklarované aktivity kobaltu-58 k datu uvedenému v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tvrdé želatinové tobolky.

*Poločas přeměny a druh záření kobaltu-58.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama kobaltu-58 mají energii 0,511 MeV (anihilační záření) a 0,811 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozpadavost.** Tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (2.9.1) s tím rozdílem, že se použije pouze jedna tobolka místo šesti.

**Obsahová stejnoměrnost.** Měří se jednotlivě aktivita nejméně deseti tobolek za použití vhodného zařízení za stejných geometrických podmínek. Vypočítá se průměrná aktivita jedné tobolky. Aktivita žádné tobolky se neliší o více než ±10 % od průměru. Relativní směrodatná odchylka je menší než 3,5 %.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Kobalt-58.** Nejméně 98 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Zaznamenaná se relativní množství přítomného kobaltu-58, kobaltu-57 a kobaltu-60.

*Hodnocení:*

– *kobalt-60:* nejvýše 1 % celkové aktivity.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kobalt-58 přítomný jako kyanokobalamin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Obsah jedné tobolky se rozpustí v 1,0 ml *vody R* a nechá se stát 10 min. Odstředí se 10 min při 2000 ot/min. Použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 10 mg kyanokobalaminu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 100 ml. *Roztok se použije do 1 h od přípravy.*

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,5, (26,5 + 73,5). *Použije se do 2 dnů od přípravy.*

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity nastavený na kobalt-58 a spektrofotometrický detektor při 361 nm.

*Nástřik.* 100 μl.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času kyanokobalaminu pro zkoušený roztok; 30 min pro porovnávací roztok.

*Limit:*

- *kobalt-58 přítomný jako kyanokobalamin:* nejméně 84 % celkové aktivity *kobaltu-58*.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

#### NEČISTOTY

- A. kobalt-57,
- B. kobalt-60.

## CYANOCOBALAMINI (<sup>58</sup>Co) SOLUTIO

7.0:0270

### Kyanokobalamin-(<sup>58</sup>Co) roztok

#### DEFINICE

Je to roztok obsahující [<sup>58</sup>Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamid-kyanid. Může obsahovat stabilizační a protimikrobní látky.

*Kobalt-58.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity k datu uvedenému v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle růžový roztok.

*Poločas přeměny a druh záření kobaltu-58.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama kobaltu-58 mají energii 0,511 MeV (anihilační záření) a 0,811 MeV.

- B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz *Zkoušky na čistotu*).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 6,0.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Kobalt-58.** Nejméně 98 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Zaznamená se relativní množství přítomného kobaltu-57, kobaltu-58 a kobaltu-60.

*Porovnání.* Referenční roztoky kobaltu-58, kobaltu-57 a kobaltu-58 a kobaltu-60.

*Hodnocení:*

- *kobalt-60:* nejvýše 1 % celkové aktivity.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kobalt-58 přítomný jako kyanokobalamin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 10 mg kyanokobalaminu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 100 ml. *Roztok se použije do 1 h od přípravy.*

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,5, (26,5 + 73,5). *Použije se do 2 dnů od přípravy.*

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity nastavený na kobalt-58 a spektrofotometrický detektor při 361 nm.

*Nástřik.* 100 μl.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času kyanokobalaminu pro zkoušený roztok; 30 min pro porovnávací roztok.

*Limit:*

- *kobalt-58 přítomný jako kyanokobalamin:* nejméně 90 % celkové aktivity *kobaltu-58*.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

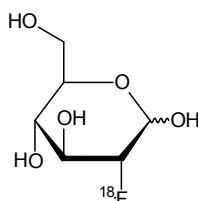
Chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

#### NEČISTOTY

- A. kobalt-57,
- B. kobalt-60.

## FLUDEOXYGLUCOSI (<sup>18</sup>F) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1325

Fludeoxyglukosa-(<sup>18</sup>F) injekční roztok

### DEFINICE

Je to sterilní roztok 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukopyranosu (2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy) připravené nukleofilní substitucí. Může také obsahovat 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosu.

*Fluor-18.* 90 % až 110 % deklarované aktivity fluoru-18 k datu a hodině uvedených v označení na obalu.

*2-Fluor-2-deoxy-D-glukosa.* Nejvýše 0,5 mg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření fluoru-18.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Zkouška A, Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.
- B.** Z nejméně tří měření aktivity vzorku ve stejných geometrických podmínkách ve vhodném časovém intervalu (např. 30 min) se stanoví přibližný poločas přeměny.  
*Hodnocení.* 105 až 115 min.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce A, Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).  
*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Jednotlivé zkoušky na chemické nečistoty se mohou vynechat, jestliže se zmiňované látky nepoužívají nebo nemohou v procesu výroby vznikat.*

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,5 až 8,5.

**2-Fluor-2-deoxy-D-glukosa a nečistota A.** Kapalinná chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 1,0 mg 2-fluor-2-deoxy-D-glukosy R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 2,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí vodou R na objem V, kde V je maximální doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (b).* 1,0 mg 2-chlor-2-deoxy-D-glukosy R (nečistota A) se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na

2,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí vodou R na objem V, kde V je maximální doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (c).* 1,0 mg 2-fluor-2-deoxy-D-mannosy R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 2,0 ml. Smíchá se 0,5 ml tohoto roztoku s 0,5 ml porovnávacího roztoku (a).

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* anex pro chromatografii silně zasa-  
ditý R (10 μm);
- *teplota:* konstantní, v rozsahu 20 °C až 25 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok hydroxidu sodného R (4 g/l) ve vodě prosté oxidu uhličitého R.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Detektor vhodný pro cukry v požadovaném koncentračním rozsahu, jako je pulzní ampérometrický detektor a detektor radioaktivity zapojené sériově.

*Nástřik.* 20 μl.

*Doba záznamu.* Dvojnásobek retenčního času 2-fluor-2-deoxy-D-glukosy.

*Relativní retence* vztažená k 2-fluor-2-deoxy-D-glukose (retenční čas asi 12 min). 2-Fluor-2-deoxy-D-mannosa asi 0,9; nečistota A asi 1,1.

*Test způsobilosti,* chromatogram porovnávacího roztoku (c) získaný pomocí detektoru pro cukry:

- *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem 2-fluor-2-deoxy-D-mannosy a píkem 2-fluor-2-deoxy-D-glukosy;
- *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro pík 2-fluor-2-deoxy-D-glukosy.

*Limity,* chromatogram získaný pomocí detektoru pro cukry:

- *2-fluor-2-deoxy-D-glukosa:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 mg/V);
- *nečistota A:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 mg/V).

**Nečistota B.** Kapková zkouška.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* Voda R.

*Porovnávací roztok (b).* 11,0 mg aminopolyetheru R (nečistota B) se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 5,0 ml. 1 ml roztoku se zředí vodou R na objem V, kde V je maximální doporučená dávka v mililitrech.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro aminopolyetherovou zkoušku pro TLC R.

*Nanášení.* 2,5 μl; dodatečně se nanese 2,5 μl zkoušeného roztoku a potom na stejné místo 2,5 μl porovnávacího roztoku (b).

*Detekce.* 1 min po nanesení se vizuálně porovnají skvrny.

*Test způsobilosti:*

- skvrna odpovídající následně aplikaci zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) odpovídá vzhledem skvrně porovnávacího roztoku (b), která je charakteristická řadou soustředných kruhů; tmavší nejvnitřnější kruh (s intenzitou úměrnou koncentraci nečistoty B) může být obklopen modročerným kruhem, za nímž následuje světlejší kruh vně ohraničený tmavým okrajem;

- skvrna porovnávacího roztoku (a) má difuznější vnitřní kruh, který je hnědorůžový a bez přesně vymezeného okraje mezi ním a obklopující světlejší zónou;
- skvrna porovnávacího roztoku (b) je zřetelně odlišná od skvrny porovnávacího roztoku (a).

**Limit:**

- *centrální část* skvrny zkoušeného roztoku je méně intenzivní než skvrna porovnávacího roztoku (b) (2,2 mg/V).

**Nečistota C.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 2,1 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydroxidu R* (25,95 g/l) (nečistota C) se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na objem *V*, kde *V* je maximální doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (b).* 1 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydroxidu R* (25,95 g/l) se zředí *vodou R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 25 ml.

**Kolona:**

- *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (3 μm);
- *teplota:* konstantní, v rozsahu 20 °C až 25 °C.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku *kyseliny toluensulfonové R* (0,95 g/l) a *acetonitrilu R* (25 + 75).

*Průtoková rychlost.* 0,6 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

*Nástřik.* 20 μl.

*Doba záznamu.* Dvojnásobek retenčního času tetrabutylamoniových iontů.

*Retenční čas.* Tetrabutylamoniumhydroxid asi 3,3 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

- *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík;
- *faktor symetrie:* nejvýše 1,8 pro hlavní pík.

**Limit:**

- *nečistota C:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,75 mg/V).

**Nečistota D.** Nejvýše 0,02 mg/V.

Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (2.2.25).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 20,0 mg *4-(4-methylpiperidin-1-yl)pyridinu* (nečistota D) se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

Měří se absorbance zkoušeného a porovnávacího roztoku v absorpčním maximu při 263 nm.

*Hodnocení.* Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Zbytková rozpouštědla.** Jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati (5.4). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA**

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky B.

**A. Spektrometrie záření gama.**

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

**B. Spektrometrie záření gama.**

Stanoví se množství fluoru-18 a radionuklidových nečistot s poločasem přeměny delším než 2 h. Pro detekci a kvantifikaci nečistot se zkoušený přípravek ponechá nejméně 24 h, aby fluor-18 se přeměnil na hodnotu umožňující detekci nečistot.

*Hodnocení.* Celková aktivita radionuklidových nečistot je nejvýše 0,1 %.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**A.** Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce 2-Fluor-2-deoxy-D-glukosa a nečistota A. Je-li třeba, zkoušený roztok se zředí *vodou R* na objemovou aktivitu odpovídající citlivosti detektoru radioaktivity.

*Nástřik.* Zkoušený roztok a porovnávací roztoky (a) a (c).

*Relativní retence* vztažená k 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukose (retenční čas asi 12 min): 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosa: asi 0,9. Částečně nebo úplně acetylované deriváty obou složek se hydrolyzují za chromatografických podmínek, a proto se eluují jako 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosa a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosa.

Určí se poloha píků 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy za použití chromatogramů získaných pomocí detektoru pro cukry a chromatogramů porovnávacích roztoků (a) a (c).

**Limity:**

- *fluor-18 ve formě 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy:* nejméně 95 % celkové aktivity fluoru-18;
- *2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosa:* nejvýše 10 % celkové aktivity 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy.

**B. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 30 mg *1,2,3,4-tetra-O-acetyl-β-D-glukopyranosy R* a 20 mg *glukosy R* se rozpustí mírným zahřátím v 1 ml *vody R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (5 + 95).

*Nanášení.* Asi 2 μl.

*Vývinění.* Po dráze 8 cm.

*Sušení.* Na vzduchu 15 min.

*Detekce.* Vhodným detektorem se stanoví rozdělení aktivity, potom se deska ponoří do roztoku *kyseliny sírové R* (75 g/l) v *methanolu R* a suší se v proudu horkého vzduchu nebo při 150 °C, dokud se na chromatogramu porovnávacího roztoku neobjeví tmavé skvrny.

*Retardační faktory.* [<sup>18</sup>F]fluorid asi 0; 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosa a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosa asi 0,45; částečně nebo úplně acetylované deriváty 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy asi 0,8 až 0,95.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– na chromatogramu jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

*Limity:*

- *fluor-18 ve formě 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy:* nejméně 95 % celkové aktivity fluoru-18;
- *fluor-18 ve formě fluoridu a částečně nebo úplně acetylovaných derivátů 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-glukosy a 2-[<sup>18</sup>F]fluor-2-deoxy-D-mannosy:* nejvýše 5 % celkové aktivity fluoru-18.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

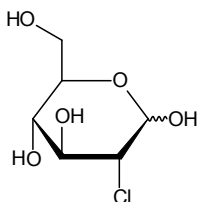
Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

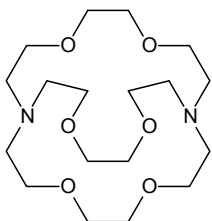
V označení na obalu se uvede nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### NEČISTOTY

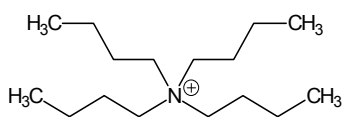
*Specifikované nečistoty: A, B, C, D a E.*



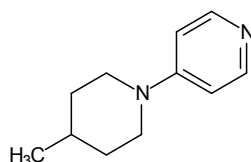
- A. 2-chlor-2-deoxy-D-glukopyranosa (2-chlor-2-deoxy-D-glukosa),



- B. 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]heptakosan (aminopolyether),



- C. tetrabutylamoniová sůl,



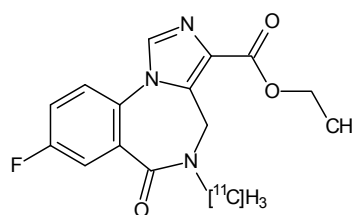
- D. 4-(4-methylpiperidin-1-yl)pyridin,

- E. [<sup>18</sup>F]fluorid.

## FLUMAZENILI (N-[<sup>11</sup>C]METHYL) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1917

Flumazenil-(N-[<sup>11</sup>C]methyl) injekční roztok



Radiofarmaceutické přípravky

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok ethyl-8-fluor-5-[<sup>11</sup>C]methyl-6-oxo-5,6-dihydro-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboxylátu. Může obsahovat stabilizátor, jako je kyselina askorbová. *Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity uhlíku-11 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Obsah flumazenilu.* Nejvýše 50 µg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

#### VÝROBA

##### VÝROBA RADIONUKLIDU

Uhlík-11 je radioaktivní izotop uhlíku, který se nejčastěji vyrábí ozařováním dusíku protony. Podle toho, zda se přidá buď stopové množství kyslíku, nebo malé množství vodíku, získává se radioaktivita ve formě oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého nebo [<sup>11</sup>C]methanu.

##### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

[5-Methyl-<sup>11</sup>C]flumazenil se může vyrábět N-alkylací ethyl-8-fluor-6-oxo-5,6-dihydro-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboxylátu (demethylflumazenilu) [<sup>11</sup>C]methyljodidem nebo [<sup>11</sup>C]methyl-triflátem ([<sup>11</sup>C]methyl-trifluormethansulfonátem).

**Syntéza [<sup>11</sup>C]methyljodidu.** [<sup>11</sup>C]Methyljodid se může získat z oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého nebo z [<sup>11</sup>C]methanu. Nejčastěji používanou metodou je redukce oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého tetrahydridohlitanem lithným. Vzniklý [<sup>11</sup>C]methanolát reaguje s kyselinou jodovodíkovou. Alternativně se [<sup>11</sup>C]methan, získaný buď přímo v terči, nebo přímým postupem z oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého, nechá reagovat s jodem.

**Syntéza [<sup>11</sup>C]methyl-triflátu.** [<sup>11</sup>C]Methyl-triflát se může vyrobit z [<sup>11</sup>C]methyljodidu za použití pevného nosiče, jako je grafitizovaný uhlík impregnovaný stříbrnou solí kyseliny trifluormethansulfonové.



**Syntéza [5-methyl-<sup>11</sup>C]flumazenilu.** Nejčastěji používanou metodou k získání [5-methyl-<sup>11</sup>C]flumazenilu je *N*-alkylace demethylflumazenilu [<sup>11</sup>C]methyljodidem v zásaditém prostředí v rozpouštědle, jako je dimethylformamid nebo aceton. Získaný [5-methyl-<sup>11</sup>C]flumazenil se může čistit semipreparativní kapalinovou chromatografií. Vhodná je např. kolona naplněná silikagelem pro chromatografii oktadecylsilylovaným eluovaná směsí ethanolu a vody.

#### PREKURZOR PRO SYNTÉZU

##### Demethylflumazenil

Teplota tání (2.2.14). 286 °C až 289 °C.

Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

Porovnání. S referenčním spektrem *Ph. Eur. demethylflumazenilu*.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření uhlíku-11.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV, v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

##### B. Zkouška B, Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

##### C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### Hodnota pH (2.2.3). 6,0 až 8,0.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

##### Flumazenil a nečistota A. Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 2,5 mg flumazenilu *R* se rozpustí v 5 ml methanolu *R*.

*Porovnávací roztok (b).* 2,5 mg demethylflumazenilu *R* se rozpustí v 50 ml methanolu *R*.

*Porovnávací roztok (c).* K 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 0,1 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se roztokem chloridu sodného *R* (0,9 g/l) na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (d).* 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí methanolem *R* na 50 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem chloridu sodného *R* (0,9 g/l) na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### Kolona:

– *rozměry:* délka 0,15 m, vnitřní průměr 3,9 mm;

– *stacionární fáze:* sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm) se specifickým povrchem 440 m<sup>2</sup>/g, velikostí pórů 100 nm a obsahem vázaného uhlíku 19 %;

– *teplota:* udržuje se konstantní teplota v rozmezí 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů methanolu *R* a vody *R* (45 + 55).

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 260 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 100 μl.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Relativní retence* vztažená k flumazenilu. Nečistota A asi 0,74.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (c):

– *rozlišení:* nejméně 2,5 mezi píkem flumazenilu a píkem nečistoty A.

*Limity,* hodnotí se chromatogramy získané se spektrofotometrickým detektorem:

– *flumazenil:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (50 μg/*V*);

– *nečistota A:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5 μg/*V*);

– *jakákoliv jiná nečistota:* nejvýše plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1 μg/*V*).

**Zbytková rozpouštědla** jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati (5.4) za použití metod uvedených v obecné stati (2.4.24). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Uhlík-11.** Nejméně 99 % celkové aktivity. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

##### B. Poločas přeměny. 19,9 min až 20,9 min.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem popsaným ve zkoušce Flumazenil a nečistota A s následujícími úpravami.

*Nástřik.* Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a); je-li třeba, zředí se zkoušený roztok na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.

*Limit,* hodnotí se chromatogram získaný s detektorem radioaktivity:

– [5-methyl-<sup>11</sup>C]flumazenil: nejméně 95 % celkové aktivity.

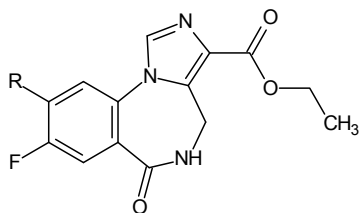
#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

## NEČISTOTY



- A. R = H: ethyl-8-fluor-6-oxo-5,6-dihydro-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboxylát (demethylflumazenil),
- B. R = CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>3</sub>: ethyl-8-fluor-6-oxo-9-(2-oxopropyl)-5,6-dihydro-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboxylát (adiční sloučenina demethylflumazenilu a acetonu).

## FLUORIDI (<sup>18</sup>F) SOLUTIO AD RADIOSIGNANDUM

7.0:2390

Fluorid-(<sup>18</sup>F) roztok ke značení radionuklidem  
*Synonymum.* Fluoridi (<sup>18</sup>F) solutio ad radio-signandum

## DEFINICE

Je to zásaditý roztok obsahující fluor-18 ve formě [<sup>18</sup>F]fluoridu.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity fluoru-18 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření fluoru-18.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Spektrometrie záření gama.  
*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pik o energii 1,022 MeV.
- B. Stanoví se přibližný poločas přeměny z nejméně tří měření aktivity vzorku ve stejných geometrických podmínkách ve vhodném časovém intervalu (např. 30 min).  
*Hodnocení.* 105 až 115 min.
- C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz *Zkoušky na čistotu*.  
*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku. Signál fluoridu na chromatogramu porovnávacího roztoku je negativní.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 8,0 až 14,0; použije se *proužek s indikátorem pH R*.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 20 m. j./ml, pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků

bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky B.

**Fluor-18.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

A. Spektrometrie záření gama; předběžná zkouška.

*Limit.* Píky v gama spektru odpovídající fotonům s energií jinou než 0,511 MeV nebo 1,022 MeV představují nejvýše 0,1 % celkové aktivity.

B. Spektrometrie záření gama.

Stanoví se množství fluoru-18 a radionuklidových nečistot s poločasem přeměny delším než 2 h. Pro detekci a kvantifikaci nečistot se zkoušený přípravek ponechá nejméně 24 h, aby se fluor-18 přeměnil na hodnotu, která umožňuje detekci nečistot.

*Hodnocení.* Celková aktivita radionuklidových nečistot je nejvýše 0,1 %.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *fluoridu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* *anex pro chromatografii silně zásaditý R* (10 μm).

*Mobilní fáze.* Roztok *hydroxidu sodného R* (4 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, chráněný před atmosférickým oxidem uhličitým.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 20 μl.

*Doba záznamu.* 12 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pik;
- *retenční čas fluoridu:* nejméně trojnásobek mrtvého času.

Hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku získaný s detektorem radioaktivity; poloha píku fluoridu se určí porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku získaným se spektrofotometrickým detektorem.

*Limit:*

- [<sup>18</sup>F]fluorid: nejméně 98,5 % celkové aktivity fluoru-18.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## OZNAČOVÁNÍ

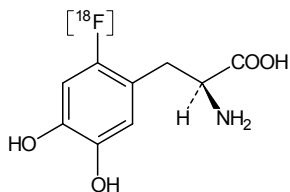
V označení na obalu se uvede:

- že přípravek není určen k přímému podání člověku;
- kde je to vhodné, že látka je určena pro použití při výrobě parenterálních přípravků.

## FLUORODOPAE (<sup>18</sup>F) SUBSTITUTIONE AB ELECTROPHILA SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1918

Fluorodopa-(<sup>18</sup>F) (připravená elektrofilní substitucí) injekční roztok



### DEFINICE

Je to sterilní roztok kyseliny (2*S*)-2-amino-3-(2-[<sup>18</sup>F]fluor-4,5-dihydroxyfenyl)propanové (6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopa). Může obsahovat stabilizátory, jako je kyselina askorbová a kyselina edetová.

Tento článek se týká injekčního roztoku obsahujícího 6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopu připravenou elektrofilní substitucí.

#### Obsah:

- *fluor-18*: 90 % až 110 % deklarované aktivity fluoru-18 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu;
- *dopa*: nejvýše 1 mg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech;
- *6-fluorolevodopa*: nejvýše 15 mg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

### VÝROBA

#### VÝROBA RADIONUKLIDU

Fluor-18 je radioaktivní izotop fluoru, který se může vyrábět různými jadernými reakcemi ozařováním kyslíku-18 protony, ozařováním neonu-20 deuterony, nebo ozařováním kyslíku-16 heliem-3 nebo heliem-4.

Aby se získal fluor-18 v chemické formě vhodné pro elektrofilní substituce, jako je plynný fluor nebo plynný acetylfluoran, musí se během výroby přidat malé množství neradioaktivního plynného fluoru jako nosiče (0,3 % až 0,8 % objemu plynu v terči).

#### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopa se může připravit různými způsoby radiochemické syntézy, která poskytuje produkty s různým výtěžkem, s rozdílnými hodnotami hmotnostní aktivity, meziproduktů a možných nečistot. Elektrofilní způsob přípravy 6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopy je založen na odstranění sloučenin kovů z pokovených derivátů levodopy molekulárním [<sup>18</sup>F]fluorem nebo [<sup>18</sup>F]acetylfluoranem, následnou hydrolyzou ochranných skupin a konečným čištěním semipreparativní kapalinovou chromatografií. Nemusí se použít způsob odstraňující rtuť nebo thallium.

### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření fluoru-18*. Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Zkouška A, Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.
- B.** Stanoví se přibližný poločas přeměny z nejméně tří měření aktivity vzorku ve stejných geometrických podmínkách ve vhodném časovém intervalu (např. 30 min). *Hodnocení*. 105 min až 115 min.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu). *Hodnocení*. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku 6-fluorolevodopy na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).
- D.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Nečistoty C a D (viz Zkoušky na čistotu). *Hodnocení*. Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru píku 6-fluorolevodopy na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 5,5.

**Sterilita**. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**6-Fluorolevodopa, dopa, nečistota A a nečistota B**. Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Porovnávací roztoky se připraví těsně před použitím*.

*Zkoušený roztok*. Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a)*. 18,0 mg 6-fluorolevodopy-hydrochloridu *R* se rozpustí v 5,0 ml mobilní fáze a zředí se jí na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (b)*. 1,0 mg levodopy *R* se rozpustí v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (c)*. 1,0 mg chlortrimethylstannanu *R* (nečistota A) se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (d)*. Smíchají se stejné objemové díly porovnávacích roztoků (b) a (c).

*Porovnávací roztok (e)*. 2,0 mg 6-hydroxydopy *R* (nečistota B) se rozpustí ve 20,0 ml mobilní fáze. 0,25 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### Kolona:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze*: sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami *R*;
- *teplota*: udržuje se konstantní teplota v rozmezí 20 °C až 30 °C.

**Mobilní fáze.** Roztok dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R (6,9 g/l), jehož pH bylo upraveno roztokem kyseliny fosforečné R (4,8 g/l) na hodnotu 2,4.

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor při 200 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

**Nástřik.** 20 µl.

**Doba záznamu.** 15 min.

**Relativní retence** vztažená k 6-fluorolevodopě (retenční čas asi 6 min). Nečistota A a nečistota B asi 0,7; dopa asi 0,8.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (d):

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem dopy a píkem nečistoty A.

**Limity,** hodnotí se chromatogramy získané spektrofotometrickým detektorem:

- 6-fluorolevodopa: nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (15 mg/V);
- dopa: nejvýše plocha píku levodopy na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 mg/V);
- součet obsahů nečistot A a B: nejvýše plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (odpovídá limitu 0,5 mg/V nečistoty A nebo limitu 0,025 mg/V nečistoty B, nebo nižšímu z nich, pokud jsou obě nečistoty přítomny).

**Zbytková rozpouštědla.** Jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati (5.4). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Fluor-18.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky B.

#### A. Spektrometrie záření gama.

**Hodnocení.** Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

#### B. Spektrometrie záření gama.

Stanoví se množství fluoru-18 a radionuklidových nečistot s poločasem přeměny delším než 2 h. Pro detekci a kvantifikaci nečistot se zkoušený přípravek ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby se fluor-18 rozpadl na hodnotu, která umožní detekovat nečistoty.

**Hodnocení.** Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra pozadí.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsána ve zkoušce 6-Fluorolevodopa, dopa, nečistota A a nečistota B.

Hodnotí se chromatogram získaný pomocí detektoru radioaktivity a určí se poloha píku 6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopy porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a) a chromatogramem získaným spektrofotometrickým detektorem.

**Limit:**

– 6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopa: nejméně 95 % celkové aktivity fluoru-18.

**Nečistoty C a D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Porovnávací roztok (a).** 2 mg DL-6-fluorodopa-hydrochloridu R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 2 mg 6-fluorolevodopa-hydrochloridu R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro chirální separace pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs stejných objemových dílů methanolu R a vody R.

**Nanášení.** 2 µl.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** 5 min na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se roztokem ninhydrinu R (2 g/l) v ethanolu bezvodém R a zahřívá se 10 min při 60 °C; vhodným detektorem se stanoví rozdělení aktivity.

**Retardační faktory.** Nečistota D asi 0; 6-[<sup>18</sup>F]fluorolevodopa asi 0,3; nečistota C asi 0,5.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (a):

– na chromatogramu jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

**Limity:**

- nečistota C: nejvýše 2 % celkové aktivity fluoru-18;
- nečistota D: nejvýše 4 % celkové aktivity fluoru-18.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

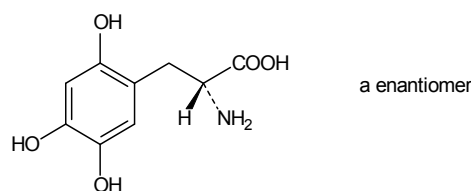
Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

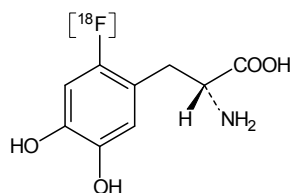
V označení na obalu se uvede nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### NEČISTOTY

A. Cl-Sn(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: chlortrimethylstannan,



B. kyselina (2*RS*)-2-amino-3-(2,4,5-trihydroxyfenyl)propanová (6-hydroxydopa),



C. kyselina (2*R*)-2-amino-3-(2-[<sup>18</sup>F]fluor-4,5-dihydroxyfenyl)propanová (6-[<sup>18</sup>F]fluorodextrodopa),

D. [<sup>18</sup>F]fluorid.

## GALII (<sup>67</sup>Ga) CITRATIS SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0555

Gallium-(<sup>67</sup>Ga)-citrát injekční roztok*Synonymum.* Citronan gallitý-(<sup>67</sup>Ga) injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující gallium-67 ve formě gallium-citrátu. Může být izotonizován přidávkem chloridu sodného a natrium-citátu a může obsahovat vhodné protimikrobní látky, jako je benzylalkohol.

*Gallium-67.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity gallia-67 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření gallia-67.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).*

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,093 MeV, 0,185 MeV a 0,300 MeV.

B. K 0,2 ml zkoušeného přípravku se přidá 0,2 ml roztoku obsahujícího roztok *chloridu železitého R* (1 g/l) a roztok *kyseliny chlorovodíkové R* 0,1 % (V/V) a zamíchá se. Zbarvení roztoku se porovná se zbarvením roztoku obsahujícího *benzylalkohol R* (9 g/l) a *chlorid sodný R* (7 g/l) připraveného stejným způsobem. Žluté zbarvení vznikne pouze u roztoku se zkoušeným přípravkem.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,0 až 8,0.

**Zinek.** Nejvýše 5 µg/ml.

*Zkoušený roztok.* K 0,1 ml zkoušeného přípravku se přidá 0,9 ml *vody R*, 1 ml roztoku *thiosíranu sodného R* (250 g/l), 5 ml *tlumivého roztoku acetátového o pH 4,7* a 5,0 ml roztoku *dithizonu* připraveného takto: 10 mg *dithizonu R* se rozpustí ve 100 ml *butan-2-onu R*, nechá se 5 min stát, zfiltruje se a těsně před použitím se zředí na desetinásobný objem *butan-2-onem R*. 2 min se důkladně protřepává a oddělí se organická vrstva.

*Porovnávací roztok.* 0,1 ml základního roztoku *zinku* (5 µg Zn/ml) se připraví stejným způsobem jako zkoušený roztok.

Změří se absorpance (2.2.25) organické vrstvy při 530 nm za použití organické vrstvy kontrolního roztoku použité jako kontrolní kapaliny.

*Hodnocení.* Absorpance organické vrstvy zkoušeného roztoku není větší než absorpance organické vrstvy porovnávacího roztoku.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Gallium-67.** Nejméně 99,8 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Hodnotí se relativní množství gallia-66 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## NEČISTOTY

A. gallium-66.

## INDII (<sup>111</sup>In) CHLORIDI SOLUTIO

7.0:1227

Chlorid inditý-(<sup>111</sup>In) roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok india-111 ve formě vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové bez přísad.

*Indium-111.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity india-111 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 1,85 GBq india-111 na mikrogram india.

## VÝROBA

Nepřidává se žádný nosič india.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření india-111.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).*

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření.

*Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.*

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama india-111 mají energie 0,171 MeV a 0,245 MeV.

B. Ke 100 µl *dusičnanu stříbrného RS2* se přidá 50 µl zkoušeného roztoku; vznikne bílá sraženina.

## C. Zkouška Hodnota pH (viz Zkoušky na čistotu).

## D. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního pik na chromatogramu zkoušeného roztoku je 0,5 až 0,8.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 1,0 až 2,0.

**Kadmium.** Nejvýše 0,40 µg/ml.

Atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 0,05 ml zkoušeného přípravku se zředí vhodným objemem vhodné koncentrace *kyseliny chlorovodíkové R*.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se zředěním základního roztoku *kadmia* (1 mg Cd/ml) *kyselinou chlorovodíkovou R* o stejné koncentraci jako u zkoušeného roztoku.

*Zdroj záření.* Kadmiová lampy s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 228,8 nm.

*Atomizér.* Elektrotermický.

**Měď.** Nejvýše 0,15 µg/ml.

Atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, Metoda I).

*Zkoušený roztok.* 0,1 ml zkoušeného přípravku se zředí vhodným objemem vhodné koncentrace *kyseliny chlorovodíkové R*.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se zředěním základního roztoku mědi (1 mg Cu/ml) *kyselinou chlorovodíkovou R* o stejné koncentraci jako u zkoušeného roztoku.

*Zdroj záření.* Měděná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 324,8 nm.

*Atomizér.* Elektrotermický.

**Železo.** Nejvýše 0,60 µg/ml.

Atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, Metoda I).

*Zkoušený roztok.* 0,1 ml zkoušeného přípravku se zředí vhodným objemem vhodné koncentrace *kyseliny chlorovodíkové R*.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se zředěním základního roztoku železa (1 mg Fe/ml) *kyselinou chlorovodíkovou R* o stejné koncentraci jako u zkoušeného roztoku.

*Zdroj záření.* Železná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 248,3 nm.

*Atomizér.* Elektrotermický.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Indium-111.** Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem india-111.

*Hodnocení.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m.

**Nečistota A.** Nejvýše 0,25 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. *Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.*

Zaznamená se spektrum záření gama pomocí vhodného detektoru s olověnou clonou o tloušťce 6 mm umístěnou mezi vzorek o aktivitě asi 30 MBq a detektor.

*Hodnocení.* Odezva v oblasti odpovídající fotonům india-114m o energiích 0,558 MeV a 0,725 MeV nepřevyšuje odezvu získanou za použití referenčního roztoku india-114m o aktivitě 75 kBq měřeného za stejných podmínek; všechna měření jsou vztažena k datu a hodině podání.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Chlorid inditý-<sup>[111]In</sup>.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R. Použije se silikagel na vrstvě skleněných vláken.

*Mobilní fáze.* Roztok *chloridu sodného R* (9,0 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na hodnotu (2,3 ± 0,05).

*Nanášení.* 5 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 15 cm.

*Sušení.* V proudě studeného vzduchu.

*Detekce.* Detektor vhodný ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* 0,5 až 0,8 pro chlorid inditý-<sup>[111]In</sup>.

*Limit:*

– *chlorid inditý-<sup>[111]In</sup>*: nejméně 95 % celkové aktivity india-111.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

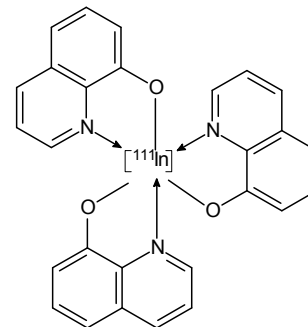
A. indium-114m.

## INDII (<sup>111</sup>In) OXINI SOLUTIO

7.0:1109

Oxinát značený indiem-(<sup>111</sup>In) roztok

*Synonymum.* Indium-(<sup>111</sup>In)-oxinát roztok



C<sub>27</sub>H<sub>18</sub>[<sup>111</sup>In]N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>      M<sub>r</sub> 543,46

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok india-111 ve formě komplexu s chinolin-8-olem. Může obsahovat vhodné povrchově aktivní látky a může být izotonizován přidávkem chloridu sodného a vhodné tlumivé přísady.

*Indium-111.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity india-111 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 1,85 GBq india-111 na mikrogram india.

#### VÝROBA

Nepřidává se žádný nosič india.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření india-111.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření. *Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.*

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama india-111 mají energie 0,171 MeV a 0,245 MeV.

- B.** 5 mg až 10 mg *oxidu hořečnatého R* se umístí do skleněné zkumavky o průměru asi 20 mm, přidá se 20 µl zkoušeného přípravku a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm; vzniká jasně žlutá fluorescence.
- C.** Rozdělení aktivity mezi organickou a vodnou vrstvu ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,0 až 7,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Indium-111.** Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem india-111.

*Hodnocení.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m.

**Nečistota A.** Nejvýše 0,25 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. *Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.*

Zaznamená se spektrum záření gama pomocí vhodného detektoru s olovenou clonou o tloušťce 6 mm umístěnou mezi vzorek o aktivitě asi 30 MBq a detektor.

*Hodnocení.* Odezva v oblasti odpovídající fotonům india-114m o energiích 0,558 MeV a 0,725 MeV nepřevyšuje odezvu získanou za použití referenčního roztoku india-114m o aktivitě 75 kBq měřeného za stejných podmínek; všechna měření jsou vztažena k datu a hodině podání.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Oxinát značený indiem-111.** Do silanizované dělicí nálevky obsahující 3 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se přidá 100 µl zkoušeného přípravku a promíchá se. Přidá se 6 ml *oktan-1-olu R* a intenzivně se protřepává. Po oddělení fází se dolní a pak i horní vrstva přenesou do vhodných stejných lahvíček pro měření. Dělicí nálevka se promyje 1 ml *oktan-1-olu R* intenzivním protřepáním a promývací tekutina se přidá do lahvičky s organickou vrstvou. Pak se dělicí nálevka promyje 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* intenzivním protřepáváním a promývací tekutina se přenesou do třetí lahvičky. Všechny lahvičky se uzavřou a za použití vhodného zařízení se změří aktivita v každé lahvičce. Vypočítá se radiochemická čistota oxinátu značeného indiem-111, vyjadřující aktivitu nalezenou v organické vrstvě, jako procento aktivity india-111 naměřené ve třech roztocích. *Hodnocení.* Nejméně 90 % celkové aktivity india-111.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, že přípravek není určen pro přímé podání člověku.

#### NEČISTOTY

A. indium-114m.

## INDII (<sup>111</sup>In) PENTETATIS SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0670

Pentetát značený indiem-(<sup>111</sup>In) injekční roztok

*Synonymum.* Pentetan inditý-(<sup>111</sup>In) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující indium-111 ve formě penta-indium-tris(diethylentriaminpentaacetátu). Může obsahovat vápník a může být izotonizován přísadkou chloridu sodného a vhodné tlumivé přísady.

*Indium-111.* 90 % až 110 % deklarované aktivity india-111 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření india-111.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama india-111 mají energie 0,171 MeV a 0,245 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu). Distribuce aktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 7,0 až 8,0.

**Kadmium.** Nejvýše 5 µg/ml.

Atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda II*).

*Zkoušený roztok.* 0,1 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 0,9 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (1 + 99).

*Porovnávací roztoky.* Připraví se za použití základního roztoku *kadmia (1 mg Cd/ml)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (1 + 99).

*Zdroj záření.* Kadmiová lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 228,8 nm.

*Atomizér.* Plamen vzduch-acetylen.

**Volná kyselina diethylentriaminpentaacetátová.** Nejvýše 0,4 mg/ml.

V mikrozkuhavce se smíchá 100 µl zkoušeného přípravku se 100 µl čerstvě připraveného roztoku *modři hydroxynaftolové sodné soli R* (1 g/l) v roztoku *hydroxidu sodného R* (42 g/l). Přidá se 50 µl roztoku *chloridu vápenatého R* (0,15 g/l). Zbarvení roztoku zůstane růžovofialové nebo se změní z modrého na růžovofialové.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 14/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Indium-111.** Spektrometrie záření gama a spektrometrie rtg záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem india-111.

*Hodnocení.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m.

**Nečistota A.** Nejvýše 0,2 % celkové aktivity k datu a hodině podání.

Spektrometrie záření gama.

Zkoušený přípravek se ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby se aktivita india-111 přeměnou dostatečně snížila na hodnotu umožňující měření radionuklidových nečistot.

Zaznamenaná se spektrum záření gama vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku india-114m.

*Hodnocení.* Indium-114m má poločas přeměny 49,5 dne a nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,190 MeV.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Pentetát značený indiem-111.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R; použije se silikagel na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok chloridu sodného R (9 g/l).

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Identifikace skvrn.* Pentetát značený indiem-111 se pohybuje v blízkosti čela rozpouštědla.

*Limit:*

– pentetát značený indiem-111: nejméně 95 % aktivity india-111.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

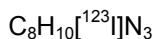
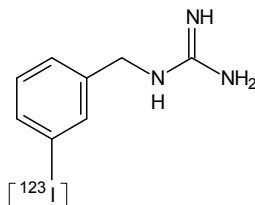
#### NEČISTOTY

A. indium-114m.

## IOBENGUANI (<sup>123</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1113

Jobenguan-(<sup>123</sup>I) injekční roztok



#### DEFINICE

Je to sterilní roztok 1-(3-[<sup>123</sup>I]jodbenzyl)guanidinu nebo jeho soli, prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu, vhodný katalyzátor ke značení (jako je měď v iontové formě), vhodnou stabilizační látku ke značení (jako je kyselina askorbová) a protimikrobní látky.

*Jod-123.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-123 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 10 GBq jodu-123 na gram báze jobenguanu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-123.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama jodu-123 má energii 0,159 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (Zkoušky na čistotu). Distribuce aktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH.** 3,5 až 8,0.

**Hmotnostní aktivita.** Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguan-sulfátu se stanoví z ploch píků odpovídajících jobenguanu na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Koncentrace báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Radionuklidy jiné než jod-123.** Nejvýše 0,35 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a spektrum rtg záření.

Stanoví se relativní množství jodu-125, telluru-121 a jiných přítomných radionuklidových nečistot. Pro jejich stanovení se zkoušený přípravek nechá stát po dostatečně dlouhou dobu, aby aktivita jodu-123 klesla na hodnotu vhodnou pro stanovení těchto nečistot. Nejsou detekovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>123</sup>I]Jobenguan.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.



*Porovnávací roztok (a).* 0,100 g jodidu sodného R se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10,0 mg jobenguan-sulfátu CRL se rozpustí ve 25 ml mobilní fáze a zředí se jí na 50,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;  
– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku dusičnanu amonného R (80 g/l), amoniaku zředěného RS2 a methanolu R (1 + 2 + 27).

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity a spektrofotometr při 254 nm, s průtokovým uspořádáním.

*Nástřik.* 10 μl.

*Limity:*

– [<sup>123</sup>I]jobenguan: nejméně 95 % celkové aktivity jodu-123;  
– *nečistota A:* nejvýše 4 % celkové aktivity jodu-123;  
– *ostatní nečistoty:* nejvýše 1 % celkové aktivity jodu-123.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede hmotnostní aktivita vyjádřená v GBq jodu-123 na gram báze jobenguanu.

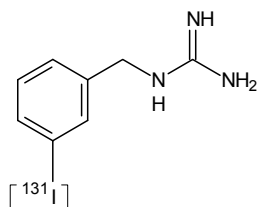
#### NEČISTOTY

A. [<sup>123</sup>I]jodid,  
B. jod-125,  
C. tellur-121.

## IOBENGUANI (<sup>131</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS AD USUM DIAGNOSTICUM

7.0:1111

Jobenguan-(<sup>131</sup>I) injekční roztok pro diagnostické použití



C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>[<sup>131</sup>I]N<sub>3</sub>

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok 1-(3-[<sup>131</sup>I]jodbenzyl)guanidinu nebo jeho soli, prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu, vhodný katalyzátor ke značení (jako je měď v iontové formě), vhodný stabilizátor ke značení (jako je kyselina askorbová) a protimikrobní látky.

*Jod-131.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 20 GBq jodu-131 na gram báze jobenguanu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu). Distribuce aktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 8,0.

**Hmotnostní aktivita.** Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguan-sulfátu se stanoví z ploch pík odpovídajících jobenguanu na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Obsah báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

[<sup>131</sup>I]Jobenguan. Kapalinná chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 0,100 g jodidu sodného R se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10,0 mg jobenguan-sulfátu CRL se rozpustí ve 25 ml mobilní fáze a zředí se jí na 50,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;  
– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku dusičnanu amonného R (80 g/l), amoniaku zředěného RS2 a methanolu R (1 + 2 + 27).

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity a spektrofotometr při 254 nm, s průtokovým uspořádáním.

*Nástřik.* 10 μl.

*Limity:*

– [<sup>131</sup>I]jobenguan: nejméně 94 % celkové aktivity jodu-131;

- *nečistota A*: nejvýše 5 % celkové aktivity jodu-131;
- *ostatní nečistoty*: nejvýše 1 % celkové aktivity jodu-131.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede hmotnostní aktivita vyjádřená v gigabecquerelech jodu-131 na gram báze jobenguanu.

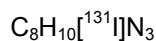
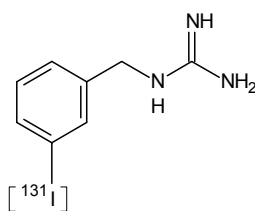
## NEČISTOTY

- A. [<sup>131</sup>I]jodid,
- B. jod-133,
- C. jod-135.

## IOBENGUANI (<sup>131</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS AD USUM THERAPEUTICUM

7.0:1112

Jobenguan-(<sup>131</sup>I) injekční roztok pro terapeutické použití



## DEFINICE

Je to sterilní roztok 1-(3-[<sup>131</sup>I]jodbenzyl)guanidinu nebo jeho solí, prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu, vhodný katalyzátor ke značení (jako je měď v iontové formě), vhodný stabilizátor ke značení (jako je kyselina askorbová) a protimikrobní látky.

*Jod-131*. 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita*. Nejméně 400 GBq jodu-131 v gramu báze jobenguanu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131*. Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení*. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz *Zkoušky na čistotu*). Distribuce aktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 8,0.

**Hmotnostní aktivita**. Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguan-sulfátu se stanoví z ploch píků odpovídajících jobenguanu na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Koncentrace báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

**Sterilita**. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-131**. Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

[<sup>131</sup>I]Jobenguan. Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok*. Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a)*. 0,100 g jodidu sodného *R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.

*Porovnávací roztok (b)*. 10,0 mg jobenguan-sulfátu *CRL* se rozpustí ve 25 ml mobilní fáze a zředí se jí na 50,0 ml.

*Kolona*:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze*: silikagel pro chromatografii *R* (5 μm).

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů roztoku *dusičnanu amonného R* (80 g/l), *amoniaku zředěného RS2* a *methanolu R* (1 + 2 + 27).

*Průtoková rychlost*. 1,0 ml/min.

*Detekce*. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity a spektrofotometr při 254 nm, s průtokovým uspořádáním.

*Nástřik*. 10 μl.

*Limity*:

- [<sup>131</sup>I]jobenguan: nejméně 92 % celkové aktivity jodu-131;
- *nečistota A*: nejvýše 7 % celkové aktivity jodu-131;
- *ostatní nečistoty*: nejvýše 1 % celkové aktivity jodu-131.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede hmotnostní aktivita vyjádřená v gigabecquerelech jodu-131 na gram báze jobenguanu.

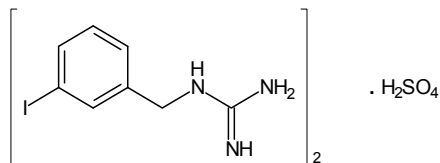
## NEČISTOTY

- A. [<sup>131</sup>I]jodid,
- B. jod-133,
- C. jod-135.

## IOBENGUANI SULFAS AD RADIOPHARMACEUTICA

6.6:2351

Jobenguan-sulfát pro radiofarmaceutické  
přípravky

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>I<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>SM<sub>r</sub> 648,26

## DEFINICE

Je to bis[(3-jodbenzyl)guanidin]-sulfát.

Obsah. 98,0 % až 102,0 % sloučeniny C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>I<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S, počítáno na vysušenou látku.

## VLASTNOSTI

Vzhled. Bílé nebo téměř bílé krystaly.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

Porovnání. S referenčním spektrem Ph. Eur. jobenguan-sulfátu.

B. Asi 10 mg se rozpustí mírným zahřáním v 1 ml vody R. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany (2.3.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Nečistota A. Kapalinová chromatografie (2.2.29). Roztoky a mobilní fáze se připraví těsně před použitím.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v 1 ml mobilní fáze a zředí se jí na 5,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg jobenguan-sulfátu CRL se v 1 ml mobilní fáze a zředí se jí na 5,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 23,1 mg 3-jodbenzylamonium-chloridu R (sůl nečistoty A) se rozpustí v 1 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (b).

Porovnávací roztok (d). 0,1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

## Kolona:

– rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii R (5 μm);

– teplota: udržuje se konstantní teplota v rozmezí 20 °C až 30 °C.

Mobilní fáze. Směs 40 ml roztoku dusičnanu amonného R (80 g/l), 80 ml amoniaku zředěného RS2 a 1080 ml methanolu R.

Průtoková rychlost. 1 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

Nástřik. 20 μl; zkoušený roztok a porovnávací roztoky (c) a (d).

Doba záznamu. 15 min.

Relativní retence vztažená k jobenguanu (retenční čas asi 7 min). Nečistota A asi 0,2.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (c):

– rozlišení: nejméně 4,0 mezi píkem nečistoty A a píkem jobenguanu.

Limit:

– nečistota A: nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %).

Ztráta sušením (2.2.32). Nejvýše 3,0 %; 0,100 g se suší v sušárně při 105 °C.

Bakteriální endotoxiny (2.6.14). Méně než 10 m. j./mg, pokud je látka určena pro použití bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Příbuzné látky (viz Zkoušky na čistotu) s následující úpravou.

Nástřik. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a).

Obsah C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>I<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S v procentech se vypočítá za použití deklarovaného obsahu jobenguan-sulfátu CRL.

## SKLADOVÁNÍ

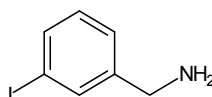
Chráněn před světlem, při teplotě do 25 °C.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se doporučuje provést provozní zkoušku před použitím látky ve výrobě radiofarmak. Tato zkouška zajistí, že látka poskytne při daných výrobních podmínkách radiofarmakum v požadovaném množství a odpovídající jakosti.

## NEČISTOTY

Specifikované nečistoty: A.



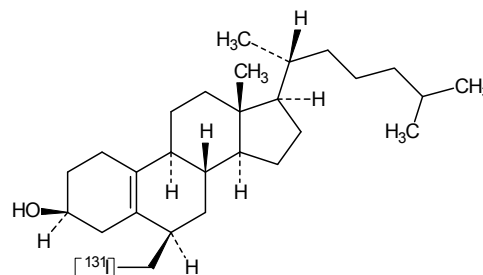
A. (3-jodfenyl)methanamin.

## IODOMETHYLNORCHOLESTEROLI (<sup>131</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0939

Jodmethylnorcholesterol-(<sup>131</sup>I) injekční roztok

Synonyma. Norcholesteroli iodinati (<sup>131</sup>I) solutio iniectabilis, Norcholesterol jodovaný-(<sup>131</sup>I) injekční roztok



## DEFINICE

Je to sterilní roztok 6β-[<sup>131</sup>I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-olu. Může obsahovat vhodný emulgátor, jako je polysorbát 80, a vhodnou protimikrobní látku, jako je benzylalkohol.

*Jod-131.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* 3,7 GBq až 37 GBq na gram 6β-jodmethylnorcholesterolu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý nebo slabě zakalený bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota 6β-[<sup>131</sup>I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-olu (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je asi 0,5.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**6β-[<sup>131</sup>I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-ol.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Roztok nosiče.* 10 mg jodidu draselného R, 20 mg jodičnanu draselného R a 0,1 g hydrogenuhličitanu sodného R se rozpustí ve vodě destilované R a zředí se jí na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Chloroform R.

*Nanášení.* Až 5 μl zkoušeného roztoku a 10 μl roztoku nosiče se nanese do stejného místa.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm, asi 60 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* V ultrafialovém světle při 254 nm a se vhodným detektorem ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* 6β-[<sup>131</sup>I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-ol asi 0,5.

*Identifikace skvrn.* Nečistota C zůstává blízko startu.

*Limit:*

– 6β-[<sup>131</sup>I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-ol: nejméně 85 % celkové aktivity jodu-131.

**Nečistota C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Roztok nosiče.* 10 mg jodidu draselného R, 20 mg jodičnanu draselného R a 0,1 g hydrogenuhličitanu sodného R se rozpustí ve vodě destilované R a zředí se jí na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs stejných objemových dílů chloroformu R a ethanolu bezvodého R.

*Nanášení.* 10 μl roztoku nosiče a pak až 5 μl zkoušeného roztoku se nanese do stejného místa.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm, asi 90 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* V ultrafialovém světle při 254 nm po dobu 5 min a se vhodným detektorem ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* pro Nečistota C asi 0,5 (žlutá skvrna).

*Identifikace skvrn.* Hlavní pik aktivity se nachází v blízkosti čela mobilní fáze; ostatní jodcholesteroly se nacházejí v blízkosti čela mobilní fáze.

*Limit:*

– nečistota C: nejvýše 5 % celkové aktivity.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující –18 °C.

## NEČISTOTY

A. jod-133,

B. jod-135,

C. [<sup>131</sup>I]jodid.

KRYPTONUM (<sup>81m</sup>Kr)  
AD INHALATIONEM

6.0:1533

Krypton-(<sup>81m</sup>Kr) plyn k inhalaci

## DEFINICE

Je to plynná směs kryptonu-81m a vhodného vehikula, jako je vzduch.

## VÝROBA

Krypton-81m vzniká přeměnou jeho mateřského radionuklidu rubidia-81. Rubidium-81 má poločas přeměny 4,58 h.

Vznikající krypton-81m se separuje z rubidia-81 proudem vhodného plynu v rubidium/kryptonovém generátoru.

Rubidium-81 se získává ozařováním izotopů kryptonu protony nebo ozařováním bromu heliem-3 nebo heliem-4. Po separaci z terče se rubidium-81 zachycuje na vhodný nosič.

Krypton-81m se eluuje vhodnou průtokovou rychlostí vehikulem, jako je vzduch. Hladina vlhkosti požadovaná v elu-

átu závisí na typu použitého generátoru. Transportní hadice pro podání má definovanou délku a vnitřní průměr. Objemová aktivita se určí před podáním.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý plyn.

*Poločas přeměny a druh záření kryptonu-81m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Hodnocení.* Foton gama kryptonu-81m má energii 0,190 MeV.

##### B. Poločas přeměny kryptonu-81m je 11,8 s až 14,4 s.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Radionuklidy jiné než krypton-81m.** Nejvýše 0,1 % aktivity, která protekla do absorbéru, počítáno k datu a času podání.

*Spektrometrie záření gama a rtg záření.* Generátor se eluuje podle návodu. Dostatečné množství eluátu (2 litry až 10 litrů) o vhodné průtokové rychlosti proteče do vhodného absorbéru, jako je voda. Stanoví se množství eluované aktivity. Krypton-81m se nechá přeměňovat 5 min a zaznamená se spektrum záření gama a rtg záření zbytkové aktivity v absorbéru za použití vhodného zařízení. Hodnotí se spektrum záření gama a rtg záření v absorbéru na přítomnost radioaktivních nečistot, které se musí identifikovat a kvantifikovat.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Za použití vhodného zařízení, jako je ionizační komora nebo spektrometr záření gama, se stanoví objemová aktivita přípravku. Aktivita se měří za definovaných pracovních podmínek, jako je průtoková rychlost a geometrie měření, shodných s těmi, které se použily pro kalibraci přístroje.

#### SKLADOVÁNÍ

Podmínky skladování se vztahují ke generátoru.

#### OZNAČOVÁNÍ

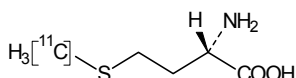
Podmínky označování se vztahují ke generátoru.

## METHIONINI ( $^{11}\text{C}$ METHYL) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1617

### Methionin-( $^{11}\text{C}$ methyl) injekční roztok

*Synonymum.* L-Methionini ( $^{11}\text{C}$ methyl) solutio iniectabilis



#### DEFINICE

Je to sterilní roztok kyseliny (2S)-2-amino-(4-( $^{11}\text{C}$ methylsulfanyl)butanové pro diagnostické použití.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity uhlíku-11 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### Čistota:

- nejméně 99 % celkové aktivity připadá na uhlík-11;
- nejméně 95 % celkové aktivity připadá na uhlík-11 ve formě L-[methyl- $^{11}\text{C}$ ]methioninu a D-[methyl- $^{11}\text{C}$ ]methioninu;
- nejvýše 10 % celkové aktivity připadá na uhlík-11 ve formě D-[methyl- $^{11}\text{C}$ ]methioninu.

*Obsah methioninu.* Nejvýše 2 mg pro nejvyšší doporučenou dávku v mililitrech.

#### VÝROBA

##### VÝROBA RADIONUKLIDU

Uhlík-11 je radioaktivní izotop uhlíku, který se nejběžněji vyrábí ozařováním dusíku protony. V závislosti na přidání buď stopového množství kyslíku, nebo malého množství vodíku, je získána aktivita ve formě oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého nebo [ $^{11}\text{C}$ ]methanu.

##### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

Methionin-( $^{11}\text{C}$ methyl) injekční roztok se může připravit různými chemickými syntézami. Všechny metody jsou založeny na alkylaci sulfidového aniontu L-homocysteinu [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidem nebo [ $^{11}\text{C}$ ]methyl-triflátem ([ $^{11}\text{C}$ ]methyl-trifluormethansulfonátem). Rozdílnost v postupech použitých k přípravě sulfidového aniontu L-homocysteinu a metod k získání [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidu vede ke vzniku nepatrných rozdílů v jakosti z hlediska hmotnostní aktivity, enantiomerní čistoty a možných chemických a radiochemických nečistot.

##### Syntéza [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidu

[ $^{11}\text{C}$ ]Methyljodid se může získat buď z výchozího oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého, nebo z [ $^{11}\text{C}$ ]methanu. Nejčastěji používanou metodou je redukce oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého tetrahydridohlitanem lithným. Vzniklý [ $^{11}\text{C}$ ]methanol reaguje s kyselinou jodovodíkovou. Alternativně se [ $^{11}\text{C}$ ]methan, získaný buď přímo v terči, nebo přímým postupem z oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého, nechá reagovat s jodem.

##### Syntéza [ $^{11}\text{C}$ ]methyl-triflátu

[ $^{11}\text{C}$ ]Methyl-triflát se může připravit z [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidu za použití pevného nosiče, jako je grafitizovaný uhlík, impregnovaného stříbrnou solí kyseliny trifluormethansulfonové.

##### Syntéza [methyl- $^{11}\text{C}$ ]methioninu

Nejvíce používaná metoda k získání [methyl- $^{11}\text{C}$ ]methioninu je alkylace sulfidového aniontu vyrobeného z L-homocysteinthiolaktonu [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidem nebo [ $^{11}\text{C}$ ]methyl-triflátem v zásaditém prostředí v rozpouštědle, jako je aceton. Získaný [methyl- $^{11}\text{C}$ ]methionin se může čistit semipreparativní kapalinovou chromatografií. Vhodná je např. kolona naplněná silikagelem oktadecylsilylovaným pro chromatografii promývaná roztokem chloridu sodného (9 g/l).

##### L-Homocysteinthiolakton-hydrochlorid

Specifická optická otáčivost (2.2.7). +20,5 až +21,5; měří se roztok (10 g/l) při teplotě 25 °C.

Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

*Porovnání.* S referenčním spektrem Ph. Eur. L-homocysteinthiolakton-hydrochloridu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření uhlíku-11.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

## B. Zkouška Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

## C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## CHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota A, nečistota B a methionin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 0,6 mg *L-homocysteinthiolakton-hydrochloridu R*, 2 mg *DL-homocysteinu R* a 2 mg *DL-methioninu R* se rozpustí ve vodě *R* a zředí se jí na objem *V*; kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (b).* 2 mg *L-methioninu R* se rozpustí ve stejném rozpouštědle použitým pro zkoušený roztok a zředí se stejným rozpouštědlem na 10 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm) se specifickým povrchem 220 m<sup>2</sup>/g, velikostí pórů 8 nm a obsahem vázaného uhlíku 6,2 %;

– *teplota:* 25 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného *R* (1,4 g/l).

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 225 nm a detektor radioaktivity zapojený do série.

*Nástřík.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Relativní retence* vztažená k methioninu (retenční čas asi 2,6 min). Nečistota B asi 0,8; nečistota A asi 2,7.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

– *rozlišení:* nejméně 2,5 mezi píkem methioninu a píkem nečistoty B.

*Limity,* hodnotí se chromatogramy získané spektrofotometrickým detektorem:

– *nečistota A:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,6 mg/*V*);

– *nečistota B:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 mg/*V*);

– *methionin:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 mg/*V*).

**Zbytková rozpouštědla** (2.4.24). Nejvýše 50 mg/*V* pro koncentraci acetonu, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Uhlík-11.** Nejméně 99 % celkové aktivity.

## A. Spektrometrie gama záření.

*Porovnání.* S referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku. Referenční roztoky fluoru-18 a/nebo kalibrace přístrojů se získají od laboratoří uznaných oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

## B. Poločas přeměny: 19,9 min až 20,9 min.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[Methyl-<sup>11</sup>C]methionin a nečistota E.** Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem uvedeným ve zkoušce Nečistota A, nečistota B a methionin.

*Nástřík.* Zkoušený roztok a porovnávací roztok (b).

*Limity,* hodnotí se chromatogram získaný detektorem radioaktivity:

– *celkový obsah [methyl-<sup>11</sup>C]methioninu a nečistoty E:* nejméně 95 % celkové aktivity;

– jiné píky na chromatogramu mohou odpovídat nečistotě C, nečistotě D a nečistotě F.

## ENANTIOMERNÍ ČISTOTA

**Nečistota E.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 2 mg *L-methioninu R* se rozpustí ve vodě *R* a zředí se jí na 10 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 4 mg *DL-methioninu R* se rozpustí v 10 ml vody *R* a zředí se jí na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro chirální separace pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs stejných objemových dílů methanolu *R* a vody *R*.

*Nanášení.* 2 μl až 10 μl.

*Vyvíjení.* Po dráze 8 cm.

*Sušení.* 5 min na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem *ninhydrinu R* (2 g/l) v *ethanolu bezvodém R* a zahřívá se 10 min při 60 °C.

Vhodným detektorem se určí distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* [*Methyl*-<sup>11</sup>C]methionin asi 0,58; nečistota E asi 0,51.

*Test způsobilosti,* chromatogram porovnávacího roztoku (b) vykazuje dvě zřetelně oddělené skvrny.

*Limity:*

- celkový obsah [*methyl*-<sup>11</sup>C]methioninu a nečistoty E: nejméně 95 % celkové aktivity;
- nečistota E: nejvýše 10 % celkové aktivity.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

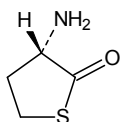
#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení porovnáním s referenčním roztokem fluoru-18 nebo přístrojem kalibrovaným pomocí tohoto roztoku.

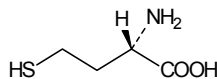
#### OZNAČOVÁNÍ

Příbalová informace uvádí nejvyšší doporučenou dávku v mililitrech.

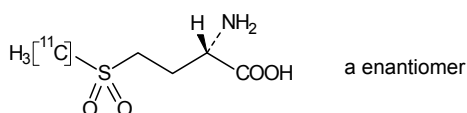
#### NEČISTOTY



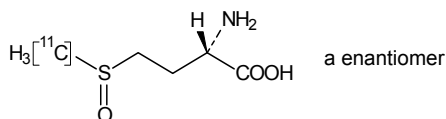
- A. (3*S*)-3-aminodihydrothiopen-2(3*H*)-on (L-homocysteinthiolakton),



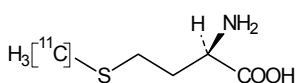
- B. kyselina (2*S*)-2-amino-4-sulfanylbutanová (L-homocystein),



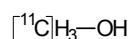
- C. kyselina (2*RS*)-2-amino-4-([<sup>11</sup>C]methylsulfonyl)butanová (DL-[*methyl*-<sup>11</sup>C]methionin-*S,S*-dioxid),



- D. kyselina (2*RS*)-2-amino-4-([<sup>11</sup>C]methylsulfinyl)butanová (DL-[*methyl*-<sup>11</sup>C]methionin-*S*-oxid),



- E. kyselina (2*R*)-2-amino-4-([<sup>11</sup>C]methylsulfanyl)butanová (D-[*methyl*-<sup>11</sup>C]methionin),



- F. [<sup>11</sup>C]methanol.

## NATRII ACETATIS ([1-<sup>11</sup>C]) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1920

Natrium-acetát-([1-<sup>11</sup>C]) injekční roztok

*Synonymum.* Octan-([1-<sup>11</sup>C]) sodný injekční roztok



#### DEFINICE

Je to sterilní roztok natrium-acetátu-[1-<sup>11</sup>C] v rovnováze s kyselinou [1-<sup>11</sup>C]octovou.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity uhlíku-11 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VÝROBA

##### VÝROBA RADIONUKLIDU

Uhlík-11 je radioaktivní izotop uhlíku, který se nejběžněji vyrábí ozařováním dusíku protony. Přidáním stopového množství kyslíku se získá aktivita ve formě oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého.

##### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

Oxid [<sup>11</sup>C]uhlíčitý se může separovat ze směsi plynů v terči kryogenním zachycením nebo zachycením na molekulárním sítu při teplotě místnosti. Oxid [<sup>11</sup>C]uhlíčitý se potom uvolní z terče a zachytí se za použití inertního plynu, jako je dusík, při teplotě vyšší, než je teplota při zachycení.

Acetát-[1-<sup>11</sup>C] se obvykle vyrábí reakcí oxidu [<sup>11</sup>C]uhlíčitého s methylmagnesiumbromidem v organickém rozpouštědle, jako je ether nebo tetrahydrofuran.

Hydrolyzou produktu vznikne kyselina [1-<sup>11</sup>C]octová, která se čistí chromatografickými postupy. Eluát se ředí roztokem chloridu sodného.

##### PREKURZOR PRO SYNTÉZU

**Methylmagnesiumbromid.** Reaktivita methylmagnesiumbromidu se zkouší rozkladem definovaného množství ve vodě. Množství methanu uvolněného během této reakce je nejméně 90 % teoretické hodnoty.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření uhlíku-11.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pik 1,022 MeV.

- B. Radionuklidová čistota, zkouška B (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

**C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### CHEMICKÁ ČISTOTA

**Acetát.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 28 mg octanu sodného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na objem V, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* anex pro chromatografii silně zásaditý R (10 μm);
- *teplota:* 25 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS chráněný před vzdušným oxidem uhličitým.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity uspořádané do série.

*Nástřik.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozdílení:* nejméně 4,0 mezi píkem připadajícím na mrtvý objem a píkem acetátu.

*Limit,* hodnotí se chromatogramy získané se spektrofotometrickým detektorem:

- *acetát:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (20 mg/V).

**Zbytková rozpouštědla** jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati (5.4), použije se obecná metoda (2.4.24). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Uhlík-11.** Nejméně 99 % celkové aktivity. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Porovnání.* S referenčním roztokem fluoru-18, nebo se změří přístrojem kalibrovaným pomocí tohoto roztoku. Referenční roztoky fluoru-18 a/nebo kalibrace přístrojů se získají od laboratoří uznaných oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

**B.** Poločas přeměny. 19,9 min až 20,9 min.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Acetát-[1-<sup>11</sup>C].** Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsána ve zkoušce Acetát.

*Limit,* hodnotí se chromatogramy získané se spektrofotometrickým detektorem a detektorem radioaktivity:

- *celkový obsah acetátu-[1-<sup>11</sup>C]:* nejméně 95 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení porovnáním s referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří přístrojem kalibrovaným pomocí tohoto roztoku.

#### OZNAČOVÁNÍ

Příbalová informace uvádí nejvyšší doporučenou dávku v mililitrech.

## NATRII CHROMATIS (<sup>51</sup>Cr) SOLUTIO STERILIS

7.0:0279

### Chroman-(<sup>51</sup>Cr) sodný sterilní roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok [<sup>51</sup>Cr]chromanu sodného izotonizovaný přísadkou chloridu sodného.

*Chrom-51.* 90 % až 110 % deklarované aktivity chromu-51 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 370 MBq chromu-51 na miligram chromanového iontu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření chromu-51.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze foton gama chromu-51 má energii 0,320 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je asi 0,9.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,0 až 8,5.

**Celkový chroman.** Nejvýše 2,7 μg chromanových iontů (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) v MBq.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* Roztok chromanu draselného R (1,7 mg/l).

Měří se absorbance (2.2.25) roztoků v maximu při 370 nm. Je-li třeba, upraví se pH zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku hydrogenuhličitánem sodným RS na hodnotu 8,0. Obsah chromanu ve zkoušeném roztoku se vypočítá za použití změřené absorbance.



**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Chrom-51.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku chromu-51.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>51</sup>Cr]chromanový iont.** Vzestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů amoniaku 17,5% RS, ethanolu 96% R a vody R (25 + 50 + 125).

*Nanášení.* Množství roztoku dostatečné pro detekční metodu.

*Vyvíjení.* Ihned, po dobu 2,5 h.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* Nečistota A 0,0 až 0,1; chroman sodný asi 0,9.

*Limit:*

– [<sup>51</sup>Cr]chromanový iont: nejméně 90 % celkové aktivity chromu-51.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>51</sup>Cr]chromitý iont.

## NATRII FLUORIDI (<sup>18</sup>F) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:2100

### Fluorid-(<sup>18</sup>F) sodný injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující fluor-18 ve formě fluoridu sodného. Může obsahovat fluoridový nosič a vhodnou tlumivou přísadu.

*Obsah:*

– fluor-18: 90 % až 110 % deklarované aktivity k datu a hodině uvedeným v označení na obalu;

– fluorid: nejvýše 4,52 mg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

#### VÝROBA

Radionuklid fluoru-18 se nejběžněji vyrábí ozařováním vody obohacené kyslíkem-18 protony. Fluor-18 ve formě fluoridu se získá z vody v terči, obvykle adsorpcí nebo desorpcí pomocí anexu nebo opětovným rozpuštěním povlaku získaného elektrochemicky.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření fluoru-18.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pik o energii 1,022 MeV.

**B.** Zkouška B, Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

**C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pík připadající na fluorid na chromatogramu porovnávacího roztoku je negativní.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH (2.2.3).** 5,0 až 8,5.

**Fluorid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* 10 mg fluoridu sodného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na objem V, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* anex pro chromatografii silně zásaditý R (10 μm);

– *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok hydroxidu sodného R (4 g/l) chráněný před vzdušným oxidem uhličitým.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 20 μl.

*Doba záznamu.* 15 min.

*Test způsobilosti,* chromatogram porovnávacího roztoku získaný spektrofotometrickým detektorem:

– *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík;

– *retenční čas fluoridu:* nejméně trojnásobek mrtvého času.

*Limit,* hodnotí se chromatogram získaný spektrofotometrickým detektorem:

– *fluorid:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (4,52 mg/V).

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Fluor-18.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušek.

**A. Spektrometrie záření gama.**

Stanoví se množství fluoru-18 a radionuklidových nečistot s poločasem přeměny delším než 2 h. Pro detekci a kvantifikaci nečistot se ponechá zkoušený přípravek dostatečně dlouhou dobu, aby přeměna fluoru-18 umožnila stanovit nečistoty.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra pozadí.

**B. Poločas přeměny. 105 min až 115 min.****RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**[<sup>18</sup>F]fluorid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem popsaným ve zkoušce Fluorid. Je-li třeba, zředí se zkoušený roztok *vodou R* tak, aby výsledná směs měla objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.

*Limit,* hodnotí se chromatogram získaný detektorem radioaktivity:

– [<sup>18</sup>F]fluorid: nejméně 98,5 % celkové aktivity.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

## NATRII IODIDI (<sup>123</sup>I) SOLUTIO AD RADIOSIGNANDUM

6.0:2314

### Jodid-(<sup>123</sup>I) sodný roztok ke značení radionuklidem

*Synonyma.* Natrii iodidi (<sup>123</sup>I) solutio ad signandum,  
Jodid-(<sup>123</sup>I) sodný roztok ke značení

**DEFINICE**

Je to silně zásaditý roztok obsahující jod-123 ve formě jodidu sodného.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-123 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

**VÝROBA**

Jod-123 se získá ozařováním xenonu vysoce obohaceného xenonem-124 protony a následnou přeměnou přímo vzniklého xenonu-123 a přeměnou cesia-123. Jodid ve formě nosiče nebo redukující látky se nepřidávají.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-123.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****A. Spektrometrie záření gama.**

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený gama foton jodu-123 má energii 0,159 MeV a je doprovázen hlavním rtg zářením o energii 0,027 MeV.

**B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).**

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Zásaditá reakce (2.2.4).** Přípravek je silně zásaditý.

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA**

**Jod-123.** Nejméně 99,7 % celkové aktivity.

Spektrometrie gama záření.

Stanoví se relativní množství jodu-123, jodu-125, telluru-121 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot. Pro detekci telluru-121 a jodu-125 se zkoušený přípravek nechá dostatečně dlouhou dobu stát, aby aktivita jodu-123 klesla na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Nejsou detekovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**[<sup>123</sup>I]jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí stejným objemovým dílem roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhlíčan sodný R* (10 g/l) a promíchá se. Je-li třeba, zkoušený přípravek se nejdříve zředí roztokem *hydroxidu sodného R* (2 g/l) tak, aby výsledná směs měla objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.

*Porovnávací roztok (a).* 10 mg *jodidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 20 mg *jodičnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).

**Kolona:**

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 μm);

– *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

Použije se kolona z nerezové oceli.

*Mobilní fáze.* 5,85 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*, přidá se 0,65 ml *oktylaminu R* a pH se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml *acetonitrilu R* a promíchá se.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřík.* 20 μl.

*Doba záznamu.* 12 min.

*Relativní retence* vztažená k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan 0,2 až 0,3.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozlišení:* nejméně 2 mezi pikem jodidu a pikem jodičnanu na chromatogramu získaném se spektrofotometrickým detektorem.

Hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku získaný s detektorem radioaktivity a určí se poloha píku jodidu

porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a) získaným se spektrofotometrickým detektorem.

*Limit:*

– [<sup>123</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.

STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita kalibrovaným přístrojem.

OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

– jakákoliv přidaná pomocná látka;

– že přípravek není určen k přímému podání pacientovi.

NEČISTOTY

A. jod-125,

B. tellur-121,

C. [<sup>123</sup>I]jodičnanový iont.

## NATRII IODIDI (<sup>123</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:0563

Jodid-(<sup>123</sup>I) sodný injekční roztok

DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující jod-123 ve formě jodidu sodného. Může obsahovat thiosíran sodný nebo jinou vhodnou redukující látku a vhodnou tlumivou přísadu.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-123 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

VÝROBA

Jod-123 se získá ozařováním xenonu obohaceného xenonem-124 (nejméně 98 %) protony a následnou přeměnou xenon-123 vzniklého přímo a přeměnou cesia-123. Nepřidává se jodid ve formě nosiče.

VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-123.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-123. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-123 má energii 0,159 MeV a je doprovázen rtg zářením o energii 0,027 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 7,0 až 10,0.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA**

**Jod-123.** Nejméně 99,65 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-123, jodu-125, telluru-121 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot. Pro detekci telluru-121, jodu-125 se zkoušený přípravek nechá dostatečně dlouhou dobu stát, aby aktivita jodu-123 klesla na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Nejsou detekovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**[<sup>123</sup>I]jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí roztokem *hydroxidu sodného R* (2 g/l) na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor. Přidá se stejný objemový díl roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhlíčan sodný R* (10 g/l) a promíchá se. *Porovnávací roztok (a).* 1 ml roztoku *jodidu draselného R* (26,2 mg/l) se zředí *vodou R* na 10 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 1 ml *jodičnanu draselného R* (24,5 mg/l) se zředí *vodou R* na 10 ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);

– *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze.* 5,85 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*, přidá se 0,65 ml *oktylaminu R* a pH se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml *acetonitrilu R* a promíchá se.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 20 µl.

*Doba záznamu.* 12 min.

*Relativní retence* vztažená k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan asi 0,2 až 0,3.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozlišení:* nejméně 2 mezi píkem jodidu a píkem jodičnanu na chromatogramu získaném se spektrofotometrickým detektorem.

*Limit,* hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku získaný s detektorem radioaktivity a určí se poloha píku jodidu porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a) získaného se spektrofotometrickým detektorem:

– [<sup>123</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita kalibrovaným přístrojem.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede jakákoliv přidaná látka.

## NEČISTOTY

A. [<sup>123</sup>I]jodičnanový iont.

## NATRII IODIDI (<sup>131</sup>I) CAPSULAE AD USUM DIAGNOSTICUM

6.0:0938

### Jodid-(<sup>131</sup>I) sodný tobolky pro diagnostické použití

## DEFINICE

Jsou to tobolky, které obsahují jod-131 ve formě jodidu sodného v pevném základu. Tobolky mohou obsahovat thiosíran sodný nebo jiné vhodné redukující látky a vhodnou tlumivou přísadu. Balení obsahuje jednu nebo více tobolek.

## Obsah:

- *jod-131*: nejvýše 37 MBq v jedné tobolce; průměrná aktivita stanovená zkouškou na obsahovou stejnoměrnost je 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu;
- *jodid*: nejvýše 20 µg v jedné tobolce.

## VÝROBA

Jod-131 se získává ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Jodid ve formě nosiče se nepřidává.

## VLASTNOSTI

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131*. Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení*. Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozpadavost**. Obsah tobolek se zcela rozpustí do 15 min. Asi 20 ml roztoku *jodidu draselného R* (2,0 g/l) se zahřívá v malé kádince ve vodní lázni při 37 °C, přidá se zkoušená tobolka a míchá se magnetickým míchadlem při 20 ot/min.

**Obsahová stejnoměrnost**. Jednotlivě se stanoví aktivita nejméně deseti tobolek a vypočítá se průměrná aktivita jedné tobolky. Aktivita jednotlivých tobolek se neliší od

průměrné aktivity o více než 10 %, relativní směrodatná odchylka není větší než 3,5 %.

**Jodid**. Kapalinná chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok (a)*. Zkoušená tobolka se rozpustí v 10 ml *vody R* a zfiltruje se přes filtr (0,2 µm).

*Zkoušený roztok (b)*. Zkoušená tobolka se rozpustí ve *vodě R*. Zfiltruje se přes filtr (0,2 µm) a filtrát se zředí roztokem *hydroxidu sodného R* (2 g/l) na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor. Přidá se stejný objemový díl roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l), *hydrogenuhlíčan sodný R* (10 g/l) a promíchá se.

*Porovnávací roztok (a)*. 1 ml roztoku *jodidu draselného R* (26,2 mg/l) se zředí *vodou R* na 10 ml.

*Porovnávací roztok (b)*. 1 ml roztoku *jodičnanu draselného R* (24,5 mg/l) se zředí *vodou R* na 10 ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).

*Kontrolní roztok*. Připraví se roztok obsahující 2 mg/ml každé ze složek uvedených v označení na obalu, kromě jodidu.

*Kolona*:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);
- *teplota*: konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

*Mobilní fáze*. 5,85 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*, přidá se 0,65 ml *oktylaminu R* a pH se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml *acetonitrilu R* a promíchá se.

*Průtoková rychlost*. 1,5 ml/min.

*Detekce*. Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástrik*. 20 µl; zkoušený roztok (a), porovnávací roztoky (a) a (b) a kontrolní roztok.

*Doba záznamu*. 12 min.

*Relativní retence* vztahovaná k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan asi 0,2 až 0,3.

*Test způsobilosti*:

- na chromatogramu kontrolního roztoku nemá žádný z píků retenční čas shodný s retenčním časem píku jodidu;
- *rozišení*: nejméně 2 mezi pikem jodidu a pikem jodičnanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) získaném se spektrofotometrickým detektorem.

*Limit*, chromatogramy získané se spektrofotometrickým detektorem:

- *jodid*: nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (20 µg/tobolka).

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-131**. Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>131</sup>I]jodid**. Kapalinná chromatografie (2.2.29) způsobem uvedeným ve zkoušce Jodid s následujícími úpravami.

*Nástřik.* 20 µl; zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

*Limit,* hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku získaného s detektorem radioaktivity a určí se poloha píku jodidu porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a) za použití spektrofotometrického detektoru:  
– [<sup>131</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita balení kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede každá přidaná pomocná látka a počet tobolek v balení.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>131</sup>I]jodičnanový iont.

## NATRII IODIDI (<sup>131</sup>I) CAPSULAE AD USUM THERAPEUTICUM

6.0:2116

### Jodid-(<sup>131</sup>I) sodný tobolek pro terapeutické použití

#### DEFINICE

Jsou to tobolek, které obsahují jod-131 ve formě jodidu sodného v pevném základu. Obsahují thiosíran sodný nebo jiné vhodné redukující látky a vhodnou tlumivou přísadu.

#### Obsah:

- jod-131: 90 % až 110 % deklarované aktivity k datu a hodině uvedeným v označení na obalu;
- jodid: nejvýše 20 µg v jedné tobolce.

#### VÝROBA

Jod-131 se získává ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Jodid ve formě nosiče se nepřidává.

#### VLASTNOSTI

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozpadavost.** Obsah tobolek se zcela rozpustí do 15 min.

Asi 20 ml roztoku *jodidu draselného R* (2,0 g/l) se zahřívá v malé kádince ve vodní lázni při 37 °C, přidá se zkoušená tobolek a míchá se magnetickým míchadlem při 20 ot/min.

#### Jodid. Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok (a).* Zkoušená tobolek se rozpustí v 10 ml *vody R* a zfiltruje se přes filtr (0,2 µm).

*Zkoušený roztok (b).* Zkoušená tobolek se rozpustí ve *vodě R*. Zfiltruje se přes filtr (0,2 µm) a filtrát se zředí stejným objemem roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhličitan sodný R* (10 g/l). Je-li třeba, filtrát se zředí nejdříve roztokem *hydroxidu sodného R* (2 g/l) na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.

*Porovnávací roztok (a).* 1,0 ml roztoku *jodidu draselného R* (26,2 mg/l) se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 1 ml roztoku *jodičnanu draselného R* (24,5 mg/l) se zředí *vodou R* na 10 ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).

*Kontrolní roztok.* Připraví se roztok obsahující 2 mg/ml každé ze složek uvedených v označení na obalu, kromě jodidu.

#### Kolona:

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 µm);
- *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

Použije se kolona z nerezové oceli.

*Mobilní fáze.* 5,85 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*, přidá se 0,65 ml *oktylaminu R* a pH se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml *acetonitrilu R* a promíchá se.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 20 µl; zkoušený roztok (a), porovnávací roztoky (a) a (b) a kontrolní roztok.

*Doba záznamu.* 12 min.

*Relativní retence* vztažená k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan asi 0,2 až 0,3.

#### Test způsobilosti:

- na chromatogramu kontrolního roztoku nemá žádný z píků retenční čas shodný s retenčním časem píku jodidu;
- *rozlišení:* nejméně 2 mezi píkem jodidu a píkem jodičnanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) za použití spektrofotometrického detektoru.

*Limit,* hodnotí se chromatogramy získané spektrofotometrickým detektorem; určí se poloha píku jodidu porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a):

- *jodid:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (20 µg/tobolka).

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**[<sup>131</sup>I]jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem uvedeným ve zkoušce Jodid s následujícími úpravami.

*Nástřik.* 20 µl; zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

*Limit,* hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku (b) získaného s detektorem radioaktivity a určí se poloha píku jodidu porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a) za použití spektrofotometrického detektoru:

– [<sup>131</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita každé tobolky se změří kalibrovaným přístrojem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede každá přidaná pomocná látka.

**NEČISTOTY**

- A. [<sup>131</sup>I]jodičnanový iont,
- B. jod-130,
- C. jod-133,
- D. jod-135.

**NATRII IODIDI (<sup>131</sup>I) SOLUTIO****6.0:0281****Jodid-(<sup>131</sup>I) sodný roztok****DEFINICE**

Je to roztok obsahující jod-131 ve formě jodidu sodného a také thiosíran sodný nebo jinou vhodnou redukující látku. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu.

**Obsah:**

- *jod-131:* 90 % až 110 % deklarované aktivity k datu a hodině uvedeným v označení na obalu;
- *jodid:* nejvýše 20 µg v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

**VÝROBA**

Jod-131 je radioaktivní izotop jodu a může se získávat ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Nepřidává se jodid ve formě nosiče.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****A. Spektrometrie záření gama.**

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

**B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jodid (viz Zkoušky na čistotu).**

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU****Hodnota pH** (2.2.3). 7,0 až 10,0.

**Sterilita.** Je-li určen pro parenterální použití, vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok (a).* Zkoušený přípravek.

*Zkoušený roztok (b).* Zkoušený přípravek se zředí hydroxidem sodným 0,05 mol/l RS tak, aby aktivita byla asi 74 MBq/ml. Přidá se stejný objemový díl roztoku obsahujícího jodid draselný R (1 g/l), jodičnan draselný R (2 g/l) a hydrogenuhličitan sodný R (10 g/l) a promíchá se.

*Porovnávací roztok (a).* 1 ml roztoku jodidu draselného R (26,2 mg/l) se zředí vodou R na objem V, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (b).* 1 ml roztoku jodičnanu draselného R (24,5 mg/l) se zředí vodou R na objem V, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).

*Kontrolní roztok.* Připraví se roztok obsahující 2 mg/ml každé složky uvedené v označení na obalu, kromě jodidu.

**Kolona:**

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm);
- *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

Použije se kolona z nerezové oceli.

*Mobilní fáze.* 5,844 g chloridu sodného R se rozpustí v 1000 ml vody R, přidá se 650 µl oktylaminu R a pH se upraví kyselinou fosforečnou R na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml acetonitrilu R a promíchá se.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástřik.* 25 µl; zkoušený roztok (a), kontrolní roztok a porovnávací roztoky (a) a (b).

*Doba záznamu.* 12 min.

*Relativní retence* vztažená k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan asi 0,2 až 0,3.

**Test způsobilosti:**

- na chromatogramu kontrolního roztoku nemá žádný z píků retenční čas shodný s retenčním časem píku jodidu;
- *rozlišení:* nejméně 2 mezi píkem jodidu a píkem jodičnanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) získaném se spektrofotometrickým detektorem.

*Limit,* hodnotí se chromatogram získaný se spektrofotometrickým detektorem a určí se poloha píku jodidu porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (a):

– *jodid:* nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA****Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA****[<sup>131</sup>I]jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem uvedeným ve Zkoušce Jodid s následující úpravou.*Nástřik.* Zkoušený roztok (b).*Limit,* hodnotí se chromatogram získaný s detektorem radioaktivity:– [<sup>131</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení porovnáním s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změní kalibrovaným přístrojem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- jakákoliv přidaná pomocná látka;
- nejvyšší doporučená dávka v mililitrech;
- kde je to vhodné, že přípravek je vhodný pro výrobu parenterálních přípravků.

**NEČISTOTY**A. [<sup>131</sup>I]jodičnanový iont.**NATRII IODIDI (<sup>131</sup>I) SOLUTIO  
AD RADIOSIGNANDUM****6.0:2121****Jodid-(<sup>131</sup>I) sodný roztok ke značení  
radionuklidem****DEFINICE**

Je to silně zásaditý roztok obsahující jod-131 ve formě jodidu sodného. Neobsahuje redukující látku.

*Obsah.* 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.**VÝROBA**

Jod-131 se může získat ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Jodid ve formě nosiče se nepřidává.

**VLASTNOSTI***Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****A.** Spektrometrie záření gama.*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).**ZKOUŠKY NA ČISTOTU****Zásaditá reakce** (2.2.4). Přípravek je silně zásaditý.**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA****Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní množství jodu-130, jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA****[<sup>131</sup>I]jodid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí stejným objemem roztoku obsahujícího jodid draselný R (1 g/l), jodičnan draselný R (2 g/l) a hydrogenuhličitan sodný R (10 g/l) a promíchá se. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek nejdříve roztokem hydroxidu sodného R (2 g/l) na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor radioaktivity.*Porovnávací roztok (a).* 10 mg jodidu draselného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 10 ml.*Porovnávací roztok (b).* 20 mg jodičnanu draselného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 10 ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a porovnávacího roztoku (a).*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm);
- *teplota:* konstantní, v rozmezí 20 °C až 30 °C.

Použije se kolona z nerezové oceli.

*Mobilní fáze.* 5,85 g chloridu sodného R se rozpustí v 1000 ml vody R, přidá se 0,65 ml oktylaminu R a pH se upraví kyselinou fosforečnou zředěnou RS na hodnotu 7,0; přidá se 50 ml acetonitrilu R a promíchá se.*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity zapojené do série.*Nástřik.* 20 μl.*Doba záznamu.* 12 min.*Relativní retence* vztažená k jodidu (retenční čas asi 5 min). Jodičnan 0,2 až 0,3.*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

- *rozlišení:* nejméně 2 mezi píkem jodidu a píkem jodičnanu na chromatogramu zaznamenaného spektrofotometrickým detektorem.

*Limit,* chromatogram získaný s detektorem radioaktivity:– [<sup>131</sup>I]jodid: nejméně 95 % celkové aktivity.**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- způsob výroby jodu-131;
- jakákoliv přidaná pomocná látka;
- že přípravek není určen k přímému podání pacientovi.

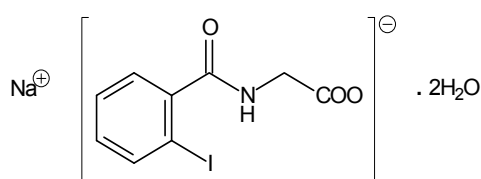
## NEČISTOTY

A. [<sup>131</sup>I]jodičnanový iont.

NATRII IODOHIPPURAS DIHYDRICUS  
AD RADIOPHARMACEUTICA

7.5:2352

Natrium-jodhippurát dihydrát pro  
radiofarmaceutické přípravky



$C_9H_7INNaO_3 \cdot 2H_2O$   $M_r$  363,08 CAS 5990-94-3  
 $M_r$  bezvodého 327,06

## DEFINICE

Je to dihydrát natrium-2-(2-jodbenzamido)acetátu.

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 % sloučeniny  $C_9H_7INNaO_3$ , počítáno na bezvodou látku.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

*Rozpustnost.* Dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

*Porovnání.* S natrium-jodhippurátem CRL.

**B.** Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (b) na sodík (2.3.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Příbuzné látky.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10 mg kyseliny 2-jodbenzoové R (nečistota A) se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* 10 mg kyseliny benzoové R se rozpustí v mobilní fázi, přidá se 1 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 100 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* organokřemičitý amorfni polymer okta-decylsilylovaný s vloženými polárními vazbami s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny octové RS, methanolu R a vody R (1 + 50 + 50).

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 230 nm.

*Nástřik.* 20 μl.

*Doba záznamu.* Sedminásobek retenčního času kyseliny 2-jodhippurové.

*Identifikace nečistot.* K identifikaci píku nečistoty A se použije chromatogram porovnávacího roztoku (b).

*Relativní retence* vztažená ke kyselině 2-jodhippurové (retenční čas asi 4,5 min). Kyselina benzoová asi 1,6; nečistota A asi 2,1.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (c):

– *rozlišení:* nejméně 5,0 mezi píkem kyseliny 2-jodhippurové a píkem kyseliny benzoové.

*Limity:*

– *nečistota A:* nejvýše pětinašobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %);

– *nespecifikované nečistoty:* pro každou nečistotu nejvýše plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,10 %);

– *celkový obsah nečistot:* nejvýše pětinašobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %);

– *limit zanedbatelnosti:* polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,05 %).

**Voda** (2.5.12). 8,0 % až 12,0%; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 2 m. j./mg, pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu k odstranění bakteriálních endotoxinů.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,250 g se rozpustí ve 20 ml kyseliny octové ledové R a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20).

1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 32,71 mg  $C_9H_7INNaO_3$ .

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

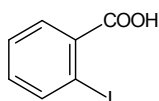
## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu je doporučeno provést provozní zkoušku před použitím látky ve výrobě radiofarmak. Tato zkouška zajistí, že látka poskytne při daných výrobních podmínkách radiofarmakum v požadovaném množství a odpovídající jakosti.

## NEČISTOTY

*Specifikované nečistoty:* A.





A. kyselina 2-jodbenzoová.

## NATRII IODOHIPPURATIS (<sup>123</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0564

Natrium-jodhippurát-(<sup>123</sup>I) injekční roztok

*Synonyma.* Natrii iodohippurati (<sup>123</sup>I) solutio iniectabilis,  
Jodhippuran-(<sup>123</sup>I) sodný injekční roztok

### DEFINICE

Je to sterilní roztok natrium-2-(2-[<sup>123</sup>I]jodbenzamido)-acetátu. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu a vhodnou protimikrobní látku, jako je benzylalkohol.

*Jod-123.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-123 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* 0,74 GBq až 10,0 GBq jodu-123 na gram natrium-2-jodhippurátu.

### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-123.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,159 MeV a je doprovázen rtg zářením o energii 0,027 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru skvrny kyseliny 2-jodhippurové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Radionuklidy jiné než jod-123.** Nejvýše 0,35 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

Stanoví se relativní obsah jodu-125, telluru-121 a jiných

přítomných radionuklidových nečistot. Pro jejich detekci se zkoušený roztok ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby aktivita jodu-123 klesla na úroveň umožňující stanovení radionuklidových nečistot. Zaznamená se spektrum záření gama a rtg záření přeměněných radionuklidů. Nejsou detekovány žádné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125.

### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kyselina 2-jodhippurová.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g jodidu draselného R se rozpustí v 10 ml vody R; připraví se směs objemových dílů tohoto roztoku a zkoušeného přípravku (1 + 10) a použije se do 10 min po smíchání. Je-li třeba, naředí se porovnávacím roztokem (nosičem) na objemovou aktivitu dostatečnou pro detekční metodu, např. 3,7 MBq/ml.

*Porovnávací roztok (nosič).* 40 mg kyseliny 2-jodhippurové R a 40 mg kyseliny 2-jodbenzoové R se rozpustí ve 4 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS, přidá se 10 mg jodidu draselného R a zředí se vodou R na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, kyseliny octové ledové R, butan-1-olu R a toluenu R (1 + 4 + 20 + 80).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm, asi 75 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* V ultrafialovém světle při 254 nm a se vhodným detektorem ke stanovení distribuce aktivity.

*Identifikace skvrn.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je skvrna odpovídající kyselině 2-jodhippurové a blíže k čelu mobilní fáze je skvrna odpovídající nečistotě D; nečistota C zůstává blízko startu.

### Limity:

– kyselina 2-jodhippurová: nejméně 96 % celkové aktivity jodu-123;

– nečistota C: nejvýše 2 % celkové aktivity jodu-123;

– nečistota D: nejvýše 2 % celkové aktivity jodu-123.

### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda přípravek je nebo není vhodný pro studie renálního průtoku plazmy.

### NEČISTOTY

A. jod-125,

B. tellur-121,

C. [<sup>123</sup>I]jodid,

D. kyselina 2-[<sup>123</sup>I]jodbenzoová.

**NATRII IODOHIPPURATIS (<sup>131</sup>I) SOLUTIO INIECTABILIS****7.0:0282****Natrium-jodhippurát-(<sup>131</sup>I) injekční roztok**

*Synonyma.* Natrii iodohippurati (<sup>131</sup>I) solutio iniectabilis, Jodhippuran-(<sup>131</sup>I) sodný injekční roztok

**DEFINICE**

Je to sterilní roztok natrium-2-(2-[<sup>131</sup>I]jodbenzamido)acetátu. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu a vhodnou protimikrobní látku, jako je benzylalkohol.

*Jod-131.* 90 % až 110 % deklarované aktivity jodu-131 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* 0,74 GBq až 7,4 GBq jodu-131 na gram natrium-2-jodhippurátu.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirá bezbarvá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření jodu-131.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****A. Spektrometrie záření gama.**

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama jodu-131 má energii 0,365 MeV.

**B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.**

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru skvrny kyseliny 2-jodhippurové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hodnota pH (2.2.3).** 6,0 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA**

**Jod-131.** Nejméně 99,9 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**Kyselina 2-[<sup>131</sup>I]jodhippurová.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g jodidu draselného R se rozpustí v 10 ml vody R; připraví se směs objemových dílů tohoto roztoku a zkoušeného přípravku (1 + 10) a použije se do 10 min po smíchání. Je-li třeba, naředí se porovnávacím roztokem (nosičem) na objemovou aktivitu dostatečnou pro detekční metodu, např. 3,7 MBq/ml.

*Porovnávací roztok (nosič).* 40 mg kyseliny 2-jodhippurové R a 40 mg kyseliny 2-jodbenzoové R se rozpustí ve 4 ml roztoku hydroxidu sodného R (4 g/l), přidá se 10 mg jodidu draselného R a zředí se vodou R na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, kyseliny octové ledové R, butan-1-olu R a toluenu R (1 + 4 + 20 + 80).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm, asi 75 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* V ultrafialovém světle při 254 nm a se vhodným detektorem ke stanovení distribuce aktivity.

*Identifikace skvrn.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je skvrna odpovídající kyselině 2-jodhippurové a blíže k čelu mobilní fáze je skvrna odpovídající nečistotě C; nečistota D zůstává blízko startu.

**Limity:**

- kyselina 2-[<sup>131</sup>I]jodhippurová: nejméně 96 % celkové aktivity jodu-131;
- nečistota C: nejvýše 2 % celkové aktivity jodu-131;
- nečistota D: nejvýše 2 % celkové aktivity jodu-131.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněn před světlem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede, že přípravek není vhodný pro studie renálního průtoku plazmy.

**NEČISTOTY**

- A. jod-133,
- B. jod-135,
- C. kyselina 2-[<sup>131</sup>I]jodbenzoová,
- D. [<sup>131</sup>I]jodid.

**NATRII MOLYBDATIS (<sup>99</sup>Mo) FISSIONE FORMATI SOLUTIO****6.0:1923****Molybdenan-(<sup>99</sup>Mo) sodný (štěpný produkt) roztok****DEFINICE**

Je to zásaditý roztok molybdenanu-[<sup>99</sup>Mo] sodného získaný extrakcí štěpných produktů uranu-235. Může obsahovat stabilizátory.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity molybden-99 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

**VÝROBA**

Molybden-99 se obvykle vyrábí štěpením uranu obohaceného uranem-235 vyvolaného absorpcí termálních neutronů, který poskytuje molybden-99 o vysoké hmotnostní aktivitě. Při štěpení uranu po zachytu neutronů vzniká více než dvě sta různých radionuklidů. Štěpný výtěžek molybden-99 je po přeměně řady krátkodobých mateřských radionuklidů asi 6 %. Po rozpuštění terče se molybden-99 oddělí od směsi radionuklidů a přečistí chromatografickým

postupem tak, aby se získal molybden-99 o vysokém stupni radionuklidové čistoty.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo téměř bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření molybden-99.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).*

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama molybden-99 má energii 0,740 MeV; je také viditelný pík technecia-99m o energii 0,141 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** Zkoušený přípravek se zředí roztokem *molybdenanu sodného R* (2,42 g/l) na objemovou aktivitu asi 370 MBq/ml.

**Zásaditě reagující látky.** Přípravek je zásaditý (2.2.4).

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

##### Jod-131, ruthenium-103 a tellur-132:

- *jod-131*: nejvýše  $5 \times 10^{-3}$  % celkové aktivity;
- *ruthenium-103*: nejvýše  $5 \times 10^{-3}$  % celkové aktivity;
- *tellur-132*: nejvýše  $5 \times 10^{-3}$  % celkové aktivity.

Následující metoda byla shledána vyhovující; mohou se použít jiné validované metody schválené oprávněnou autoritou.

Spektrometrie záření gama.

Kolona o vnitřním objemu asi 1,5 ml naplněná *anexem silně zásaditým R* se ustálí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R*. Průtoková rychlost všech elucí z kolony nepřevyšuje 1 ml/min.

*Zkoušený roztok.* Do zkumavky se za míchání postupně přidá 1 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (24,2 g/l), 0,5 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*, 2,5 ml *kyseliny octové ledové R*, 1,0 ml roztoku s *příměsí jodu-123 a ruthenia-106 R* a 1,0 ml roztoku S. Nechá se stát 30 min při teplotě místnosti.

*Porovnávací roztok.* Smíchá se 1,0 ml roztoku s *příměsí jodu-123 a ruthenia-106 R* a 4,0 ml *vody R*.

Zkoušený roztok se převede na kolonu a nechá se protékat kolonou. Těsně před poklesem kapaliny v horní části kolony se přidá 6 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a nechá se protékat kolonou.

5,0 ml spojených eluátů se převede do měřicí zkumavky.

Stanoví se aktivita jodu-123, jodu-131, ruthenia-103, ruthenia-106 a jodu-132 o energiích gama 0,159 MeV pro jod-123, 0,365 MeV pro jod-131, 0,497 MeV pro ruthenium-103, 0,512 MeV pro ruthenium-106 a 0,668 MeV pro jod-132. Stejným způsobem se stanoví aktivita jodu-123 a ruthenia-106 v porovnávacím roztoku a vypočítá se výtěžek jodu-123 a ruthenia-106 ve spojených eluátech.

Vypočítá se aktivita jodu-131, jodu-132 a ruthenia-103 ve spojených eluátech, bere se v úvahu výtěžnost, frakce použitých eluátů, vypočítaná účinnost a radioaktivní přeměna. Z aktivity jodu-132 (dceřiný radionuklid telluru-132) se vypočítá aktivita telluru-132, v úvahu se bere čas zkoušky a čas separace molybden-99.

**Celková aktivita stroncia-89 a stroncia-90.** Nejvýše  $6 \times 10^{-5}$  % celkové aktivity.

Následující metoda byla shledána vyhovující; mohou se použít jiné validované metody schválené oprávněnou autoritou.

Kapalinová scintilační spektrometrie.

Dvě kolony, každá o vnitřním objemu asi 1,5 ml, naplněné *anexem silně zásaditým R* a zapojené do série, se ustálí 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l). Průtoková rychlost všech elucí z kolon nepřevyšuje 1 ml/min.

*Zkoušený roztok.* Do zkumavky se za míchání postupně přidá 1,0 ml roztoku S, 50  $\mu$ l roztoku s *příměsí stroncia-85 R* a 0,05 ml *chlornanu sodného RS*. Nechá se stát 10 min při teplotě místnosti.

*Porovnávací roztok.* V lahvičce pro kapalinovou scintilaci se smíchá 50  $\mu$ l roztoku s *příměsí stroncia-85 R* s 5,0 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (9,5 g/l) a přidá se 10 ml směsi pro kapalinovou scintilaci R.

Zkoušený roztok se převede na horní z obou kolon a nechá se protékat. Těsně před poklesem kapaliny v horní části kolony se přidají 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a promývá se do vysušení kolon. Eluáty se spojí a přidají se 4 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (947 g/l) (eluát prostý molybdenem). Stanoví se aktivita molybden-99 za použití spektrometru záření gama. Je-li aktivita molybden-99 vyšší než  $6 \times 10^{-7}$  % aktivity molybden-99 v 1 ml roztoku S, opakuje se výše uvedený postup se dvěma novými kolonami.

Kolona o vnitřním objemu asi 2 ml naplněná *sorbentem k selektivní extrakci stroncia R* se ustálí 5 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (473 g/l) a kolona se vysuší. Průtoková rychlost všech elucí nepřevyšuje 1 ml/min. Na kolonu se převede eluát prostý molybdenem a nechá se protékat kolonou.

Těsně před poklesem kapaliny v horní části kolony se přidá 20 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (473 g/l) a nechá se protékat do vysušení kolony. Kolona se promyje 2 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (9,5 g/l), vysuší se a eluát se odstraní. Kolonou se nechá protékat 8,0 ml roztoku *kyseliny dusičné R* (9,5 g/l) do vysušení kolony. 5,0 ml eluátu se převede do lahvičky pro kapalinovou scintilaci a přidá se 10 ml směsi pro kapalinovou scintilaci R.

Stanoví se celková aktivita stroncia-89 a stroncia-90 v tomto roztoku kapalinovou scintilační spektrometrií a aktivita stroncia-85 spektrometrií záření gama. Aktivita stroncia-85 v porovnávacím roztoku se stanoví spektrometrií gama. Vypočítá se výtěžek stroncia-85 v eluátu. Vypočítá se změřená celková aktivita stroncia-89 a stroncia-90 v eluátu, vezme se v úvahu výtěžek stroncia a frakce použitého eluátu.

**Celková aktivita nečistot emitujících alfa částice.** Nejvýše  $1 \times 10^{-7}$  % celkové aktivity.

Následující metoda byla shledána vyhovující; mohou se použít jiné validované metody schválené oprávněnou autoritou.

Spektrometrie záření alfa.

*Zkoušený roztok.* K 0,2 ml zkoušeného přípravku se přidá 1,0 ml roztoku s příměsí plutonia-242 R, 1,0 ml roztoku s příměsí americia-243 R a 9,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (927 g/l). Vzorek se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (927 g/l). Znovu se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (10,3 g/l).

Zkoušený roztok se převede na kolonu obsahující 0,7 g anexu R1. Eluát se zachytí a kolona se promyje 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (10,3 g/l). Spojené eluáty se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí ve 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (10,3 g/l). Tento roztok se převede na druhou kolonu obsahující 0,7 g anexu R1. Eluát se zachytí a kolona se promyje 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (10,3 g/l). Spojené eluáty se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 1 ml kyseliny dusičné R. Odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí znovu v 1 ml kyseliny dusičné R.

Přidá se 1 ml roztoku síranu sodného bezvodého R (42,6 g/l) a odpaří do sucha. Přidají se 0,3 ml kyseliny sírové R. Zahřívá se do rozpuštění zbytku. Přidají se 4 ml vody destilované R a 0,01 ml modři thymolové RS. Po kapkách se přidává amoniak 26% R do změny červeného zbarvení na žluté.

Připraví se galvanizační pokovovací cela následujícím způsobem. Elektrolyticky vyleštěná nerezová ocelová destička se vloží do 20ml polyethylenové scintilační lahvičky opatřené zátkou. Dno lahvičky se odřízne a středem zátky se vyvrtá otvor pro elektrické připojení k destičkové katodě. Před použitím se destička o průměru 20 mm a tloušťce 0,5 mm omyje acetonem R a vodou R. Anoda, platinová spirála, se zavede dnem lahvičky a umístí se 5 mm od katody.

Roztok připravený výše popsaným způsobem se nalije do galvanizační pokovovací cely a nádoba se promyje celkem 5 ml roztoku kyseliny sírové R (10 g/l) (roztok je světle růžový). Upraví se pH amoniakem 26% R nebo roztokem kyseliny sírové R (200 g/l) na hodnotu 2,1 až 2,4. Elektrolyza probíhá při 1,2 A po dobu 75 min bez míchání.

Asi 1 min před vypnutím proudu se přidá 1 ml amoniaku 26% R. Destička se promyje roztokem amoniaku 17,5% RS (57 g/l). Destička se promyje acetonem R a případné zbytkové rozpouštědlo se odstraní z destičky savým papírem. Destička se zahřívá 10 min na horké plotně při 180 °C.

Stanoví se aktivita alfa emitujících částic spektrometrií záření alfa, vezme se v úvahu výtěžek radionuklidů emitujících částice alfa (měří se za použití roztoků s příměsí plutonia-242 a americia-243).

**Celkové záření gama emitované jinými radionuklidy než molybden-99, technecium-99m, jod-131, ruthenium-103 a tellur-132.** Nejvýše  $1 \times 10^{-2}$  % celkové aktivity.

Následující metoda byla shledána vyhovující; mohou se použít jiné validované metody schválené oprávněnou autoritou.

Spektrometrie záření gama.

Přípravek se nechá přeměňovat 4 až 6 týdnů. Hodnotí se spektrum záření gama na přítomnost jiných nečistot emitujících gama záření. Identifikuje a stanoví se obsah jiných nečistot emitujících gama záření. Přípravek se může uvolnit do použití před ukončením zkoušky.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

##### [ $^{99}\text{Mo}$ ]Molybdenan

Následující metoda byla shledána vyhovující; mohou se použít jiné validované metody schválené oprávněnou autoritou.

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí roztokem hydroxidu sodného R (4,0 g/l) na objemovou aktivitu vhodnou pro detektor.

*Porovnávací roztok.* Roztok molybdenanu sodného R (50 g/l) v roztoku hydroxidu sodného R (4,0 g/l).

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Roztok uhličitanu sodného bezvodého R (10,6 g/l).

*Nanášení.* 5  $\mu\text{l}$  zkoušeného roztoku a 2  $\mu\text{l}$  porovnávacího roztoku.

*Vývojení.* Po dráze odpovídající 2/3 desky.

*Sušení.* V proudu teplého vzduchu.

*Detekce.* Vhodným detektorem se stanoví distribuce aktivity a deska se postříká roztokem fenylylhydrazinu R (2 g/l) v kyselině octové ledové R; deska se zahřívá 5 min při 100 °C až 105 °C.

*Retardační faktor.* Molybdenan a technecistan asi 0,9.

*Limit:*

– součet [ $^{99}\text{Mo}$ ]molybdenanu a [ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanu: nejméně 95 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, že přípravek je vhodný pouze pro přípravu techneciových-99m generátorů.

#### NEČISTOTY

- A. jod-131,
- B. ruthenium-103,
- C. tellur-132,
- D. stroncium-89,
- E. stroncium-90.

## NATRII PERTECHNETATIS ( $^{99m}\text{Tc}$ ) FISSIONE FORMATI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0124

Technecistan-( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodný (štěpný produkt)  
injekční roztok

Článek se vztahuje na injekční roztok technecistanu-( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodného, který byl získán z molybden-99 extrahovaného ze

štěpných produktů uranu. Injekční roztok technecianu- $^{99m}\text{Tc}$  sodného, který byl získán z molybdenu-99 připraveného ozařováním molybdenu neutrony, je popsán v článku Natrii pertechnetatis ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sine fissioni formati solutio iniectabilis (0283).

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující technecium-99m ve formě technecianového iontu, izotonizovaný přísadkou chloridu sodného. Přípravek může být připraven ze sterilního přípravku molybdenu-99 za aseptických podmínek.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 8,0.

**Hliník.** Nejvýše 5  $\mu\text{g/ml}$ .

*Zkoušený roztok.* 1 ml zkoušeného přípravku se zředí vodou R na 2,5 ml a ve zkumavce o vnitřním průměru asi 12 mm se smíchají 2 ml tohoto roztoku s 1 ml *tlumivého roztoku acetátového o pH 4,6*. Přidá se 0,05 ml roztoku *chromazuroly S R* (10 g/l).

*Porovnávací roztok.* Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití 2 ml základního roztoku *hliníku* (2  $\mu\text{g Al/ml}$ ).

Po 3 min se zkoušený roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

*Předběžná zkouška.* Je určena k získání předběžného odhadu před použitím přípravku. Vezme se objemový díl odpovídající aktivitě 37 MBq a zaznamená se spektrum záření gama za použití NaI detektoru, stíněného olovem o tloušťce 6 mm, umístěným mezi vzorkem a detektorem. Odezva v oblasti odpovídající fotonu molybdenu-99 o energii 0,740 MeV nepřevyšuje odezvu získanou za použití referenčního roztoku molybdenu-99 o aktivitě 37 kBq měřeného za stejných podmínek. Všechna měření se vztahují k datu a hodině podání.

*Konečná zkouška.* Přípravek se nechá stát dostatečně dlouho, aby aktivita technecia-99m klesla na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Všechna měření aktivity se vztahují k datu a hodině podání.

– *Nečistota A.* Nejvýše  $5 \times 10^{-3}$  % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. *Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky.*

*Porovnání.* Vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku jodu-131.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,365 MeV; jod-131 má poločas přeměny 8,04 dnů.

– *Nečistota B.* Nejvýše 0,1 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. *Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky.*

*Porovnání.* Vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku molybdenu-99.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,181 MeV, 0,740 MeV a 0,778 MeV; molybden-99 má poločas přeměny 66,0 h.

– *Nečistota C.* Nejvýše  $5 \times 10^{-3}$  % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. *Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky.*

*Porovnání.* Vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku ruthenia-103.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,497 MeV; ruthenium-103 má poločas přeměny 39,3 dny.

– *Nečistota D.* Nejvýše  $6 \times 10^{-5}$  % celkové aktivity.

Přítomnost stroncia-89 v přeměněné látce se stanoví vhodným přístrojem pro detekci záření beta. Obvykle je nutné nejprve provést chemickou separaci stroncia tak, aby referenční roztok a vzorek byly ve stejné fyzikální a chemické formě.

*Porovnání.* S referenčním roztokem stroncia-89.

*Hodnocení.* Stroncium-89 s poločasem přeměny 50,5 dne emituje záření beta s maximální energií 1,492 MeV.

– *Nečistota E.* Nejvýše  $6 \times 10^{-6}$  % celkové aktivity.

Přítomnost stroncia-90 v přeměněné látce se stanoví vhodným přístrojem pro detekci záření beta. Proveďte se chemická separace yttria-90, které je dceřiným nuklidem stroncia-90, a použije se k rozlišení stroncia-90 od stroncia-89 porovnáním aktivity yttria-90 s referenčním přípravkem yttria-90. Je-li nutná předcházející chemická separace stroncia, musí být zajištěna podmínka radioaktivní rovnováhy. Referenční přípravek yttria-90 a vzorek se porovnávají ve stejné fyzikální a chemické formě.

*Hodnocení.* Stroncium-90 a yttrium-90 se přeměňují za emise záření beta s maximálními energiemi 0,546 MeV, respektive 2,284 MeV a mají poločasy přeměny 29,1 roku, respektive 64,0 h.

– *Ostatní nečistoty emitující záření gama.* Nejvýše 0,01 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama.

*Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot.*

– *Nečistoty emitující záření alfa.* Nejvýše  $1 \times 10^{-7}$  % celkové aktivity.

Změří se aktivita alfa přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot emitujících záření alfa.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA**

**[ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanový iont.** Sestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí vodou R na vhodnou objemovou aktivitu.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

*Nanášení.* 5  $\mu\text{l}$ .

*Vývíjení.* Po dobu 2 h.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* [ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanový iont asi 0,6.

*Limit:*

– [ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanový iont: nejméně 95 % celkové aktivity technecia-99m.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

**NEČISTOTY**

- A. jod-131,
- B. molybden-99,
- C. ruthenium-103,
- D. stroncium-89,
- E. stroncium-90.

## NATRII PERTECHNETATIS ( $^{99m}\text{Tc}$ ) SINE FISSIONE FORMATI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0283

Technecistan-( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodný (neštěpný produkt)  
injekční roztok

*Článek se vztahuje na injekční roztok technecianu-( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodného, který byl získán z molybden-99 připraveného ozařováním molybdenu neutrony. Injekční roztok technecianu-( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodného, který byl získán z molybden-99 extrahovaného ze štěpných produktů uranu, je popsán v článku Natrii pertechnetatis ( $^{99m}\text{Tc}$ ) fissionis formati solutio iniectabilis (0124).*

**DEFINICE**

Je to sterilní roztok obsahující technecium-99m ve formě technecianového iontu, izotonizovaný chloridem sodným.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Hodnota retardačního faktoru hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je asi 0,6.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 8,0.

**Hliník.** Nejvýše 5  $\mu\text{g/ml}$ .

*Zkoušený roztok.* 1 ml zkoušeného přípravku se zředí vodou R na 2,5 ml a ve zkumavce o vnitřním průměru asi 12 mm se smíchají 2 ml tohoto roztoku s 1 ml tlumivého roztoku acetátového o pH 4,6. Přidá se 0,05 ml roztoku chromazurolu S R (10 g/l).

*Porovnávací roztok.* Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití 2 ml základního roztoku hliníku (2  $\mu\text{g Al/ml}$ ).

Po 3 min se zkoušený roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA**

*Předběžná zkouška.* Slouží k získání předběžného odhadu před použitím přípravku. Vezme se objemový díl odpovídající aktivitě 37 MBq a zaznamená se spektrum záření gama za použití NaI detektoru, stíněného olovem o tloušťce 6 mm, umístěným mezi vzorkem a detektorem. Odezva v oblasti odpovídající fotonům molybden-99 o energii 0,740 MeV nepřevyšuje odezvu k referenčnímu roztoku molybden-99 o aktivitě 37 kBq, měřeného za stejných podmínek. Všechna měření se vztahují k datu a hodině podání.

*Konečná zkouška.* Přípravek se nechá stát dostatečně dlouho, aby se radioaktivita technecia-99m snížila na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Všechna měření aktivity se vztahují k datu a hodině podání.

– *Nečistota A.* Nejvýše 0,1 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky.

*Porovnání.* Referenční roztok molybden-99.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,181 MeV, 0,740 MeV a 0,778 MeV; molybden-99 má poločas přeměny 66,0 h.

– *Ostatní nečistoty emitující záření gama.* Nejvýše 0,01 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA T**

**[ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanový iont.** Sestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí vodou R na vhodnou objemovou aktivitu.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

*Nanášení.* 5 µl.

*Vyvíjení.* Po dobu 2 h.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení rozdělení aktivity.

*Retardační faktor.* [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont asi 0,6.

*Limit:*

– [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont: nejméně 95 % celkové aktivity technecia-99m.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. molybden-99.

## NATRII PHOSPHATIS (<sup>32</sup>P) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:0284

### Fosforečnan-(<sup>32</sup>P) sodný injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok hydrogen(<sup>32</sup>P)fosforečnanu sodného a dihydrogen(<sup>32</sup>P)fosforečnanu sodného, izotonizovaný chloridem sodným.

*Fosfor-32.* 90 % až 110 % deklarované aktivity fosforu-32 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 11,1 MBq fosforu-32 na miligram fosforečnanového iontu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření fosforu-32.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření beta.

*Hodnocení.* Nejvyšší energie záření beta je 1,71 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,0 až 8,0.

**Fosforečnany.** Nejvýše 0,89 µg/MBq.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí vodou R na objemovou aktivitu 370 kBq fosforu-32 v mililitru. 1,0 ml tohoto roztoku se v odměrné baňce protřepe se směsí obsahující 0,5 ml molybdenanu amonného RS, 0,5 ml roztoku vanadičnanu amonného R (2,5 g/l), 1 ml kyseliny chloristé R a zředí se vodou R na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití 1,0 ml roztoku obsahujícího 33 mg fosforečnanových iontů v litru.

Po 30 min se zkoušený roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Spektrometrie záření beta.

*Hodnocení.* Spektrum získané se zkoušeným přípravkem se významně neliší od spektra získaného za stejných podmínek s referenčním roztokem fosforu-32.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>32</sup>P]fosfát.** Vzestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí vodou R tak, aby aktivita odpovídala asi 10 000 až 20 000 impulzů za minutu na 10 µl.

*Porovnávací roztok.* Připraví se roztok kyseliny fosforečné R obsahující 2 mg fosforu v 1 ml.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii R; použije se pruh papíru 25 mm široký a asi 300 mm dlouhý.

*Mobilní fáze.* Směs obsahující 0,3 ml amoniaku 17,5% RS, 5 g kyseliny trichloroctové R, 25 ml vody R a 75 ml propan-2-olu R.

*Nanášení.* 10 µl porovnávacího roztoku, pak se na stejné místo nanese 10 µl zkoušeného roztoku.

*Vyvíjení.* Po dobu 16 h.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Stanoví se poloha neaktivní kyseliny fosforečné postříkáním roztokem kyseliny chloristé R (50 g/l), pak roztokem molybdenanu amonného R (10 g/l) a potom se papír vystaví působení sirovodíku R; vzniká modré zbarvení. Rozdělení aktivity se stanoví vhodným detektorem.

*Limit:*

– [<sup>32</sup>P]fosfát: nejméně 95 % celkové aktivity fosforu-32.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita kalibrovaným přístrojem.

## OXYGENIUM (<sup>15</sup>O)

6.0:1620

### Kyslík-(<sup>15</sup>O)

#### DEFINICE

Je to směs [<sup>15</sup>O]kyslíku v plynné fázi a vhodného vehikula, jako je *Aer medicinalis* (I238), pro diagnostické použití.

*Čistota:*

– nejméně 99 % celkové aktivity připadá na kyslík-15;

– nejméně 97 % celkové aktivity připadá na kyslík-15 ve formě kyslíku (O<sub>2</sub>).

## VÝROBA

## VÝROBA RADIONUKLIDU

Kyslík-15 je radioaktivní izotop kyslíku, který může být vyroben různými jadernými reakcemi, jako je ozařování dusíku-15 protony nebo ozařování dusíku-14 deuterony.

## RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

Aby se získal z plynného dusíku v terči molekulární kyslík-15, přidá se kyslík ve formě nosiče v koncentraci obvykle 0,2 % (V/V) až 1,0 % (V/V). Po ozáření se terčový plyn před smícháním s vehikulem obvykle čistí přechodem přes aktivní uhlí a přes natronové vápno, přičemž se odstraní oxid uhličitý.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvý plyn.

*Poločas přeměny a druh záření kyslíku-15.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pozorují se pouze fotony gama mající energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pík 1,022 MeV.

## B. Zkouška Radionuklidová čistota (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

## C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních piků na chromatogramu zkoušeného plynu získané za použití detektoru radioaktivity odpovídají retenčním časům hlavních piků kyslíku na chromatogramu porovnávacího plynu získaného za použití tepelně vodivostního detektoru.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Následující zkoušky se vztahují na kyslík-15 před smícháním s vehikulem, jak je uvedeno v odstavci Radiochemická syntéza.*

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

## Kyslík-15. Nejméně 99 % celkové aktivity.

## A. Spektrometrie záření gama.

*Porovnání.* S referenčním roztokem fluoru-18, nebo se změří na přístroji kalibrovaném tímto roztokem. Referenční roztoky fluoru-18 a/nebo kalibrace přístroje se získají od laboratorů pověřených oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

## B. Poločas přeměny. 1,9 min až 2,2 min.

Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Kyslík-15 ve formě O<sub>2</sub>.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený vzorek.* [<sup>15</sup>O]kyslík, jak je popsáno v odstavci Radiochemická syntéza.

*Porovnávací plyn.* Směs plynů v dusíku R.

## Kolona:

– *rozměry:* délka 1,8 m, 1. vnitřní průměr 6,3 mm, 2. vnitřní průměr 3,2 mm;

– *stacionární fáze:* koncentrická kolona pro plynovou chromatografii R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 65 ml/min.

## Teplota:

– *kolona:* 40 °C;

– *nástrikový prostor:* 40 °C;

– *tepelně vodivostní detektor:* 70 °C.

*Detekce.* Tepelně vodivostní detektor a detektor radioaktivity zapojené do série.

*Nástrik.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 10 min.

*Retenční časy.* Kyslík, dusík a oxid uhelnatý eluující se z vnitřní kolony asi 0,4; oxid uhličitý eluující se z vnitřní kolony asi 0,8; kyslík eluující se z vnější kolony asi 2,1; dusík eluující se z vnější kolony asi 3,1; oxid uhelnatý eluující se z vnější kolony asi 6,2.

*Test způsobilosti,* porovnávací plyn:

– pět zřetelně oddělených hlavních piků na chromatogramu získaném za použití tepelně vodivostního detektoru;

– *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem oxidu uhličitého eluujícího se z vnitřní kolony a píkem kyslíku eluujícího se z vnější kolony na chromatogramu získaném za použití tepelně vodivostního detektoru.

*Limity,* hodnotí se chromatogram získaný detektorem radioaktivity a z ploch piků se vypočítá obsah kyslíku-15 v procentech:

– *kyslík-15 plyn ve formě O<sub>2</sub>:* nejméně 97 % celkové aktivity;

– nepřehlíží se k prvnímu píku, který se eluuje společně se složkami z vnitřní kolony.

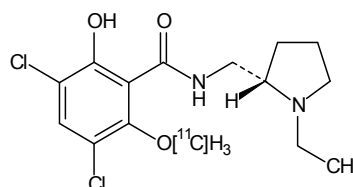
## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Objemová aktivita se stanoví před podáním.

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří na přístroji kalibrovaném tímto roztokem.

RACLOPRIDI ([<sup>11</sup>C]METHOXY) SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1924

Rakloprid-(<sup>11</sup>C)methoxy) injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok 3,5-dichlor-N-{{(2S)-1-ethylpyrrolidin-2-yl}methyl}-2-hydroxy-6-(<sup>11</sup>C)methoxy)benzamidu.



*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity uhlíku-11 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Čistota:*

- nejméně 99 % celkové aktivity uhlíku-11;
- nejméně 95 % celkové aktivity uhlíku-11 ve formě ( $^{11}\text{C}$ methoxy)raklopridu.

*Obsah raklopridu.* Nejvýše 10  $\mu\text{g}$  v nejvyšší doporučené dávce v mililitrech.

## VÝROBA

### VÝROBA RADIONUKLIDU

Uhlík-11 je radioaktivní izotop uhlíku, který se nejčastěji vyrábí ozařováním dusíku protony. Podle toho, zda se přidá buď stopové množství kyslíku, nebo malé množství vodíku, je získána aktivita ve formě oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého nebo [ $^{11}\text{C}$ ]methanu.

### RADIOCHEMICKÁ SYNTÉZA

( $^{11}\text{C}$ methoxy)rakloprid se může vyrábět *O*-alkylací odpovídajícího fenolátového aniontu (*S*)-3,5-dichlor-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2,6-dihydroxybenzamidu [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidem nebo [ $^{11}\text{C}$ ]methyl-triflátem ([ $^{11}\text{C}$ ]methyl-trifluormethansulfonátem).

### Syntéza [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidu

[ $^{11}\text{C}$ ]Methyljodid se může získat buď z oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého, nebo z [ $^{11}\text{C}$ ]methanu. Nejčastěji používanou metodou je redukce oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého tetrahydridohlitanem lithným. Vzniklý aluminium-lithium-[ $^{11}\text{C}$ ]methanolát reaguje s kyselinou jodovodíkovou na [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodid přes [ $^{11}\text{C}$ ]methanol. Alternativně se [ $^{11}\text{C}$ ]methan, získaný buď přímo v terči, nebo přímým postupem z oxidu [ $^{11}\text{C}$ ]uhlíčitého, nechá reagovat s jodem.

### Syntéza [ $^{11}\text{C}$ ]methyl-triflátu

[ $^{11}\text{C}$ ]Methyl-triflát se může vyrobit z [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidu při použití pevného nosiče, jako je grafitizovaný uhlík impregnovaný stříbrnou solí kyseliny trifluormethansulfonové.

### Syntéza ( $^{11}\text{C}$ methoxy)raklopridu

Provede se methylace [ $^{11}\text{C}$ ]methyljodidem v zásaditém prostředí v rozpouštědle, jako je dimethylsulfoxid. Methylace [ $^{11}\text{C}$ ]methyltriflátem se provede v rozpouštědle, jako je dimethylformamid nebo aceton. Získaný ( $^{11}\text{C}$ methoxy)-rakloprid se může čistit semipreparativní kapalinovou chromatografií, např. kolonou naplněnou silikagelem pro chromatografií oktadecylsilylovaným eluovanou směsí objemových dílů acetonitrilu a kyseliny fosforečné (0,01 mol/l) (25 +75).

### PREKURZOR PRO SYNTÉZU

#### (*S*)-3,5-Dichlor-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2,6-dihydroxybenzamid-hydrobromid

Teplota tání (2.2.14). 211 °C až 213 °C.

Specifická optická otáčivost (2.2.7). +11,3 až +11,5; měří se roztok (15,0 g/l) v *ethanolu bezvodém R* při teplotě 22 °C.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření uhlíku-11.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Pouze fotony gama mají energii 0,511 MeV a v závislosti na geometrii měření se může pozorovat sumační pik 1,022 MeV.

### B. Radionuklidová čistota, zkouška B (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

### C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota.

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,5 až 8,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## CHEMICKÁ ČISTOTA

### Rakloprid a nečistota A.

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* 7,2 mg rakloprid-tartarátu *R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 1,2 mg (*S*)-3,5-dichlor-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2,6-dihydroxybenzamid-hydrobromidu *R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

*Porovnávací roztok (c).* K 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 0,1 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se *vodou R* na objem *V*, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

*Porovnávací roztok (d).* 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,05 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* sférický silikagel pro chromatografií oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami *R* (3,5  $\mu\text{m}$ ) se specifickým povrchem 175  $\text{m}^2/\text{g}$ , velikostí pórů 12,5 nm, objemem pórů 0,7  $\text{cm}^3/\text{g}$  a obsahem vázaného uhlíku 15 %;
- *teplota:* 30 °C.

*Mobilní fáze.* 2 g natrium-heptansulfonátu *R* se rozpustí v 700 ml *vody R*, pH se upraví kyselinou fosforečnou *R* na hodnotu 3,9 a zředí se acetonitrem *R* na 1000 ml.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm a detektor radioaktivity spojené do série.

*Nástřík.* Injektorová smyčka; nástříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztoky (b) a (c).

*Doba záznamu.* 10 min.

Relativní retence vztažená k raklopridu. Nečistota A asi 0,46.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (c):

– rozlišení: nejméně 5 mezi píkem raklopridu a píkem nečistoty A.

Limity, hodnotí se chromatogramy získané se spektrofotometrickým detektorem:

– *raklopid*: nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (10 µg/V);  
– *nečistota A*: nejvýše plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1 µg/V).

**Zbytková rozpouštědla** jsou limitována podle zásad uvedených v obecné stati 5.4, použije se obecná metoda 2.4.24. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Uhlík-11.** Nejméně 99 % celkové aktivity. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### A. Spektrometrie záření gama.

*Porovnání.* S referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku. Referenční roztoky fluoru-18 a/nebo kalibrace přístrojů se získají od laboratorů uznaných oprávněnou autoritou.

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku fluoru-18.

#### B. Poločas přeměny. 19,9 min až 20,9 min.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Kapalinová chromatografie (2.2.29) způsobem popsáným ve zkoušce *Raklopid* a nečistota A s těmito úpravami.

*Nástřik.* Zkoušený roztok a porovnávací roztok (d).

Limity, hodnotí se chromatogram získaný detektorem radioaktivity:

– ([11C]*methoxy*)*raklopid*: nejméně 95 % celkové aktivity.

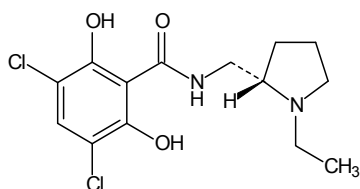
#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení porovnáním s referenčním roztokem fluoru-18 nebo se změří přístrojem kalibrovaným pomocí tohoto roztoku.

#### OZNAČOVÁNÍ

V příbalové informaci se uvede nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### NEČISTOTY



#### A. 3,5-dichlor-N-[[2,5-(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2,6-dihydroxybenzamid.

## RHENII SULFIDI COLLOIDALIS ET TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0126

Sulfid rhenistý koloidní značený  
techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní koloidní disperze sulfidu rhenistého, jehož micely jsou značené techneciem-99m.

Připravuje se z injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis* (0283)]. Přípravek je stabilizovaný želatinou, pH přípravku se může upravit přidáním vhodného tlumivého roztoku, jako je tlumivý roztok citrátový.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Rhenium.* Nejvýše 0,22 mg/ml.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Světle hnědá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je 0,0 až 0,1.

##### C. K 1 ml se přidá 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R*, 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 5 ml roztoku *thiomočoviny R* (50 g/l); vzniká žluté zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 7,0.

**Rhenium.** Nejvýše 0,22 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztoky.* Zředěním roztoku obsahujícího 100 µg *rhenistanu draselného R* (odpovídá 60 µg Re/ml) a 240 µg *thiosíranu sodného R* na mililitr *vodou R* na stejný konečný objem se připraví řada roztoků.

K 1 ml zkoušeného roztoku a k 1 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R*, 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 5 ml roztoku *thiomočoviny R* (50 g/l) a zředí se *vodou R* na 25,0 ml. Nechá se 40 min stát a změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 400 nm proti kontrolnímu roztoku získanému slepou zkouškou. Za použití

absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah rhenia ve zkoušeném přípravku.

**Fyziologická distribuce.** Každé ze tří myši vážících 20 g až 25 g se do vena caudalis podá nejvýše 0,2 ml. Po 20 min se myši šetrně usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří aktivita orgánů. Po odstranění ocasu se změří aktivita zbytku těla. Procento radioaktivity každého vyjmutého orgánu se stanoví podle vzorce:

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – celkovou aktivitu všech vyjmutých orgánů a zbytku těla bez ocasu.

U každé ze tří myši se nachází nejméně 80 % aktivity v játrech a slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud distribuce aktivity u jedné ze tří myši neodpovídá výše uvedenému požadavku, zkouška se zopakuje na dalších třech myších. Přípravek vyhovuje zkoušce, pokud je předepsaná distribuce aktivity nalezena u pěti ze šesti použitých myši. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml; kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě.** Vzestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii *R*.

*Mobilní fáze.* Roztok chloridu sodného *R* (9 g/l).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě 0,0 až 0,1; nečistota *A* asi 0,6; jiné nečistoty 0,8 až 0,9.

*Limit:*

– [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě: nejméně 92 % celkové aktivity technecia-99m.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede koncentrace rhenia vyjádřená v miligramech na mililitr.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>99m</sup>Tc]technecianový iont.

## STANNI COLLOIDALIS ET TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0689

### Cín koloidní značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní koloidní disperze cínu značená techneciem-99m. Přípravuje se z injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectionabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissioni formati solutio iniectionabilis* (0283)]. Přípravek obsahuje proměnlivé množství cínu nepřevyšující 1 mg Sn v mililitru a fluoridové ionty. Může se stabilizovat vhodnou přísadou prostou pyrogenních látek chránící koloid a může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Cín.* Nejvýše 1 mg/ml.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá nebo opalizující bezbarvá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B.** Smíchá se 0,05 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS* s 0,05 ml *alizarinu S RS* a přidá se 0,05 ml zkoušeného přípravku; vznikne žluté zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 7,0.

*Cín.* Nejvýše 1 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* 3,0 ml se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l) a 3,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) a promíchá se. Změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) jako kontrolního roztoku. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce.** Každé ze tří myši vážících 20 g až 25 g se podá do vena caudalis nejvýše 0,2 ml. Po 20 min se myši šetrně usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří aktivita orgánů. Po odstranění ocasu se změří aktivita zbytku těla. Stanoví se procenta aktivity v játrech, ve slezině a v plicích vzhledem k celkové aktivitě všech orgánů a zbytku těla kromě ocasu.

U každé ze tří myší se nachází nejméně 80 % aktivity v játrech a ve slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud rozdělení aktivity u jedné ze tří myší neodpovídá výše uvedenému požadavku, zkouška se zopakuje na dalších třech myších. Přípravek vyhovuje zkoušce, pokud je předepsané rozdělení aktivity nalezeno u pěti ze šesti použitých myší.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok *chloridu sodného R* (9 g/l) čištěného dusíkem R.

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě 0,0 až 0,1; nečistota A 0,9 až 1,0.

*Limit:*

– [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě: nejméně 95 % celkové aktivity technecia-99m.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

## STANNI PYROPHOSPHATIS ET TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0129

Difosforečnan cínatý značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok, který se může připravit smícháním roztoků difosforečnanu sodného a chloridu cínatého s injekčním roztokem technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis (0124)* nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis (0283)*].

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Difosforečnan sodný* (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O). 1 mg/ml až 50 mg/ml.

*Cín.* Nejvýše 3,0 mg/ml.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkouškách A a B, Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení:*

- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku ve zkoušce A je 0,9 až 1,0;
- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku ve zkoušce B je 0,0 až 0,1.

**C.** K 1 ml se přidá 1 ml *kyseliny octové RS* a zahřívá se 1 h na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 10 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného s kyselinou dusičnou R* a nechá se 30 min stát; vzniká žluté zbarvení.

**D.** K 1 ml se přidá 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 2 ml roztoku *kyseliny sírové R 30 % (V/V)* a nechá se 30 min stát; vzniká růžové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,0 až 7,0.

**Difosforečnan sodný.** 1 mg/ml až 50 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* 1 ml zkoušeného přípravku nebo jeho vhodné zředění.

*Porovnávací roztoky.* Zředěním roztoku obsahujícího *difosforečnan sodný R* a *chlorid cínatý R* ve stejném poměru jako ve zkoušeném přípravku *vodou R* na konečný objem se připraví řada roztoků.

Ke zkoušenému roztoku a k 1 ml každého porovnávacího roztoku se postupně přidá 10 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (1 g/l), 10 ml základního roztoku *železa* (8 µg Fe/ml), 5 ml *kyseliny octové ledové R* a 5 ml roztoku *hydroxylaminhydrochloridu R* (1 g/l).

Všechny roztoky se zředí *vodou R* na 40 ml a zahřívají se 1 h ve vodní lázni při 40 °C. Ke každému roztoku se přidají 4 ml roztoku *fenanthrolin-hydrochloridu R* (1 g/l) a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 515 nm proti kontrolnímu roztoku, získanému při slepé zkoušce, obsahujícímu kyselinu chlorovodíkovou (1,1 g/l HCl) místo základního roztoku *železa* (8 µg Fe/ml). Ze získaných absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah difosforečnanu sodného ve zkoušeném přípravku.

**Cín.** Nejvýše 3,0 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* 1 ml zkoušeného přípravku nebo jeho vhodné zředění.

*Porovnávací roztoky.* Zředěním roztoku obsahujícího *difosforečnan sodný R* a *chlorid cínatý R* v *kyselině chlorovodíkové R* (6,2 g/l HCl) ve stejném poměru jako ve zkou-

šeném přípravku *kyselinou chlorovodíkovou R* (6,2 g/l HCl) na stejný objem se připraví řada roztoků.

Ke zkoušenému roztoku a k 1 ml každého porovnávacího roztoku se přidají 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (300 g/l) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou R* (6,2 g/l HCl) na 15 ml. Roztoky se nechají 30 min stát a změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 530 nm proti kontrolnímu roztoku, získanému při slepé zkoušce, obsahujícímu stejné množství *difosforečnanu sodného R* jako zkoušený přípravek. Ze získaných absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah cínu ve zkoušeném přípravku.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/V m. j./ml; kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**A. Nečistota A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok *octanu sodného R* (136 g/l).

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm po dobu asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Nečistota A 0,0 až 0,1; difosforečnan cínatý značený techneciem-99 a nečistota B 0,9 až 1,0.

**B. Nečistota B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* *Butan-2-on R*, který byl těsně před použitím v chromatografické komoře 10 min probubláván dusíkem.

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl a usuší se v proudu dusíku.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Difosforečnan cínatý značený techneciem-99 0,0 až 0,1; nečistota B 0,95 až 1,0.

*Limit:*

– součet nečistot A a B: nejvýše 10 % celkové aktivity technecia-99m na chromatogramech získaných ve zkouškách A a B.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- koncentrace difosforečnanu sodného vyjádřená v miligramech na mililitr;
- koncentrace cínu vyjádřená v miligramech na mililitr.

#### NEČISTOTY

- A. [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě,
- B. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

## STRONTIÍ (<sup>89</sup>Sr) CHLORIDI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1475

Chlorid strontnatý-(<sup>89</sup>Sr) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok obsahující chlorid [<sup>89</sup>Sr]strontnatý.

*Stroncium-89.* 90 % až 110 % deklarované aktivity stroncia-89 k datu uvedenému v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 1,8 MBq stroncia-89 v miligramu stroncia.

*Stroncium.* 6,0 mg/ml až 12,5 mg/ml.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření stroncia-89.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Hodnocení.* Detekovaný foton gama má energii 0,909 MeV a vzniká z krátkodobého dceřiného produktu stroncia-89, tj. z yttria-89m (0,01 % přeměn), které je v rovnováze se stronciem-89.

**B.** K 0,1 ml se přidá 1 ml čerstvě připraveného roztoku *natrium-rhodisonátu R* (1 g/l), promíchá se a nechá se stát 1 min; vznikne červenohnědá sraženina.

**C.** K 0,1 ml *dusičnanu stříbrného RS2* se přidá 50 µl zkoušeného přípravku; vznikne bílá sraženina.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH (2.2.3).** 4,0 až 7,5.

*Poznámka.* Následující zkoušky *Hliník, Železo a Olovo* se mohou provést současně se zkouškou *Stroncium*. Pokud ne, porovnávací roztok se připraví tak, aby obsahoval přibližně stejnou koncentraci stroncia jako zkoušený roztok.

**Hliník.** Nejvýše 2 µg/ml.

Atomová emisní spektrometrie (metoda plazmatu nebo oblouku) (2.2.22, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se zředí na vhodný objem *kyselinou dusičnou zředěnou RS*.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se za použití základního roztoku hliníku (10 µg Al/ml) zředěním podle potřeby kyselinou dusičnou zředěnou RS.

**Železo.** Nejvýše 5 µg/ml.

Atomová emisní spektrometrie (metoda plazmatu nebo oblouku) (2.2.22, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se zředí na vhodný objem kyselinou dusičnou zředěnou RS.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se za použití základního roztoku železa (20 µg Fe/ml) zředěním podle potřeby kyselinou dusičnou zředěnou RS.

**Olovo.** Nejvýše 5 µg/ml.

Atomová emisní spektrometrie (metoda plazmatu nebo oblouku) (2.2.22, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se zředí na vhodný objem kyselinou dusičnou zředěnou RS.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se za použití základního roztoku olova (10 µg Pb/ml) zředěním podle potřeby kyselinou dusičnou zředěnou RS.

**Stroncium.** 6,0 mg/ml až 12,5 mg/ml.

Atomová emisní spektrometrie (2.2.22, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se zředí na vhodný objem kyselinou dusičnou zředěnou RS.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se za použití základního roztoku stroncia (10 mg Sr/ml) zředěním podle potřeby kyselinou dusičnou zředěnou RS.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

Celková aktivita připadající na jiné radionuklidy než stroncium-89 je nejvýše 0,6 %.

**Gama zářiče jiné než yttrium-89m.** Nejvýše 0,4 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

**Beta zářiče.** 100 µl se odpaří do sucha pod zdrojem sálavého tepla. Zbytek se rozpustí ve 2 ml kyseliny bromovodíkové 47% R, odpaří se pod zdrojem sálavého tepla do sucha a zbytek se rozpustí ve 2 ml kyseliny bromovodíkové zředěné RS1. Roztok se nanese na kolonu o průměru 5 mm až 6 mm naplněnou asi 2 ml *katexu R1* (100 µm až 250 µm) předem promytého kyselinou bromovodíkovou zředěnou RS1. Kolona se promývá stejným rozpouštědlem do nádoby obsahující 50 µl roztoku síranu sodného bezvodého R (15 g/l) v kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS do získání 10 ml eluátu.

Ke vhodnému objemu směsi pro kapalinovou scintilaci R v měřicí lahvičce se přidá 1 ml vody R, 0,1 ml roztoku síranu sodného bezvodého R (15 g/l) v kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS a 100 µl eluátu. Třepe se do vzniku čirého roztoku. Vhodným detekčním zařízením se určí aktivita nečistot A a B ve vzorku.

S ohledem na účinnost separace, účinnost měření a radioaktivní přeměnu se stanoví radioaktivní koncentrace nečistot A a B ve vzorku jako procento celkových nečistot beta zářičů ve zkoušeném přípravku.

*Limit.*

– nečistoty A a B: nejvýše 0,2 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. síra-35,

B. fosfor-32.

## SULFURIS COLLOIDALIS ET TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0131

Síra koloidní značená techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní koloidní disperze síry prostá pyrogenních látek, jejíž micely jsou značené techneciem-99m. Připravuje se z injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis (0124)* nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis (0283)*]. Může se stabilizovat složkou na bázi želatiny, která chrání koloid. Hodnota pH přípravku se může upravit přidáním vhodného tlumivého roztoku, jako je tlumivý roztok acetátový, citrátový nebo fosforečnanový. Přípravek obsahuje proměnlivé množství koloidní síry v závislosti na způsobu přípravy.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá nebo opalizující, bezbarvá nebo nažloutlá kapalina.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz *Zkoušky na čistotu*.

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je 0,0 až 0,1.

**C.** 0,2 ml zkoušeného přípravku se odpaří do sucha ve zkumavce o délce 100 mm a vnitřním průměru 16 mm. Síra se rozpustí třepáním zbytku s 0,2 ml *pyridinu R* a přidá se asi 20 mg *benzoinu R*. Hrdlo zkumavky se přikryje filtračním papírem navlhčeným *octanem olovnatým RS* a zkumavka se zahřívá v glycerinové lázni při 150 °C; papír pomalu zhnědne.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 7,0.

**Fyziologická distribuce.** Každé ze tří myši vážících 20 až 25 g se podá do vena caudalis nejvýše 0,2 ml. Po 20 min se myši šetrně usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří aktivita orgánů. Po odstranění ocasu se změří aktivita zbytku těla. Procento radioaktivity každého vyjmutého orgánu se stanoví podle vzorce:

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – celkovou aktivitu všech vyjmutých orgánů a zbytku těla bez ocasu.

U každé ze tří myši se nejméně 80 % aktivity nachází v játrech a ve slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud neodpovídá distribuce aktivity u jedné ze tří myši výše uvedeným požadavkům, zkouška se opakuje na dalších třech myších. Přípravek vyhovuje zkoušce, pokud je předepsaná distribuce aktivity nalezena u pěti ze šesti použitých myši. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Pyrogenní látky.** Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Na 1 kg hmotnosti králíka se podá nejméně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**[<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě.** Vzestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze.* Roztok chloridu sodného R (9 g/l).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě 0,0 až 0,1; nečistota A asi 0,6; jiné nečistoty 0,8 až 0,9.

*Limit:*

– [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě: nejméně 92 % celkové aktivity technecia-99m.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## NEČISTOTY

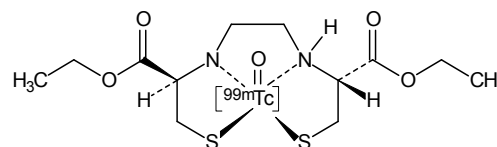
A. [<sup>99m</sup>Tc]technecianový iont.

TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) BICISATIS SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:2123

Bicisát značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

*Synonyma.* Technetii (<sup>99m</sup>Tc) bicisati solutio iniectabilis,  
Technecium-(<sup>99m</sup>Tc) bicisát injekční roztok



## DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu technecia-99m s diethyl-N,N'-ethylendi-L-cysteinátem. Může obsahovat stabilizátory a inertní přísady, jako je mannitol [*Mannitolum* (0559)] a dinatrium-edetát dihydrát [*Dinatrii edetas dihydricus* (0232)].

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VÝROBA

Připravuje se z diethylesteru kyseliny N,N'-(1,2-ethylenediyl)bis[(2R)-2-amino-3-sulfanylpropionové] a injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis* (0283)] za přítomnosti redukujících látek, jako je cínatá sůl.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retardačnímu faktoru hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,5 až 7,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistoty A, B, C, D, E a F.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* Do lahvičky B kitu bicisátu ke značení CRL umístěného v oloveném stínění se přidají 2 ml injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpný nebo neštěpný produkt) o aktivitě 400 MBq až 800 MBq. Obsah lahvičky A kitu bicisátu ke značení CRL se rozpustí ve 3 ml roztoku chloridu sodného R (9 g/l). 1,0 ml roztoku z lahvičky A se ihned převede do lahvičky B, promíchá se a nechá se stát 30 min při teplotě místnosti.

*Porovnávací roztok (b).* Injekční roztok technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpný nebo neštěpný produkt).

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Ethyl-acetát R.

*Nanášení.* 5 µl; skvrny se nechají sušit 5 min až 10 min.

*Vyvíjení.* Po dráze odpovídající 4/5 desky.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodným detektorem se stanoví distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Bicisát značený techneciem-99 více než 0,4; nečistoty A, B, C, D, E a F méně než 0,2.

*Test způsobilosti.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se zřetelně liší od retardačního faktoru píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

*Limit:*

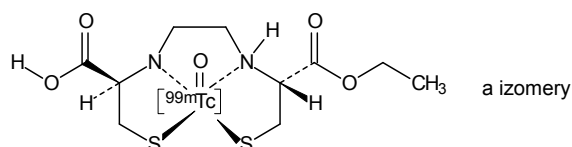
– součet obsahů nečistot A, B, C, D, E a F: nejvýše 6 % celkové aktivity.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

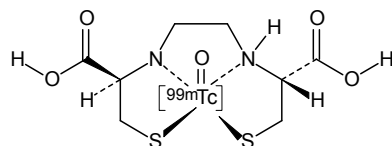
Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

- A. technecium-99m v koloidní formě,  
B. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont,



- C. komplex technecia-99m s ethyl-hydrogen-*N,N'*-ethylen-di-L-cysteinátem,



- D. komplex technecia-99m s *N,N'*-ethylen-di-L-cysteinem,  
E. komplex technecia-99m s mannitolem,  
F. komplex technecia-99m s dinatrium-edetátem dihydrátem.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) ET ALBUMINI HUMANI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0640

### Albumin lidský značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

*Synonyma.* Technecii (<sup>99m</sup>Tc) humani albumini solutio iniectionabilis, Technetii (<sup>99m</sup>Tc) humani albuminati solutio iniectionabilis

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok lidského albuminu značeného techneciem-99m, prostý pyrogenních látek. Přípravuje se z injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectionabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectionabilis* (0283)]. Obsahuje redukující látku, jako je sůl cínu v množství nepřevyšujícím 1 mg Sn v mililitru. Přestože v současné době není přesně určena hodnota pro maximální limit cínu, doporučuje se dodržovat co nejmenší poměr cínu k albuminu. Může obsahovat vhodnou tlumivou přísadu a protimikrobní látku. Použitý lidský albumin vyhovuje požadavkům článku *Albumini humani solutio* (0255).

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Albumin.* 90,0 % až 110,0 % množství albuminu uvedeného v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

- B. Provedou se precipitační zkoušky zkoušeného přípravku se vhodným rozsahem druhově specifických antisér. Zkouška se provádí za použití antiséra specifického proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v příslušné zemi k přípravě látek biologického původu. Přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a poskytuje negativní reakce se specifickými antiséry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

- C. Provede se vhodným imunoelektroforetickým postupem. Za použití antiséra proti normálnímu lidskému séru se porovná normální lidské sérum a zkoušený přípravek, je-li třeba, zředěný. Hlavní složka zkoušeného přípravku odpovídá hlavní složce normálního lidského séra. Ve zředěném přípravku se mohou nalézt malá množství jiných plazmatických bílkovin.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 2,0 až 6,5.

#### Albumin.

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.



**Porovnávací roztok.** Albumin lidský RS se zředí roztokem chloridu sodného R (9 g/l) na koncentraci 5 mg albuminu v mililitru.

K 1,0 ml zkoušeného roztoku a 1,0 ml porovnávacího roztoku se přidá po 4,0 ml zkoumadla biuretového R a promíchá se. Přesně po 30 min se změří absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm proti roztoku chloridu sodnému R (9 g/l) upravenému stejným způsobem. Z naměřených absorbancí se vypočítá obsah albuminu ve zkoušeném přípravku v miligramech na mililitr.

**Cín.** Nejvýše 1 mg/ml.

**Zkoušený roztok.** K 1,0 ml zkoušeného přípravku se přidá 1,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (206 g/l) a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 100 °C. Ochladí se a odstředí se 10 min při 300 g. 1,0 ml supernatantní tekutiny se zředí roztokem kyseliny chlorovodíkové R (103 g/l) na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 95 mg chloridu cínatého R se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové R (103 g/l) a zředí se stejným roztokem kyseliny na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,05 ml kyseliny thioglykolové R, 0,1 ml zkoumadla dithiolového R, 0,4 ml roztoku natrium-lauryl-sulfátu R (20 g/l), 3,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (21 g/l) a promíchá se. Měří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku kyseliny chlorovodíkové R (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce.** Každému ze tří samců potkana vážících 150 g až 250 g se podá nejvýše 0,5 ml, o obsahu nejvýše 1,0 mg albuminu, do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena. Změří se aktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 30 min se potkani šetrně usmrtí, vhodným způsobem se odebere 1 ml krve, vyjmou se játra, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odstraní se ocas. Vhodným přístrojem se stanoví aktivita 1 ml krve, jater, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocasu. Stanoví se procenta aktivity v játrech a v 1 ml krve vztažená k celkové aktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu). Obsah aktivity v krvi se vynásobí faktorem  $m/200$ , kde  $m$  je hmotnost těla potkana v gramech. Nejméně u dvou ze tří použitých potkanů není aktivita v játrech větší než 15 % a v krvi po korekci není menší než 3,5 %.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

**Mobilní fáze.** Butan-2-on R.

**Nanášení.** 5 µl až 10 µl; nechá se usušit.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

**Retardační faktory.** Albumin lidský značený techneciem-99 0,0 až 0,1; nečistota A 0,9 až 1,0.

**Limit:**

– nečistota A: nejvýše 5,0 % celkové aktivity technecia-99m.

**Frakce II až V albuminu značeného techneciem-[<sup>99m</sup>Tc].** Vylučovací chromatografie (2.2.30).

**Mobilní fáze (koncentrovaná).** 1,124 g dihydrogenfosforečnanu draselného R, 4,210 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R, 1,17 g chloridu sodného R a 0,10 g azidu sodného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 100 ml.

**Zkoušený roztok.** 0,25 ml se smíchá s 0,25 ml mobilní fáze (koncentrované). Použije se ihned po zředění.

**Kolona:**

– rozměry: délka 0,6 m, vnitřní průměr 7,5 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro vylučovací chromatografii R.

**Mobilní fáze.** Směs stejných objemových dílů mobilní fáze (koncentrované) a vody R.

**Průtoková rychlost.** 0,6 ml/min.

**Detekce.** Detektor radioaktivity nastavený na technecium-99m.

**Nástřík.** 200 µl.

**Doba záznamu.** Nejméně 10 min po dosažení hodnoty pozadí.

Píky se eluují s následujícími retenčními časy:

I	sloučenina s vysokou molekulovou hmotností	19 až 20 min
II	poly III-albumin	23 až 24 min
III	poly II-albumin	25 až 27 min
IV	poly I-albumin	28 až 29 min
V	lidský sérový albumin	32 až 33 min
VI	koloid cínu	40 až 47 min
VII	technecistan	48 min

**Limit:**

– frakce II až V albuminu značeného techneciem-99m: nejméně 80 % aktivity technecia-99m naneseného na kolonu.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

– množství albuminu;

– množství cínu, pokud ho přípravek obsahuje.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) ET ETIFENINI  
SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:0585

Etifenin značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok, který se může připravit smícháním injekčního roztoku technecianu- (<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpný nebo neštěpný produkt) s roztokem etifeninu (kyselina N-[(2,6-diethylfenyl)karbamoylmethyl]iminodictová; C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a s roztokem chloridu cínatého. Přípravek obsahuje proměnné množství cínu (Sn) nepřevyšující 0,2 mg/ml. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu. Nejméně 95,0 % aktivity odpovídá komplexu etifeninu s techneciem-99m.

Připravuje se z injekčního roztoku technecianu- (<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) za použití vhodných sterilních složek. Vypočítá se poměr radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

## VLASTNOSTI

Čirý bezbarvý roztok.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se buď přímé porovnání spekter, nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od laboratorů uznaných oprávněnou autoritou. Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,140 MeV.

**B.** Provede se kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí *methanolem R* tak, aby získaný roztok obsahoval asi 1 mg etifeninu v mililitru.

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg *etifeninu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii oktadecylsilylovaným R* (5 μm až 10 μm);
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (14 g/l) (20 + 80), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2,5; průtoková rychlost je 1,0 ml/min;
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se po 20 μl každého roztoku. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 6,0.

**Fyziologická distribuce.** Každé ze tří myši vážících 20 g až 25 g se do vena caudalis podá 0,1 ml (odpovídá asi 3,7 MBq). Po 1 h se myši šetrně usmrtí, vyjmou se játra, žlučník, tenké střevo, tlusté střevo a ledviny, sebere se vyloučená moč. Aktivita orgánů se změní vhodným detektorem. Po odstranění ocasu se změní aktivita zbytku těla. Procenta aktivity v každém orgánu se stanoví podle vzorce:

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – aktivitu všech orgánů a zbytku těla bez ocasu.

Nejméně u dvou myší není součet procent aktivity ve žlučníku, v tenkém střevě a v tlustém střevě menší než 80 %. Nejvýše 3 % aktivity se nachází v játrech a nejvýše 2 % v ledvinách.

## Cín

*Zkoušený roztok.* 1,0 ml se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* Připraví se za použití *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* tak, aby roztok obsahoval 0,075 mg *chloridu cínatého R* v mililitru.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (0,2 mg Sn v mililitru).

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Provede se tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) za použití kyseliny křemičité na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C. Při vyvíjení dosáhne čelo mobilní fáze během asi 15 min vzdálenosti 10 cm až 15 cm.

Nanese se 5 μl až 10 μl zkoušeného přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm. Vrstva se nechá usušit a distribuce aktivity se stanoví vhodným detektorem. Komplex etifeninu s techneciem-99m se pohybuje téměř ve středu chromatogramu, technecianový iont se pohybuje s čelem rozpouštědla a nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu. Komplexu etifeninu s techneciem-99m připadá nejméně 95,0 % celkové aktivity chromatogramu.

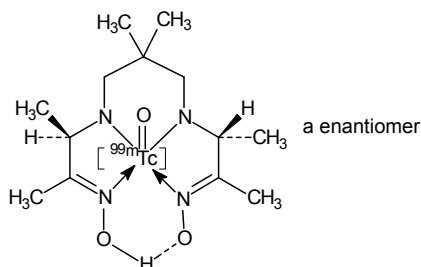
## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změní na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) EXAMETAZIMI SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1925

Exametazim značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok



### DEFINICE

Je to sterilní roztok lipofilního technecium-99m-exametazimu, který se může připravit rozpuštěním racemické směsi (3*RS*,9*RS*)-4,8-diaza-3,6,6,9-tetramethylundekan-2,10-dion-dioximu v přítomnosti cínaté soli v injekčním roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectionabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectionabilis* (0283)]. Může obsahovat stabilizátory a inertní přísady.

**Obsah.** 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

**Čistota.** Nejméně 80 % celkové aktivity odpovídá lipofilnímu technecium-99m-exametazimu a jeho *meso*-izomeru.

### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Čirý roztok.

**Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.** Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

#### A. Spektrometrie záření gama.

**Porovnání.** S referenčním roztokem technecia-99m nebo se použije zařízení kalibrované pomocí tohoto roztoku. Referenční roztoky technecia-99m a/nebo standardizace přístrojů se získávají od laboratoří uznaných oprávněnou autoritou.

**Hodnocení.** Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra získaného s referenčním roztokem technecia-99m. Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,141 MeV.

#### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Nečistota A (viz Radiochemická čistota).

**Hodnocení.** Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku lipofilního technecium-99m-exametazimu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,0 až 10,0.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken.

**Mobilní fáze.** Roztok chloridu sodného R (9,0 g/l).

**Nanášení.** Asi 5 μl.

**Vyvíjení.** Ihned, po dráze odpovídající 2/3 desky.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vhodným detektorem pro stanovení distribuce aktivity.

**Retardační faktory.** Nečistota C 0,8 až 1,0; lipofilní technecium-99m-exametazim a nečistoty A, B a D zůstávají na startu.

**Limity:**

– **nečistota C:** nejvýše 10 % celkové aktivity.

**Celkový lipofilní technecium-99m-exametazim a nečistota A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken.

**Mobilní fáze.** *Butan-2-on*.

**Nanášení.** Asi 5 μl.

**Vyvíjení.** Ihned, po dráze odpovídající 2/3 desky.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vhodným detektorem pro stanovení distribuce aktivity.

**Retardační faktory.** Lipofilní technecium-99m-exametazim 0,8 až 1,0; nečistota A 0,8 až 1,0; nečistota C 0,8 až 1,0; nečistoty B, D a E zůstávají na startu.

**Limity.** Vypočítá se procento aktivity nečistot B, D a E ze zkoušky B (B) a procento aktivity nečistoty C ze zkoušky A (A). Celkové procento lipofilního technecium-99m-exametazimu a nečistoty A se vypočítá podle vzorce:

$$100 - A - B;$$

– **celkový obsah lipofilního technecium-99m-exametazimu a nečistoty A:** nejméně 80 % celkové aktivity.

**Nečistota A.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Porovnávací roztok.** Obsah lahvičky *exametazimu bohatého na meso-izomer CRL* se rozpustí v 0,5 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a převede se do olovem stíněné lahvičky naplněné dusíkem. Přidá se 6 μl čerstvě připraveného roztoku *chloridu cínatého R* (1 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,05 mol/l RS* a 2,5 ml injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) o aktivitě 370 MBq až 740 MBq. Opatrně se promíchá a použije se do 30 min od přípravy.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** sférický silikagel pro chromatografii *oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami deaktivovaný pro bazické látky R* (5 μm) s velikostí pórů 13 nm a s obsahem vázaného uhlíku 11 %.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů acetonitrilu R a tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 3,0 (0,1 mol/l) (33 + 67).

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity.

*Nástřik.* Injektorová smyčka.

*Doba záznamu.* 20 min.

*Relativní retence* vztažená k lipofilnímu technecium-99m-exametazimu. Nečistota A asi 1,2.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s exametazimem bohatém na meso-izomer CRL;
- rozlišení: nejméně 2 mezi píkem lipofilního technecium-99m-exametazimu a píkem nečistoty A.

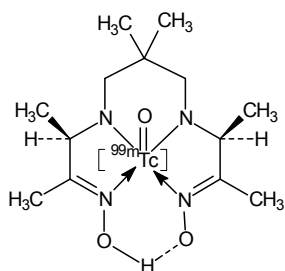
*Limity:*

- nečistota A: nejvýše 5 % celkové aktivity lipofilního technecium-99m-exametazimu s nečistotou A.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Změří se aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

#### NEČISTOTY



- A. meso-izomer lipofilního technecium-99m-exametazimu,
- B. technecium-99m v koloidní formě,
- C. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont,
- D. nelipofilní komplex technecium-99m-exametazimu,
- E. meso-izomer nelipofilního komplexu technecium-99m-exametazimu.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) GLUCONATIS SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1047

Glukonát značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

*Synonymum.* Glukonan značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu kalcium-glukonátu a technecia-99m. Připravuje se z injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) fissionis formati solutio

inietabilis (0124) nebo Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) sine fissionis formati solutio inietabilis (0283)].

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Slabě opalizující roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

##### B. 5 μl roztoku vyhovuje zkoušce totožnosti A popsané v článku Calcii gluconas monohydricus (0172).

##### C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, viz Zkoušky na čistotu.

*Hodnocení:*

- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaného se zkoušeným roztokem ve zkoušce A je 0,9 až 1,0;
- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaného se zkoušeným roztokem ve zkoušce B je 0,0 až 0,1.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 6,0 až 8,5.

**Fyziologická distribuce.** Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se do vena caudalis podá nejvýše 0,2 ml. Změří se aktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 30 min se potkani šetrně usmrtí, vhodným způsobem se odebere nejméně 1 g krve, vyjmou se ledviny, játra, močový měchýř se zadržnou močí a ocas. Vzorek krve se zváží.

Vhodným přístrojem se stanoví aktivita orgánů, vzorku krve a ocasu. Stanoví se procenta aktivity v každém orgánu a v 1 g krve vztažená k celkové aktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání a odečte se aktivita ocasu). Hodnota aktivity v krvi se vynásobí faktorem  $m/200$ , kde  $m$  je hmotnost těla potkana v gramech.

Nejméně u dvou ze tří potkanů je aktivita v:

- ledvinách: nejméně 15 %;
- močovém měchýři se zadržnou močí: nejméně 20 %;
- játrech: nejvýše 5 %;
- krvi, po korekci: nejvýše 0,50 %.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku Radiofarmaca (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

##### A. Nečistota A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* Roztok *chloridu sodného R* (9 g/l).

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm po dobu asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Nečistota A 0,0 až 0,1; glukonát značený techneciem-[<sup>99m</sup>Tc] a nečistota B 0,9 až 1,0.

#### B. Nečistota B. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze.* *Butan-2-on R*.

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl; nechá se vysušit.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

*Sušení.* V proudu teplého vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Glukonát značený techneciem-99m a nečistota A 0,0 až 0,1; nečistota B 0,9 až 1,0.

*Limit:*

– *součet nečistot A a B:* nejvýše 10 % celkové aktivity technecia-99m na chromatogramech získaných ve zkouškách A a B.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě,

B. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) MACROSALBI SUSPENSIO INIECTABILIS

7.4:0296

### Makrosalb značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční suspenze

#### DEFINICE

Je to sterilní suspenze lidského albuminu ve formě nepravidelných nerozpustných agregátů získaných denurací lidského albuminu ve vodném roztoku. Přípravuje se za použití injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis* (0283)]. Částice albuminu jsou značeny techneciem-99m a mají obvykle průměr 10 µm až 100 µm. Přípravek obsahuje redukující látky, jako jsou soli cínu, může obsahovat vhodný tlumivý roztok, jako je tlumivý roztok acetátový, citrátový nebo fosforečnanový, a také nedenaturovaný lidský albumin a protimikrobní látku, jako je benzylalkohol.

Použitý lidský albumin vyhovuje požadavkům článku *Albumini humani solutio* (0255).

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita.* Nejméně 37 MBq technecia-99m na miligram agregovaného albuminu k datu a hodině podání.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílá suspenze, která se stáním může rozdělit.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Dominantní foton záření gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

##### B. Zkoušky Nefiltrovatelná radioaktivita a Velikost částic (viz Zkoušky na čistotu) jsou zároveň zkouškami totožnosti přípravku.

C. 1 ml zkoušeného přípravku se přenesse do odstředivkové zkumavky a odstředí se 5 min až 10 min při 2500 g. Supernatantní tekutina se odstraní, ke zbytku se přidá 5 ml *vinanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Je-li třeba, zahřívá se do rozpuštění částic. Nechá se ochladit, rychle se přidá 0,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového zředěného RS* a ihned se promíchá; vzniká modré zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,8 až 7,5.

**Nefiltrovatelná radioaktivita.** Nejméně 90 % celkové aktivity. Použije se polykarbonátový membránový filtr o průměru 13 mm až 25 mm, tloušťce 10 µm a s kulatými póry o průměru 3 µm, upevněný do vhodného držáku. Na membránu filtru se převede 0,2 ml zkoušeného přípravku a během filtrace se přidává 20 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Stanoví se radioaktivita zbytku na membráně filtru.

**Velikost částic.** Nejvýše 10 částic má maximální rozměr větší než 100 µm a žádná částice nemá maximální rozměr větší než 150 µm.

Hodnotí se za použití mikroskopu. Je-li třeba, zkoušený přípravek se zředí tak, aby počet částic byl dostatečně nízký pro jejich rozlišení. Použije se stříkačka s jehlou o průměru nejméně 0,35 mm, potřebné množství se převede do vhodného zařízení, jako je hemocytometrická komůrka, která nemá být přeplněná. Suspenze se nechá 1 min stát a pak se opatrně přikryje krycím sklíčkem bez stlačení vzorku. Hodnotí se plocha odpovídající nejméně 5000 částic.

##### Agregovaný albumin.

*Zkoušený roztok.* Objem přípravku o předpokládaném obsahu asi 1 mg agregovaného albuminu se přenesse do odstředivkové zkumavky, 5 min až 10 min se odstředí při asi 2500 g, supernatantní tekutina se odstraní. Sediment se znovu suspenduje ve 2,0 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), odstředí se 5 min až 10 min při 2500 g a supernatantní tekutina se odstraní. Sediment se znovu suspenduje v 5,0 ml *uhličitanu sodného RS1* a zahřívá se ve vodní lázni

při 80 °C až 90 °C do rozpuštění agregovaného albuminu. Nechá se ochladit, převede se do odměrné baňky a zředí se *uhlíčanem sodným RSI* na 10,0 ml.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se řada porovnávacích roztoků obsahujících 0,05 mg až 0,2 mg lidského albuminu v mililitru ředěním *albuminu lidského RS uhlíčanem sodným RSI*.

3,0 ml každého roztoku se odděleně převedou do 25ml baňek. Do každé baňky se přidá 15,0 ml *vinanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Pak se rychle přidá 1,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového zředěného RS*, ihned se promíchá a nechá se 30 min stát. Změří se absorbance (2.2.25) při 750 nm za použití *uhlíčanu sodného RSI* jako kontrolní kapaliny. Z absorbancí porovnávacích roztoků se sestrojí kalibrační křivka a vypočítá se obsah agregovaného albuminu v přípravku.

**Cín.** Nejvýše 3 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* K 1,0 ml se přidá 1,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (206 g/l) a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Ochladí se a 10 min se odstředí uje při 300 g. 1,0 ml supernatantní tekutiny se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l) a 3,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) a promíchá se. Změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce.** Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se do vena caudalis podá nejvýše 0,2 ml. Po 15 min se potkani šetrně usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným přístrojem se změní aktivita orgánů. Odstraní se ocas a změní se aktivita zbytku těla, včetně krve. Procenta aktivity v plicích, v játrech a ve slezině se stanoví podle vzorce:

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – celkovou aktivitu jater, sleziny, plic a zbytku těla.

Nejméně u dvou ze tří potkanů je alespoň 80 % aktivity nalezeno v plicích a nejvýše 5 % v játrech a ve slezině. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny** (2.6.14). Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změní kalibrovaným přístrojem.

## OZNAČOVÁNÍ

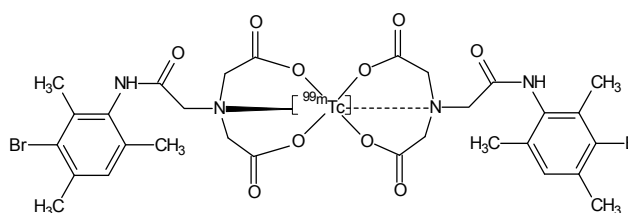
V označení na obalu se uvede:

- koncentrace cínu uvedená v miligramech na mililitr, pokud ho přípravek obsahuje;
- že přípravek se má před použitím protřepat;
- že přípravek se nesmí použít, pokud po protřepání není suspenze homogenní.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) MEBROFENINI SOLUTIO INIECTABILIS

6.3:2393

Mebrofenin značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok



Radiofarmaceutické přípravky

## DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu technecia-99m s mebrofeninem. Může obsahovat stabilizátory a inertní přísady.

*Obsah.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VÝROBA

Připravuje se rozpuštěním kyseliny ([(3-brom-2,4,6-trimethylfenyl)karbamoyl]methyl}imino)dioctové (mebrofenin) za přítomnosti redukujících látek, jako je cínatá sůl, v injekčním roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectionabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectionabilis* (0283)].

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,141 MeV.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné radiochemické nečistoty (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píku mebrofeninu značeného techneciem-99m na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 4,0 až 7,5.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/V m. j./ml, kde V je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok (a).* Do uzavřené lahvičky se k 1 ml roztoku chloridu cínatého R (1 g/l) v kyselině chlorovodíkové 0,05 mol/l RS přidají 2 ml injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu). Použije se do 30 min po přípravě.

*Porovnávací roztok (b).* 40 mg mebrofeninu CRL se rozpustí ve 2 ml vody R a pH se upraví roztokem hydroxidu sodného R (40 g/l) na hodnotu 6,5. K tomuto roztoku se přidá 25 µl roztoku chloridu cínatého R (20 mg/ml) v kyselině chlorovodíkové 0,05 mol/l RS a 2 ml injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) o aktivitě 400 MBq. Nechá se stát 15 min.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC na vrstvě skleněných vláken.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (40 + 60).

*Nanášení.* Asi 5 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze odpovídající 4/5 desky.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodným detektorem se určí distribuce aktivity.

*Retardační faktor.* Nečistota A 0,0 až 0,1.

*Test způsobilosti.* Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 0,1. Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejvýše 0,7.

**Jiné radiochemické nečistoty.** Kapalínová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok.* Použije se porovnávací roztok (b) ze zkoušky Nečistota A.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s vloženými polárními skupinami a s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 µm).

*Mobilní fáze A.* Roztok octanu amonného R (3,85 g/l).

*Mobilní fáze B.* Acetonitril R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	70	30
20–25	70 → 0	30 → 100
25–30	0	100

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Detektor radioaktivity.

*Nástřik.* 20 µl.

*Relativní retence* vztažená k mebrofeninu značeného techneciem-99m (retenční čas asi 20 min). Nečistota B asi 0,17.

*Limity:*

– *mebrofenin značený techneciem-99m:* nejméně 94 % celkové aktivity.

Obsah aktivity mebrofeninu technecia-99m v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$(100 - A) \cdot T,$$

v němž značí:

A – procentuální aktivitu nečistoty A stanovenou ve zkoušce Nečistota A, Radiochemická čistota;

T – dávku aktivity připadající na pík mebrofeninu značeného techneciem-99m vztaženou k celkové eluované aktivitě na chromatogramu zkoušeného roztoku.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří vhodným kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

A. technecium-99m v koloidní formě,

B. [<sup>99m</sup>Tc]technecianový iont.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) MEDRONATI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0641

### Medronát značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

*Synonymum.* Medronan značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu technecia-99m a natrium-medronátu (dinatrium-methylendifosfonátu). Přípravuje se z injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectionabilis (0124)* nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectionabilis (0283)*]. Může obsahovat protimikrobní látky, antioxidanty, stabilizátory a tlumivé přísady.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkouškách A a B, Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení:*

- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaném se zkoušeným roztokem ve zkoušce A je 0,9 až 1,0;
- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaném se zkoušeným roztokem ve zkoušce B je 0,0 až 0,1.

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – celkovou aktivitu (vypočítanou jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byl injekční roztok podán do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu).

Vypočítá se aktivita krve na jednotku hmotnosti, obsah aktivity v krvi se upraví vynásobením faktorem *m*/200, kde *m* je tělesná hmotnost potkana v gramech.

Nejméně u dvou ze tří potkanů je aktivita v:

- *játrech*: nejvýše 1,0 %;
- *stehenní kosti*: nejméně 1,5 %;
- *krvi po korekci*: nejvýše 0,05 % v gramu.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

**RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA****A. Nečistota A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken.

*Mobilní fáze.* Roztok *octanu sodného R* (136 g/l).

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení.* Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm po dobu asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Nečistota A 0,0 až 0,1; medronát značený techneciem-[<sup>99m</sup>Tc] a nečistota B 0,9 až 1,0.

**B. Nečistota B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken.

*Mobilní fáze.* *Butan-2-on R*.

*Nanášení.* 5 µl až 10 µl; rychle se vysuší.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm až 15 cm, asi 10 min.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory.* Medronát značený techneciem-99m a nečistota A 0,0 až 0,1; nečistota B 0,9 až 1,0.

*Limity:*

- *nečistota B*: nejvýše 2,0 % aktivity technecia-99m na chromatogramu získanému ve zkoušce B;
- *součet nečistot A a B*: nejvýše 5,0 % aktivity technecia-99m na chromatogramech získaných ve zkouškách A a B.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

*Zkoušený roztok.* Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* tak, aby získaný roztok obsahoval asi 0,1 mg až 0,5 mg natrium-medronátu v mililitru.

*Porovnávací roztok.* Vhodné množství (1 mg až 5 mg) *kyseliny medronové CRL* se rozpustí ve vhodné směsi roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a *vody R* a zředí se na 10 ml tak, aby se získaný roztok shodoval se zkoušeným roztokem v obsahu medronátu a chloridu sodného.

*Stacionární fáze.* *Celulosa pro chromatografii R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *propan-2-olu R*, *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *butan-2-onu R* (20 + 30 + 60).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm až 14 cm, asi 4 h.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *molybdenanem amonným RS4* a pak se na asi 10 min vystaví působení ultrafialového světla při 254 nm.

*Hodnocení.* Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hodnota pH** (2.2.3). 3,5 až 7,5.

**Cín.** Nejvýše 3 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* 1,0 ml se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l) a 3,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) a promíchá se. Měří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce.** Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se podá nejvýše 0,2 ml, odpovídající ne více než 0,05 mg natrium-medronátu, do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena. Změří se aktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 2 h se potkani šetrně usmrtí, vyjme se jedna stehenní kost, játra a část krve; krev se zváží. Pokud byl injekční roztok podán do vena caudalis, odstraní se ocas. Vhodným přístrojem se stanoví aktivita stehenní kosti, jater, krve, a pokud byl injekční roztok podán do vena caudalis, i ocasu. Procenta aktivity v každém orgánu se stanoví podle vzorce:

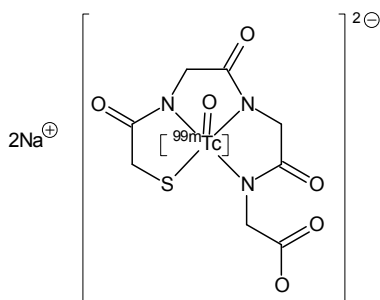


## NEČISTOTY

- A. [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě,  
B. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) MERTIATIDI  
SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:1372

Mertiatiid značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok oxo-[[[(sulfido-κS-acetyl)amidyl-κN]acetyl]amidyl-κN]acetato[<sup>99m</sup>Tc]-techneciánu disodného. Může se připravit buď zahřátím směsi obsahující S-benzoylsulfanylacetyltriglycin (betiatiid), slabé chelatační činidlo, jako je tartarát, cínatou sůl a injekční roztok technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpný nebo neštěpný produkt) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis* (0283)], nebo smícháním roztoků sulfanylacetyltriglycinu (mertiatidu), cínaté soli a injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *fissione formati solutio iniectabilis* (0124) nebo *Natrii pertechnetatis* (<sup>99m</sup>Tc) *sine fissione formati solutio iniectabilis* (0283)] při zásaditém pH. Může obsahovat stabilizátory a tlumivou přísadu.

*Technecium-99m*. 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m*. Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení*. Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné radiochemické nečistoty, v části Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku přibližně odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

nímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,0 až 7,5.

**Sterilita**. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota A**. Vzestupná papírová chromatografie (2.2.26).

*Zkoušený roztok*. Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze*. Papír pro chromatografii R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (40 + 60).

*Nanášení*. 2 μl

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktor*. Nečistota A 0,0 až 0,1.

*Limit*:

– *nečistota A*: nejvýše 2,0 % celkové aktivity.

**Jiné radiochemické nečistoty**. Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok*. Zkoušený přípravek.

*Porovnávací roztok*. 5 mg S-benzoylsulfanylacetyltriglycinu CRL se zahříváním na vodní lázni rozpustí v 5 ml vody R. K 1 ml tohoto roztoku v uzavřené lahvičce naplněné dusíkem R se přidá 0,5 ml roztoku *vinanu draselno-sodného* R (40 g/l), 25 μl roztoku *chloridu cínatého* R (4 g/l) v *kyselině chlorovodíkové* 0,05 mol/l RS a 370 MBq až 740 MBq injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) v objemu nepřevyšujícím 3 ml. Směs se zahřívá na vroucí vodní lázni po dobu 10 min a ochladí se na teplotu místnosti.

*Kolona*:

– *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný* R (5 μm).

*Mobilní fáze A*. Směs objemových dílů *ethanolu bezvodého* R a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného* R (1,36 g/l), jejíž pH bylo upraveno roztokem *hydroxidu sodného* R (4 g/l) na hodnotu 6,0, (7 + 93).

*Mobilní fáze B*. Směs objemových dílů vody R a *methanolu* R (10 + 90).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–10	100	0
10–25	0	100

*Průtoková rychlost*. 1,0 ml/min.

*Detekce*. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Ustavení rovnováhy*. Mobilní fázi A, po dobu 20 min.

*Nástřik*. 20 μl.

**Limity:**

- součet ploch píků předcházejících hlavnímu píku (odpovídá hydrofilním nečistotám včetně nečistoty B): nejvýše 3,0 % součtu ploch všech píků na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- součet píků následujících za hlavním píkem (odpovídá lipofilním nečistotám): nejvýše 4,0 % součtu ploch všech píků na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- meriatid značený techneciem-99m: nejméně 94 % celkové aktivity technecia-99m.

**STANOVENÍ RADIOAKTIVITY**

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

**NEČISTOTY**

- A. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecium v koloidní formě,
- B. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]technecistanový iont.

## TECHNETII ( $^{99m}\text{Tc}$ ) MICROSPHAERARUM SUSPENSIO INIECTABILIS

7.0:0570

### Mikročástice značené techneciem-( $^{99m}\text{Tc}$ ) injekční suspenze

**DEFINICE**

Je to sterilní suspenze lidského albuminu, který byl denaturován do formy kulovitých nerozpustných částic; částice jsou značeny techneciem-99m a mají obvykle průměr 10  $\mu\text{m}$  až 50  $\mu\text{m}$ . Přípravuje se z injekčního roztoku technecianu- ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis ( $^{99m}\text{Tc}$ ) fissionis formati solutio iniectionabilis (0124)* nebo *Natrii pertechnetatis ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sine fissionis formati solutio iniectionabilis (0283)*]. Přípravek obsahuje redukující látky, jako jsou soli cínu, vhodný tlumivý roztok, jako je tlumivý roztok acetátový, citrátový nebo fosforečnanový, a přísady, jako jsou smáčedla.

Použitý lidský albumin vyhovuje článku *Albumini humani solutio (0255)*.

**Technecium-99m.** 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

**Radioaktivita.** Nejméně 185 MBq technecia-99m na milion částic k datu a hodině podání.

**VLASTNOSTI**

**Vzhled.** Suspenze bílých, žlutých nebo uměle obarvených částic, která se stáním může rozdělit.

**Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.** Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****A. Spektrometrie záření gama.**

**Hodnocení.** Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

**B. Zkoušky Nefiltrovatelná radioaktivita a Velikost částic (viz Zkoušky na čistotu) jsou zároveň zkouškami totožnosti.**

- C.** 1 ml zkoušeného přípravku se přenese do odstředivkové zkumavky a odstředí se 5 min až 10 min při 2500 g. Supernatantní tekutina se odstraní a ke zbytku se přidá 5 ml *vinanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Je-li třeba, zahřívá se do rozpuštění částic. Nechá se ochladit, rychle se přidá 0,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového zředěného RS* a ihned se promíchá; vzniká modré zbarvení.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Hodnota pH (2.2.3).** 4,0 až 9,0.

**Nefiltrovatelná radioaktivita.** Nejméně 95 % celkové aktivity.

Použije se polykarbonátový membránový filtr o průměru 13 mm až 25 mm, tloušťce 10  $\mu\text{m}$  a s kulatými póry o průměru 3  $\mu\text{m}$ , upevněný do vhodného držáku. Na membránu filtru se přenese 0,2 ml zkoušeného přípravku a během filtrace se přidává 20 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Změří se aktivita zbytku na membráně.

**Velikost částic.** Nejvýše 10 částic má největší rozměr větší než 75  $\mu\text{m}$ , ale žádná částice nemá největší rozměr větší než 100  $\mu\text{m}$ .

Hodnotí se za použití mikroskopu. Je-li třeba, zkoušený přípravek se zředí tak, aby počet částic byl dostatečně nízký pro jejich rozlišení. Použije se stříkačka s jehlou o průměru nejméně 0,35 mm. Potřebné množství se přenese do vhodného zařízení, jako je hemocytometrická komůrka; komůrka nemá být přeplněná. Suspenze se nechá 1 min stát a pak se opatrně přikryje krycím sklíčkem bez stlačení vzorku. Hodnotí se plocha odpovídající nejméně 5000 částic. Částice mají stejný kulovitý vzhled.

**Počet částic.** Hodnotí se za použití mikroskopu. Použije se vhodné zařízení, jako je hemocytometrická komůrka, a naplní se vhodně zředěným přípravkem tak, aby během převádění nedošlo k oddělení částic. Spočítá se počet částic v komůrce. Postup se opakuje dvakrát a vypočítá se počet částic v mililitru zkoušeného přípravku.

**Cín.** Nejvýše 3 mg/ml.

**Zkoušený roztok.** K 1,0 ml se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a 1,5 ml *kyseliny dusičné R*, zahřívá se a odpaří se na asi 1 ml. Přidají se 2 ml *vody R* a znovu se odpaří na asi 1 ml.

Tento postup se opakuje dvakrát, roztok se ochladí a zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) a promíchá se. Změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce.** Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se do vena caudalis podá nejvýše 0,2 ml. Po 15 min se potkani šetrně usmrtní, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným přístrojem se změří aktivita orgánů.

Odstraní se ocas a změří se aktivita zbytku těla, včetně krve a zadržené moči. Procenta aktivity v játrech, ve slezině a v plicích se stanoví podle vzorce:

$$\frac{A}{B} \cdot 100,$$

v němž značí:

*A* – aktivitu jednotlivého orgánu;

*B* – celkovou aktivitu jater, sleziny, plic a zbytku těla, včetně zadržené moči.

Nejméně u dvou ze tří potkanů se nachází alespoň 80 % aktivity v plicích a nejvýše 5 % v játrech a slezině. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

**Bakteriální endotoxiny (2.6.14).** Méně než 175/*V* m. j./ml, kde *V* je nejvyšší doporučená dávka v mililitrech.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- koncentrace cínu vyjádřená v miligramech na mililitr, pokud ho přípravek obsahuje;
- že přípravek se má před použitím protřepat.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) PENTETATIS SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0642

Pentetát značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

*Synonymum.* Pentetan značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc)  
injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu technecia-99m a natrium-pentetátu (pentanatrium-diethylentriaminopentaacetátu) nebo kalcium-trinatrium-pentetátu (kalcium-trinatrium-diethylentriaminopentaacetátu). Přípravuje se z injekčního roztoku technecianu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [*Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) fissionis formati solutio iniectionabilis (0124)* nebo *Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) sine fissionis formati solutio iniectionabilis (0283)*]. Může obsahovat vhodné protimikrobní látky, antioxidanty, stabilizátory a tlumivé přísady.

*Technecium-99m.* 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m.* Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7)*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkouškách A a B, Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení:*

- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaném se zkoušeným roztokem ve zkoušce A je 0,9 až 1,0;
- retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaném se zkoušeným roztokem ve zkoušce B je 0,0 až 0,1.

##### C. Zkoušený roztok. Do čisté suché 10ml skleněné zkumavky se umístí takový objem zkoušeného přípravku, aby obsahoval 2 mg pentetátu. Je-li třeba, zředí se vodou *R* na 1 ml.

*Porovnávací roztok.* Do čisté suché 10ml skleněné zkumavky se převede 1 ml vody *R*.

Do každé zkumavky se přidá po 0,1 ml roztoku *síranu nikelnatého R* (1 g/l), 0,5 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 50% (*V/V*) a 0,75 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (50 g/l). Promíchá se a změří se pH, které má hodnotu nejvýše 5. Do každé zkumavky se přidá 0,1 ml roztoku *dimethylglyoximu R* (10 g/l) v *ethanolu 96% R*. Promíchá se a nechá se 2 min stát. V každé zkumavce se pH upraví roztokem *hydroxidu sodného R* (100 g/l) na hodnotu nejméně 12. Promíchá se a ověří se, zda hodnota pH není menší než 12. Nechá se stát 2 min. Zkumavky se opatrně zahřívají 2 min na vodní lázni.

*Hodnocení:*

- zkoušený roztok je stále čirý a bezbarvý;
- porovnávací roztok se po přidání roztoku dimethylglyoximu zbarví červeně a po zahřátí na vodní lázni vznikne červená sraženina.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH (2.2.3).** 4,0 až 7,5.

**Cín.** Nejvýše 1 mg/ml.

*Zkoušený roztok.* 1,5 ml se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,05 ml *kyseliny thio glykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 0,4 ml roztoku *natrium-lauryl-sulfátu R* (20 g/l) a 3,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) a promíchá se. Měří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca (0125)*. Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

## A. Nečistota A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken, předem zahřívána 10 min při 110 °C.

Mobilní fáze. Roztok chloridu sodného R (9 g/l).

Nanášení. 5 µl až 10 µl.

Vyvíjení. Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm po dobu asi 10 min.

Sušení. Na vzduchu.

Detekce. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

Retardační faktory. Nečistota A 0,0 až 0,1; pentetát značený techneciem-[<sup>99m</sup>Tc] a nečistota B 0,9 až 1,0.

## B. Nečistota B. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken, předem zahřívána 10 min při 110 °C.

Mobilní fáze. Butan-2-on R.

Nanášení. 5 µl až 10 µl; nechá se vysušit.

Vyvíjení. Po dráze 10 cm až 15 cm asi 10 min.

Sušení. Na vzduchu.

Detekce. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

Retardační faktory. Pentetát značený techneciem-[<sup>99m</sup>Tc] a nečistota A 0,0 až 0,1; nečistota B 0,9 až 1,0.

Limit:

– součet nečistot A a B: nejvýše 5 % aktivity technecia-99m na chromatogramech získaných ve zkouškách A a B.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

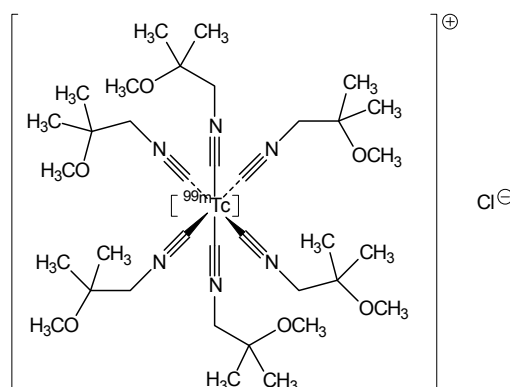
Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## NEČISTOTY

- [<sup>99m</sup>Tc]technecium v koloidní formě,
- [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SESTAMIBI SOLUTIO INIECTABILIS

6.0:1926

Technecium-(<sup>99m</sup>Tc) sestamibi injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok chloridu (OC-6-11)-hexakis[1-(isokyan-κC)-2-methoxy-2-methylpropan][<sup>99m</sup>Tc]technecného(1+), který se může připravit zahříváním směsi obsahující tetrafluoroboritan tetrakis[1-(isokyan-κC)-2-methoxy-2-methylpropan]mědný(1+), slabé chelatační činidlo, cínatou sůl a technecistan-(<sup>99m</sup>Tc) sodný (štěpný nebo neštěpný produkt) injekční roztok [Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) fissioni formati solutio iniectabilis (0124) nebo Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) sine fissioni formati solutio iniectabilis (0283)].

Obsah. 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

## VLASTNOSTI

Vzhled. Čirý bezbarvý roztok.

Poločas přeměny a druh záření technecia-99m. Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Spektrometrie záření gama.

Hodnocení. Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Nejvíce zastoupený foton gama má energii 0,141 MeV.

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota, Nečistota C (viz Zkoušky na čistotu).

Hodnocení. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Hodnota pH (2.2.3). 5,0 až 6,0.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku Radiofarmaca (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

## RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

Nečistota A a další polární nečistoty. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů tetrahydrofuranu R, roztoku octanu amonného R (38,5 g/l), methanolu R a acetonitrilu R (10 + 20 + 30 + 40).

**Nanášení.** Asi 5 µl.

**Vyvíjení.** Ihned, po dráze 6 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Detektorem aktivity se určí distribuce aktivity.

**Retardační faktory.** Nečistota B a nepolární nečistoty 0,0 až 0,1; nečistota C a technecium-99m sestamibi 0,3 až 0,6; nečistota A a další polární nečistoty 0,9 až 1,0.

**Limit.** Viz zkoušku Nečistota B.

**Nečistota B.** Papírová chromatografie (2.2.26). Jestliže ve zkoušce Nečistota A a další polární nečistoty není při retardačním faktoru 0,0 až 0,1 nalezena žádná aktivita, není nečistota B přítomna a zkouška Nečistota B se může vypustit.

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Stacionární fáze.** Papír pro chromatografii R.

**Mobilní fáze.** Směs stejných objemových dílů acetonitrilu R, kyseliny octové 0,5 mol/l RS a roztoku chloridu sodného RS (20 g/l).

**Nanášení.** Asi 5 µl.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Detektorem aktivity se určí distribuce aktivity.

**Retardační faktory.** Nečistota B 0 až 0,1; nečistota A, nečistota C a technecium-99m sestamibi 0,8 až 1,0.

**Limit:**

– součet obsahů nečistoty A a dalších polárních nečistot a nečistota B: nejvýše 5 % celkové aktivity.

**Nečistota C.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Zkoušený přípravek.

**Porovnávací roztok.** Do lahvičky s obsahem kitu sestamibi ke značení CRL se přidají 3 ml roztoku chloridu sodného R (9 g/l) obsahujícího 700 MBq až 900 MBq technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) injekčního roztoku. Směs se vaří 10 min ve vodní lázni a nechá se ochladit na teplotu místnosti.

**Kolona:**

– rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami deaktivovaný pro bazické látky R (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů acetonitrilu R, roztoku síranu amonného RS (6,6 g/l) a methanolu R (20 + 35 + 45).

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Detektor radioaktivity.

**Nanášení.** 25 µl.

**Doba záznamu.** 25 min.

**Relativní retence** vztažená k techneciu-99m sestamibi.

Nečistota C asi 1,3.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– chromatogram porovnávacího roztoku odpovídá chromatogramu kitu sestamibi ke značení CRL;

– relativní retence vztažená k techneciu-99m sestamibi: nečistota C nejméně 1,2.

**Limity:**

– nečistota C: nejvýše 3 % celkové aktivity;

– technecium-99m sestamibi: nejméně 94 % celkové aktivity.

Vypočítá se procento aktivity připadající na technecium-99m sestamibi podle vzorce:

$$\frac{(100 - B) \cdot T}{100},$$

v němž značí:

B – procento aktivity nečistoty B získané ze zkoušky Radiochemická čistota, Nečistota B;

T – plochu píku technecia-99m sestamibi ve zkoušeném přípravku.

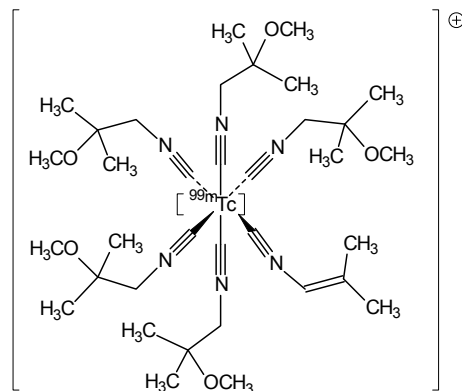
## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

## NEČISTOTY

A. <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>: (<sup>99m</sup>Tc)technecistanový iont,

B. technecium-99m v koloidní formě,



C. (OC-6-22)-pentakis[1-(isokyan-κC)-2-methoxy-2-methylpropan][1-(isokyan-κC)-2-methylprop-1-en][<sup>99m</sup>Tc]technecny(1+) iont.

## TECHNETII (<sup>99m</sup>Tc) SUCCIMERI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0643

Sukcimer značený techneciem-(<sup>99m</sup>Tc) injekční roztok

## DEFINICE

Je to sterilní roztok komplexu technecia-99m a kyseliny meso-2,3-disulfanyljantarové. Přípravuje se z injekčního roztoku technecistanu-(<sup>99m</sup>Tc) sodného (štěpného nebo neštěpného produktu) [Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) fissioni formati solutio iniectabilis (0124) nebo Natrii pertechnetatis (<sup>99m</sup>Tc) sine fissioni formati solutio iniectabilis (0283)].

Obsahuje redukující látky, jako jsou cínaté soli a může obsahovat stabilizátory, antioxidanty, jako je kyselina askorbová, a inertní přísady.

*Technecium-99m*. 90 % až 110 % deklarované aktivity technecia-99m k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření technecia-99m*. Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Spektrometrie záření gama.

*Hodnocení*. Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,141 MeV.

##### B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Retardační faktor hlavního píku na chromatogramu získaného se zkoušeným roztokem je 0,0 až 0,1.

##### C. 1 ml zkoušeného přípravku se přenesse do zkumavky, přidá se 0,1 ml kyseliny octové ledové R, 1 ml roztoku nitroprusidů sodného R (20 g/l) a promíchá se. Na hladinu roztoku se opatrně přidá vrstva amoniaku 26% R; prsteneček na rozhraní vrstev se zbarví fialově.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 2,3 až 3,5.

**Cím**. Nejvýše 1 mg/ml.

*Zkoušený roztok*. 1,5 ml se zředí roztokem kyseliny chlorovodíkové R (103 g/l) na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok*. 0,115 g chloridu cínatého R se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové R (103 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá po 0,05 ml kyseliny thio-glykolové R, 0,1 ml zkoumadla dithiolového R, 0,4 ml roztoku natrium-lauryl-sulfátu R (20 g/l), 3,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové R (21 g/l) a promíchá se. Nechá se 60 min stát a změří se absorbance (2.2.25) každého roztoku při 540 nm za použití roztoku kyseliny chlorovodíkové R (21 g/l) jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku.

**Fyziologická distribuce**. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena, podá nejvýše 0,2 ml obsahující ne více než 0,1 mg kyseliny disulfanylantarové. Změří se aktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 1 h se potkani šetrně usmrtí, vyjmou se ledviny, játra, žaludek, plíce, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocas. Vhodným přístrojem se stanoví aktivita orgánů, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocasu. Stanoví se procenta aktivity v každém orgánu vztažená k celkové aktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu).

Nejméně u dvou ze tří potkanů je aktivita v:

- ledvinách: nejméně 40 %;
- játrech: nejvýše 10,0 %;

- plicích: nejvýše 5,0 %;
- žaludku: nejvýše 2,0 %.

**Sterilita**. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit pro použití před dokončením zkoušky.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Nečistota A**. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. Zkoušený přípravek.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R na vrstvě skleněných vláken zahřívána 10 min při 110 °C.

*Mobilní fáze*. *Butan-2-on R*.

*Nanášení*. 5 µl až 10 µl.

*Vyvíjení*. Ihned, po dráze 10 cm až 15 cm po dobu asi 10 min.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Vhodný detektor ke stanovení distribuce aktivity.

*Retardační faktory*. Sukcimer značený techneciem-99m 0,0 až 0,1; nečistota A 0,9 až 1,0.

#### Limity:

- sukcimer značený techneciem-99m: nejméně 95 % celkové aktivity technecia-99m;
- nečistota A: nejvýše 2,0 % celkové aktivity technecia-99m.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

#### NEČISTOTY

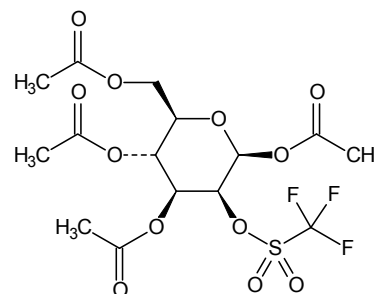
A. [<sup>99m</sup>Tc]technecistanový iont.

Radiofarmaceutické přípravky

## TETRA-*O*-ACETYLMANNOSI TRIFLAS AD RADIOPHARMACEUTICA

7.3:2294

Tetra-*O*-acetylmannosa-triflát pro radiofarmaceutické přípravky



C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S

M<sub>r</sub> 480,37

CAS 9205-23-5

#### DEFINICE

Je to 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-*O*-(trifluormethansulfonyl)-β-D-mannopyranosa.

*Obsah.* 97,0 % až 102,0 % sloučeniny  $C_{15}H_{19}F_3O_{12}S$ , počítáno na vysušenou látku.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek.

*Rozpustnost.* Prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonitrilu, snadno rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24).

*Porovnání.* S tetra-O-acetylmannosa-triflátem CRL.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Specifická optická otáčivost** (2.2.7). –12,0 až –16,0, počítáno na vysušenou látku; měří se při 20 °C. 0,250 g se rozpustí v acetonitrilu R a zředí se jím na 10,0 ml.

**Nečistota B.** Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (2.2.33), metoda  $^{19}F$ -NMR. *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

*Zkoušený roztok.* 20,0 mg se rozpustí v acetonitrilu deuterovaném R a zředí se jím na 1,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 20,0 mg tetra-O-acetylmannosa-triflátu CRL se rozpustí v acetonitrilu deuterovaném R a zředí se jím na 1,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 4,0 ml lithium-triflátu R (lithná sůl nečistoty B) se rozpustí v acetonitrilu deuterovaném R a zředí se jím na 1,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 10  $\mu$ l porovnávacího roztoku (b).

*Limit.* Plocha píku identifikovaného ve spektru zkoušeného roztoku při asi –78 ppm je menší než plocha píku identifikovaného ve spektru porovnávacího roztoku (c) při stejném chemickém posunu (0,2 %).

**Příbuzné látky.** Kapalinová chromatografie (2.2.29). *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

*Zkoušený roztok (a).* 0,200 g se rozpustí v acetonitrilu R a zředí se jím na 2,0 ml.

*Zkoušený roztok (b).* 10,0 mg se rozpustí v acetonitrilu R a zředí se jím na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10,0 mg tetra-O-acetylmannosa-triflátu CRL se rozpustí v acetonitrilu R a zředí se jím na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí acetonitrilem R na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí acetonitrilem R na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* 10 mg 1,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosy CRL (nečistota A) se rozpustí v 5 ml acetonitrilu R. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

#### Kolona:

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5  $\mu$ m);
- *teplota:* 25 °C.

#### Mobilní fáze:

- *mobilní fáze A:* voda R;
- *mobilní fáze B:* acetonitril R1.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	80	20
1–20	80 → 55	20 → 45
20–35	55	45
35–45	55 → 0	45 → 100
45–50	0	100

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor při 220 nm.

*Nástřík.* 20  $\mu$ l; zkoušený roztok (a) a porovnávací roztoky (b) a (c).

*Relativní retence* vztažená k tetra-O-acetylmannosa-triflátu (retenční čas asi 29 min). Nečistota A asi 0,2.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (c):

- *rozlišení:* nejméně 5,0 mezi píkem nečistoty A a píkem tetra-O-acetylmannosa-triflátu.

#### Limity:

- *nečistota A:* nejvýše dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %);
- *jakákoliv jiná nečistota:* pro každou nečistotu nejvýše plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,10 %);
- *celkový obsah nečistot:* nejvýše pětinašobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %);
- *limit zanedbatelnosti:* polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**Ztráta sušením.** Nejvýše 0,6 %; stanoví se termogravimetricky (2.2.34) s 25 mg zkoušené látky. Zahřívá se rychlostí 2,5 °C/min na teplotu 80 °C.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Příbuzné látky (viz Zkoušky na čistotu) s následující úpravou.

*Nástřík.* Zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

Obsah  $C_{15}H_{19}F_3O_{12}S$  v procentech se vypočítá za použití deklarovaného obsahu tetra-O-acetylmannosa-triflátu CRL.

#### SKLADOVÁNÍ

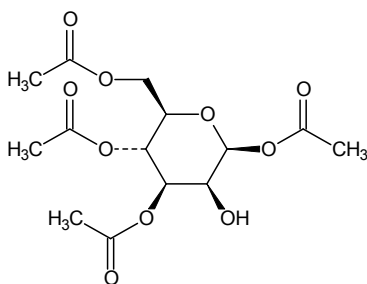
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

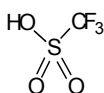
V označení na obalu je doporučeno provést provozní zkoušku před použitím látky ve výrobě radiofarmak. Tato zkouška zajistí, že látka poskytne při daných výrobních podmínkách radiofarmakum v požadovaném množství a odpovídající jakosti.

#### NEČISTOTY

*Specifikované nečistoty A a B.*



A. 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-mannopyranosa,



B. kyselina trifluormethansulfonová.

## THALLOSI (<sup>201</sup>Tl) CHLORIDI SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0571

### Chlorid thallný-(<sup>201</sup>Tl) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok thallia-201 ve formě chloridu thallného. Může být izotonizován přidavkem chloridu sodného [*Natrii chloridum* (0193)] a může obsahovat vhodnou protimikrobní látku, jako je benzylalkohol [*Alcohol benzylicus* (0256)].

*Thallium-201*. 90 % až 110 % deklarované aktivity thallia-201 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

*Hmotnostní aktivita*. Nejméně 3,7 GBq na miligram thallia.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirý bezbarvý roztok.

*Poločas přeměny a druh záření thallia-201*. Viz *Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů* (5.7).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Hodnocení*. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,135 MeV, 0,166 MeV a 0,167 MeV. Rtg záření má energie 0,069 MeV až 0,083 MeV.

B. Hodnotí se elektroforegram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota, viz *Zkoušky na čistotu*. Rozdělení aktivity je zároveň zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Hodnota pH* (2.2.3). 4,0 až 7,0.

#### Thallium

*Zkoušený roztok*. K 0,5 ml se přidá 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové (220 g/l HCl), 0,05 ml *bromové vody R* a promíchá se. Přidá se 0,1 ml roztoku *kyseliny sulfosalicylové R* (30 g/l); po odbarvení se přidá 1,0 ml roztoku *rhodaminu B R* (1 g/l), 4 ml *toluenu R* a 1 min se protřepává. Oddělí se toluenová vrstva.

*Porovnávací roztok*. Připraví se současně a stejným způsobem za použití 0,5 ml základního roztoku *thallia* (10 μg Tl/ml).

Toluenová vrstva zkoušeného roztoku není zbarvena intenzivněji než toluenová vrstva porovnávacího roztoku

**Sterilita**. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

#### RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**Thallium-201**. Nejméně 97,0 % celkové aktivity.

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

Stanoví se relativní obsah thallia-200, thallia-201, thallia-202, olova-201 a olova-203 a ostatních přítomných radionuklidových nečistot.

*Hodnocení*. Nejvýše 2,0 % celkové aktivity odpovídají thalliu-202.

#### RADIOCHEMICKÁ ČISTOTA

**Thallium-201 ve formě thallných iontů**. Zónová elektroforeza (2.2.31).

Použije se vhodný proužek acetátu celulosy jako nosič a roztok *dinatrium-edetátu R* (18,6 g/l) jako elektrolyt. Proužek se 45 min až 60 min namáčí v elektrolytu, pak se pinzetou vyjme pouze za vnější konce, umístí se mezi dvě absorpční podložky a přebytečný roztok se odstraní.

*Zkoušený roztok*. Smíchají se stejné objemové díly zkoušeného přípravku a elektrolytu.

Nanese se nejméně 5 μl zkoušeného roztoku do středu proužku a označí se místo nanesení. Nejméně 10 min se nechá působit elektrické pole 17 V/cm, proužek se usuší na vzduchu a distribuce aktivity se stanoví za použití vhodného zařízení.

*Hodnocení*. Nejméně 95,0 % aktivity migruje směrem ke katodě.

#### STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Aktivita se změří kalibrovaným přístrojem.

#### NEČISTOTY

- A. olovo-201,
- B. olovo-203,
- C. thallium-200,
- D. thallium-202,
- E. [<sup>201</sup>Tl]thallitý iont.

## XENONI (<sup>133</sup>Xe) SOLUTIO INIECTABILIS

7.0:0133

### Xenon-(<sup>133</sup>Xe) injekční roztok

#### DEFINICE

Je to sterilní roztok xenonu-133, který může být izotonizován přidavkem chloridu sodného.

*Xenon-133*. 80 % až 130 % deklarované aktivity xenonu-133 k datu a hodině uvedeným v označení na obalu.

Přípravek je v obalu, který umožňuje manipulaci s obsahem bez vzniku vzduchových bublin. Obal je zcela naplněn a přítomné bubliny plynu nezaujímají více než 1 % objemu přípravku; určí se vizuálním porovnáním s vhodným standardem.



## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirý bezbarvý roztok.

*Polčas přeměny a druh záření xenonu-133.* Viz Tabulku fyzikálních vlastností radionuklidů (5.7).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Porovnání.* Referenční roztok xenonu-133 v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

*Hodnocení.* Nejvíce zastoupený foton gama xenonu-133 má energii 0,081 MeV a je doprovázen rtg zářením (vznikajícím v důsledku vnitřní konverze), které má energie 0,030 MeV až 0,035 MeV.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Hodnota pH** (2.2.3). 5,0 až 8,0.

**Sterilita.** Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca* (0125). Přípravek se může uvolnit do použití před dokončením zkoušky.

## RADIONUKLIDOVÁ ČISTOTA

**A.** Spektrometrie záření gama a rtg záření.

*Porovnání.* Referenční roztok xenonu-133 v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

*Hodnocení.* Spektrum zkoušeného roztoku se významně neliší od spektra referenčního roztoku xenonu-133

v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), kromě rozdílů způsobených přítomností xenonu-131m a xenonu-133m.

**B.** 2 ml zkoušeného přípravku se převedou do otevřené baňky a 30 min se probublávají vzduchem při dodržení vhodných opatření proti rozptýlení radioaktivity. Změří se zbytková beta a gama aktivita roztoku, která se významně neliší od aktivity pozadí zaznamenané přístrojem.

## STANOVENÍ RADIOAKTIVITY

Zváží se obal s obsahem, stanoví se celková aktivita za použití vhodného zařízení a porovná se s referenčním roztokem xenonu-133 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku při dodržení přesně stejných podmínek měření. Při použití ionizační komory by se mělo dbát na to, aby stěny komory příliš nezeslabovaly záření. Oddělí se nejméně polovina obsahu a obal se opět zváží. Změří se aktivita obalu a zbylého obsahu, jak je popsáno výše, a vypočítá se aktivita xenonu-133 ve zkoušeném přípravku.

## UPOZORNĚNÍ

*Významné množství xenonu-133 může být přítomno na uzávěru a na stěnách obalu, proto se s ním musí počítat při dodržování pravidel týkajících se převozu a skladování radioaktivních látek a při manipulaci s použitými obaly.*

## NEČISTOTY

A. xenon-131m.

# ROSTLINNÉ DROGY A PŘÍPRAVKY Z ROSTLINNÝCH DROG

## ÚVOD

7.0 až 7.2:90029

Z praktických důvodů a pro zlepšení práce uživatelů Evropského lékopisu jsou články rostlinných drog a přípravků z rostlinných drog uvedeny v následující části.

Tento přehled není úplný a není zamýšlen jako regulační předpis pro rostlinné materiály. Je založen na definicích uvedených v obecných člancích Rostlinné drogy (1433) a Přípravky z rostlinných drog (1434) a určen výhradně pro zjednodušení práce uživatelů.

## ABSINTHII HERBA

7.1:1380

### Pelyňková nať

#### DEFINICE

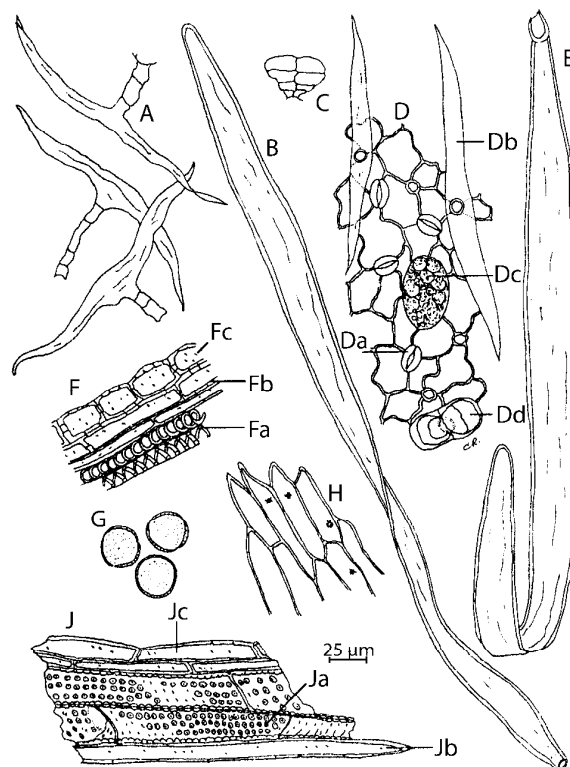
Jsou to usušené celé nebo řezané přízemní listy nebo kvetoucí málo olistěné vrcholky druhu *Artemisia absinthium* L. nebo jejich směs.

**Obsah.** Nejméně 2 ml/kg silice, počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou naředlé nebo nazelenalé, na obou stranách plstnaté. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté s trojúhelníkovitou nebo oválnou čepelí, dvakrát až třikrát peřenosečnou, úkrojky listu jsou okrouhlé až kopinaté. Na stonku jsou listy méně dělené, v horní části jsou kopinaté. Stonek je v horní části zelenošedý, plstnatý, o průměru až 2,5 cm, obvykle s pěti plochými podélnými rýhami. Květenství je uspořádáno v přímé latě. Na bázi každé větvičky jsou kopinaté až slabě peřenodílné listeny. Úbory jsou kulovité až ploše kulovité o průměru 2 mm až 4 mm. Zákrov je šedě plstnatý, vnější lístky jsou čárkovité, vnitřní vejčité, na konci suchomázdčitě. Lůžko s velmi dlouhými pentlicovitými chlupy až 1 mm nebo i několik mm dlouhými. Četné oboupohlavně žluté trubkovité květy jsou asi 2 mm dlouhé, žlutých paprscitých květů je malý počet.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné krycí chlupy tvaru písmene T [A] s krátkou jednořadou jednobuněčnou až pětibuněčnou nohou tvořenou malými buňkami a na ní kolmo nasazenou velmi dlouhou koncovou buňkou na obou koncích zúženou; úlomky pokožky z plošného pohledu [D] se stěnami vlnitými nebo zprohýbanými, průduchy anomocytické (2.8.3) [Da], krycí chlupy [Db] a žláznaté chlupy obsahující silici [Dc] nebo neobsahující silici [Dd], každý s krátkou dvouřadou dvoubuněčnou nohou a dvouřadou dvoubuněčnou nebo čtyřbuněčnou hlavičkou; volné žláznaté chlupy v podélném pohledu [C]; úlomky trubkovitých a paprscitých květů, některé obsa-

hující malé drúzy kalcium-oxalátu [H]; četné pentlicovité chlupy, každý tvoří malá bazální buňka a velmi dlouhá (asi 1 mm až 1,5 mm) tenkostěnná válcovitá buňka, buď celá [E], nebo jen koncová část [B]; kulovitá pylová zrna o průměru asi 30  $\mu\text{m}$  se třemi klíčovými póry a jemně bradavčitou exinou [G]; úlomky svazků vláken z listů [F] nebo stonků [J] skládajících se ze šroubovitě nebo prstencovitě ztlustlých cév [Fa], nebo z větších tečkovaně ztlustlých cév [Ja], vláken [Fb, Jb] a parenchymatických buněk s mírně ztlustlými tečkovanými stěnami [Fc, Jc].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové pelyňkové natě

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 50 ml vroucí vody R a nechají se stát 5 min za občasného protřepávání. Po ochlazení se přidá 5 ml roztoku octanu olovnatého R (100 g/l), promíchá se a zfiltruje. Baňka a zbytek na filtru se promyjí 20 ml vody R. Filtrát se protřepe s 50 ml dichlormethanu R, organická vrstva se oddělí a vysuší se nad síranem sodným bezvodým R, zfiltruje se a filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml ethanolu 96% R.

**Porovnávací roztok.** 2 mg červeně methylové R a 2 mg resorcinolu R se rozpustí v 10,0 ml methanolu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů acetonu R, kyseliny octové ledové R, toluenu R a dichlormethanu R (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 10  $\mu\text{l}$ ; do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Postříká se *acetanhydridem* v *kyselině sírové RS* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (*artabsin*) v poloze odpovídající poloze těsně nad červenou skvrnou (červeně methylová) na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Vrstva se zahřívá 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině červená skvrna (červeně methylová) a pod ní světle růžová skvrna (*resorcinol*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní červená nebo hnědočervená skvrna (*absinthin*) s hodnotou  $R_f$  odpovídající skvrně *resorcinolu* na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny, které jsou méně intenzivní než skvrna *absinthinu*.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % stonků o průměru větším než 4 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 10 000.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 1000 ml baňce s kulatým dnem za použití 50,0 g řezané drogy a 500 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R* a destiluje se nejméně 3 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

## ACACIAE GUMMI

6.3:0307

### Arabská klovatina

#### DEFINICE

Je to na vzduchu ztvrdlá klovatina vytékající samovolně nebo získaná po naříznutí kmene a větví druhu *Acacia senegal* L. WILLD., jiných druhů rodu *Acacia* afrického původu a druhu *Acacia seyal* DEL.

#### VLASTNOSTI

Je velmi zvolna (asi po 2 h) a téměř úplně rozpustná ve dvojnásobné hmotnosti vody. Rostlinné částice mohou být přítomny jen ve velmi malém množství; získaná tekutina (sliz) je bezbarvá nebo nažloutlá, hustá, viskózní, lepivá, průsvitná, na papír lakmusový modrý reaguje slabě kyselě. Je prakticky nerozpustná v *ethanolu 96%*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Okrouhlé, oválné nebo ledvinovité kousky (kapky) o průměru asi 1 cm až 3 cm. Jsou nažloutlé, žluté nebo světle jantarové, občas s nařůžovělým odstínem, drobné, neprůhledné, na povrchu často popraskané, snadno se lámající na nepravidelné bělavé nebo lehce nažloutlé hranaté úlomky, sklovité, průhledné; lom je lasturovitý. Ve střední části celých nerozlámaných kapek je občas drobná dutina.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je bílý nebo nažloutlý. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: hranaté nepravidelné bezbarvé průhledné úlomky. Mohou být patry jen stopy škrobu nebo rostlinných tkání. Nejsou přítomny vrstevnaté membrány.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Glukosa a fruktosa* (viz *Zkoušky na čistotu*).
- Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny odpovídající *galaktose*, *arabinose* a *rhamnose*; zejména v horní části chromatogramu nejsou zřetelné žádné další důležité skvrny.
- D.** 1 g práškové drogy (355) (2.9.12) se častým mícháním po dobu 2 h rozpustí ve 2 ml *vody R* a přidají se 2 ml *ethanolu 96% R*. Po protřepání vznikne bílý rosovitý sliz; po přidání 10 ml *vody R* vznikne tekutina.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 3,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se mícháním po dobu 30 min rozpustí ve 25 ml *vody R*. Nechá se 30 min stát a zředí se *vodou R* na 30 ml.

**Nerozpustné látky.** Nejvýše 0,5 %. K 5,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 100 ml *vody R* a 14 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a mírně se vaří 15 min za častého protřepávání. Ještě horký roztok se filtruje přes předem zvážený filtr ze slinutého skla (2.1.2). Filtr se promyje horkou *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 25 mg.

**Glukosa a fruktosa.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27). *Zkoušený roztok.* K 0,100 g práškové drogy (355) (2.9.12) v silnostěnné odstředivkové zkumavce se přidají 2 ml roztoku *kyseliny trifluoroctové R* (100 g/l) a intenzivně se protřepává, aby se rozpustil vznikající gel, zkumavka se uzavře a směs se 1 h zahřívá při 120 °C. Hydrolyzát se odstředí a čirá supernatantní tekutina se opatrně převede do 50 ml baňky, přidá se 10 ml *vody R* a odpaří se do sucha za sníženého tlaku. Ke vzniklému čirému filmu se přidá 0,1 ml *vody R* a 0,9 ml *methanolu R* a odstředí se, aby se oddělila amorfní sraženina. V případě potřeby se supernatantní tekutina zředí *methanolem R* na 1 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *arabiny R*, 10 mg *galaktosy R*, 10 mg *glukosy R*, 10 mg *rhamnosy R* a 10 mg *xylosy R* se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R* (16 g/l), *butan-1-olu R* a *acetonu R* (10 + 40 + 50).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení A.** Po dráze 10 cm.

**Sušení A.** Několik minut v proudu teplého vzduchu.

**Vyvíjení B.** Po dráze 15 cm, stejnou mobilní fází jako při vyvíjení A.

**Sušení B.** 10 min při 110 °C.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 10 min při 110 °C.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je pět zřetelně oddělených barevných skvrn odpovídajících galaktose (šedozelená nebo zelená), glukose (šedá), arabinose (žlutozelená), xylose (zelenošedá nebo žlutošedá) a rhamnose (žlutozelená) v pořadí vzrůstající hodnoty  $R_f$ . Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná šedá nebo šedozelená skvrna v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami galaktosy a arabinosy na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Škrob, dextrin a agar.** 10 ml roztoku S se zahřeje k varu a po ochlazení se přidá 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*; nevznikne modré nebo červenohnědé zbarvení.

#### Slizy z rostlin rodu *Sterculia*

**A.** K 0,2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se v 10ml odměrném válci se zabroušenou zátkou děleném po 0,1 ml přidá 10 ml *ethanolu 60% (V/V) R a protřepe se*; objem vzniklého gelu je nejvýše 1,5 ml.

**B.** K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 100 ml *vody R*, protřepe se a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 5,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS*.

**Třísloviny.** K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *chloridu železitého RS1*; vznikne rosolovitá sraženina; sraženina ani roztok se však nezbarví tmavě modře.

**Tragant.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Glukosa a fruktosa (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není zelenošedá nebo žlutošedá skvrna odpovídající skvrně xylosy na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 4,0 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti  $10^4$  CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti  $10^2$  CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

#### FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

*Následující část poskytuje informace o těch charakteristikách látky, které se uznávají jako významné kontrolní parametry z hlediska jedné nebo více funkcí látky použité jako pomocná (viz obecnou část 5.15). Tato část není povinnou*

*částí článku a není nutné ověřovat tyto charakteristiky k prokázání shody. Jejich kontrolou se však může přispět k jakosti léčivých přípravků zlepšením shodnosti výrobního postupu a účinku přípravku při použití. Tam, kde se uvádějí kontrolní metody, jedná se o metody uznávané pro daný účel, ale mohou se použít i jiné metody. Kdekoliv se udávají výsledky jednotlivých charakteristik, musí se uvést použitá kontrolní metoda.*

*Následující charakteristiky mohou být významné pro arabskou klovatinu použitou jako látka zvyšující viskozitu a/nebo suspenzní prostředek ve vodných přípravcích.*

**Zdánlivá viskozita.** Stanoví se dynamická viskozita s roztokem arabské klovatiny (100 g/l, počítáno na vysušenou látku) za použití kapilárního viskozimetru (2.2.9) nebo rotačního viskozimetru (2.2.10).

## ACANTHOPANACIS GRACILISTYLI CORTEX

7.3:2432

### Kůra akantopanaxu štíhlostopkého

#### DEFINICE

Je to usušená kůra kořene druhu *Eleutherococcus gracilistylus* (W. W. SM.) S. Y. HU var. *nodiflorus* (DUNN) H. OHASHI (*Acanthopanax gracilistylus* W. W. SM.) sbíraná v létě a na podzim.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Kůra je asi 2 mm silná, stočená do nepravidelných 5 cm až 15 cm dlouhých rourek o průměru 0,4 cm až 1,4 cm. Svrchní strana je šedohnědá s mírně zkroucenými podélnými rýhami a příčnými jizvami podobnými lentice-lám. Vnitřní strana je světle žlutá nebo šedožlutá, jemně podélně rýhovaná. Kůra je lehká, křehká a snadno se láme. Lom je nepravidelný, šedobílý.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: drůzy kalcium-oxalátu o průměru 8 µm až 64 µm, někdy v průvodních buňkách uspořádaných do řad; buňky korku obdélníkové nebo mnohohranné, tenkostěnné, někdy jsou stěny korkových buněk ve starší kůře nepravidelně ztlustlé, lehce tečkované; úlomky sekrečních kanálků s bezbarvým nebo světle žlutým obsahem. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*. V práškové droze jsou četná, mnohohranná nebo téměř kulatá, jednoduchá nebo složená (dvoučetná až desetičetná) škrobová zrna o průměru 2 µm až 8 µm.

**C.** Hodnotí se chromatogram ze zkoušky *Periploca sepium* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
thymol: oranžová skvrna	
borneol: hnědá skvrna	široká růžová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Periploca sepium.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 0,3 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidají 3 ml *methanolu R*, zahřívá se 1 min ve vodní lázni při 60 °C a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *thymolu R* a 8 mg *borneolu R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *dichlormethanu R* (2 + 98).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 1 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min při 105 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou žádné intenzivně zbarvené skvrny v poloze odpovídající poloze nad skvrnou borneolu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Acanthopanax giraldii.** Svrchní strana kůry kořene nesmí být pokryta šupinkovitými krycími chlupy.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

**Extrahovatelné látky.** Nejméně 16,0 %.

Ke 2,000 g práškové rostlinné drogy (250) (2.9.12) se přidá směs 8 g *vody R* a 12 g *ethanolu 96% R*, nechá se macerovat 2 h za častého protřepávání a zfiltruje se. Filtrát se odpaří ve vakuu na vodní lázni do sucha a suší se 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku po vysušení je nejméně 320 mg.

## AGAR

6.3:0310

## Agar

## DEFINICE

Je to směs polysacharidů z různých druhů řas třídy *Rhodophyceae*, zejména rodu *Gelidium*. Vyrábí se extrakcí řas vroucí vodou. Výtažek se za horka zfiltruje, zahustí a usuší.

## VLASTNOSTI

**Vzhled.** Vyskytuje se ve formě prášku nebo stlačených proužků 2 mm až 5 mm širokých nebo někdy ve vločkách. Je bezbarvý nebo světle žlutý, průsvitný, houževnatý, nenasadno lámavý, po usušení je křehčí.

Agar má slizovitou chuť.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Pozoruje se pod mikroskopem. Proužky nebo vločky vložené do *jodu 0,005 mol/l RS* se částečně zbarví hnědofialově. Při stonásobném zvětšení jsou patrná četná drobná bezbarvá vejčitá nebo okrouhlá zrna na amorfním pozadí; ojediněle mohou být přítomné hnědé okrouhlé nebo vejčité spory, na povrchu síťovité, o průměru až 60 µm. Je-li třeba, droga se upráškuje; prášek je žluto bílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *jodu 0,005 mol/l RS*; prášek je tvořen hranatými úlomky s četnými zrny vzhledem podobnými těm, která lze pozorovat v proužcích a vločkách. Některé úlomky jsou zbarveny hnědofialově.
- B.** 0,1 g se rozpustí zahřátím v 50 ml *vody R*. Po ochlazení se k 1 ml slizu opatrně přidají 3 ml *vody R* tak, aby vznikly dvě oddělené vrstvy. Přidá se 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*. Rozhraní vrstev se zbarví tmavě hnědofialově. Po protřepání se tekutina zbarví světle žlutě.
- C.** 5 ml slizu ze Zkoušky totožnosti B se zahřívá 30 min na vodní lázni s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1*. Do 30 min vznikne bílý zákal.
- D.** 0,5 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 50 ml *vody R*. Zůstane pouze několik nerozpuštěných úlomků. Tekutina se nechá zvolna chladnout; při 35 °C až 30 °C přechází v gel. Tento gel při zahřívání na vodní lázni netaje při teplotě nižší než 80 °C.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 10; nalezená hodnota se liší od deklarované hodnoty nejvýše o 10 %. Stanoví se s práškovou drogou (355) (2.9.12).

**Nerozpustné látky.** 5,00 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 100 ml *vody R* a 14 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Vaří se mírně 15 min za častého míchání a za horka se zfiltruje přes předem zvážený filtr ze slinutého skla (160) (2.1.2). Filtr se promyje horkou *vodou R* a suší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 50 mg (1,0 %).

**Želatina.** 1,00 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni ve 100 ml *vody R* a ochladí se na 50 °C. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *trinitrofenolu RS*; do 10 min nevznikne zákal.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 20,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Mikrobiální kontaminace:**

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti  $10^3$  CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti  $10^2$  CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede číslo bobtnavosti.

**AGNI CASTI FRUCTUS**

6.2:2147

**Drmkový plod**

**DEFINICE**

Je to celý zralý usušený plod druhu *Vitex agnus castus* L. *Obsah*. Nejméně 0,08 % kasticinu ( $C_{19}H_{18}O_8$ ;  $M_r$  374,3), počítáno na vysušenou drogu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Plod je oválný nebo téměř kulovitý, o průměru až 5 mm. Kalich je vytrvalý, zelenošedý, jemně ochmýřený, na konci se čtyřmi až pěti krátkými cípy. Kalich kryje dvě třetiny až tři čtvrtiny povrchu plodu. Plod je černohnědý, pokožka vnějšího oplodí rychle přechází do sklerenchymatické vnitřní vrstvy oplodí. Na temeni plodu je často patrná jizva po čnělce. Některé plody mohou mít asi 1 mm dlouhou stopku. Na příčném řezu jsou patrná čtyři pouzdra, každé s protáhlým semenem.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je

charakteristická těmito znaky: úlomky zevní pokožky kalicha z mnohohranných buněk hustě pokrytých krátkými, pentlicovitými nebo zkroucenými jednobuněčnými, dvoubuněčnými nebo třibuněčnými jednořadými krycími chlupy; buňky epikarpu se ztlustlými stěnami a zřetelnými velkými dvůrky; jednotlivé žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a jednobuněčnou nebo mnohobuněčnou hlavičkou; vrstvy parenchymu ze svrchní části mezokarpu, některé z nich obsahují hnědý pigment, jiné zasahují do septa; úlomky vnitřní části mezokarpu z tenkostěnných, tečkovaných sklerenchymatických buněk a typických izodiametrických sklereid se silně ztlustlými, hluboce zprohýbanými stěnami a úzkým hvězdicovitým lumenem; malé hnědé buňky endokarpu; úlomky osemení s plochami velkých tenkostěnných zdřevnatělých buněk, se síťovitě ztlustlými pruhy; četné úlomky endospermu z tenkostěnných parenchymatických buněk obsahujících aleuronová zrna a kapky oleje.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R*, zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C; po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok*. 0,5 mg *aukubinu R* a 1 mg *agnusidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 1,0 ml.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (5 μm až 40 μm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 μm až 10 μm)].

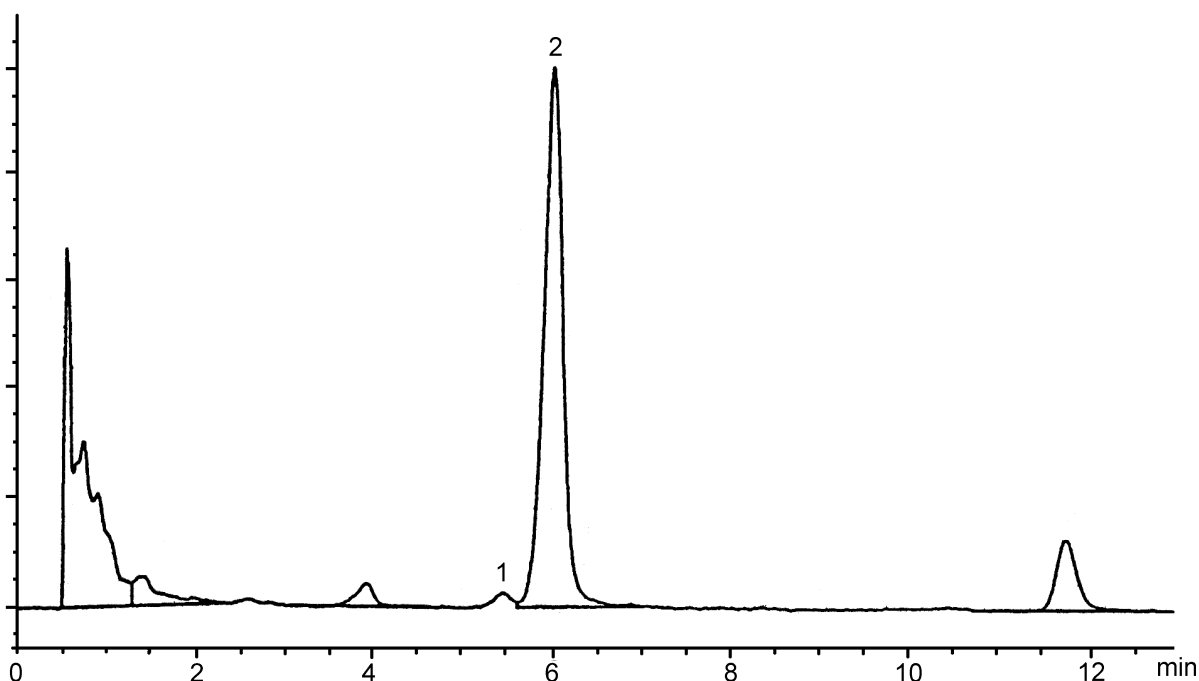
*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (8 + 15 + 77).

*Nanášení*. 10 μl [nebo 8 μl], do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 8 cm [nebo 5 cm].

*Sušení*. Na vzduchu.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



**Obr. 1** Chromatogram zkoušeného roztoku pro Stanovení obsahu kasticinu v drmkovém plodu  
1 = penduletin 2 = kasticin

*Detekce.* Postříká se kyselinou mravenčí R, zahřívá se 10 min při 120 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další skvrny.

Horní okraj desky	
agnusid: modrá skvrna	modrá skvrna (agnusid)
aukubin: modrá skvrna	modrá skvrna (aukubin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 3,0 %.

**Jiné druhy rodu *Vitex*, zejména druhu *Vitex negundo*.**

Nejsou přítomné plody jiných druhů s větším průměrem.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 5,0 %.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 40 ml *methanolu R* a 2 min se extrahuje ve vhodném homogenizátoru. Supernatantní tekutina se zfiltruje do 250ml baňky. Extrakce se opakuje s dalšími 40 ml *methanolu R* a supernatantní tekutina se zfiltruje do téže 250ml baňky. Zbytek se opatrně promyje malým množstvím *methanolu R*. Methanolvé extrakty a promývací tekutiny se spojí a odpaří se do sucha ve vakuu ve vodní lázni při teplotě nepřesahující 30 °C. Zbytek se rozpustí za použití ultrazvukové lázně v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml. Roztok se zfiltruje přes membránový filtr (0,45 µm). 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 100,0 mg *drmkového plodu standardizovaného suchého extraktu CRL* se za použití ultrazvukové lázně po dobu 20 min rozpustí ve 20,0 ml *methanolu R*, zředí se stejným rozpouštědlem na 25,0 ml a zfiltruje se přes membránový filtr (0,45 µm).

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,125 m, vnitřní průměr 3,0 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel oktadecylsilylovaný pro chromatografii R (3 µm);
- *teplota:* 25 °C.

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* roztok kyseliny fosforečné R (5,88 g/l);
- *mobilní fáze B:* *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–13	50 → 35	50 → 65
13–18	35 → 0	65 → 100
18–23	0 → 50	100 → 50

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 348 nm.

*Nástřik.* 10 µl.

*Test způsobilosti,* zkoušený roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem penduletinu a píkem kasticinu (viz obrázek 1).

Obsah kasticinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot p_1 \cdot 8}{F_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku kasticinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku kasticinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použitou k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *drmkového plodu standardizovaného suchého extraktu CRL* použitou k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p_1$  – obsah kasticinu v *drmkovém plodu standardizovaném suchém extraktu CRL* v procentech.

AGRIMONIAE HERBA

7.0:1587

Řepíková nať

DEFINICE

Jsou to usušené kvetoucí vrcholky druhu *Agrimonia eupatoria* L.

*Obsah.* Nejméně 2,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 126,1), počítáno na vysušenou drogu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Stonek je zelený nebo většinou načervenalý, válcovitý, nepravidelně větvený. Je pokryt dlouhými přímými nebo zahnutými chlupy. Listy jsou peřenodílné se třemi až šesti většími páry vstříčných lístků, se dvěma až třemi páry menších lístků mezi nimi. Lístky jsou na svrchní straně tmavě zelené, na spodní straně našedlé plstnaté, na okraji hluboce zubaté až pilovité. Drobné pětičetné květy vyrůstající v paždí chlupatých listenů tvoří koncový klas. Kalich je nahoře uzavřen koncovými hákovitými štětinami, které tvoří okraj chlupatého receptakula. Korunní lístky jsou volné, žluté a opadavé. Plod je obřáčeně kuželovitá češule s hlubokými žebry a hákovitými štětinami. Většinou se vyskytuje v dolní části květenství.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený nebo šedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydratu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné přímé nebo zahnuté jednobuněčné dlouhé ztlustlé krycí chlupy o délce asi 500 µm [Ab, Ca, F], jemně bradavčité a někdy šroubovitě, často polámané [F]; úlomky pokožky stonků [A] s průduchy [Aa], krycími chlupy [Ab] a žláznatými chlupy [Ac]; úlomky pokožky svrchní strany listu v plošném pohledu [C] s rovnými stěnami s krycími chlupy [Ca] a s palisádovým parenchy-

mem [Cb], s některými buňkami obsahujícími krystaly kalcium-oxalátu [Cc]; úlomky pokožky spodní strany listu v plošném pohledu [J] z buněk se stěnami zprohýbanými, s četnými průduchy [Ja] většinou anomocytickými (2.8.3), někdy i anisocytickými a žláznatými chlupy [Jb]; vejčitá až okrouhlá pylová zrna se třemi póry a hladkou exinou [D]; žláznaté chlupy s mnohobuněčnou jednořadnou nohou a jednobuněčnou až čtyřbuněčnou hlavičkou [B, Jb]; úlomky stonku [H] se skupinami vláken [Ha] a parenchymatickými buňkami, z nichž některé obsahují shluky krystalů kalcium-oxalátu [Hb]; malé šroubovitě cévy z lístků [G]; úlomky velkých šroubovitě nebo dvůrkovitě ztlustlých cév ze stonku [E].

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

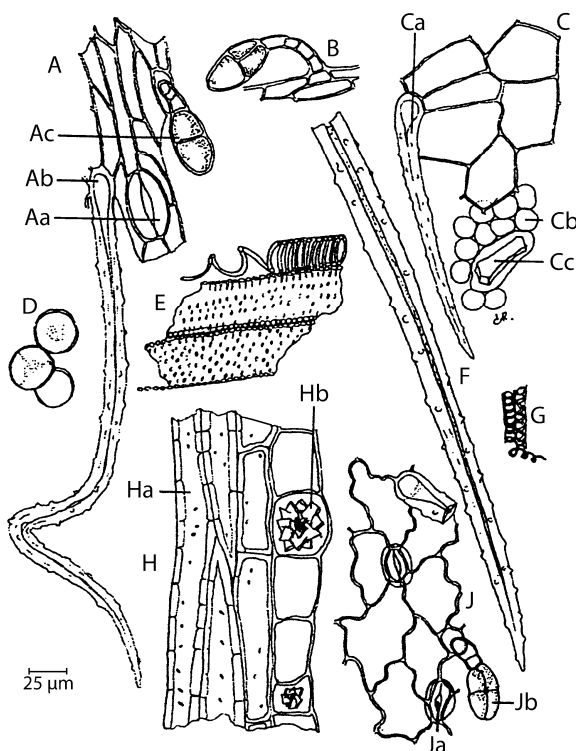
**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 20 ml *methanolu R*, zahřívá se 10 min při 40 °C za protřepávání a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *rutinu R* a 1,0 mg *isokvercitrinu R* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové natě řepíkové natě

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě teplá deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se na vzduchu 30 min. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
isokvercitrin: oranžově fluoreskující skvma	oranžově fluoreskující skvma může být patrná (kvercitrin)
fluoreskující skvma	oranžově fluoreskující skvma (isokvercitrin)
rutin: oranžově fluoreskující skvma	oranžově fluoreskující skvma (hyperosid)
	oranžově fluoreskující skvma (rutin)
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14) s 1,000 g práškové drogy (180) (2.9.12).

## ALCHEMILLAE HERBA

6.0:1387

### Kontryhelová nať

#### DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Alchemilla vulgaris L. sensu latiore*.

**Obsah.** Nejméně 6,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Drogu tvoří převážně šedozelené, částečně hnědozelené dlouze řapíkaté listy přizemní růžice se sedmilaločnou až devítialočnou nebo jedenáctialočnou čepelí ledvinitého, až mírně polokruhového tvaru, o průměru až 8 cm, zřídka až 11 cm. Listy stonku jsou menší, krátce řapíkaté nebo přisedlé, pětialočné až devítialočné, na bázi s párem velkých palistů. Listy jsou zvláště na spodní straně chlupaté, okraj listu je hrubě zubatý. Mladé listy složené v záhyby jsou bělostříbřitě chlupaté; starší listy jsou na svrchní straně olysalé s jemnou síťovitou žilnatinou vyniklou zejména na spodní straně listu. Šedozelený nebo žlutozelený řapík je chlupatý, o průměru asi 1 mm, na vnitřní straně s podélným mělkým žlábkem. Květy jsou čtyřčetné, bezkorunné, žlutozelené nebo světle zelené o průměru asi 3 mm se špičatými až trojúhelníkovitými kališními cípy, střídajícími se s menšími cípy kališku, se čtyřmi krátkými tyčinkami a jednopouzdrým semeníkem s hlavatou bliznou. Šedozelený nebo žlutozelený stonek je ochmýřený, více nebo méně podélně rýhovaný a dutý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: jednobuněčné



úzké chlupy až 1 mm dlouhé, místy zkroucené, špičaté, se silně zdřevnatělými stěnami, někdy protáhlé a tečkované na bázi; úlomky listů se dvěma řadami palisádového parenchymu, horní vrstva je dvakrát až třikrát silnější než spodní vrstva, houbový parenchym obsahuje drúzy šťavelanu vápenatého o průměru až 25 µm; úlomky listu na svrchní straně s buňkami pokožky zprohýbanými až vlnitě zprohýbanými, antiklinální stěny nepravidelně růžencovitě ztlustlé, anomocytické průduchy (2.8.3); cévní svazky a zdřevnatělá vlákna z řapíku a stonku, cévy šroubovitě nebo tečkovaně ztlustlé, příležitostně tenkostěnné kuželovité chlupy asi 300 µm dlouhé; tenkostěnný parenchym obsahující drúzy šťavelanu vápenatého; okrouhlá pylová zrna o průměru asi 15 µm se třemi zřetelnými klíčovými póry a zrnitou exinou; někdy úlomky stěny semeníku obsahující jednotlivé krystaly šťavelanu vápenatého.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem při 70 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny kávové R* a 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (8 + 8 + 84).

**Nanášení.** 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku; do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** 5 min při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Deska se suší na vzduchu asi 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny ještě další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: světlá modře fluoreskující skvrna	dvě červeně fluoreskující skvrny (chlorofyl) jedna nebo dvě intenzivní světlé modře fluoreskující skvrny jedna nebo více intenzivních zeleně nebo zelenožlutě fluoreskujících skvrn
kyselina chlorogenová: světlá modře fluoreskující skvrna	intenzivní žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 12,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,50 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**ALLII SATIVI BULBUS PULVERATUS**

**6.0:1216**

Cibule česneku setého práškováná

*Synonymum.* Allii sativi bulbi pulvis

**DEFINICE**

Získává se z cibule druhu *Allium sativum* L. řezáním, vymrazováním nebo sušením při teplotě nepřevyšující 65 °C a práškováním.

**Obsah.** Nejméně 0,45 % *allicinu* (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>OS<sub>2</sub>; M<sub>r</sub> 162,3), počítáno na vysušenou drogu.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Slabě nažloutlý prášek.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*.

Jsou patrné četné úlomky parenchymu a skupiny šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlých cév provázených tenkostěnným parenchymem.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g zkoušené drogy se smíchá s 5,0 ml *methanolu R*, protřepává se 60 s a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *alaninu R* se rozpustí v 10 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 20 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *propan-1-olu R*, *vody R* a *ethanolu bezvodého R* (20 + 20 + 20 + 40).

**Nanášení.** 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku; do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se roztokem *ninhydrinu R* (2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *butan-1-olu R* (5 + 95) a zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °C až 110 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině fialová skvrna (alanin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je fialová nebo hnědočervená skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *alliiinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku; v poloze nad a pod touto skvrnou jsou další obvykle slabě fialové skvrny.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Škrob.** Droga se pozoruje pod mikroskopem ve *vodě R*; po přidání *jodu RS1* nevznikne modré zbarvení.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 7,0 %; 1,000 g drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29). Stanovení se provádí co nejrychleji.

*Roztok vnitřního standardu.* 20,0 mg butylparabenu CRL se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů methanolu R a vody R a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.

*Zkoušený roztok.* 0,800 g zkoušené drogy se smíchá s 20,0 ml vody R a homogenizuje se 5 min v ultrazvukové lázni při 4 °C. Pak se nechá stát 30 min při teplotě místnosti a potom se 30 min odstředí. 10,0 ml supernatantní tekutiny se zředí na 25,0 ml směsí objemových dílů roztoku kyseliny mravenčí bezvodé R 1% (V/V) a methanolu R (40 + 60) (zásobní roztok). Protřepe se 5 min se odstředí. Do odměrné baňky se převede 0,50 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se zásobním roztokem na 10,0 ml.

*Předkolona:*

- *rozměry:* délka 20 mm, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze:* silanizovaný silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm).

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 25 mm, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze:* silanizovaný silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku kyseliny mravenčí bezvodé R 1% (V/V) a methanolu R (40 + 60).

*Průtoková rychlost.* 0,8 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

*Nástřik.* 1 μl roztoku vnitřního standardu a 10 μl zkoušeného roztoku, injektorovou smyčkou.

Vypočítá se obsah allicinu v procentech podle vzorce:

$$\frac{S_1 \cdot m_2 \cdot 22,75}{S_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

- $S_1$  – plochu píku allicinu (hlavní pík) na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $S_2$  – plochu píku butylparabenu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- $m_2$  – hmotnost butylparabenu v gramech ve 100,0 ml roztoku vnitřního standardu; 1 mg butylparabenu odpovídá 8,65 mg allicinu.

## ALOE BARBADENSIS

6.0:0257

### Aloe barbadoská

#### DEFINICE

Je to zahuštěná a usušená šťáva z listů druhu *Aloe barbadensis* MILL.

*Obsah.* Nejméně 28,0 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin (barbaloin) (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>; M<sub>r</sub> 418,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tmavohnědá hmota, slabě lesklá nebo matná, lasturovitého lomu nebo hnědý prášek.

*Rozpustnost.* Částečně rozpustná ve vroucí vodě, za horka dobře rozpustná v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,25 g práškované drogy se smíchá s 20 ml methanolu R a zahřeje se ve vodní lázni k varu. Protřepává se několik minut a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

*Porovnávací roztok.* 25 mg aloinu R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu G R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, methanolu R a ethyl-acetátu R (13 + 17 + 100).

*Nanášení.* 10 μl, do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Postříká se roztokem hydroxidu draselného R (100 g/l) v methanolu R a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části žlutě fluoreskující skvrna (aloin) odpovídající svojí polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku a v dolní části je světle modře fluoreskující skvrna (aloesin).

*Detekce B.* Zahřívá se 5 min při 110 °C.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je těsně pod skvrnou odpovídající aloinu fialově fluoreskující skvrna.

- B.** 1 g práškované drogy se protřepává se 100 ml vroucí vody R. Po ochlazení se přidá 1 g mastku R a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g tetraboritanu sodného R a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml vody R. Roztok fluoreskuje žlutozeleně. Fluorescence je zvláště výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.
- C.** 5 ml roztoku ze Zkoušky totožnosti B se smíchá s 1 ml čerstvě připravené bromové vody R; vznikne hnědožlutá sraženina, supernatantní tekutina je zbarvena fialově.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,300 g práškované drogy (180) (2.9.12) se převede do 250ml kuželové baňky. Zvlhčí se 2 ml methanolu R, přidá se 5 ml vody R asi 60 °C teplé a směs se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml vody R asi 60 °C teplé a 30 min se protřepává. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky. Kuželová baňka i filtr se promyjí 20 ml vody R. Promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se vodou R na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml

baňky s kulatým dnem, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu kapaliny v baňce. Nechá se ochladit, roztok se převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml *vody R*, 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 4 ml *vody R*. Promývací tekutiny se přidají k roztoku v dělicí nálevce. Protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Etherové vrstvy se spojí a protřepou se dvakrát 10 ml *vody R*. Dolní vrstva se odstraní a etherová vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Změří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako aloin ( $C_{21}H_{22}O_9$ ), podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 19,6}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorpenci zkoušeného roztoku při 512 nm;

*m* – hmotnost drogy v gramech.

Specifická absorbance aloinu má hodnotu 255.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## ALOE CAPENSIS

6.0:0258

### Aloe kapská

#### DEFINICE

Je to zahuštěná a usušená šťáva z listů některých druhů *Aloe*, zejména *Aloe ferox* MILL. a jejich kříženců.

*Obsah.* Nejméně 18,0 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin (barbaloin) ( $C_{21}H_{22}O_9$ ;  $M_r$  418,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tmavohnědá hmota nazelenalého lesku, lesklého lasturovitého lomu nebo zelenohnědý prášek.

*Rozpustnost.* Částečně rozpustná ve vroucí vodě, za horka dobře rozpustná v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu Aloe barbadoská.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části žlutě fluoreskující skvrna (aloin), která odpovídá polohou poloze hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku. V dolní části chromatogramu jsou dvě žlutě fluoreskující skvrny (aloinosid A a B) a modře fluoreskující skvrna (aloesin).

**B.** 1 g práškové drogy se protřepává se 100 ml vroucí vody *R*. Po ochlazení se přidá 1 g *mastku R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g *tetraboritanu sodného R* a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smí-

chají se 20 ml vody *R*. Roztok fluoreskuje žlutozeleně, fluorescence je zvláště výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.

**C.** 5 ml filtrátu ze Zkoušky totožnosti B se smíchá s 1 ml čerstvě připravené *bromové vody R*; vznikne žlutá sraženina, supernatantní tekutina není fialově zbarvena.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Aloe barbadoská.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,25 g práškové drogy se smíchá s 20 ml *methanolu R* a zahřeje se ve vodní lázni k varu. Protřepává se několik minut a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

*Porovnávací roztok.* 25 mg *aloinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody *R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (13 + 17 + 100).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R*, zahřívá se 5 min při 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není těsně pod skvrnou aloinu fialově fluoreskující skvrna.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.* 0,400 g práškové drogy (180) (2.9.12) se převede do 250ml kuželové baňky. Zvlhčí se 2 ml *methanolu R* a přidá se 5 ml vody *R* asi 60 °C teplé a důkladně se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml vody *R* asi 60 °C teplé a 30 min se protřepává. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky, kuželová baňka a filtr se promyjí 20 ml vody *R*, promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se vodou *R* na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml baňky s kulatým dnem, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se zahřívá 4 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu kapaliny v baňce. Nechá se ochladit, roztok se převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml vody *R*, 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 4 ml vody *R*, a promývací tekutiny se přidají k roztoku v dělicí nálevce. Protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Etherové vrstvy se spojí a protřepou se dvakrát 10 ml vody *R*. Dolní vrstva se odstraní, etherová vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Měří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako aloin ( $C_{21}H_{22}O_9$ ), podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 19,6}{m},$$

v němž značí:

$A$  – absorbanci zkoušeného roztoku při 512 nm;

$m$  – hmotnost drogy v gramech.

Specifická absorbance aloinu má hodnotu 255.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## ALOESE EXTRACTUM SICCUM NORMATUM

6.2:0259

### Aloový extrakt suchý standardizovaný

#### DEFINICE

Je to standardizovaný suchý extrakt vyrobený z barbadoské aloe nebo kapské aloe, nebo z jejich směsi.

*Obsah.* 19,0 % až 21,0 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin (barbaloin) ( $C_{21}H_{22}O_9$ ;  $M_r$  418,4), počítáno na vysušený, je-li třeba upravený, extrakt.

#### VÝROBA

Vyrábí se z rostlinné drogy vhodnými metodami za použití vroucí vody.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědý nebo žlutohnědý prášek.

*Rozpustnost.* Mírně rozpustný ve vroucí vodě.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,25 g se přidá 20 ml *methanolu R* a zahřeje se k varu ve vodní lázni. Několik minut se protřepává a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

*Porovnávací roztok.* 25 mg *aloinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (13 + 17 + 100).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *hydroxidů draselného R* (100 g/l) v *methanolu R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části žlutě fluoreskující skvrna (aloin), v poloze odpovídající poloze hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku, v dolní části chromatogramu je světle modře fluoreskující skvrna (aloesin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být dvě žlutě fluoreskující skvrny (aloinosid A

a B) (kapská aloe); těsně pod skvrnou aloinu může být skvrna fluoreskující fialově (barbadoská aloe).

- B.** 1 g se protřepe se 100 ml vroucí vody *R*. Po ochlazení se přidá 1 g *mastku R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g *tetraboritanu sodného R* a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml vody *R*. Roztok fluoreskuje žlutozeleně. Fluorescence je zvláště výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 4,0 %.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,400 g extraktu se převede do 250ml kuželové baňky, zvlhčí se 2 ml *methanolu R* a přidá se 5 ml vody *R* asi 60 °C teplé a důkladně se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml vody *R* asi 60 °C teplé a protřepává se 30 min. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky. Kuželová baňka i filtr se promyjí 20 ml vody *R*. Promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se vodou *R* na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml baňky s kulatým dnem, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se zahřívá 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Nechá se ochladit, roztok se převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml vody *R*, 4 ml *hydroxidů sodného 1 mol/l RS* a 4 ml vody *R*. Promývací tekutiny se přidají k roztoku do dělicí nálevky a protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se protřepou dvakrát 10 ml vody *R*. Dolní vrstva se odstraní, organická vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Změří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako aloin ( $C_{21}H_{22}O_9$ ), podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 19,6}{m},$$

v němž značí:

$A$  – absorbanci zkoušeného roztoku při 512 nm;

$m$  – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech.

Specifická absorbance aloinu má hodnotu 255.

## ALTHAEAE FOLIUM

7.3:1856

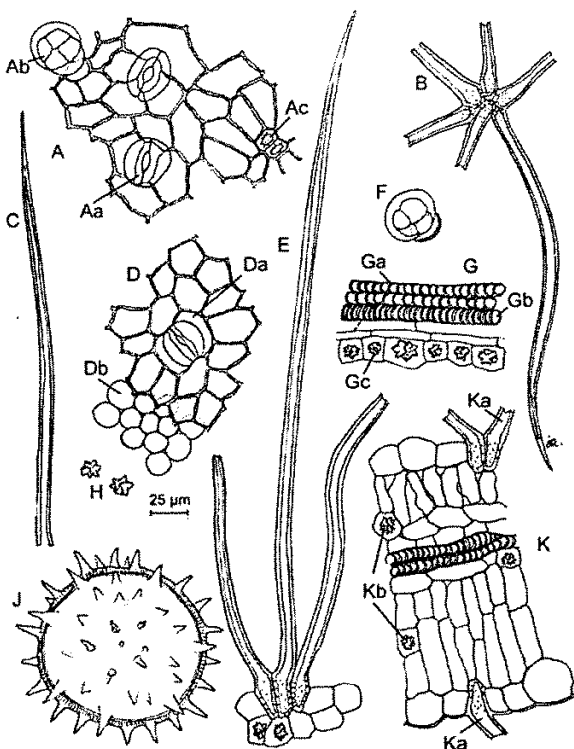
### Proskurníkový list

#### DEFINICE

Je to usušený celý nebo řezaný list druhu *Althaea officinalis L.*

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je dlouze řapíkatý, asi 7 cm až 10 cm dlouhý; srdčitý nebo vejčitý, mělce třílaločný nebo pětilaločný, na okraji vroubkovaný nebo zubatý s dlanitou žilnatinou. Řapík a čepel listu jsou šedozelené, na obou stranách hedvábně plstnaté. Zřídka mohou být přítomny úlomky květů nebo nezralých plodů.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné dlouhé tuhé jednobuněčné krycí chlupy se ztlustlými stěnami, na konci zašpičatělé, často polámané [C], na bázi ohnuté, tečkované, jednobuněčné chlupy jsou někdy až po osmi hvězdotivě sdružené, v plošném pohledu [B] nebo v příčném řezu [E]; zřídka žláznaté chlupy, samostatné s jednobuněčnou nohou a kulovitou mnohobuněčnou hlavičkou [F]; úlomky spodní [A] a svrchní [D] pokožky listu v plošném pohledu s anomocytickými [Aa] nebo paracytickými [Da] průduchy (2.8.3), žláznatými chlupy [Ab] a bazálními buňkami krycích chlupů [Ac], často provázené palisádovým parenchymem [Db]; drúzy kalcium-oxalátu samostatné [H] nebo v parenchymatických buňkách mezofylu [Gc, Kb]; úlomky žilnatiny [G] s malými šroubovitě [Gb] nebo kruhovitě [Ga] ztlustlými cévami často provázené komůrkovými vlákny obsahujícími drúzy kalcium-oxalátu [Gc]; úlomky čepele v příčném řezu [K] s pokožkou s polámanými krycími chlupy [Ka], symetrickým heterogenním mezofylem s některými buňkami obsahujícími drúzy kalcium-oxalátu [Kb]; zřídka kulovitá pylová zrna o průměru asi 150 µm s hrubě ostnitou exinou [J]. Pozoruje se pod mikroskopem v *červení rutheniové RS*. V práškové droze jsou slizové buňky ve skupinách parenchymu zbarveny oranžovočerveně.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového proskurníkového listu

## C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a vaří se 5 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zfiltruje se a filtrát se odpaří za sníženého tlaku na celkový objem asi 2 ml.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *kvercitrinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. **Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*. **Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 27 + 100).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se na vzduchu 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kvercitrin: oranžová skvrna	modře fluoreskující skvrna
	žlutě fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: modře fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna
	oranžově fluoreskující skvrna
	modře fluoreskující skvrna
	oranžově fluoreskující skvrna
	intenzivní žlutě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 4 % listů napadených rzí *Puccinia malvacearum*, která tvoří červené skvrnky, a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 18,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).**

Nejvýše 2,0 %.

**Číslo bobtnavosti (2.8.4).** Nejméně 12; stanoví se s 0,2 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12).**ALTHAEAE RADIX**

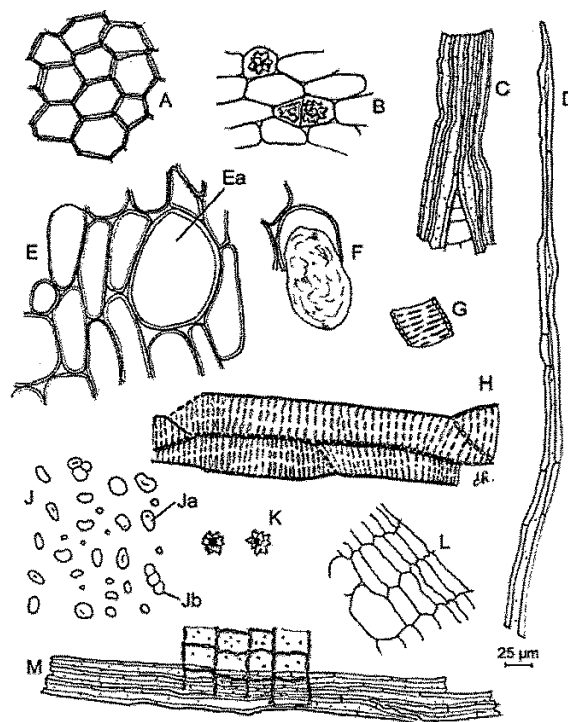
7.3:1126

**Proskurníkový kořen****DEFINICE**

Je to loupaný nebo neloupaný, celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Althaea officinalis* L.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Neloupaná celá droga je tvořena válcovitými, mírně zkroucenými kořeny až 2 cm tlustými, hrubě podélně brázdítky. Na povrchu je šedohnědá, s četnými jizvami po postranních kořenech. Lom je v obvodové části vláknitý, ve vnitřní části nepravidelně zrnitý. Na lomu je patrná více nebo méně silná vrstva bělavé kůry s nahnědlým peridermem; kůra je nahnědlým kambiem zřetelně oddělena od bílé zbarveného dřeva. Po navlhčení je zřetelný vrstevnatý vzhled kůry a paprscitá struktura dřeva. Loupaná droga je na povrchu šedobílá, jemně vláknitá. Korek a zevní vrstva parenchymu kůry chybí.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedohnědý (neloupaný kořen) nebo bělavý (loupaný kořen). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky bezbarvých, převážně nezdřevnatělých, ztlustlých vláken [C, D, M] na konci špičatých nebo rozštěpených [D], někdy provázené parenchymatickými buňkami dřevných paprsků [M], nebo spojených [C]; úlomky dvůrkovitě tečkovaných, nebo síťovitě nebo stupňovitě ztlustlých cév [G, H]; drúzy kalcium-oxalátu o průměru 20 μm až 35 μm, většinou však 25 μm až 30 μm, samostatně [K] nebo v parenchymatických buňkách [B]; úlomky parenchymu [E] s buňkami obsahujícími sliz [Ea, F], u neloupaného kořene úlomky korku s tenkostěnnými, deskovitými buňkami v plošném pohledu [A] a v příčném řezu [L]. Pozoruje se pod mikroskopem v *červení ruteniové RS*. V práškové droze jsou slizové buňky ve skupinách parenchymu zbarveny oranžovočerveně. Pozoruje se pod mikroskopem ve *vodě R*. Prášková droga obsahuje četná škrobová zrna [J] o průměru 3 μm až 25 μm, zřídka s podlouhlým hilem. Škrobová zrna jsou většinou jednotlivá [Ja], někdy dvoučetná až čtyřčetná [Jb].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového proskurníkového kořene

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU****Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 2 % zhnědlé drogy.**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 6,0 % pro loupaný kořen a nejvýše 8,0 % pro neloupaný kořen.**Číslo bobtnavosti (2.8.4).** Nejméně 10; stanoví se s práškovou rostlinnou drohou (710) (2.9.12).**ANGELICAE DAHURICAE RADIX**

7.3:2556

**Kořen děhele dahurského****DEFINICE**

Je to usušený celý nebo rozlámaný kořen druhu *Angelica dahurica* (HOFFM.) BENTH. et HOOK. f. ex FRANCH. et SAV., zbavený kořínků, sbíraný v létě nebo na podzim.

**Obsah.** Nejméně 0,08 % imperatorinu ( $C_{16}H_{14}O_4$ ;  $M_r$  270,28), počítáno na vysušenou drogu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Droga vcelku. Kořeny kuželovité 10 cm až 25 cm dlouhé, o průměru 1,5 cm až 2,5 cm. Kořenová hlava je více či méně čtyřhranná, tupá, na výčnělcích s jizvami po lodyhách. Kořen se zužuje do špičky. Povrch kořene je hnědošedý nebo žlutohnědý, zřetelně podélně zvrásněný, s jizvami po vedlejších kořenech a s bradavčitými příčně uspořádanými výrůstky podobné lenticelám, z nichž některé jsou uspořádány ve čtyřech podélných řadách. Ko-

řen je kompaktní, tvrdý a těžký; lom je bílý nebo bělavě šedý, moučnatý, se soustředným rýhováním a s hnědým kambiálním kruhem. V korové vrstvě jsou na příčném řezu patrné četné hnědé tečky sekrečních kanálků.

- B. Mikroskopické hodnocení (2.8.23).** Prášek je žlutobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: síťovitě ztlustlé zděvnatělé cévy, jednotlivé nebo ve svazcích po dvou až třech, doprovázené zděvnatělým tenkostěnným parenchymem; četné úlomky parenchymu s vejčitými buňkami; málo četné úlomky oranžového několikavrstevného korku; sekreční kanálky, obvykle poškozené, se žlutým nebo světle hnědým obsahem a olejovými kapkami. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R 50% (V/V)*. Jsou patrná velmi četná škrobová zrna o rozměrech 5 µm až 25 µm, některá jsou jednotlivá okrouhlá, jiná dvojčetná až osmičetná, většinou mnohostěnná vzniklá buď rozbitím složených zrn nebo jejich stlačením do buněk.

- C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum* (viz Zkoušky na čistotu).**

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modrobíle fluoreskující skvrna	modrobíle fluoreskující skvrna
osthol: modře fluoreskující skvrna	bělavě fluoreskující skvrna
imperatorin: bělavě fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna
	bělavě fluoreskující skvrna (imperatorin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě žhášející skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modře fluoreskující skvrna	slabá žhášející skvrna
osthol: žhášející skvrna	žhášející skvrna
imperatorin: žhášející skvrna	žhášející skvrna (imperatorin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení C.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: šedá skvrna	dvě výrazné načervenalé skvrny
osthol: fialová skvrna	slabá modrá skvrna
imperatorin: šedá skvrna	žlutá a fialová dvojité skvrna
	výrazná fialová skvrna
	žlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum*.

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 1 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidají 4 ml *heptanu R*, uzavře se a vloží se na 5 min do ultrazvukové lázně. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *imperatorinu R*, 1 mg *(Z)-ligustilidu R* a 1 mg *ostholu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. *Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (1 + 10 + 90).

*Nanášení.* 4 µl, do proužků 8 mm.

*Vyvíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná intenzivně modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze pod skvrnou *imperatorinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *(Z)-ligustilidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není viditelná žádná žhášející skvrna v poloze odpovídající poloze *ostholu* nebo v poloze odpovídající poloze pod skvrnou *imperatorinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce C.* Vrstva se postříká roztokem *kyseliny sírové R 10% (V/V)* v *methanolu R* a zahřívá se 5 min při 100 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení C.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná fialová skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *ostholu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,5 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,400 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se disperguje v odměrné baňce ve 45 ml *methanolu R* a vloží se na 1 h do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se zředí *methanolem R* na 50,0 ml a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Porovnávací roztok (a).** 5,0 mg *imperatorinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 80 mg *kořene děhele dahurského HRL* se disperguje v 9 ml *methanolu R* a vloží se na 1 h do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se zředí *methanolem R* na 10 ml a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Předkolona:**

- **rozměry:** délka 4 mm, vnitřní průměr 4,0 mm;
- **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm).

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm).

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** voda *R*;
- **mobilní fáze B:** acetonitril *RI*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–15	45	55
15–33	45 → 5	55 → 95
33–35	5	95

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 210 nm.

**Nástřik.** 20 μl.

**Identifikace píků.** K identifikaci píku felopterinu se použije chromatogram dodávaný s *kořenem děhele dahurského HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku (b).

**Relativní retence** vztažená k *imperatorinu* (retenční čas asi 5 min). Felopterin asi 1,1.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

- **rozlíšení:** nejméně 1,5 mezi píkem *imperatorinu* a píkem felopterinu.

Obsah *imperatorinu* (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 10}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku *imperatorinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku *imperatorinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- $m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *imperatorinu CRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;
- $p$  – obsah *imperatorinu* v procentech v *imperatorinu CRL*.

## ANGELICAE PUBESCENTIS RADIX

7.3:2557

### Kořen děhele pýřitého

#### DEFINICE

Je to usušený kořen druhu *Angelica pubescens* MAXIM. f. *biserrata* R. H. SHAN et C. Q. YUAN, zbavený kořínků, sbíraný začátkem jara před rašením, nebo koncem podzimu, kdy stonky a listy zvadnou.

**Obsah.** Nejméně 0,50 % ostholu (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>;  $M_r$  244,29), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Hlavní kořen je víceméně kuželovitý, v dolní části rozvětvený do dvou až tří nebo více postranních kořenů; celý kořen je asi 5 cm až 30 cm dlouhý. Kořenová hlava o průměru 0,5 cm až 4,5 cm je rozšířená, s příčnými kruhovitými rýhami, jsou na ní patrné zbytky lodyh, listů nebo pupenů. Kořen je na svrchní straně šedoohnědý nebo tmavě hnědý, podélně rýhovaný, s mírně vystoupilými kořenovými jizvami a s příčně uspořádanými bradavčitými výrůstky. Na lomu je patrná šedožlutá kůra s četnými hnědými tečkami sekrečních kanálků; kambální kruh hnědý, dřevo šedožluté nebo žlutohnědé.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutohnědý nebo hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky zdřevnatělých šroubovitě nebo síťovitě ztlustlých cév o průměru až 90 μm, jednotlivě nebo ve svazcích po dvou až třech; úlomky parenchymu lýka s drobnými zprohýbanými vřetenovitými buňkami o průměru asi 7 μm až 38 μm s mírně ztlustlými stěnami a s jemnými šikmými, vzájemně se křížícími rýhami; oranžovohnědé úlomky několikavrstevného korku, v plošném pohledu z mnohohranných buněk; sekreční kanálky obvykle rozlámané, se žlutým nebo světle hnědým obsahem a s kapkami silice. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná četná jednotlivá malá okrouhlá nebo vejčitá škrobová zrna o průměru asi 10 μm, na větších zrnech je viditelné tečkovité hilum; zřídka jsou přítomna dvoučetná až desetičetná škrobová zrna.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum* (viz Zkoušky na čistotu).  
**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na



chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modrobíle fluoreskující skvrna	modrobíle fluoreskující skvrna
osthol: modře fluoreskující skvrna imperatorin: bělavě fluoreskující skvrna	velmi slabá bělavá skvrna výrazná modře fluoreskující skvrna (osthol) bělavě fluoreskující skvrna (může chybět)
	modře fluoreskující skvrna tři modře fluoreskující skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zhašející skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modře fluoreskující skvrna	slabá zhašející skvrna
osthol: zhašející skvrna	zhašející skvrna (osthol) modře fluoreskující skvrna
imperatorin: zhašející skvrna	zhašející skvrna (může chybět)
	dvě nebo tři zhašející skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení C.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: šedá skvrna	výrazná načervenalá skvrna
osthol: fialová skvrna imperatorin: šedá skvrna	fialová skvrna (osthol) fialová skvrna (může chybět)
	výrazná fialová skvrna žlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

### Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum*.

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 1 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidají 4 ml *heptanu R*, uzavře se a vloží se na 5 min do ultrazvukové lázně. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *imperatorinu R*, 1 mg (Z)-*ligustilidu R* a 1 mg *ostholu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (1 + 10 + 90).

*Nanášení.* 4 µl, do proužků 8 mm.

*Vyvíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná intenzivně bělavě fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze přímo nad skvrnou ostholu a žádná modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze přímo pod skvrnou *imperatorinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny (Z)-*ligustilidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce C.* Vrstva se postříká roztokem *kyseliny sírové R* 10% (V/V) v *methanolu R* a zahřívá se 5 min při 100 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení C.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny (Z)-*ligustilidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,500 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se disperguje v odměrné baňce v 18 ml *methanolu R* a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se zředí *methanolem R* na 20,0 ml, promíchá se a zfiltruje. 5,0 ml filtrátu se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5,0 mg *ostholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 0,250 g *kořene děhele pýřitého HRL* se disperguje v odměrné baňce v 9 ml *methanolu R* a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se zředí *methanolem R* na 10,0 ml promíchá se a zfiltruje. 5,0 ml filtrátu se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,125 m, vnitřní průměr 2,0 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (4 µm);

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (40 + 60).

**Průtoková rychlost.** 0,23 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 322 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Retenční čas.** Osthol asi 8 min.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

- rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem ostholu a píkem 2; k identifikaci píku 2 se použije chromatogram dodávaný s kořenem děhele pýřitého HRL.

Obsah ostholu (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,8}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- A<sub>1</sub> – plochu píku ostholu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A<sub>2</sub> – plochu píku ostholu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- m<sub>2</sub> – hmotnost ostholu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;
- p – obsah ostholu v procentech v ostholu CRL.

**ANGELICAE RADIX**

7.0:1857

**Andělikový kořen****DEFINICE**

Je to celý nebo řezaný opatrně usušený oddenek a kořen druhu *Angelica archangelica* L. (*Archangelica officinalis* HOFFM.).

**Obsah.** Nejméně 2,0 ml/kg silice, počítáno na vysušenou drogu.

**VLASTNOSTI**

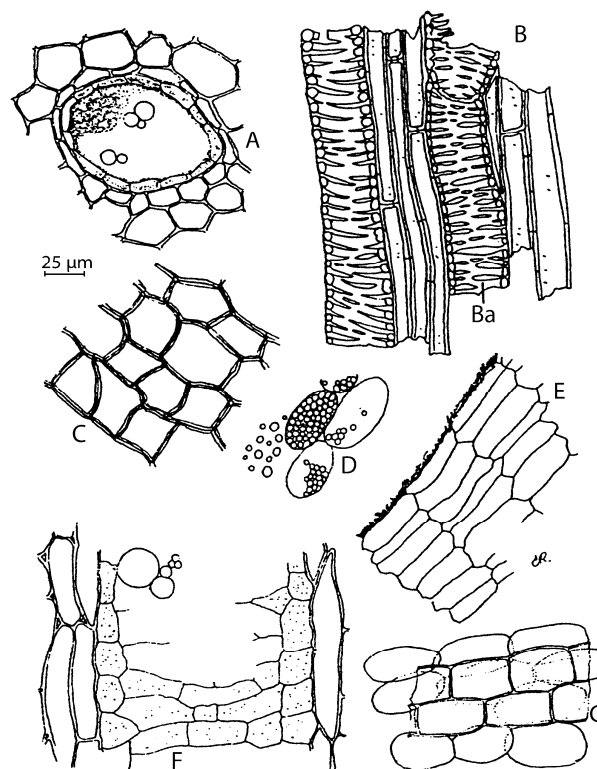
Droga hořké chuti.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Oddenek je šedohnědý nebo červenohnědý, příčně kruhovitě rýhovaný, na spodu s šedohnědými nebo červenohnědými, válcovitými, podélně brázditými, někdy rozvětvenými kořeny, které jsou na povrchu často neúplně příčně kroužkované. Na vrcholu oddenku jsou někdy zbytky stonků a bází listů. Lom je nepravidelný. Na příčném řezu je patrná šedobílá houbovitá, zřetelně pa-

prscitá kůra, v níž tvoří siličné kanálky hnědé body, a široké žluté nebo šedožluté dřevo, které v oddenku obklopuje našedlou nebo hnědobílou dřevň.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky korku sestávající z několika vrstev tenkostěnných šedohnědých nebo červenohnědých buněk v plošném pohledu [C] nebo v příčném řezu [E]; celé velké žlutohnědé sekreční kanálky nebo jejich úlomky v příčném řezu [A] nebo v podélném řezu [F]; úlomky dvouřadých nebo čtyřřadých dřevňových páprsků [G]; úlomky dřeva [B] skládající se ze zdřevnatělých síťovitě ztlustlých cév [Ba] vyskytujících se jednotlivě nebo v malých skupinách a z nezdřevnatělého parenchymu, jehož některé cévní buňky jsou kolenchymaticky ztlustlé. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku glycerolu R 50% (V/V). V práškové droze jsou patrna četná jednoduchá škrobová zrna o průměru 2 µm až 4 µm, která jsou volná nebo uvnitř parenchymatických buněk [D].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového andělikového kořene

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu *Levistici radix*.  
**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

Horní okraj desky	
eugenol: (pozorováno při 254 nm)	
kumarin: (pozorováno při 254 nm)	
	intenzivní modře fluoreskující skvrna
	žlutě fluoreskující skvrny
	modře fluoreskující skvrna
	žlutě fluoreskující skvrna
	intenzivní modře fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Levistici radix.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g čerstvě práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a vaří se 30 s. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *kumarinu R* a 25 µl *eugenolu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *dichlormethanu R* a *toluenu R* (50 + 50).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Dvakrát po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou viditelné zřetelnější skvrny kumarinu a eugenolu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není světle modře nebo bíle fluoreskující skvrna v poloze vymezené polohou skvrny kumarinu a skvrny eugenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % bázi listů a stonků, nejvýše 5 % jinak zbarvené drogy a nejvýše 1 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 2000 ml baňce s kulatým dnem za použití 40,0 g těsně před použitím upráškové drogy (500) (2.9.12) a 500 ml vody R s 10 kapkami *parafínu tekutého R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R* a destiluje se nejméně 4 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

## ANGELICAE SINENSIS RADIX

7.5:2558

## Kořen děhele čínského

## DEFINICE

Je to celý nebo rozlámaný kořen druhu *Angelica sinensis* (OLIV.) DIELS, sbíraný pozdě na podzim, usušený v kouři a zbavený kořínků.

**Obsah.** Nejméně 0,05 % kyseliny *trans-ferulové* (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 194,2), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Hlavní kořen se rychle dělí na deset nebo více kuželovitých kořenů; celý kořen je asi 15 cm až 25 cm dlouhý. Prstencovitá kořenová hlava má průměr asi 1,5 cm až 4 cm, na jejím tupém zaobleném vrcholu jsou žlutozelelé zbytky lodyh a listových řapíků. Svrchní strana kořene je světle hnědožlutá až tmavě hnědá, hrbolatá, nepravidelně podélně rýhovaná s četnými jizvami po postranních kořenech a s příčnými tečkami podobnými lentice-lám. Rozvětvené kořeny, v horní části o průměru 0,3 cm až 1 cm, se směrem dolů zužují. Jsou často zkroucené, s jizvami po postranních kořenech. Tkáň je drobná. Lom je žlutobílý až žlutohnědý, kůra je silná s několika dutinami a s četnými hnědými tečkami odpovídajícími sekrečním kanálkům. Kambium tvoří žlutohnědý kruh, dřevo je zbarvené světle.

Úlomky kořene jsou podlouhlé 1,5 mm až 2 mm silné, v oblasti kořenové hlavy 1,5 cm až 4 cm široké a 10 cm až 15 cm dlouhé.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: síťovitě nebo žebříčkovitě ztlustlé cévy o průměru až 80 µm, jednotlivě nebo ve skupinách po dvou nebo třech, provázené zděvnatělými buňkami parenchymu se ztlustlými stěnami; četné úlomky parenchymu s vejčitými buňkami; oranžové úlomky několikavrstevného korku s buňkami více nebo méně pravoúhlými, v plošném pohledu; v korku velmi malé hranolovité krystaly kalcium-oxalátu viditelné v polarizovaném světle; zřídka sekreční kanálky o průměru až 170 µm, obvykle rozlámané, s oranžovožlutým obsahem. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). V práškové droze jsou malá (méně než 10 µm) jednotlivá okrouhlá až vejčitá škrobová zrna, obvykle v parenchymatických buňkách.

**C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modrobíle fluoreskující skvrna	výrazná modrobíle fluoreskující skvrna ((Z)-ligustilid)
osthol: modře fluoreskující skvrna imperatorin: bělavě fluoreskující skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zhášeující skvrny.

Horní okraj desky	
(Z)-ligustilid: modře fluoreskující skvrna	výrazná modře fluoreskující skvrna ((Z)-ligustilid) slabá zhášeující skvrna
osthol: zhášeující skvrna imperatorin: zhášeující skvrna	slabá zhášeující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

### Jiné druhy rodu *Angelica*, *Levisticum* a *Ligusticum*.

Tenkvrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidají 4 ml *heptanu R*, uzavře se a vloží se na 5 min do ultrazvukové lázně. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 1 mg (Z)-ligustilidu *R*, 1 mg imperatorinu *R* a 1 mg ostholu *R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC *R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny octové ledové *R*, ethyl-acetátu *R* a toluenu *R* (1 + 10 + 90).

**Nanášení.** 4  $\mu$ l, do proužků 8 mm.

**Vyvíjení.** Po dráze 6 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení A.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná intenzivní modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny ostholu na chromatogramu porovnávacího roztoku, nebo pod ní.

**Detekce B.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení B.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná zhášeující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny imperatorinu na chromatogramu porovnávacího roztoku, nebo pod ní.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,200 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se disperguje v kuželové baňce ve 20,0 ml roztoku *methanolu R* 70% (V/V), dobře se uzavře a zváží se. Zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem, ochladí se a znovu se zváží. Úbytek rozpouštědla se doplní roztokem *methanolu R* 70% (V/V), dobře se promíchá a nechá se stát. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45  $\mu$ m); filtrát se použije jako zkoušený roztok.

**Porovnávací roztok (a).** 10,0 mg kyseliny ferulové *CRL* se rozpustí v odměrné baňce z hnědého skla v roztoku *methanolu R* 70% (V/V) a zředí se jím na 100,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** Pro přípravu kyseliny *cis*-ferulové *in situ* se převedou 2 ml porovnávacího roztoku (a) do průhledné lahvičky a vystaví se působení ultrafialového záření při 254 nm po dobu asi 60 min.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,150 m, vnitřní průměr 2,0 mm;

– **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (4  $\mu$ m);

– **teplota:** 35 °C.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku kyseliny fosforečné *R* 0,085% (V/V) (17 + 83).

**Průtoková rychlost.** 0,23 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 316 nm.

**Nástrik.** 10  $\mu$ l.

**Retenční časy.** Kyselina *trans*-ferulová asi 13 min; kyselina *cis*-ferulová asi 14 min.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

– **rozlišení:** nejméně 1,3 mezi píkem kyseliny *trans*-ferulové a píkem kyseliny *cis*-ferulové.

Obsah kyseliny *trans*-ferulové ( $C_{10}H_{10}O_4$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku kyseliny *trans*-ferulové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku i kyseliny *trans*-ferulové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost kyseliny ferulové *CRL* použité k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

$p$  – obsah kyseliny *trans*-ferulové v kyselině ferulové *CRL*, v procentech.

## ANISI ETHEROLEUM

7.0:0804

## Anýzová silice

*Synonymum.* Anisi aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná ze zralých suchých plodů druhu *Pimpinella anisum* L. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo světle žlutá tekutina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *linalolu R*, 30 µl *anisaldehydu R* a 200 µl *anetholu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 15 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *toluenem R* na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (7 + 93).

*Nanášení.* 5 µl, do 10mm proužků (normální TLC desky) [nebo 2 µl, do 10mm proužků (pro desky HPTLC)].

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm (pro normální TLC desky) [nebo 6 cm (pro desky HPTLC)].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

*Detekce B.* Postříká se zkoumadlem *methyl-4-acetylbenzoátovým R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C; ještě horká deska se pozoruje do 5 min v denním světle.

Horní okraj desky	
anethol: zhášející skvrna	velmi silně zhášející skvrna (anethol)
anisaldehyd: zhášející skvrna	zhášející skvrna (anisaldehyd)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: hnědá skvrna	fialovohnědá skvrna (monoterpenické uhlovodíky) (čelo rozpouštědla) velmi silná hnědá skvrna (anethol), zřetelně oddělená
anisaldehyd: žlutá skvrna	šedá skvrna žlutá skvrna (anisaldehyd)
linalol: šedá skvrna	šedá skvrna (linalol) šedá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům těchto pík na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,980 až 0,990.

**Index lomu** (2.2.6). 1,552 až 1,561.

**Teplota tuhnutí** (2.2.18). 15 °C až 19 °C.

**Fenchon.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsaná ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

*Zkoušený roztok.* 400 µl se rozpustí ve 2,0 ml *hexanu R*.

*Porovnávací roztok (a).* 10 µl *fenchonu R* se zředí *hexanem R* na 1,2 g.

*Porovnávací roztok (b).* 100 µl porovnávacího roztoku (a) se zředí *hexanem R* na 100 ml.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):  
– *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík.

*Limit:*

– *fenchon:* nejvýše 0,01 %.

**Fenikulin.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsaná ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

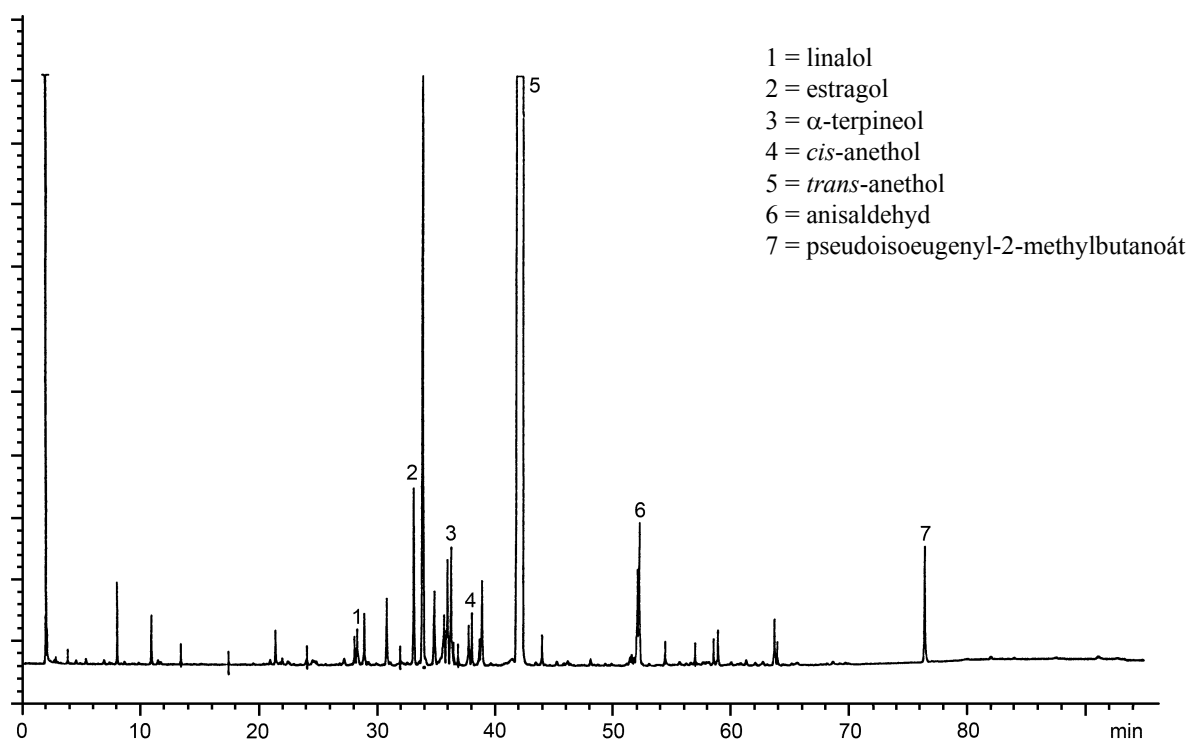
*Porovnávací roztok (a).* 10 mg zkoušeného roztoku se zředí *hexanem R* na 1,000 g. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *hexanem R* na 100 ml.

*Porovnávací roztok (b).* *Fenikulin pro identifikaci pík CRL.*

*Test způsobilosti:*

– chromatogram porovnávacího roztoku (b) odpovídá chromatogramu dodávanému s *fenikulinem pro identifikaci pík CRL*;

– *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).



**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v anýzové silici

*Limit*, pík fenikulinu se určí porovnáním s chromatogramem dodávaným s *fenikulinem pro identifikaci píků CRL*:  
– *fenikulin*: nejvýše 0,01 %.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 200 µl se rozpustí v 1,0 ml *hexanu R*.

*Porovnávací roztok.* K 1,0 ml *hexanu R* se přidá 20 µl *linalolu R*, 20 µl *estragolu R*, 20 µl *α-terpineolu R*, 60 µl *anetholu R* a 30 µl *anisaldehydu R*.

*Kolona:*

- *materiál*: tavený křemen;
- *rozměry*: délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze*: makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5	60
	5–80	60 → 210
	80–95	210
nástřikový prostor		200
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení*: nejméně 1,5 mezi píkem estragolu a píkem α-terpineolu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku a z chromatogramu uvedeného na obrázku 1 se určí *cis-anethol* a *pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát* (nepřihlíží se k píku hexanu).

Vypočítají se obsahy těchto látek v procentech, které jsou v následujících rozmezech:

- *linalol*: nejvýše 1,5 %;
- *estragol*: 0,5 % až 5,0 %;
- *α-terpineol*: nejvýše 1,2 %;
- *cis-anethol*: 0,1 % až 0,4 %;
- *trans-anethol*: 87 % až 94 %;
- *anisaldehyd*: 0,1 % až 1,4 %.
- *pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát*: 0,3 % až 2,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## ANISI FRUCTUS

7.3:0262

Anýzový plod

**DEFINICE**

Je to celá usušená dvojnážka druhu *Pimpinella anisum L.*

*Obsah silice.* Nejméně 20 ml/kg bezvodé drogy.

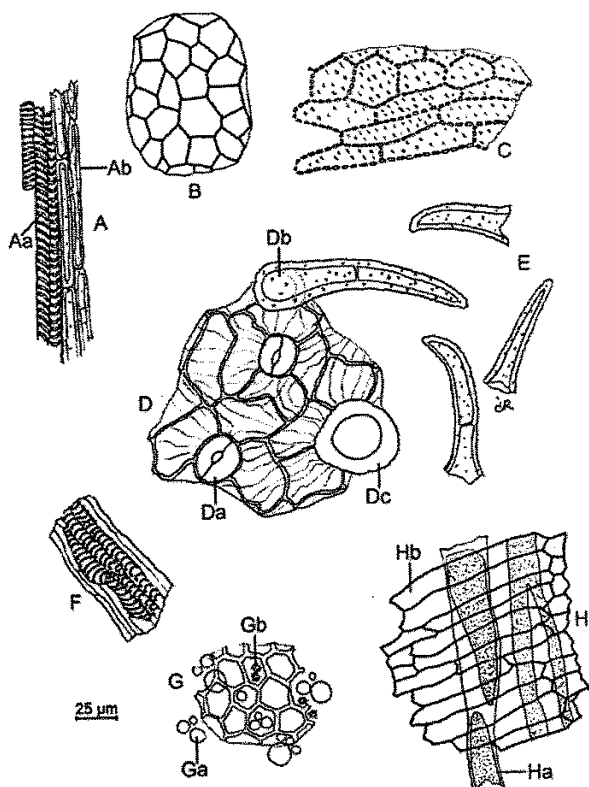
## VLASTNOSTI

Droga má charakteristický pach po anetholu.

Je to obvykle celá dvojnážka, často s malým zbytkem tenké tuhé lehce zakřivené stopky.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Dvojnážka je vejčitá nebo hruškovitá, z boku lehce zmáčklá, žlutozelená nebo zelenošedá, 3 mm až 5 mm dlouhá a až 3 mm široká, ukončená stylopodiem se dvěma krátkými, nazpět ohnutými konci. Nažky jsou na vrcholu spojené karpoforem; poutcová strana je plochá, hřbetní strana vypouklá s krátkými bradavčitými chlupy viditelnými pod lupou. Každá nažka má pět primárních podélných, málo výrazných žebor světlejší barvy, tři hřbetní a dvě postranní.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového anýzového plodu

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelenožlutý nebo hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky oplodí v plošném pohledu [D] s buňkami se zvrásněnou kutikulou, někdy s anomocytickými průduchy (2.8.3) [Da], báze krycích chlupů [Dc] a celé krycí chlupy [Db] jsou většinou jednobuněčné, někdy zakřivené, na konci tupé, s bradavčitou kutikulou; samostatné úlomky krycích chlupů [E]; úlomky [H] četných úzkých rozvětvených siličných kanálků [Ha], často doprovázené protáhlými buňkami na poutcové straně [Hb]; úlomky osemení [B]

složené z vrstvy hnědých mnohohranných tenkostěnných buněk; úlomky endospermu [G] obsahující olejové kapky [Ga], aleuronová zrna a malé drúzy kalcium-oxalátu [Gb]; podlouhlé sklereidy z mezokarpu [C] nebo z poutcové strany plodu; svazky krátkých sklerenchymatických vláken karpoforu [A] a stopky [Ab] doprovázené kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlými cévami [Aa, F].

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,10 g práškované rostlinné drogy (1400) (2.9.12) se protřepává 15 min se 2 ml *dichlor-methanu R*. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří do sucha ve vodní lázni při 60 °C. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 3 μl *anetholu R* a 40 μl *oleje olivového R* se rozpustí v 1 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub> R*.

*Mobilní fáze.* *Toluen R*.

*Nanášení.* 2 μl a 3 μl zkoušeného roztoku a 1 μl, 2 μl a 3 μl porovnávacího roztoku, odděleně ve 2 cm vzdálenostech.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Ve střední části chromatogramů je skvrna zhašející fluorescenci (anethol) na světlém pozadí.

*Detekce B.* Postříká se čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu 96% R* (použije se 10 ml na desku o straně 200 mm) a zahřívá se 5 min při 120 °C.

*Hodnocení B.* Skvrny odpovídající anetholu jsou zbarveny modře na žlutém pozadí. Velikost skvrny anetholu na chromatogramu při nanášení 2 μl zkoušeného roztoku je v rozmezí velikosti odpovídajících skvrn na chromatogramech při nanášení 1 μl a 3 μl porovnávacího roztoku. Na chromatogramech zkoušeného roztoku je v dolní třetině modrá skvrna (triacylglyceroly) odpovídající polohou a zbarvením skvrně v dolní třetině na chromatogramech porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 70 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškované rostlinné drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,5 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 10,0 g rostlinné drogy upráškované těsně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min v 250 ml baňce s kulatým dnem se 100 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylynu R*.

## ANISI STELLATI ETHEROLEUM

7.0:2108

## Badyáníková silice

*Synonymum.* Anisi stellati aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná ze zralých suchých souplodí druhu *Illicium verum* HOOK. fil. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo světle žlutá tekutina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *linalolu R*, 30 µl *anisaldehydu R* a 200 µl *anetholu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 15 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *toluenem R* na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (7 + 93).

*Nanášení.* 5 µl, do 10mm proužků (pro normální TLC desky) [nebo 2 µl, do 10mm proužků (pro desky HPTLC)].

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm (pro normální TLC desky) [nebo 6 cm (pro desky HPTLC)].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: žhášející skvrna	zhášející skvrna, částečně oddělená velmi silně žhášející skvrna (anethol)
anisaldehyd: žhášející skvrna	zhášející skvrna (anisaldehyd)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se *zkoumadlem methyl-4-acetylbenzoátovým R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C; ještě horká deska se do 10 min pozoruje v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: hnědá skvrna	fialovohnědá skvrna, ne zcela oddělená velmi silná hnědá skvrna (anethol)
anisaldehyd: žlutá skvrna	žlutá skvrna (anisaldehyd)
linalol: šedá skvrna	šedá skvrna (linalol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům těchto píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,979 až 0,985.

**Index lomu** (2.2.6). 1,553 až 1,556.

**Teplota tuhnutí** (2.2.18). 15 °C až 19 °C.

**Fenchon.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsaná ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

*Zkoušený roztok.* 400 µl se rozpustí ve 2,0 ml *hexanu R*.

*Porovnávací roztok (a).* 10 µl *fenchonu R* se zředí *hexanem R* na 1,2 g.

*Porovnávací roztok (b).* 100 µl porovnávacího roztoku (a) se zředí *hexanem R* na 100 ml.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík.

*Limit:*

– *fenchon:* nejvýše 0,01 %.

**Pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsaná ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok (a).* 10 mg zkoušeného roztoku se zředí *hexanem R* na 1,000 g. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *hexanem R* na 100 ml.

*Porovnávací roztok (b).* *Pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát pro identifikaci píků CRL.*

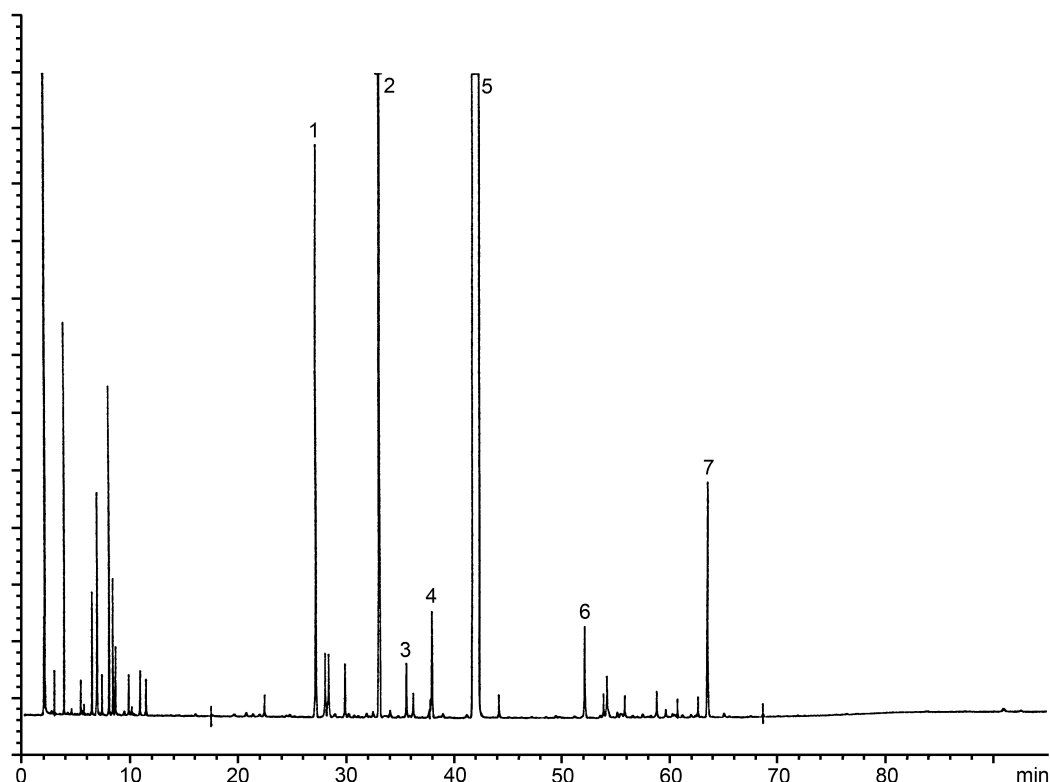
*Test způsobilosti:*

– chromatogram porovnávacího roztoku (b) odpovídá chromatogramu dodávanému s *pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoátem pro identifikaci píků CRL*;  
– *poměr signálu k šumu:* nejméně 10 pro hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

*Limit,* pík pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoátu se určí porovnáním s chromatogramem dodávaným s *pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoátem pro identifikaci píků CRL*:  
– *pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát:* nejvýše 0,01 %.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatěle silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.





1 = linalol                                      3 =  $\alpha$ -terpineol                                      5 = *trans*-anethol                                      7 = fenikulin  
 2 = estragol                                      4 = *cis*-anethol                                      6 = anisaldehyd

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v badyánkové silici

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 200  $\mu$ l se rozpustí v 1,0 ml hexanu R.

*Porovnávací roztok.* K 1,0 ml hexanu R se přidá 20  $\mu$ l linalolu R, 20  $\mu$ l estragolu R, 20  $\mu$ l  $\alpha$ -terpineolu R, 60  $\mu$ l anetholu R a 30  $\mu$ l anisaldehydu R.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5	60
	5–80	60 → 210
	80–95	210
nástřikový prostor		200
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2  $\mu$ l.

*Eluční pořadí.* Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem estragolu a píkem  $\alpha$ -terpineolu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se určí látky na chromatogramu zkoušeného roztoku a z chromatogramu uvedeného na obrázku 1 se určí *cis*-anethol a fenikulin (nepřihlíží se k píku hexanu).

Vypočítají se obsahy těchto látek v procentech, které jsou v následujících rozmezech:

- *linalol:* 0,2 % až 2,5 %;
- *estragol:* 0,5 % až 6,0 %;
- *$\alpha$ -terpineol:* nejvýše 0,3 %;
- *cis-anethol:* 0,1 % až 0,5 %;
- *trans-anethol:* 86 % až 93 %;
- *anisaldehyd:* 0,1 % až 0,5 %;
- *fenikulin:* 0,1 % až 3,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## ANISI STELLATI FRUCTUS

6.0:1153

## Badyáníkový plod

## DEFINICE

Je to usušené souplodí druhu *Illicium verum* HOOK. fil.

## Obsah:

- *silice*: nejméně 70 ml/kg bezvodé drogy;
- *trans-anethol*: nejméně 86,0 % v silici.

## VLASTNOSTI

Měchýřky jsou hnědé.

Droga má charakteristický pach po anetholu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Souplodí je složeno obvykle z osmi jednosemenných měchýřků, 12 mm až 22 mm dlouhých a 6 mm až 12 mm širokých, paprscitě uspořádaných kolem krátkého středního, tupě zakončeného sloupku. V každém souplodí mohou jeden nebo dva měchýřky chybět, ale jejich poloha je jasně patrná. Jednotlivé měchýřky jsou člunkovité nebo botkovité, hřbetní strana je šedohnědá, hrubě vrásčitá, boční strany nesou jizvy po sousedních měchýřcích. Jeden nebo více měchýřků má otevřenou hřbetní trhlinu, která odhaluje jedno čočkovité, lesklé, červenohnědé semeno o průměru asi 8 mm. Znaky patrné na hřbetní straně nejsou viditelné na straně spodní. Některé měchýřky (1–3) mohou být neúplně vyvinuté. V droze mohou být přítomny jednotlivé měchýřky, stopěčky a semena.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: hnědé buňky epikarpu, při pohledu shora mnohohranné, se silně zvrásněnou kutikulou a příležitostně s anomocytickými průduchy (2.8.3); úlomky endokarpu s dlouhými palisádovými buňkami; úlomky mezokarpu s velkými parenchymatickými buňkami; cévy, siličné buňky a skupiny sklereid; úlomky osemení s palisádovými, žlutými sklereidami až 200 µm dlouhými se silně tečkovanými stěnami; úlomky sloupku a plodní stopky se silně a nepravidelně ztlustlými hvězdovitými sklereidami asi 400 µm dlouhými a 150 µm širokými; kosočtverečné nebo hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého.
- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky B (viz zkoušky na čistotu *Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) a některé další druhy rodu *Illicium*).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: světle modře fluoreskující skvrna kvercitrin: hnědožlutě fluoreskující skvrna	hnědožlutě fluoreskující skvrna
hyperosid: hnědožlutě fluoreskující skvrna kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	nazelenale fluoreskující skvrna hnědožlutě fluoreskující skvrna
rutin: hnědožlutě fluoreskující skvrna	zeleně fluoreskující skvrna hnědožlutě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Illicium anisatum* (= *I. religiosum*) a některé další druhy rodu *Illicium*.

- A.** Pro znečištění druhem *Illicium anisatum* nebo některými dalšími druhy rodu *Illicium* je charakteristická přítomnost souplodí s více než osmi měchýřky; souplodí jsou buď menší než 2,5 cm, nebo větší než 3,5 cm; měchýřky se švem končícím ztlustlinou zasahující do sousedního měchýřku nebo s dorzálními znaky patrnými ze spodní strany; měchýřky jsou poněkud zvlňené a končí jemným zobáčkem nebo malým nahoru otočeným hrotem; měchýřky jsou z profilu pravouhlé; plodní stopka může být delší než 5 cm; plody bez semen; semena jsou buď velmi plochá, nebo téměř okrouhlá.
- B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při teplotě 60 °C; po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *kyseliny kávové R*, 1 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *kvercitrinu R*, 2,5 mg *rutinu R* a 2,5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 26 + 100).

*Nanášení.* 5 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* V proudu horkého vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Po 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není hnědožlutě fluoreskující skvrna v poloze, která odpovídá poloze, nebo je výše než skvrna kvercitrinu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žlutě fluoreskující skvrna v poloze, která odpovídá poloze, nebo je výše než skvrna kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není hnědožlutě fluoreskující skvrna v poloze, která odpovídá poloze, nebo je výše než skvrna hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice.** Proveďte se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 50,0 g drogy se těsně před stanovením rozdrobí na hrubý prášek (1400) (2.9.12) a promíchá se. Asi 10,0 g této směsi se rozdrobí na jemnější prášek (710) (2.9.12). 2,50 g práškové drogy (710) (2.9.12) se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 250 ml baňce se 100 ml vody R jako destilační tekutiny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu R.

**trans-Anethol.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** Směs silice a xylenu R ze zkoušky Stanovení obsahu, odstavec Silice se zředí xylenem R, který byl použit k promytí destilačního přístroje na 5,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 1,0 ml xylenu R, 20 µl estragolu R, 20 mg α-terpineolu R a 60 µl anetholu R.

**Kolona:**

- **materiál:** tavený křemen;
- **rozměry:** délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R.

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 100.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5	60
	5–80	60 → 210
	80–95	210
nástřikový prostor		200
detektor		220

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřik.** 1 µl.

**Eluční pořadí.** Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **rozlíšení:** nejméně 5 mezi píkem estragolu a píkem α-terpineolu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku se identifikují látky za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku.

Vypočítá se obsah *trans*-anetholu v procentech. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla nebo k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05 % plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

## ARNICAE FLOS

7.3:1391

### Arníkový květ

#### DEFINICE

Jsou to celé nebo částečně rozlámané usušené úbory druhu *Arnica montana* L.

**Obsah.** Nejméně 0,40 % celkových seskviterpenových laktónů, vyjádřeno jako dihydrohelenalin-tiglát, počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

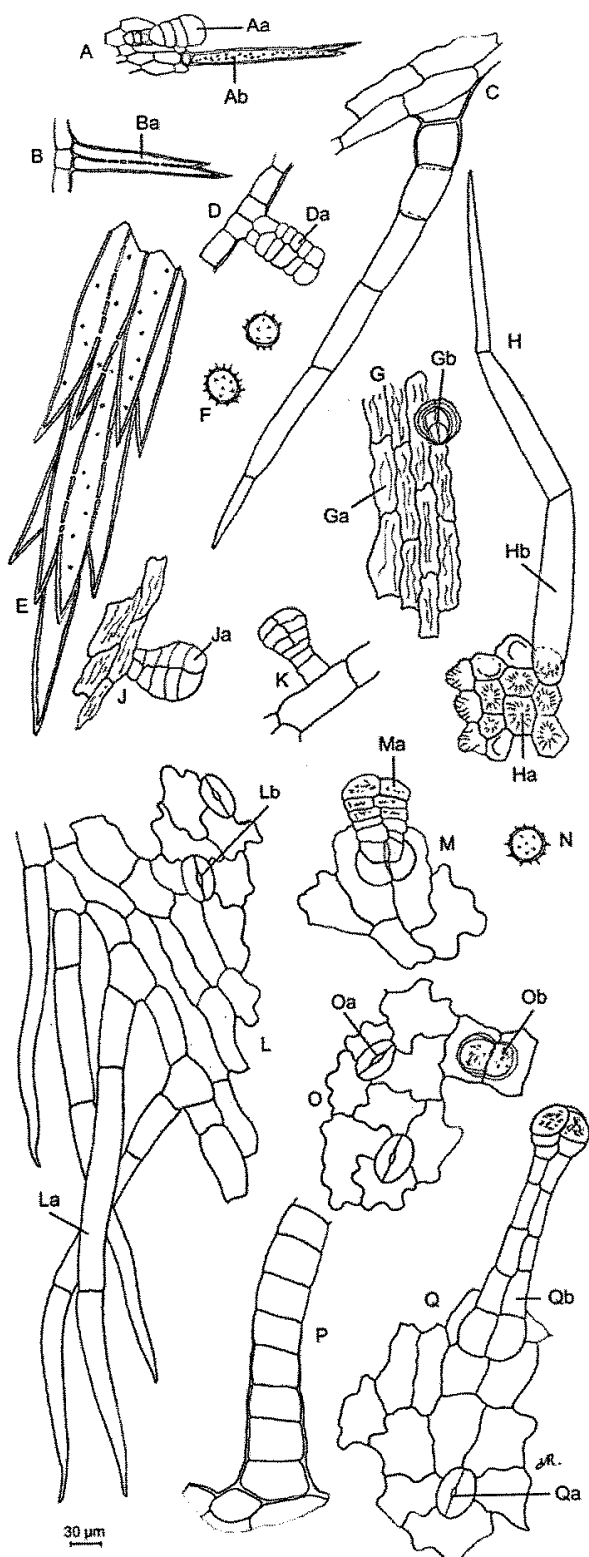
Droga má aromatický pach.

Je-li úbor rozkvetlý, má průměr asi 20 mm a výšku asi 15 mm, stopka květenství je 2 cm až 3 cm dlouhá. Jednořadý až dvouřadý zákrov tvoří 18 až 24 protáhle kopinatých listenů na konci zašpičatělých. Zákrovní listeny jsou asi 8 mm až 10 mm dlouhé, zelené, na vnější straně se žlutozelenými chlupy, viditelnými pod lupou. Lůžko úboru o průměru asi 6 mm je vypouklé, chlupaté, na povrchu s drobnými jamkami. Na jeho obvodu je asi dvacet jazykovitých květů, 20 mm až 30 mm dlouhých; terč tvoří větší počet trubkovitých asi 15 mm dlouhých květů. Semeníky jsou 4 mm až 8 mm dlouhé, nahoře s pentlicovitým bělavým 4 mm až 8 mm dlouhým chmýrem. V droze mohou být přítomny hnědé nažky s chmýrem nebo bez chmýru.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Zákrov tvoří protáhle vejčité listeny, na konci zašpičatělé, s brvitým okrajem. Jazykovité květy mají redukovaný kalich, nahoře s jemným lesklým bělavým pentlicovitým chmýrem s malými drsnými chlupy. Koruna jazykovitých květů je oranžově žlutá, se sedmi až deseti souběžně probíhajícími žilkami, na konci jazyka se třemi malými zuby. Tyčinky s volnými prašníky jsou neúplně vyvinuté. Semeník je úzký hnědý s dvojklannou nazpět obrácenou bliznou. Trubkovité květy jsou paprčitě souměrné. Semeník i kalich jsou stejné jako u jazykovitých květů. Krátká koruna je pětičetná s trojúhelníkovitými nazpět obrácenými korunními cípy, pět fertálních tyčinek je spojeno s prašníky.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Úbor se rozdělí na jednotlivé části. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): pokožka zákrovních listenů [L, M, O, Q] s průduchy [Lb, Oa, Qa] a chlupy na vnější (spodní) straně četnějšími. Chlupy jsou různých typů: jednořadé mnohobuněčné krycí chlupy délky 50 µm až 500 µm, celé [La] nebo úlomky [P], jsou četnější na okraji listenů; žláznaté chlupy s jednořadou nebo dvouřadou mnohobuněčnou nohou a mnohobuněčnou kulovitou hlavičkou délky asi 300 µm jsou četnější na vnější straně listenů [Qb]; žláznaté chlupy s mnohobuněčnou nohou a mnohobuněčnou kulovitou hlavičkou

délky asi 80  $\mu\text{m}$  jsou četnější na vnitřní straně listenu, v plošném pohledu [Ob] nebo v bočním pohledu [Ma]. Pokožku jazykovité koruny [C, G, H, J] tvoří laločnaté nebo protáhlé buňky s ryhovanou kutikulou [Ga] s několika průduchy a chlupy různých typů: ostře zašpičaté krycí chlupy, které mohou být delší než 500  $\mu\text{m}$ , na bázi s jednou až třemi buňkami se stěnami ztlustlými



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového arnikového květu

a dvěma až čtyřmi tenkostěnnými koncovými buňkami [C, Hb]; žláznaté chlupy s dvouřadou mnohobuněčnou hlavičkou v plošném pohledu [Gb] nebo v bočním pohledu [Ja]; žláznaté chlupy s mnohobuněčnou nohou a mnohobuněčnou kulovitou hlavičkou [K]. Na okraji jazyka jsou okrouhlé papilózní buňky [Ha]. Úlomky pokožky semeníku [A, B, D] se dvěma typy chlupů: žláznatými chlupy s krátkou nohou a mnohobuněčnou kulovitou hlavičkou v plošném pohledu [Aa] nebo v bočním pohledu [Da]; krycí chlupy obvykle tvořené dvěma protáhlými, podélně rostlými buňkami, většinou s tečkovanými stěnami, v plošném pohledu [Ab] nebo v bočním pohledu [Ba]; na konci jsou chlupy zašpičaté, někdy dvojkřanné. Pokožku kalicha tvoří protáhlé buňky s krátkými jednobuněčnými krycími chlupy směřujícími k hornímu konci chmýru [E]. Pylová zrna jsou okrouhlá o průměru asi 30  $\mu\text{m}$ , s ostnitou exinou a třemi klíčovými póry [F, N].

- C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky na čistotu *Calendula officinalis* L. – *Heterotheca inuloides* CASS. **Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části modře fluoreskující skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku, nad touto skvrnou jsou tři žlutohnědé nebo oranžovožlutě fluoreskující skvrny a nad nimi skvrna fluoreskující zelenožlutě (astragalin). Skvrna pod astragalinem odpovídá isokvercitosidu a skvrna těsně pod ní luteolin-7-glukosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v poloze odpovídající poloze pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku zelenomodře fluoreskující skvrna.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5,0 %.

*Calendula officinalis* L. – *Heterotheca inuloides* CASS.

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,00 g práškované rostlinné drogy (710) (2.9.12) se smíchají s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C, za protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 2,0 mg *kyseliny kávové R*, 2,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 5,0 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 30 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 15  $\mu\text{l}$ , do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu, po několik minut.

**Detekce.** Postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a potom roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části oranžovožlutě fluoreskující skvrna (rutin), ve střední části světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a v horní části světle modře fluoreskující

skvrna (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrná oranžovožlutá skvrna odpovídající polohou a fluorescencí skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku ani žádná další skvrna pod ní.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Roztok vnitřního standardu.** 0,010 g *santoninu CRL* přesně odváženého se těsně před použitím rozpustí v 10,0 ml *methanolu R*.

**Zkoušený roztok.** 1,00 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se převede do 250ml baňky s kulatým dnem, přidá se 50 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem za častého protřepávání ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C. Nechá se ochladit a zfiltruje se přes papírový filtr. Filtrační papír nastříhaný na kousky se přidá ke zbytku v baňce, smíchá se s 50 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C za častého protřepávání. Stejný postup se opakuje ještě dvakrát. Ke spojeným filtrátům se přidají 3,00 ml roztoku vnitřního standardu a se odpaří za sníženého tlaku na 18 ml, baňka s kulatým dnem se promyje *vodou R* a touto promývací tekutinou se zředí roztok na 20,0 ml. Převede se na chromatografickou kolonu o délce asi 0,15 m a o vnitřním průměru asi 30 mm naplněnou 15 g *křemeliny pro chromatografii R*. Nechá se 20 min stát a promývá se 200 ml směsi stejných objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *dichlormethanu R*. Eluát se odpaří do sucha v 250ml baňce s kulatým dnem. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml *methanolu R*, přidá se 10,0 ml *vody R* a 7,0 g *oxidu hlinitého neutrálního R*, protřepává se 120 s, odstřeďuje se 10 min při 5000 g a zfiltruje se přes papírový filtr. 10,0 ml filtrátu se odpaří do sucha, odparek se rozpustí ve 3,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zfiltruje se.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,12 m, vnitřní průměr 4 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (4 μm).

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** *voda R*;
- **mobilní fáze B:** *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–3	62	38
3–20	62 → 55	38 → 45
20–30	55	45
30–55	55 → 45	45 → 55
55–57	45 → 0	55 → 100
57–70	0	100
70–90	62	38

**Průtoková rychlost.** 1,2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 225 nm.

**Nástřik.** 20 μl, injektorovou smyčkou.

Obsah celkových seskviterpenových laktonů v procentech, vyjádřeno jako dihydrohelenalin-tiglát, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{S_{LS} \cdot C \cdot V \cdot 1,187 \cdot 100}{S_S \cdot m \cdot 1000},$$

v němž značí:

- $S_{LS}$  – plochu všech pík seskviterpenových laktonů, které mají vyšší retenční čas než pik *santoninu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $S_S$  – plochu píku *santoninu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $m$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- $C$  – koncentraci *santoninu* v roztoku vnitřního standardu přidaného ke zkoušenému roztoku v miligramech na mililitr;
- $V$  – objem roztoku vnitřního standardu přidaného ke zkoušenému roztoku v mililitrech;
- 1,187 – korelační faktor pro přepočítání mezi dihydrohelenalin-tiglátem a *santoninem*.

## ARNICAE TINCTURA

6.3:1809

### Arniková tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Arnicae flos* (1391).

**Obsah.** Nejméně 0,04 % seskviterpenových laktonů, vyjádřeno jako dihydrohelenalin-tiglát (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>; M<sub>r</sub> 346,42).

#### VÝROBA

Připravuje se vhodným postupem z 1 dílu drogy a 10 dílů ethanolu [60% (V/V) až 70% (V/V)].

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Žlutohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky *Calendula officinalis* – *Heterotheca inuloides* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku:

- ve střední části je modře fluoreskující skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- nad touto skvrnou jsou tři skvrny fluoreskující žlutohnědě až oranžovožlutě a nad nimi skvrna fluoreskující zelenožlutě odpovídající astragalínu; skvrna pod astragalínem odpovídá isokvercitrínu; skvrna těsně pod touto skvrnou odpovídá luteolin-7-glukosidu;
- zelenomodře fluoreskující skvrna je v poloze odpovídající poloze pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Calendula officinalis – Heterotheca inuloides.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená tinktura.

*Porovnávací roztok.* 2,0 mg kyseliny kávové R, 2,0 mg kyseliny chlorogenové R a 5,0 mg rutinu R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 30,0 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo 2 µm až 10 µm].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, butan-2-onu R a ethyl-acetátu R (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 30 µl [nebo 8 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 8 cm].

*Sušení.* Při 80 °C až 105 °C.

*Detekce.* Ještě horká vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a potom roztokem makrogolu 400 R v methanolu R (50 g/l). Zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C, nechá se vysušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části oranžovožlutě fluoreskující skvrna (rutin), ve střední části je fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové a v horní části světle modře fluoreskující skvrna (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrná skvrna odpovídající skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku ani žádná další skvrna pod ní.

**Ethanol (2.9.10).** Konečná koncentrace ethanolu je nejméně 90 % počáteční koncentrace vyluhovačla.

**Methanol a propan-2-ol (2.9.11).** Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

**Zbytek po vysušení (2.8.16).** Nejméně 1,7 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Roztok vnitřního standardu.* 0,010 g *santoninu* CRL přesně odváženého a 0,02 g *butylparabenu* R se těsně před použitím rozpustí v 10,0 ml *methanolu* R.

*Zkoušený roztok.* 5,00 g se převede do baňky s kulatým dnem, smíchá se se 2,00 ml roztoku vnitřního standardu a 3 g *oxidu hlinitého bezvodého* R. Směs se protřepává 120 s a pak se zfiltruje přes papírový filtr. Baňka s kulatým dnem i filtr se promyjí 5 ml směsí stejných objemových dílů *methanolu* R a *vody* R a zfiltruje se. Spojené filtry se odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 2,0 ml směsi objemových dílů *vody* R a *methanolu* R (20 + 80) a zfiltruje se membránovým filtrem (velikost pórů 0,45 µm).

*Porovnávací roztok.* 0,02 g *methylparabenu* R a 0,02 g *ethylparabenu* R se rozpustí v *methanolu* R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,12 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 µm);

– *teplota:* 20 °C.

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* voda R;

– *mobilní fáze B:* methanol R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–3	62	38
3–20	62 → 55	38 → 45
20–30	55	45
30–55	55 → 45	45 → 55

*Průtoková rychlost.* 1,2 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 225 nm.

*Nástrik.* 20 µl.

*Relativní retence* vztažená k *santoninu* (retenční čas asi 9,5 min). *Butylparaben* asi 4,6.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozišení:* nejméně 5 mezi píkem *methylparabenu* a píkem *ethylparabenu*.

Obsah seskviterpenových laktonů v procentech, vyjádřeno jako *dihydrohelenalin-tiglát*, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot C \cdot V \cdot 1,187}{F_2 \cdot m \cdot 10}$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu všech píků objevujících se mezi píkem *santoninu* a píkem *butylparabenu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku odpovídajícího *santoninu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$m$  – hmotnost zkoušené tinktury v gramech;

$C$  – koncentraci *santoninu* v roztoku vnitřního standardu přidaného ke zkoušenému roztoku v miligramech na mililitr;

$V$  – objem roztoku vnitřního standardu přidaného ke zkoušenému roztoku v mililitrech;

1,187 – faktor pro přepočítání mezi *dihydrohelenalin-tiglátem* a *santoninem*.

## ASTRAGALI MONGHOLICI RADIX

7.0:2435

Kořen kozince blanitého

## DEFINICE

Je to celý usušený kořen druhu *Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* [syn. *Astragalus membranaceus* BUNGE var. *mongholicus* (BUNGE) P. K. HSIAO] a *Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) PODLECH (syn. *Astragalus membranaceus* BUNGE) zbavený kořínků, sbíraný od jara do podzimu.

*Obsah.* Nejméně 0,040 % *astragalosidu* IV (C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>; M<sub>r</sub> 785), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Kořen je válcovitý, často rozvětvený, s horní částí 30 cm až 90 cm dlouhou, relativně silnou, o průměru

1 cm až 3,5 cm. Svrchní strana je světle hnědožlutá nebo světle hnědá, nepravidelně podélně zvrásněná nebo rýhovaná. Kořen je tvrdý a houževnatý; obtížně se láme, lom je silně vláknitý a slabě (pěstované rostliny) až silně (plané rostliny) škrobnatý, kůra je nažloutle bílá, dřevo světle žluté, s paprscitými rýhami a trhlinami; centrální část tmavě hnědá, u starších kořenů může být vylomená, takže tvoří dutinu obklopenou úlomkou neuspořádané tkáně.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: vlákna ve svazcích nebo roztroušená, o průměru 8 µm až 30 µm, se ztlustlými stěnami, na povrchu s podélnými prasklinami, primární stěny často oddělené od sekundárních, oba konce vláken často zlomené nebo třapcovité, nebo mírně tupé. Dvůrkovité cévy bezbarvé nebo oranžové, dvůrky hustě uspořádané. Někdy okrouhlé, podlouhlé nebo nepravidelné kamenné buňky s mírně ztlustlými stěnami.

Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R 50% (V/V)*. Jsou patrná malá okrouhlá nebo vejčitá škrobová zrna, obvykle jednotlivá nebo někdy dvojčetná nebo trojčetná o průměru asi 5 µm.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 3 g práškované drogy (355) (2.9.12) se zahřívají 50 min pod zpětným chladičem s 50 ml *methanolu R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v 1 ml *vody R*. Tento roztok se převede na 6ml kolonu pro extrakci na pevné fázi obsahující *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* předem upravený 3 ml *methanolu R* a potom 3 ml *vody R*. Kolona se promyje 15 ml *vody R* a potom 15 ml roztoku *methanolu R 30% (V/V)* a obě promývací tekutiny se odstraní. Eluuje se 20 ml *methanolu R*, eluát se odebere, odpaří se za sníženého tlaku do sucha a zbytek se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 10,0 mg *daidzinu R* a 5,0 mg *daidzeinu R* se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 13,5 + 100).

*Nanášení.* 3 µl, do 8mm proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 7 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
daidzein: zhášející skvrna	modře fluoreskující skvrna
_____	_____
daidzin: zhášející skvrna	zhášející skvrna
_____	_____
_____	zhášející skvrna
_____	zhášející skvrna
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, 3 min se zahřívá při 100 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 366 nm.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
daidzein: světle modrá skvrna	fialová skvrna
_____	_____
daidzin: světle modrá skvrna	fialová skvrna
_____	_____
_____	fialová skvrna
_____	hnědá skvrna
_____	pět hnědých skvrn
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 3 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 4,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se převedou do extrakčního přístroje typu Soxhlet, přidá se 40 ml *methanolu R* a maceruje se přes noc. Pak se znovu přidá 40 ml *methanolu R*, zahřívá se 4 h pod zpětným chladičem a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 10 ml *vody R* a protřepe se čtyřikrát vždy 40 ml *butan-1-olu R* nasyceného *vodou R*. Butanolové extrakty se spojí a protřepou se dvakrát vždy 40 ml *amoniaku 17,5% RS*. Amoniaková vrstva se odstraní, butanolová vrstva se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 5 ml *vody R* a ochladí se. Tento roztok se převede na kolonu pro extrakci na pevné fázi obsahující 1 g *silikagelu pro chromatografii oktadecylsilylovaného R* předem promytého 5 ml *methanolu R* a 5 ml *vody R*. Kolona se promyje 20 ml *vody R* a 20 ml *ethanolu 25% (V/V) R*. Vzorek se eluuje 25 ml

ethanolu 70% (V/V) R a eluát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml methanolu R.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg astragalosidu IV CRL se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztoky (b), (c) a (d). Porovnávací roztok (a) se zředí na tři koncentrace astragalosidu IV tak, aby zahrnovaly předpokládanou hodnotu ve zkoušeném roztoku.

Porovnávací roztok (e). 5,0 mg ginsenosidu Rb1 R se rozpustí v 5 ml methanolu R a zředí se porovnávacím roztokem (a) na 10,0 ml.

Kolona:

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 3,2 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (3 μm);
- teplota: 25 °C.

Mobilní fáze:

- mobilní fáze A: voda R;
- mobilní fáze B: acetonitril R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	90	10
5–10	90 → 80	10 → 20
10–20	80 → 75	20 → 25
20–30	75 → 67	25 → 33
30–40	67 → 65	33 → 35
40–50	65 → 40	35 → 60
50–55	40	60

Průtoková rychlost. 0,5 ml/min.

Detekce. Detektor na bázi rozptylu světla s odpařováním; jako vhodné bylo nalezeno následující nastavení; jestliže má detektor různé parametry nastavení, upraví se jeho nastavení tak, aby bylo v souladu s kritériem testu způsobilosti:

- nosný plyn: vzduch;
- průtoková rychlost: 1,5 ml/min;
- teplota odpařování: 50 °C.

Nástřik. 20 μl; zkoušený roztok a porovnávací roztoky (b), (c), (d) a (e).

Relativní retence vztažená ke ginsenosidu Rb1 (retenční čas asi 33,6 min). Astragalosid IV asi 1,05.

Test způsobilosti:

- rozlišení: nejméně 4,0 mezi píkem astragalosidu IV a píkem ginsenosidu Rb1 na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Sestrojí se kalibrační křivka za použití logaritmu koncentrací (mg/ml) porovnávacích roztoků (b), (c) a (d) na ose x (korigováno deklarovaným obsahem astragalosidu IV CRL) a logaritmu ploch odpovídajících piků na ose y. Obsah astragalosidu IV v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{10^4 \cdot 0,5}{m}$$

v němž značí:

- A – logaritmus koncentrace píku astragalosidu IV na chromatogramu zkoušeného roztoku, odečtený z kalibrační křivky;
- m – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech.

## ATRACTYLODIS LANCEAE RHIZOMA

7.5:2559

### Oddenek atraktylu kopinatého

#### DEFINICE

Je usušený celý oddenek druhu *Atractylodes lancea* (THUNB.) DC. [synonymum: *Atractylodes chinensis* (BUNGE) KOIDZ.] zbavený kořenů, nebo jeho úlomky, sbíraný na jaře a na podzim.

Obsah sílice. Nejméně 14 ml/kg bezvodé drogy.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Celý oddenek je nepravidelně zkroucený, uzlinovitě válcovitý, 3 cm až 10 cm dlouhý, o průměru 1 cm až 3 cm; svrchní strana je příčně rýhovaná, tmavě šedo-hnědá až žlutohnědá s četnými okrouhlými výčnělky a velkými kruhovými jizvami po lodyhách a menšími jizvami po kořenech.

Úlomky oddenku tvoří plátky s velmi proměnlivým průměrem (1 cm až 4 cm) a tloušťkou asi 0,5 cm. Svrchní strana je zvrásněná, tmavě šedo-hnědá až žlutohnědá, s četnými jizvami. Příčný řez je světle žlutý až hnědo-žlutý tvořený vláknitou tkání s početnými oranžovými siličnými nádržkami, které se jeví jako jemné tečky.

B. Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky oranžového korku s mnohohrannými buňkami, často provázené téměř pravouhlými nebo vejčitými sklereidami pocházejícími z felodermu, se silně ztlustlými žlábkovitými stěnami; jednotlivé vejčité až téměř pravouhlé sklereidy s velmi silnými žlábkovitými stěnami a s úzkým lumenem, proměnlivého tvaru, o průměru 20 μm až 80 μm; úlomky parenchymu s mnohohrannými nebo téměř pravouhlými buňkami obsahujícími malé jehličkovité krystaly kalcium-oxalátu (5 μm až 30 μm) zřetelně patrné v polarizovaném světle; úlomky svazků vláken se silně ztlustlými jemně tečkovanými stěnami, o průměru 40 μm, s úzkým lumenem, velmi často provázené cévami dřeva; úlomky krátkých síťovitě nebo tečkovitě ztlustlých cév, obvykle provázených tenkostěnným parenchymem; úlomky siličných kanálků s tenkostěnnými buňkami a zmitým oranžovohnědým obsahem a oranžovými kapkami sílice.

Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R*, bez zahřívání; v práškové droze jsou kousky inulinu volně nebo uvnitř buněk parenchymu.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Atractylodes macrocephala* (viz Zkoušky na čistotu).

Rostlinné drogy a přípravky...



*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
β-karyofylen: růžová skvrna	růžová nebo fialová skvrna může být přítomna oranžová skvrna
	intenzivní šedozelená skvrna velmi slabá fialová skvrna
bornyl-acetát: hnědá skvrna	fialová skvrna několik fialových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Attractylodis macrocephala.* Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) v odstředivkové zkumavce se přidají 2 ml *methanolu R*, uzavře se, vloží se na 15 min do ultrazvukové lázně při 25 °C a pak se odstředí.

*Porovnávací roztok.* 10 mg β-karyofylenu *R* a 10 mg bornyl-acetátu *R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *heptanu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 5 μl [nebo 3 μl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm], v nenasycené komoře.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °až 110 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední třetině intenzivní šedozelená skvrna. V případě záměny s *Attractylodis macrocephala* není ve střední třetině žádná intenzivní šedozelená skvrna.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se se 20,0 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 15,0 g rostlinné drogy upráškové (710) (2.9.12) těsně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s kulatým dnem se 200 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE RHIZOMA

7.5:2560

### Oddenek atraktylu velkokvětého

#### DEFINICE

Je usušený celý oddenek druhu *Attractylodes macrocephala* KOIDZ. zbavený kořenů, nebo jeho úlomky, sbíraný v zimě, kdy jsou spodní listy zežloutlé a vrchní křehké.

*Obsah silice.* Nejméně 9 ml/kg bezvodé drogy.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oddenek je nepravidelného tvaru, 3 cm až 13 cm dlouhý, o průměru 1,5 cm až 7 cm, svrchní strana je šedožlutá až tmavě hnědá, s malými knoflíkovitými výčnělky přerušovanými podlouhlými rýhami a žlábků.

Úlomky kořene tvoří plátky s velmi proměnlivým průměrem (1 cm až 7 cm) a tloušťkou asi 0,5 cm. Svrchní strana je rýhovaná nebo žlábkovaná, víceméně tmavě žlutohnědá s četnými kořenovými jizvami. Příčný řez světle žlutý, tvořený tkání se širokými plochami, mezi nimiž jsou četné oranžové siličné nádržky roztroušené jako jemné tečky, které jsou velmi hojné v zevních tkáních.

Tkáň je tvrdá, těžko se láme.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky oranžového korku s mnohohrannými buňkami; úlomky parenchymu s mnohohrannými nebo téměř pravoúhlými buňkami, mnohé z nich obsahují malé jehličkovité krystaly kalcium-oxalátu (10 μm až 32 μm) zřetelně patrné v polarizovaném světle; sklereidy jednotlivě nebo v malých skupinách s velmi silnými žlábkovitými stěnami proměnlivého tvaru (o průměru 35 μm až 65 μm); úlomky vláken jednotlivě nebo ve svazcích s mírně ztlustlými a jemně tečkovanými stěnami o průměru 40 μm; úlomky krátkých síťovitě nebo tečkovitě ztlustlých cév, obvykle provázené tenkostěnným parenchymem; úlomky siličných kanálků s tenkostěnnými buňkami a se zrnitým oranžovohnědým obsahem. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* bez zahřívání; v práškové droze jsou četné kousky inulinu volně, nebo uvnitř buněk parenchymu.

**C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Attractylodis lancea* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
β-karyofylen: růžová skvrna	růžová nebo fialová skvrna oranžová skvrna
	velmi slabá fialová skvrna
bornyl-acetát: hnědá skvrna	velmi slabá fialová skvrna několik slabých fialových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *ethanolu* 96% R, zahřívá se 2 min ve vodní lázni při 60 °C a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 0,25 ml roztoku čerstvě připraveného následujícím způsobem: 5 mg *vanilinu* R se rozpustí v 0,5 ml *ethanolu* 96% R, přidá se 0,5 ml *vody* R, 3 ml *kyseliny chlorovodíkové* R a ihned se protřepe; vznikne trvalé červené až červenopurpurové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Attractylodis lancea.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27). **Zkoušený roztok.** K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) v odstředivkové zkumavce se přidají 2 ml *methanolu* R, uzavře se, vloží se na 15 min do ultrazvukové lázně při 25 °C a pak se odstředí.

**Porovnávací roztok.** 10 mg β-karyofyleny R a 10 mg bornyl-acetátu R se rozpustí v 5 ml *methanolu* R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu* R a *heptanu* R (5 + 95).

**Nanášení.** 5 μl [nebo 3 μl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

**Vývíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm], v nenasycené komoře.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem* RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 105 ° až 110 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není ve střední třetině nad velmi slabou fialovou skvrnou žádná šedo zelená skvrna.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se se 20,0 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 15,0 g rostlinné drogy upráškové (710) (2.9.12) těsně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s kulatým dnem se 200 ml *vody* R jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu* R.

### AURANTII AMARI FLORIS ETHEROLEUM

6.0:1175

Silice květů hořkého pomeranče

*Synonymum.* Neroli aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvých květů druhu *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* L. (*C. aurantium* L. ssp. *amara* ENGL.) destilací s vodní parou.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Čirá světle žlutá nebo tmavě žlutá tekutina, charakteristického pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Bergapten (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
methyl-anthranilát: modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (methyl-anthranilát)
bergapten: zelenožlutě fluoreskující skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Postříká se *anisaldehydem* RS a 10 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna linalolu intenzivnější než skvrna linalyl-acetátu.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

Horní okraj desky	
linalyl-acetát: hnědočerveně fluoreskující skvrna	hnědě fluoreskující skvrna intenzivní hnědočerveně fluoreskující skvrna (linalyl-acetát)
methyl-anthranilát: modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna methyl-anthranilát) slabě hnědočerveně fluoreskující skvrna
linalol: hnědočerveně fluoreskující skvrna bergapten: zelenožlutě fluoreskující skvrna	hnědočerveně fluores- kující skvrna (linalol)
	několik modře a hnědočer- veně fluoreskujících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,863 až 0,880.

**Index lomu** (2.2.6). 1,464 až 1,474.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +1,5° až +11,5°, měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 2,0.

**Bergapten.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se rozpustí v *ethanolu 96% R* a zředí se jím na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 2 µl *methyl-anthranilátu R*, 10 µl *linalyl-acetátu R*, 20 µl *linalolu R* a 5 mg *bergaptenu R* se rozpustí v *ethanolu 96% R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (15 + 85).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 8 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není přítomna skvrna odpovídající skvrně *bergaptenu R* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok (a).* 20 µl *β-pinenu R*, 5 mg *sabinenu R*, 40 µl *limonenu R*, 40 µl *linalolu R*, 20 µl *linalyl-acetátu R*, 5 mg *α-terpineolu R*, 5 µl *neryl-acetátu R*, 5 µl *geranyl-acetátu R*, 5 µl *trans-nerolidolu R*, 5 µl

*methyl-anthranilátu R* a 5 µl *(E,E)-farnesolu R* se rozpustí ve 2 ml *heptanu R*.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl *methyl-anthranilátu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;

– *stacionární fáze:* *makrogol 20 000 R* (tloušťka vrstvy 0,25 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–4	75
	4–42,8	75 → 230
	42,8–63	230
nástřikový prostor		270
detektor		270

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem *β-pinenu R* a píkem *sabinenu R*.

Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují jednotlivé látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

*Limity:*

– *β-pinenu R:* 7,0 % až 17,0 %;

– *limonenu R:* 9,0 % až 18,0 %;

– *linalolu R:* 28,0 % až 44,0 %;

– *linalyl-acetát:* 2,0 % až 15,0 %;

– *α-terpineolu R:* 2,0 % až 5,5 %;

– *neryl-acetát:* nejvýše 2,5 %;

– *geranyl-acetát:* 1,0 % až 5,0 %;

– *trans-nerolidolu R:* 1,0 % až 5,0 %;

– *methyl-anthranilát:* 0,1 % až 1,0 %;

– *(E,E)-farnesolu R:* 0,8 % až 4,0 %;

– *limit zanedbatelnosti:* plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

**Chirální čistota.** Plynová chromatografie (2.2.28).

*Zkoušený roztok.* 20 mg se rozpustí v *pentanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* K 10 µl *linalolu R* se přidá 10 µl *linalyl-acetátu R* a zředí se *pentanem R* na 10,0 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 25 m, vnitřní průměr 0,25 mm;

– *stacionární fáze:* *β-cyklohextrin pro chirální chromatografii modifikovaný R* (tloušťka vrstvy 0,25 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,3 ml/min.

Dělicí poměr. 1 : 30.

Teplota:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–65	50 → 180
nástříkový prostor		230
detektor		230

Detekce. Plamenoionizační detektor.

Nástřík. 1 µl.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 5,5 mezi píkem (R)□□□-linalolu (první pík) a píkem (S)(+)-linalolu (druhý pík); nejméně 2,7 mezi píkem (R)(-)-linalyl-acetátu (třetí pík) a píkem (S)(+)-linalyl-acetátu (čtvrtý pík).

Obsah specifikovaných S-enantiomerů v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1}{A_1 + A_2} \cdot 100,$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku odpovídajícího S-enantiomeru;

$A_2$  – plochu píku odpovídajícího R-enantiomeru.

Limity:

– (S)(+)-linalol: nejvýše 30 %;

– (S)(+)-linalyl-acetát: nejvýše 5 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## AURANTII AMARI FLOS

7.3:1810

Květ hořkého pomeranče

#### DEFINICE

Je to celý usušený nerozvitý květ druhu *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* ENGL.).

Obsah. Nejméně 8,0 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako naringin ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ ;  $M_r$  580,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

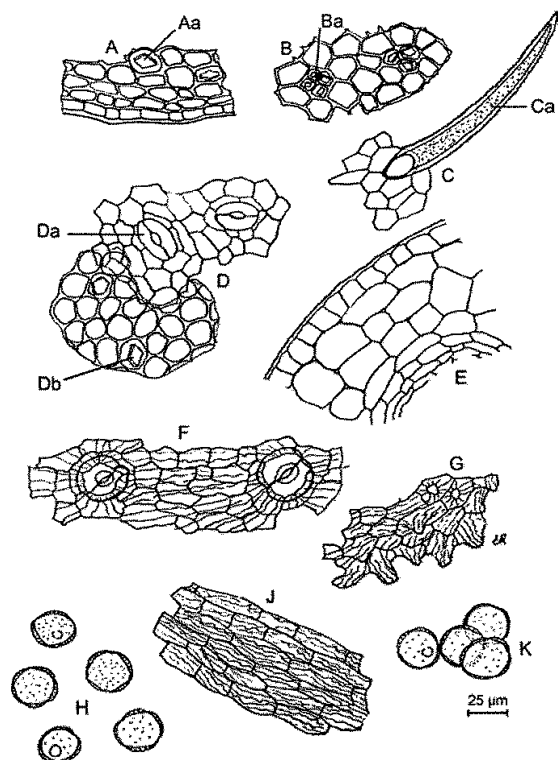
- A.** Poupata jsou bílá nebo žlutobílá, až 25 mm dlouhá. Korunu tvoří pět silných podlouhlých, vypouklých lístků s prosvítavými siličnými žlázkami viditelnými pod lupou. Kalich je krátký, vytrvalý, pětičetný, žlutozelený; kališní lístky jsou hvězdovitě odstálé, na bázi srostlé, ukončené žlutozelenou asi 5 mm až 10 mm dlouhou stopkou. Poupata mají nejméně dvacet tyčinek se žlutými prašníky, tyčinky jsou na bázi srostlé do skupin po čtyřech nebo pěti; semeník je svrchní, hnědočerný, kulovitý, osmipouzdrý až desetipouzdrý s mnoha vajíčky, s prstencovitým zrnitým valem na bázi; ztlustlá válcovitá čnělka nese hlavičkovitou bliznu.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Práš-

kovaná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): velmi četná kulovitá pylová zrna s jemně tečkovanou exinou a třemi až pěti klíčovými póry [H, K]; úlomky pokožky kalicha v plošném pohledu [D] a v příčném řezu [A, C] s buňkami mezofylu [B], obsahujícími hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Aa, Ba, Db], jednobuněčné krycí chlupy [Ca] a četné anomocytické průduchy (2.8.3) [Da]; úlomky pokožky koruny v plošném pohledu [F, G, J] se zřetelně zvrásněnou kutikulou; úlomky velkých schizolysigenních siličných nádržek o průměru až 100 µm v příčném řezu [E]. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku hydroxidu draselného R (20 g/l), který zežloutne vlivem přítomnosti hesperidinu v rostlinné droze.

- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Aurantii dulcis flos (viz Zkoušky na čistotu).

Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
	slabá žlutě fluoreskující skvrna
	slabá žlutě fluoreskující skvrna
hesperidin: zelenožlutě fluoreskující skvrna	zelenožlutě fluoreskující skvrna (hesperidin)
naringin: žlutě fluoreskující skvrna	žlutě fluoreskující skvrna (naringin)
	červeně fluoreskující skvrna (neoriocitrin)
	žlutě fluoreskující skvrna (diosmin a neodiosmin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného květu hořkého pomeranče

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Aurantii dulcis flos.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se míchá 10 min s 5 ml *methanolu R* při 40 °C a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 3,0 mg *naringinu R* a 3,0 mg *hesperidinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 15 + 75).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu a pak 5 min v sušárně při 110 °C až 120 °C.

*Detekce.* Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenyloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se po nejméně 1 h v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je žlutá skvrna odpovídající polohou skvrně *naringinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod ní je červená skvrna (*neoeriocitrin*).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok.* 0,175 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 95 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla (2.1.2). Filtr se promyje 5 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, filtráty a promývací kapalina se spojí a zředí se v odměrné baňce *ethanolu 50% (V/V) R* na 100,0 ml.

*Zkoušený roztok.* Do zkumavky (10 mm × 180 mm) se převede 0,150 g práškované (250) (2.9.12) *hořčiku R*, magnetické míchadlo délky 25 mm a 2,00 ml základního roztoku. Zkumavka se ve svislé poloze odstředí při 125 g, opatrně se po kapkách, zejména zpočátku, přidají 2,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, pak 6,0 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a uzavře se. Promíchá se převrácením zkumavky.

*Kontrolní roztok.* Ve druhé zkumavce se ke 2,00 ml základního roztoku opatrně po kapkách, zejména zpočátku, přidají 2,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a pak 6,0 ml *ethanolu 50% (V/V) R*.

Po 10 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 530 nm.

Obsah celkových flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako *naringin* (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 9,62}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 530 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance pro reakční produkt *naringinu* má hodnotu 52.

AURANTII AMARI PERICARPII  
TINCTURA

6.0:1604

## Tinktura z oplodí hořkého pomeranče

*Synonymum.* Aurantii amari epicarpium et mesocarpium tinctura

## DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z usušené drogy *Aurantii amari pericarpium* (1603).

## VÝROBA

Připravuje se z 1 dílu čerstvě práškované drogy (2000) (2.9.12) a 5 dílů roztoku *ethanolu 70% (V/V)* vhodným postupem.

## VLASTNOSTI

Tekutina hořké chuti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27)

*Zkoušený roztok.* Zkoušená tinktura.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *naringinu R* a 1,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 15 + 75).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu a 5 min v sušárně při 110 °C až 120 °C.

*Detekce.* Ještě teplá vrstva se postříká roztokem *difenyloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se za 1 h v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna
	světle modře fluoreskující skvrna
naringin: tmavě zeleně fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna
	světle modře fluoreskující skvrna
	tmavě zeleně fluoreskující skvrna ( <i>naringin</i> )
	červeně fluoreskující skvrna ( <i>neoeriocitrin</i> )
	oranžově fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 63,0 % až 67,0 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol (2.9.11).** Nejvýše 0,05 % methanolu (*V/V*) a nejvýše 0,05 % propan-2-olu (*V/V*).

**Zbytek po odpaření.** Nejméně 6,0 %; stanoví se s 2,00 g tinktury.

## AURANTII AMARI PERICARPIUM

6.3:1603

### Oplodí hořkého pomeranče

*Synonymum.* Aurantii amari epicarpium et mesocarpium

#### DEFINICE

Je to usušené oplodí zralého plodu druhu *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* ENGL.), částečně zbavené bílé houbovitě tkáně (albeda).

*Obsah.* Nejméně 20 ml/kg silice, počítáno na bezvodou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má aromatický pach a kořenitě hořkou chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oválné nebo nepravidelné kousky 5 cm až 8 cm dlouhé, 3 cm až 5 cm široké a asi 3 mm silné, na svrchní straně nažloutlé nebo červenohnědé a zřetelně tečkované, na vnitřní straně nažloutlé až nahnědle bílé.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: malé mnohohranné buňky s mírně ztlustlými antiklinálními stěnami, uvnitř s oranžovočervenými chromatofory, velmi zřídka anomocytické průduchy (2.8.3); úlomky kolenchymaticky ztlustlé hypodermis; skupiny parenchymatických buněk, z nichž každá obsahuje hranolovité krystal šťavelanu vápenatého; úlomky lysisenných siličných nádržek; parenchymatické buňky obsahující krystaly hesperidinu, které se rozpouštějí v roztoku *hydroxidu draselného R* (20 g/l) za vzniku žlutého zbarvení.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min při 65 °C ve vodní lázni za častého protřepávání. Nechá se ochladit a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *naringinu R* a 1,0 mg *kyselelínny kávové R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *kyselelínny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 15 + 75).

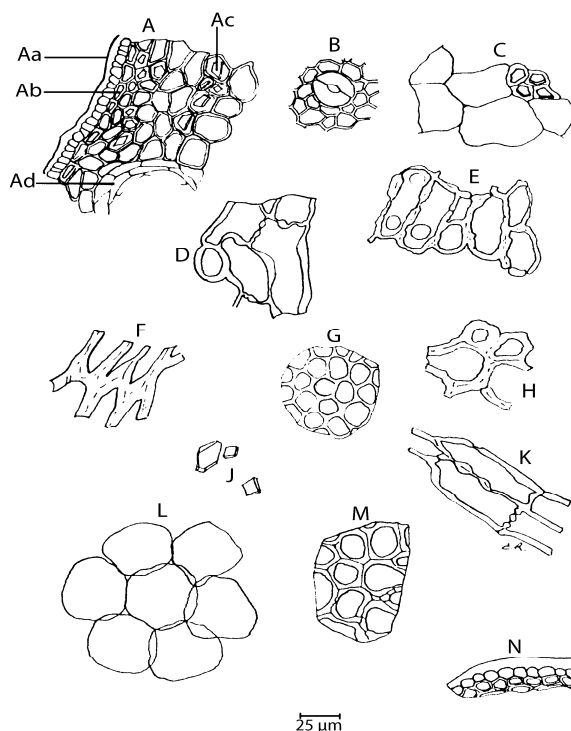
*Nanášení.* Po 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu a 5 min v sušárně při 110 °C až 120 °C.

*Detekce.* Ještě teplá vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a potom roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se za nejméně 1 h v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další fluoreskující skvrny.



- A = úlomek oplodí, na příčném řezu, se ztlustlou kutikulou (Aa) kolenchymatickou hypodermis (Ab) a částí parenchymatického mezokarpu, obsahující hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého (Ac) a úlomek siličné nádržky (Ad)
- B = úlomek oplodí s anomocytickým průduchem z plošného pohledu
- C = skupina buněk mezokarpu, z nichž některé obsahují krystaly šťavelanu vápenatého
- D, E, F, H, K a M = úlomky mezokarpu
- G = kolenchymatické buňky uvnitř vrstvy oplodí
- J = hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého
- L = skupina parenchymatických buněk
- N = úlomek oplodí se ztlustlou kutikulou a kolenchymaticky ztlustlou hypodermis, příčný řez

**Obr. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškového oplodí hořkého pomeranče (viz zkoušku totožnosti B)

Horní okraj desky	
	světle modře fluoreskující skvrna
	světle modře fluoreskující skvrna
kyselina kávová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna
	světle modře fluoreskující skvrna
	světle modře fluoreskující skvrna
naringin: tmavozeleně fluoreskující skvrna	tmavozeleně fluoreskující skvrna (naringin)
	červeně fluoreskující skvrna (neorierocitrin)
	oranžově fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné drogy a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Extrahovatelné látky**. Nejméně 6,0 %.

Ke 2,000 g práškové drogy (250) (2.9.12) se přidá směs 3 ml vody R a 7 ml ethanolu 96% R, nechá se stát 2 h za častého protřepávání a pak se zfiltruje. 2,000 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a suší se 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad oxidem fosforečným R se zváží. Hmotnost zbytku po vysušení je nejméně 120 mg.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). Droga se upráškuje (710) (2.9.12) těsně před použitím. 15,0 g drogy se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce se 200 ml vody R. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu R.

AURANTII DULCIS PERICARPII  
ETHEROLEUM

6.0:1811

Silice oplodí sladkého pomeranče

*Synonymum*. Aurantii dulcis aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná bez zahřívání, vhodným mechanickým způsobem z čerstvého oplodí plodu druhu *Citrus sinensis* (L.) OSBECK (*Citrus aurantium* L. var. *dulcis* L.). Může být přidána vhodná antioxidační látka.

## VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirá světle žlutá až oranžová pohyblivá kapalina, která se může ochlazením zakalit. Má charakteristický pach po čerstvé pomerančové kůře.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Bergapten (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
bergapten: zelenožlutě fluoreskující skvrna	
	mnoho modře fluoreskujících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
linalyl-acetát: hnědooranžově fluoreskující skvrna	hnědě fluoreskující skvrna slabě hnědooranžově fluoreskující skvrna (linalyl-acetát)
linalol: hnědooranžově fluoreskující skvrna bergapten: slabě zelenožlutě fluoreskující skvrna	mnoho oranžově fluoreskujících skvrn hnědooranžově fluoreskující skvrna (linalol)
	mnoho hnědooranžově fluoreskujících skvrn
	mnoho modře fluoreskujících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům těchto píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,842 až 0,850.

**Index lomu** (2.2.6). 1,470 až 1,476.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +94° až +99° měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo peroxidové** (2.5.5, Metoda B). Nejvýše 20.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce na mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

**Bergapten**. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,2 ml se rozpustí v ethanolu 96% R a zředí se jím na 1 ml.

*Porovnávací roztok*. 2 mg bergaptenu R, 10 µl linalolu R a 20 µl linalyl-acetátu R se rozpustí v 10 ml ethanolu 96% R.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (15 + 85).

*Nanášení*. 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce A*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou žádné zelenožlutě fluoreskující skvrny jako na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B*. Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 300 µl se zředí acetonem R na 1 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 10 µl α-pinenu R, 10 µl β-pinenu R, 10 µl sabinenu R, 20 µl β-myrcenu R, 800 µl limonenu R, 10 µl oktanalu R, 10 µl dekanalu R, 10 µl linalolu R, 10 µl citralu R (složeného z neralu a geranialu) a 10 µl valencenu R se rozpustí v 1 ml acetonu R.

**Porovnávací roztok (b).** 5 µl β-pinenu R se rozpustí v 10 ml acetonu R. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí acetonem R na 10 ml.

**Kolona:**

- **materiál:** tavený křemen;
- **rozměry:** délka 30 m, vnitřní průměr 0,53 mm;
- **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 1 µm).

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 100.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–6	50
	6–31	50 → 150
	31–41	150 → 180
	4–55	180
nástříkový prostor		250
detektor		250

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřík.** 0,5 µl.

**Pořadí eluce.** Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (a):

- **rozišení:** nejméně 3,9 mezi píkem β-pinenu a píkem sabinenu a nejméně 1,5 mezi píkem valencenu a píkem geranialu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se určí látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Vypočítají se obsahy těchto látek v procentech, které jsou v následujících mezích:

- α-pinén: 0,4 % až 0,6 %;
- β-pinén: 0,02 % až 0,3 %;
- sabinén: 0,2 % až 1,1 %;
- β-myrcén: 1,7 % až 2,5 %;
- limonén: 92,0 % až 97,0 %;
- oktanal: 0,1 % až 0,4 %;
- dekanal: 0,1 % až 0,4 %;
- linalol: 0,2 % až 0,7 %;
- neral: 0,02 % až 0,10 %;
- valencén: 0,02 % až 0,5 %;
- geranial: 0,03 % až 0,20 %.

**Limit zanedbatelnosti.** Plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,01 %).

**Zbytek po odpaření.** 1,0 % až 5,0 %; 5,0 g se odpaří do sucha na vodní lázni a potom se suší 4 h při 100 °C až 105 °C.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve zcela naplněných, vzduchotěsných obalech, chráněných před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## BALLOTAE NIGRAE HERBA

7.2:1858

Nat' měrnice černá

**DEFINICE**

Jsou to usušené kvetoucí vrcholky nati druhu *Ballota nigra* L.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % celkových derivátů kyseliny ortho-dihydroxykořicové, vyjádřeno jako akteosid (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>; M<sub>r</sub> 624,6), počítáno na vysušenou drogu.

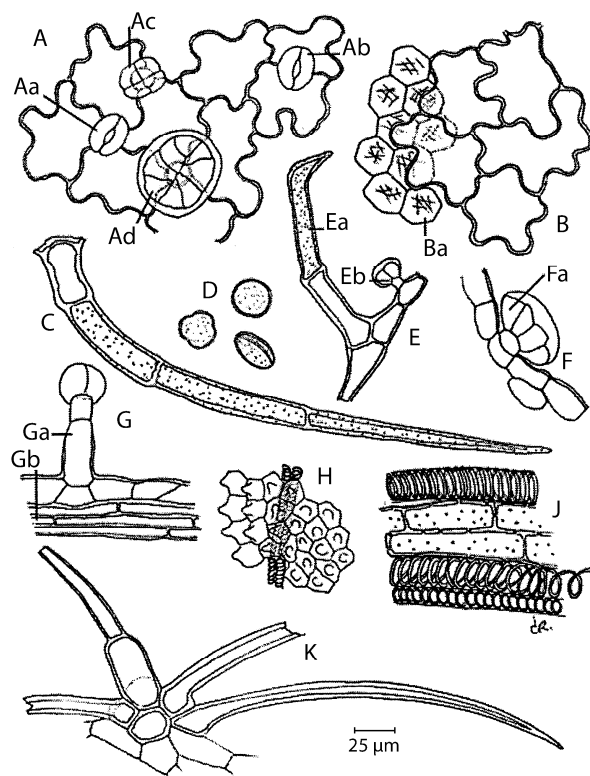
**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Lodyha je čtyřhranná, podélně rýhovaná, tmavě zelená nebo červenohnědá, roztroušeně až hustě chlupatá. Listy jsou šedozeleňé, řapíkaté, čepel je vejčitá až okrouhlá, 2 cm až 4 cm široká, na bázi klinovitá nebo srdčitá, s okrajem nepravidelně vroubkovaným, obě strany čepele jsou roztroušeně bělavě chlupaté, žilnatina je zpeřená, na spodní straně vyniklá, na svrchní straně mírně vpadlá. Květy jsou přisedlé nebo jen velmi krátce řapíkaté, kalich je nálevkovitý, hustě chlupatý, s deseti vyniklými žebry a pěti široce vejčitými téměř stejnými cípy, koruna je červenofialová, trubka je o něco málo kratší než trubka kalicha, zřetelně dvoupyská, horní korunní pysk je vně hustě chlupatý, dolní korunní pysk trojlaločný, střední lalok je na vrcholu vykrojený.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedozeleňý a mírně vločkovitý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné dlouhé jednoradé mnohobuněčné krycí chlupy, tvořené čtyřmi nebo více ztlustlými buňkami na bázi rozšířeními, s mírně zdřevnatělými a tečkovanými stěnami, volné [C] nebo na pokožce v příčném řezu [Ea]; ojedinělé žláznaté chlupy obvykle na pokožce v příčném řezu [E, F, G]; některé s jednobuněčnou nebo vícebuněčnou nohou a kulovitou jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou hlavičkou [Ga], jiné s jednobuněčnou nohou a mnohobuněčnou hlavičkou v plošném pohledu [Ac] nebo v příčném řezu [Eb], a jiné s jednobuněčnou nohou a osmibuněčnou hlavičkou typu Lamiaceae v plošném pohledu [Ad] nebo v příčném řezu [Fa]; úlomky svrchní pokožky listu [B] s buňkami se zprohýbanými stěnami, doprovázené palisádovým parenchymem, z nichž většina obsahuje jemné jehličkovité krystaly [Ba]; úlomky spodní pokožky listu [A] s četnými průduchy většinou anomocytického typu (2.8.3) [Aa], ale někdy i diacytického typu [Ab]; úlomky pokožky koruny tvořené mnohohranými buňkami z vnitřní pokožky papilózních pysků [H] a z vnitřní pokožky trubky s jednobuněčnými nebo

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



dvoubuněčnými krycími hvězdovitými [K] chlupy; okrouhlá pylová zrna se třemi klíčovými póry a hladkou exinou [D]; úlomky stonku [G] se skupinami kolenchymatických buněk [Gb] a zdřevnatělých kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlých cév [J].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové natě měrnice černé

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** 2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchají se 100 ml *methanolu R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem; nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku na objem asi 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg *rutinu R* a 1 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethylacetátu R* (7,5 + 7,5 + 18 + 67).

**Nanášení.** 20 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se roztokem obsahujícím *difenylboryloxyethylamin R* (10 g/l) a *makrogol 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se usušit v proudu teplého vzduchu. Pozoruje se po 30 min v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	načervenalé fluoreskující skvrna
	slabá žlutě fluoreskující skvrna
rutin: oranžovožlutě fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina kávoyljablečná)
	zelenomodře fluoreskující skvrna (akteosid)
	žlutohnědě fluoreskující skvrna (luteolin-7-laktát)
	zelenomodře fluoreskující skvrna (forsythosid B)
	dvě zelenomodře fluoreskující skvrny (arenariosid)
	žlutě fluoreskující skvrna (luteolin-7-laktát-glukosid)
	slabá zelenomodře fluoreskující skvrna (ballo-tetrosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 13,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

**Základní roztok.** 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 90 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se do 100ml odměrné baňky, baňka i filtr se promyjí 10 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky, spojené roztoky se zředí *ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 1,0 ml základního roztoku se v 10ml odměrné baňce postupně smíchá (za protřepávání po každém přidání) se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS*, 2 ml roztoku obsahujícího *dusitan sodný R* (100 g/l) a *molybdenan sodný R* 100 g/l a 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

**Kontrolní roztok.** V 10ml odměrné baňce se smíchá 1,0 ml základního roztoku se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS*, 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Okamžitě se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 525 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah celkových derivátů kyseliny *ortho*-dihydroxyskořicové, vyjádřeno jako akteosid (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1000}{185 \cdot m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 525 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance akteosidu má hodnotu 185.

## BALSAMUM PERUVIANUM

6.2:0754

### Peruánský balzám

#### DEFINICE

Je to balzám získaný z popáleného a poraněného kmene druhu *Myroxylon balsamum* (L.) HARMS var. *pereirae* (ROYLE) HARMS.

**Obsah.** 45,0 % až 70,0 % esterů, zejména benzyl-benzoátu a benzyl-cinnamátu.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Tmavě hnědá viskózní tekutina, v tenké vrstvě průhledná a žlutohnědá; není lepivá, nevysychá ani se nitřovitě netáhne.

**Rozpustnost.** Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu bezvodém, nemísitelný s mastnými oleji s výjimkou ricinového oleje.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** 0,20 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu 96% R*. Přidají se 0,2 ml *chloridu železitého RSI*; vzniká zelené až žlutozelené zbarvení.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,5 g se rozpustí v 10 ml *ethyl-acetátu R*.

**Porovnávací roztok.** 4 mg *thymolu R*, 30 mg *benzyl-cinnamátu R* a 80 µl *benzyl-benzoátu R* se rozpustí v 5 ml *ethyl-acetátu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *hexanu R* (0,5 + 10 + 90).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

**Vyvíjení.** Dvakrát po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; skvrny se označí.

**Hodnocení A.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v horní třetině dvě skvrny zhášeující fluorescenci, z nichž horní odpovídá benzyl-benzoátu a dolní benzyl-cinnamátu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny zhášeující fluorescenci odpovídající polohou a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Detekce B.** Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu 96% R* (použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm × 200 mm) a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Skvrny odpovídající benzyl-benzoátu a benzyl-cinnamátu jsou zbarveny modře na žlutém pozadí. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je přibližně uprostřed fialovošedá skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (nerolidol) v poloze odpovídající polohou těsně pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pod skvrnou nerolidolu není žádná modrá skvrna zhášeující fluorescenci v ultrafialovém světle při 254 nm (kalafuna). V horní a dolní části chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě modře zbarvené skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 1,14 až 1,17.

**Číslo zmýdelnění** (2.5.6). 230 až 255; stanoví se ze zbytku získaného ve zkoušce Stanovení obsahu.

**Umělé balzámy.** 0,20 g se protřepe se 6 ml *petroletheru R1*. Roztok je čirý a bezbarvý, všechny nerozpustné části balzámu ulpívají na stěnách zkumavky.

**Mastné oleje.** 1 g se protřepává se 3 ml roztoku *chloralhydrátu R* (1000 g/l). Roztok je stejně čirý jako roztok *chloralhydrátu R* (1000 g/l).

**Terpentýn.** 4 ml roztoku ze zkoušky Umělé balzámy se odpaří do sucha. Odparek nepáchne po terpentýnu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

K 2,50 g se v dělicí nálevce přidá 7,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 40 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a protřepává se intenzivně 10 min. Dolní vrstva se oddělí a protřepává se třikrát 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Spojené etherové výtřepky se vysuší 10 g *síranu sodného bezvodého R* a zfiltrují se. Síran sodný se promyje dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Spojené etherové vrstvy se odpaří do sucha. Zbytek (estery) se suší 30 min při 100 °C až 105 °C a pak se zváží.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem.

## BALSAMUM TOLUTANUM

6.0:1596

### Toluánský balzám

#### DEFINICE

Je to balzám získaný nařezáváním kůry stromů druhu *Myroxylon balsamum* (L.) HARMS var. *balsamum*.

**Obsah.** 25,0 % až 50,0 % volných nebo vázaných kyselin, vyjádřeno jako kyselina skořicová (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>; M<sub>r</sub> 148,2), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Tvrdá drolivá nahnědlá až červenohnědá hmota; tenké úlomky jsou v procházejícím světle hnědožluté. Droga má charakteristický pach po vanilinu.

**Rozpustnost.** Prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno až snadno rozpustný v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v petroletheru.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,40 g rozdrobněné drogy se 5 min míchá s 10 ml *dichlormethanu R* a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 50 mg *benzyl-cinnamátu R* se rozpustí v *dichlormethanu R*, přidá se 50 µl *benzyl-benzoátu R* a zředí se *dichlormethanem R* na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *petroletheru R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny další jinak zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
benzyl-benzoát: šedomodrá skvrna	šedomodrá skvrna
benzyl-cinnamát: šedozelená skvrna	šedozelená skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Číslo kyselosti.** 100 až 160; 0,5 g rozdrobněné drogy se rozpustí v 50 ml *ethanolu 96% R*. Přidá se 0,5 ml *modři kyselé 93 RS* a 5,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS*. Za intenzivního míchání se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* z hnědočerveného do černozeleného zbarvení ( $n_1$  ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS*). Proveďte se slepá zkouška ( $n_2$  ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS*). Číslo kyselosti se vypočítá stejným způsobem jako číslo zmydelnění (2.5.6).

**Podíl nerozpustný v ethanolu.** Nejvýše 5 %; 2,0 g rozdrobněné drogy se vaří s 25 ml *ethanolu 90% (V/V) R* a zfiltruje se. Zbytek se promývá vroucím *ethanolem 90% (V/V) R* do úplného vyextrahování. Zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C a zváží se.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 2,000 g rozdrobněné drogy se suší na ploché odpařovací misce o průměru 9 cm a pak 4 h ve vakuu.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 0,3 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

1,500 g se smíchá s 25,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Ethanol se odpaří, zbytek se smíchá s 50 ml *vody R* a zahřívá se, až je droga stejnoměrně rozptýlena. Po ochlazení se přidá 80 ml *vody R*, 1,5 g *síranu hořečnatého R* v 50 ml *vody R*, promíchá se a po 10 min stání se zfiltruje přes skládaný papírový filtr. Zbytek se promyje 20 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutiny se spojí, okyslí se *kyselinou chlorovodíkovou R* a protřepou se čtyřikrát 40 ml *etheru R*. Dolní vrstva se odstraní. Spojené horní vrstvy se protřepou dvakrát 20 ml a třikrát 10 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (50 g/l). Horní vrstva se odstraní. Spojené dolní vrstvy se okyslí *kyselinou chlorovodíkovou R* a protřepou se 30 ml,

dvakrát 20 ml a 10 ml *dichlormethanu R*. Spojené dichlormethanové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se přes skládaný papírový filtr a zbytek se promyje 10 ml *dichlormethanu R*. Spojené dichlormethanové extrakty se oddestilují tak, aby zbylo 10 ml a zbytek *dichlormethanu R* se odpaří v proudě vzduchu. Zbytek se rozpustí zahřátím v 10 ml *ethanolu 96% R* předem neutralizovaného na *červeň fenolovou RS*. Po ochlazení se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití stejného indikátoru do změny zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,82 mg celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina skořicová ( $C_9H_8O_2$ ).

## SKLADOVÁNÍ

Neskladuje se v práškové formě.

BELLADONNAE FOLII EXTRACTUM  
SICCCUM NORMATUM

6.3:1294

Extrakt z rulíkového listu suchý standardizovaný

## DEFINICE

Je to suchý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Belladonnae folium* (0221).

*Obsah.* 0,95 % až 1,05 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ;  $M_r$  289,4), počítáno na vysušenou látku.

## VÝROBA

Připravuje se z rostlinné drogy a *ethanolu 70% (V/V)* vhodným postupem.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědý nebo nazelenalý hygroskopický prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g se smíchá s 5,0 ml *methanolu R*, protřepává se 2 min a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Teplá vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, nechá se sušit 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího i na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části světlemodře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a v dolní části žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je těsně nad startem žlutohnědě fluoreskující skvrna, těsně nad

ni žlutě fluoreskující skvrna a mezi skvrnou rutinu a skvrnou kyseliny chlorogenové je žlutě nebo žlutohnědě fluoreskující skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny i další skvrny.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Atropin (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Atropin.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,20 g se smíchá s 10,0 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*, protřepává se 2 min a zfiltruje se. Filtrát se smíchá s 1,0 ml *amoniaku 26% R* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, je-li třeba, vrstvy se odstředí. Spojené etherové vrstvy se vysuší asi 2 g *síranu sodného bezvodého R*, zfiltruje se a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 50 mg *hyoscyamin-sulfátu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolamin-hydrobromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. Smíchá se s 1,8 ml roztoku skopolamin-hydrobromidu a 8 ml roztoku hyoscyamin-sulfátu.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 15 min při 100 °C až 105 °C; nechá se ochladit.

*Detekce A.* Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí.

*Hodnocení A.* Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny i další méně intenzivní skvrny.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná; pozoruje se po 15 min.

*Hodnocení B.* Oranžové nebo hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin).

**Ztráta sušením v extraktech (2.8.17).** Nejvýše 5,0 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti  $10^4$  CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti  $10^2$  CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

#### STANOVENÍ OBSAHU

V každém extrakčním stupni je nutné ověřit, že extrakce alkaloidů byla provedena kvantitativně. Při extrakci do organické fáze se odpaří několik mililitrů z poslední organické vrstvy do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a pomocí *tetrajodortu'natanu draselného RS* se ověří nepřítomnost alkaloidů. Při extrakci do kyselé vod-

né fáze se nepřítomnost alkaloidů ověří v několika mililitrech poslední kyselé vodné vrstvy *tetrajodortu'natanem draselným RS*.

3,00 g se dispergují ve směsi 5 ml *amoniaku 17,5% RS* a 15 ml *vody R*. Směs se protřepává nejméně třikrát 40 ml směsi objemových dílů *dichlormethanu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) až do kvantitativní extrakce alkaloidů. Spojené organické vrstvy se zahustí destilací na vodní lázni na asi 50 ml. Výsledná tekutina se převede do dělicí nálevky s použitím *etheru prostého peroxidických látek R* jako promývací kapaliny. K této tekutině se přidá nejméně 2,1 násobek objemu *etheru prostého peroxidických látek R*, aby vznikla vrstva o hustotě dostatečně nižší, než je hustota vody. Výsledný roztok se protřepává nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS* do kvantitativní extrakce alkaloidů. Je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním, kyselá vrstva se převede do druhé dělicí nálevky. Spojené kyselá vrstvy se zalkalizují *amoniakem 17,5% RS* a protřepává se nejméně třikrát 30 ml *dichlormethanu R* do kvantitativní extrakce alkaloidů. Organické vrstvy se spojí, přidají se 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasných protřepání. Dichlormethanová vrstva se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *dichlormethanu R*. Spojené organické vrstvy se odpaří do sucha na vodní lázni. Zbytek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C, potom se rozpustí v několika mililitrech *dichlormethanu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a opět se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C, rozpustí se v několika mililitrech *dichlormethanu R* a přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l VS* a dichlormethan se odpaří na vodní lázni. Přidá se *červeně methylová směsný indikátor RS* a přebytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{100 \cdot m}$$

v němž značí:

*n* – spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*

v mililitrech;

*m* – hmotnost použité drogy v gramech.

## BELLADONNAE FOLII TINCTURA NORMATA

6.0:1812

Tinktura z rulíkového listu standardizovaná

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Belladonnae folium* (0221). *Obsah.* 0,027 % až 0,033 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ; *M*, 289,4). Alkaloidy se skládají hlavně z hyoscyaminu doprovázeného malým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

#### VÝROBA

Připravuje se z 1 dílu práškované drogy (355) (2.9.12) a 10 dílů ethanolu 70% (V/V) vhodným postupem.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml se odpaří do sucha za sníženého tlaku ve vodní lázni při 40 °C. Zbytek se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 40 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Teplá vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, nechá se usušit na vzduchu 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) žlutě nebo žlutohnědě fluoreskující skvrna
rutin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	modrošedě fluoreskující skvrna žlutě fluoreskující skvrna žlutohnědě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

- B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve Zkoušce na čistotu *Atropin*, detekce A.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny, zejména ve střední části chromatogramu při nanášení 40 µl zkoušeného roztoku nebo v blízkosti startu při nanášení 20 µl zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
hyoscin: hnědooranžová skvrna	hnědooranžová skvrna (hyoscin)
	další slabě zbarvené skvrny
hyoscyamin: hnědooranžová skvrna	hnědooranžová skvrna (hyoscyamin) další slabě zbarvené skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Atropin.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 15,0 ml tinktury se smíchá s 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a pak se protřepává dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*; je-li třeba, vrstvy se odstředí. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 50 mg *hyoscyamin-sulfátu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolamin-hydrobromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. Smíchá se s 1,8 ml roztoku *skopolamin-hydrobromidu* a 8 ml roztoku *hyoscyamin-sulfátu*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90).

**Nanášení.** 20 µl a 40 µl každého roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** 15 min při 100 °C až 105 °C.

**Detekce A.** Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2*.

**Detekce B.** Postříká se *dusitanem sodným RS* tak, aby vrstva byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min.

**Hodnocení B.** Zbarvení skvrn odpovídajících *hyoscyaminu* na chromatogramech zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku se mění z hnědooranžového na červenohnědé, ne však na šedomodré (*atropin*) a další vedlejší skvrny již nejsou patrné.

**Ethanol (2.9.10).** 64,0 % (V/V) až 69,0 % (V/V).

## STANOVENÍ OBSAHU

50,0 g tinktury se odpaří na objem asi 10 ml a převede se malým množstvím *ethanolu 70% (V/V) R* do dělicí nálevky. Přidá se 5 ml *amoniaku 17,5 % RS* a 15 ml *vody R*. Protřepe se nejméně třikrát vždy 40 ml směsi objemových dílů *dichlormethanu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak, aby nedošlo ke vzniku emulze, až do úplné extrakce alkaloidů. Spojené organické vrstvy se odpaří na vodní lázni na objem asi 50 ml. Tento roztok se kvantitativně převede do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Pak se přidá *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1 násobek objemu organické vrstvy a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Výsledný roztok se protřepe nejméně třikrát vždy 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS* až do úplné extrakce alkaloidů, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstředěním. Spojené dolní vrstvy se převedou se do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5 % RS* a vytřepou se nejméně třikrát vždy 30 ml *dichlormethanu R* až do úplné extrakce alkaloidů. Ke spojeným organickým vrstvám se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepání. *Dichlormethan* se slíje a zfiltruje se, *síran sodný* se promyje třikrát vždy 10 ml *dichlormethanu R*. Spojené organické extrakty se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech *dichlormethanu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a zbytek se opět suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se znovu rozpustí v několika mililitrech *dichlormethanu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l VS* a *dichlormethan* se odstraní odpařením na vodní lázni. Přidá se *čer-*

veň *methylová směsný indikátor RS* a přebytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{100 \cdot m},$$

v němž značí:

$n$  – spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech;

$m$  – hmotnost drogy v gramech.

## BELLADONNAE FOLIUM

7.3:0221

### Rulíkový list

#### DEFINICE

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Atropa belladonna* L.

**Obsah.** Nejméně 0,30 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ;  $M_r$  289,4), počítáno na vysušenou drogu. Alkaloidy tvoří především hyoscyamin s malým množstvím skopolaminu (hyoscinu).

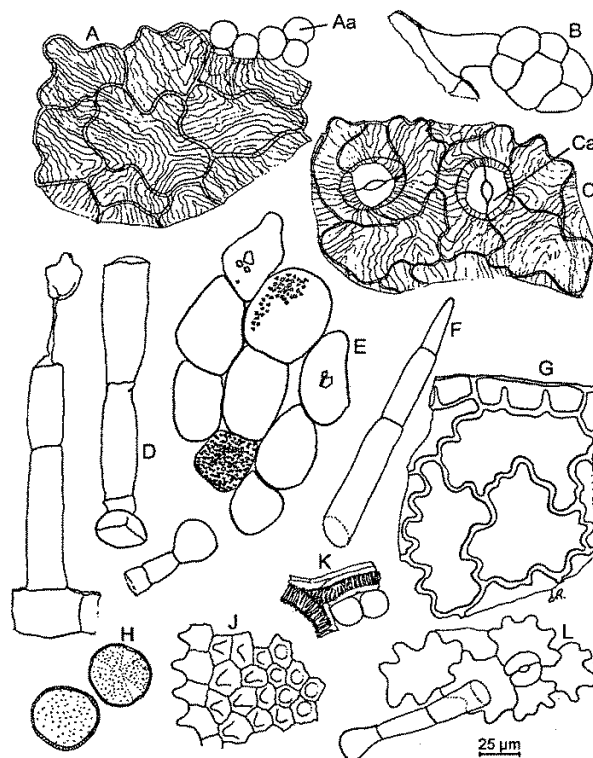
#### VLASTNOSTI

Droga má slabý pach nutkající ke zvracení.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou zelené nebo hnědozelené, na svrchní straně mírně tmavší, často svraskalé, zkroucené a částečně zmáčknuté dohromady. List je řapíkatý, na bázi zašpičatělý, sbíhavý, čepel je celokrajná. Kvetoucí lodyhy jsou zploštělé, s párem listů nestejně velikosti v každé uzlině; v paždí listů jsou jednotlivé květy nebo někdy i plody. Květy mají srostloplátěčný kalich a zvonkovitou korunu. Droga může obsahovat plody, kulaté zelené nebo hnědočerné bobule s vytrvalým kalichem a se široce odstálými ušty.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je tmavě zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky čepele listu s buňkami pokožky se zvlněnými stěnami a zvrásněnou kutikulou [A, C] a část pod ní ležícího palisádového parenchymu [Aa] spojeného s vrchní pokožkou [A]; četné anizocytické a někdy také anomocytické průduchy [Ca] (2.8.3), četnější na spodní straně listu [C]; mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy s hladkou kutikulou [F], žláznaté chlupy s jednobuněčnou hlavičkou a mnohobuněčnou jednořadou nohou [D] nebo s mnohobuněčnou hlavičkou a jednobuněčnou nohou [B]; okrouhlé parenchymatické buňky, některé obsahující mikrokrystaly kalcium-oxalátu [E]; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy [K]. V práškové droze mohou také být: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy lodyhy; téměř kulovitá pylová zrna o průměru 40  $\mu$ m až 50  $\mu$ m, se třemi klíčovými póry, třemi rýhami a s exinou s četnými tečkami [H]; úlomky

koruny s papilózní pokožkou [J] nebo s četnými krycími nebo žláznatými chlupy výše popsaných typů [L]; úlomky hnědožlutého osemení s nepravidelně ztlustlými buňkami [G].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové a přípravy...  
rulíkového listu

- C.** 1 g práškové rostlinné drogy (180) (2.9.12) se protřepává 2 min 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*, zfiltruje se, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně 15 ml *etheru R* tak, aby nedošlo k tvorbě emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltruje a ether se na porcelánové misce odpaří. K odparu se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a opět se odpaří do sucha na vodní lázni, přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *ethanolu 96% R*; vznikne tmavě fialové zbarvení.
- D.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografie (viz Zkoušky na čistotu).  
*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají při nanášení shodných objemů polohou, zbarvením a velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Chromatografie.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 0,6 g práškové rostlinné drogy (180) (2.9.12) se protřepává 15 min 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*, zfiltruje se a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* do získání 20 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředováním. Spojené etherové vrstvy se vysuší

síranem sodným bezvodým R, zfiltruje se a odpaří do sucha na vodní lázni. Odparek se rozpustí v 0,5 ml methanolu R. Porovnávací roztok. 50 mg hyoscyamin-sulfátu R se rozpustí v 9 ml methanolu R. 15 mg skopolamin-hydrobromidu R se rozpustí v 10 ml methanolu R. Smíchá se 1,8 ml roztoku skopolamin-hydrobromidu a 8 ml roztoku hyoscyamin-sulfátu.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC R.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů amoniaku 26% R, vody R a acetonu R (3 + 7 + 90).

Nanášení. 10 µl a 20 µl, odděleně do proužků (20 mm × 3 mm) se vzdáleností 1 cm mezi jednotlivými proužky.

Vývíjení. Po dráze 10 cm.

Sušení. 15 min při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

Detekce A. Postříká se jodobismutitanem draselným RS2 (použije se asi 10 ml na desku o straně 200 mm) do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí.

Hodnocení A. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou nejméně stejně velké jako skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny ve střední části chromatogramu při nanášení 20 µl, nebo v blízkosti startu při nanášení 10 µl.

Detekce B. Vrstva se postříká dusitanem sodným RS tak, aby byla průsvitná, a pozoruje se po 15 min.

Hodnocení B. Hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), neobjeví se žádné další skvrny.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % stonků o průměru větším než 5 mm.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 16,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

- Provede se zkouška Ztráta sušením (2.2.32). 2,000 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.
- 10,00 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se navlhčí směsí 5 ml amoniaku 17,5% RS, 10 ml ethanolu 96% R a 30 ml etheru prostého peroxidických látek R a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h macerovat. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů chloroformu R a etheru prostého peroxidických látek R (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v kyselině sírové 0,25 mol/l RS a nepřítomnost alkaloidů se ověří tetrajodortuňnatem draselným RS. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí etheru prostého peroxidických lá-

tek R. Přidá se ether prostý peroxidických látek R tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1 násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml kyseliny sírové 0,25 mol/l RS, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené dolní kyselá vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se amoniakem 17,5% RS a protřepávají se třikrát 30 ml chloroformu R. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g síranu sodného bezvodého R a nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Chloroform se dekantuje a síran sodný se promyje třikrát 10 ml chloroformu R. Promývací tekutiny se přidají k chloroformovým extraktům, odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech chloroformu R, přidá se 20,0 ml kyseliny sírové 0,01 mol/l RS a chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se červeně methylová směsný indikátor RS a přebytek kyseliny se titruje hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako hyoscyamin (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{(100 - d) \cdot m}$$

v němž značí:

*d* – ztrátu sušením v procentech;

*n* – spotřebu hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS v mililitrech;

*m* – hmotnost práškované rostlinné drogy v gramech.

## BELLADONNAE PULVIS NORMATUS

6.2:0222

### Rulíkový list práškováný standardizovaný

#### DEFINICE

Je to práškováný rulíkový list (180) (2.9.12), jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo drogy s nižším obsahem alkaloidů.

*Obsah.* 0,28 % až 0,32 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 289,36), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má slabý pach nutkající ke zvracení.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- Prášek je tmavě zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listu s buňkami pokožky se stěnami zvlněnými a zvrásněnou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy četnější na spodní straně listu; mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy s hladkou kutikulou; žláznaté chlupy s jednobuněčnou hlavičkou a jednořadou mnohobuněčnou nohou nebo s mnohobuněčnou hlavičkou a jednobuněčnou nohou; okrouhlé parenchymatické buňky s mikrokristaly šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. V práškované droze mohou také být: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; téměř kulovitá pylková zrna

o průměru 40 µm až 50 µm, se třemi klíčovými póry, třemi šterbinami, s exinou s četnými tečkami; úlomky koruny s papilózní pokožkou nebo s četnými krycími nebo žláznatými chlupy výše popsaných typů; úlomky hnědožlutých semen s nepravidelně ztlustlými tečkovanými buňkami osemi.

Pozoruje se v *glycerolu 85% R*: mohou být patrné krystaly laktosy.

- B.** 1 g se smíchá s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a protřepává se 2 min. Pak se zfiltruje, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně 15 ml *etheru R* tak, aby nedošlo k tvorbě emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltruje a ether se na porcelánové misce odpaří. Ke zbytku se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Ke zbytku se přidá 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného R (30 g/l)* v *ethanolu 96% R*; vznikne tmavofialové zbarvení.

- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografie (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Chromatografie.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,6 g se smíchá s 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a protřepává se 15 min. Pak se zfiltruje a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do získání 20 ml filtrátu. Filtrát se smíchá s 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 50 mg *hyoscyamin-sulfátu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolamin-hydrobromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. Smíchá se 1,8 ml roztoku *skopolamin-hydrobromidu* a 8 ml roztoku *hyoscyamin-sulfátu*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R (3 + 7 + 90)*.

*Nanášení.* Po 10 µl a 20 µl obou roztoků; odděleně do proužků (20 mm × 3 mm), vzdálenost mezi jednotlivými proužky je 1 cm.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 15 min při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

*Detekce A.* Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* (použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm × 200 nm) do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí.

*Hodnocení A.* Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (*hyoscyamin* v dolní třetině, *skopolamin* v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou nejméně tak velké jako skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další méně výrazné skvrny; při

nanášení 20 µl především ve střední části chromatogramu, při nanášení 10 µl v blízkosti startu.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná, a pozoruje se po 15 min.

*Hodnocení B.* Hnědé skvrny odpovídající *hyoscyaminu* na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (*atropin*), další skvrny již nejsou patrné.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejméně 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejméně 16,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejméně 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

a) **Ztráta sušením (2.2.32).** 2,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

b) 10,00 g se zvlhčí směsí 5 ml *amoniaku 17,5% RS*, 10 ml *ethanolu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h macerovat. Pak se perkoluje směsí objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R (1 + 3)* tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetraiodortuńatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1 násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené dolní kyselé vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasných protřepávání. Pak se chloroform slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS* a chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako *hyoscyamin (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>)*, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{(100 - d) \cdot m},$$

v němž značí:

*d* – ztrátu sušením v procentech;

*n* – spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech;

*m* – hmotnost zkoušené látky v gramech.



## SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## BENZOE SUMATRANUS

6.0:1814

## Benzoová pryskyřice sumaterská

## DEFINICE

Je to pryskyřice získaná nařezáváním kmene druhu *Styrax benzoin* DRYANDER.

*Obsah.* 25,0 % až 50,0 % celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina benzoová ( $C_7H_6O_2$ ;  $M_r$  122,1), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Jsou to krémově bílé okrouhlé nebo oválné kousky, které mohou být zanořené do nevýrazné šedohnědé nebo červenohnědé hmoty. Jsou tvrdé a křehké, na lomu matné a nepravidelné.

**B.** Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu B, *Styrax tonkinensis*.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn zhasňujících fluorescenci na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny slabě zhasňující fluorescenci.

Horní okraj desky	
	velmi intenzivní tmavá skvrna
methyl-cinnamát: velmi intenzivní tmavá skvrna	tmavá skvrna
kyselina benzoová: tmavá skvrna	velmi slabá tmavá skvrna (kyselina benzoová)
kyselina skořicová: intenzivní tmavá skvrna	velmi intenzivní tmavá skvrna (kyselina skořicová)
	tmavá skvrna velmi intenzivní tmavá skvrna
vanilin: tmavá skvrna	tmavá skvrna velmi slabá tmavá skvrna (vanilin) skupina nezřetelně oddělených skvrn, včetně dvou tmavých skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Dammarová pryskyřice.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,2 g se rozpustí opatrným zahřátím v 10 ml *ethanolu 90% (V/V) R* a odstředí se.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou oxidu hlinitého *G* pro *TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *petroletheru R4* a *etheru R* (40 + 60).

*Nanášení.* 5  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení.* Na chromatogramu není výrazná skvrna v poloze vymezené hodnotami  $R_F$  0,4 a 1,0.

**Styrax tonkinensis**

**A.** 0,2 g jemně práškované drogy se smíchá s 10 ml *ethanolu 96% R* a protřepává se intenzivně do téměř úplného rozpuštění, pak se zfiltruje. 5 ml filtrátu se ve zkumavce smíchá s 0,5 ml roztoku *chloridu železitého R* (50 g/l) v *ethanolu 96% R*. Vznikne nažloutlé, slabě zelené zbarvení.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,2 g jemně práškované drogy se v ultrazvukové lázni rozpustí v 5 ml *ethanolu 96% R* a zfiltruje se. Filtrát se uschová.

*Porovnávací roztok.* 20 mg *kyseliny benzoové R*, 10 mg *kyseliny trans-skořicové R*, 4 mg *vanilinu R* a 20 mg *methyl-cinnamátu R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 96% R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro *TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub>* pro *TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *diisopropyletheru R* a *hexanu R* (10 + 40 + 60).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm [nebo 5 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě slabě zbarvené skvrny odpovídající polohou tmavým skvrnám *kyseliny benzoové* a *vanilinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Látky nerozpustné v ethanolu.** Nejvýše 20,0 %.

Ke 2,0 g práškované drogy se přidá 25 ml *ethanolu 90% (V/V) R* a vaří se do téměř úplného rozpuštění. Zfiltruje se přes předem zvážený filtr ze slinutého skla (16) (2.1.2) a promyje se třikrát 5 ml vroucího *ethanolu 90% (V/V) R*. Filtr ze slinutého skla se zbytkem se zahřívá 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí se zváží.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 2,000 g hrubě práškované drogy se suší 4 h ve vakuu.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,750 g jemně práškované drogy se v 250ml baňce z borokřemičitého skla smíchá s 15,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l* v *ethanolu VS* a vaří se pod zpětným chladičem na vodní lázni 30 min. Po ochlazení se zpětný chladič promyje 20 ml *ethanolu 96% R* a nadbytek *hydroxidu draselného* se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20). Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l* v *ethanolu VS* odpovídá 61,05 mg *kyseliny benzoové* ( $C_7H_6O_2$ ).

**BENZOIE TONKINENSIS****6.0:2158****Benzoová pryskyřice siamská****DEFINICE**

Je to pryskyřice získaná nařezáváním kmene druhu *Styrax tonkinensis* (PIERRE) CRAIB ex HARTWICH.

*Obsah.* 45,0 % až 55,0 % celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina benzoová ( $C_7H_6O_2$ ;  $M_r$  122,1), počítáno na vysušenou drogu.

**VLASTNOSTI**

Droga má charakteristický pach po vanilinu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Jsou to matné, zrnité, okrouhlé nebo oválné kousky (kapky) různé velikosti od několika milimetrů až do 3 cm, jednotlivé nebo někdy spleené do červenohnědé průsvitné pryskyřice. Jednotlivé kapky jsou na svrchní straně žlutavě bílé až načervenalé, lom je voskovitý bělavý, na vzduchu červenající.
- B.** Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu B, *Styrax benzoin*.
- Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
methyl-cinnamát: velmi silně zhášeující skvrna kyselina benzoová: zhášeující skvrna kyselina skořicová: silně zhášeující skvrna	zhášeující skvrna (kyselina benzoová)
vanilin: zhášeující skvrna	zhášeující skvrna velmi silně zhášeující skvrna zhášeující skvrna (vanilin) skupina nezřetelně oddělených skvrn, včetně zhášeující skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU*****Styrax benzoin***

- A.** 0,2 g jemně práškované drogy se smíchá s 10 ml *ethanolu 96% R* a protřepává se intenzivně do úplného rozpuštění, pak se zfiltruje. 5 ml filtrátu se ve zkumavce smíchá s 0,5 ml roztoku *chloridu železitého R* (50 g/l) v *ethanolu 96% R*. Roztok se zbarví zeleně, ne však žlutě.
- B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).
- Zkoušený roztok.* 0,2 g jemně práškované drogy se v ultrazvukové lázni rozpustí v 5 ml *ethanolu 96% R* a zfiltruje se. Filtrát se uchová.

*Porovnávací roztok.* 20 mg *kyseliny benzoové R*, 10 mg *kyseliny trans-skořicové R*, 4 mg *vanilinu R* a 20 mg *methyl-cinnamátu R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 96% R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *diisopropyletheru R* a *hexanu R* (10 + 40 + 60).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny skořicové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Látky nerozpustné v ethanolu.** Nejvýše 5,0 %.

2 g práškované drogy se vaří v 25 ml *ethanolu 90% (V/V) R* do téměř úplného rozpuštění. Zfiltruje se přes předem zvažovaný filtr ze slinutého skla (16) (2.1.2) a promyje se třikrát 5 ml vroucího *ethanolu 90% (V/V) R*. Filtr ze slinutého skla se zahřívá 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí se zvaží.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 2,00 g hrubě práškované drogy se suší 4 h ve vakuu.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

0,750 g jemně práškované drogy se v 250 ml baňce z borokřemičitého skla smíchá s 15,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l* v *ethanolu VS* a vaří se pod zpětným chladičem na vodní lázni 30 min. Po ochlazení se zpětný chladič promyje 20 ml *ethanolu 96% R* a nadbytek hydroxidu draselného se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20). Proveďte se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l* v *ethanolu VS* odpovídá 61,05 mg kyseliny benzoové ( $C_7H_6O_2$ ).

**BENZOIS SUMATRANI TINCTURA****6.0:1813****Tinktura z benzoové pryskyřice sumaterské**

*Synonymum.* Benzoová tinktura sumaterská

**DEFINICE**

Je to tinktura vyrobená z pryskyřice *Benzoie sumatranus* (1814).

*Obsah.* Nejméně 4,0 % celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina benzoová ( $C_7H_6O_2$ ;  $M_r$  122,1).

**VÝROBA**

Připravuje se z 1 dílu drogy a 5 dílů *ethanolu (75% V/V až 96% V/V)* vhodným postupem.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Oranžovožlutá tekutina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Tinktura z benzoové pryskyřice siamské (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn zhášejících fluorescenci na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny slabě zhášející fluorescenci.

Horní okraj desky	
	velmi intenzivní tmavá skvrna
methyl-cinnamát: velmi intenzivní tmavá skvrna	tmavá skvrna
kyselina benzoová: tmavá skvrna	velmi slabá tmavá skvrna (kyselina benzoová)
kyselina skořicová: intenzivní tmavá skvrna	velmi intenzivní tmavá skvrna (kyselina skořicová)
	tmavá skvrna
	velmi intenzivní tmavá skvrna
vanilin: tmavá skvrna	tmavá skvrna
	velmi slabá tmavá skvrna (vanilin)
	skupina nezřetelně oddělených tmavých skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Tinktura z benzoové pryskyřice siamské.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 20 mg kyseliny benzoové R, 10 mg kyseliny trans-skořicové R, 4 mg vanilinu R a 20 mg methyl-cinnamátu R se rozpustí ve 20 ml ethanolu téže koncentrace, jaká se použila k výrobě tinktury.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, diisopropyletheru R a hexanu R (10 + 40 + 60).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l [nebo 8  $\mu$ l], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou skvrny kyseliny benzoové a vanilinu intenzivnější než odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ethanol (2.9.10).** 95 % až 105 % hodnoty uvedené v označení na obalu.

## STANOVENÍ OBSAHU

3,50 g se v 250ml baňce z borokřemičitého skla smíchá s 15,0 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS a vaří se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zpětný chladič promyje 20 ml ethanolu 96% R a nadbytek hydroxidu draselného se titruje kyselinou chlo-

rovodíkovou 1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20). Provede se slepá zkouška.

1 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS odpovídá 61,05 mg kyseliny benzoové ( $C_7H_6O_2$ ).

## BENZOIS TONKINENSIS TINCTURA

6.0:2157

## Tinktura z benzoové pryskyřice siamské

## DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z pryskyřice *Benzoë tonkinensis* (2158).

*Obsah.* Nejméně 5,0 % celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina benzoová ( $C_7H_6O_2$ ;  $M_r$  122,12).

## VÝROBA

Připravuje se z 1 dílu drogy a 5 dílů ethanolu (75% V/V až 96% V/V) vhodným postupem.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Oranžovožlutá tekutina, charakteristického pachy po vanilinu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** 10 ml se ve zkumavce smíchá s 0,5 ml roztoku chloridu železitého R (50 g/l) v ethanolu 96% R; vznikne zelené zbarvení.

**B.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Tinktura z benzoové pryskyřice sumaterské (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
methyl-cinnamát: velmi silně zhášející skvrna	
kyselina benzoová: zhášející skvrna	zhášející skvrna (kyselina benzoová)
kyselina skořicová: silně zhášející skvrna	
	zhášející skvrna
	velmi silně zhášející skvrna
vanilin: zhášející skvrna	zhášející skvrna (vanilin)
	skupina nezřetelně oddělených skvrn, včetně zhášejících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Tinktura z benzoové pryskyřice sumaterské.**

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 20 mg kyseliny benzoové R, 10 mg kyseliny trans-skořicové R, 4 mg vanilinu R a 20 mg

*methyl-cinnamátu R* se rozpustí ve 20 ml ethanolu těže koncentrace, jaká byla použita k výrobě tinktury.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (5  $\mu\text{m}$  až 40  $\mu\text{m}$ ) [nebo deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (2  $\mu\text{m}$  až 10  $\mu\text{m}$ )].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, diisopropyletheru R a hexanu R (10 + 40 + 60).

**Nanášení.** 20  $\mu\text{l}$  [nebo 8  $\mu\text{l}$ ], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou skvrny odpovídající polohou skvrnám kyseliny skořicové a methyl-cinnamátu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ethanol (2.9.10).** 95 % až 105 % obsahu uvedeného v označení na obalu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

3,50 g se v 250 ml baňce z borokřemičitého skla smíchá s 15,0 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS a vaří se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se chladič promyje 20 ml ethanolu 96% R a nadbytek hydroxidu draselného se titruje kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20). Proveďte se slepá zkouška.

1 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu VS odpovídá 61,05 mg kyseliny benzoové ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ).

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky čepele s pokožkovými buňkami se stěnami rovnými a na spodní straně s anomocytickými průduchy (2.8.3); štítovitě žláznaté chlupy obvykle o průměru 100  $\mu\text{m}$  až 120  $\mu\text{m}$  se nacházejí na svrchní i spodní pokožce; úlomky mezofylu obsahují krystaly šťavelanu vápenatého. Úlomky cévních svazků a sklerenchymatická vlákna jsou provázena krystalickými pouzdry. Jestliže jde o druh *Betula pubescens*, prášek obsahuje velmi silně ztlustlé jednobuněčné krycí chlupy asi 80  $\mu\text{m}$  až 600  $\mu\text{m}$  dlouhé, obvykle 100  $\mu\text{m}$  až 200  $\mu\text{m}$ .

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml methanolu R a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1 mg kyseliny kávové R, 1 mg kyseliny chlorogenové R, 2,5 mg hyperosidu R a 2,5 mg rutinu R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, butan-2-onu R a ethyl-acetátu R (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 10  $\mu\text{l}$ , do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** V proudu teplého vzduchu.

## BETULAE FOLIUM

6.2:1174

### Březový list

#### DEFINICE

Je to usušený list, celý nebo jeho úlomky, druhu *Betula pendula* ROTH a/nebo *Betula pubescens* EHRH. a/nebo jejich kříženců.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

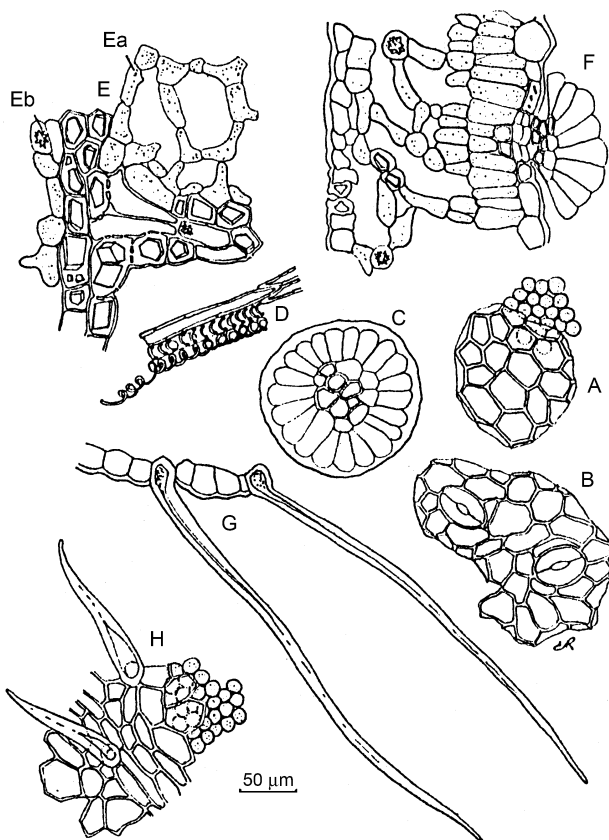
#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Listy obou druhů na svrchní straně tmavě zelené, na spodní straně světlejší, šedozelené, s charakteristickou síťovitou žilnatinou.

Žilky jsou světle hnědé nebo téměř bílé.

Listy druhu *Betula pendula* jsou lysé, na obou stranách žláznatě tečkované, 3 cm až 7 cm dlouhé a 2 cm až 5 cm široké; řapík je dlouhý a na okraji dvojité pilovité čepel listu je trojúhelníkovitá nebo kosodélníkovitá a na bázi široce klínovitá nebo zkrácená. Úhel na každé straně je nezaoblený nebo mírně zaoblený a vrchol je dlouhý a zašpičatělý.

Listy druhu *Betula pubescens* mají žláznaté chlupy na obou stranách a jsou slabě pýřité. Na spodní straně listu v paždí žilek jsou malé svazky žlutošedých chlupů. Listy jsou menší, vejčité nebo kosodélníkovité a zaoblenější. Jsou drsnější a pravidelněji pilovité. Vrchol není ani dlouhý ani zašpičatělý.



A = pokožka svrchní strany čepele s palisádovým parenchymem

- B = pokožka spodní strany čepele s anomocytickými průduchy  
 C = štítovitě žláznaté chlupy v plošném pohledu  
 D = dřevní cévní svazky provázené sklerenchymatickými vlákny  
 E = krystalcká pouzdra obsahující krystaly šťavelanu vápenatého, houbovitý parenchym (Ea) a buňky obsahující shluky krystalů šťavelanu vápenatého (Eb)  
 F = příčný řez čepele se štítovitými žláznatými chlupy z bočního pohledu  
 G = krycí chlupy na okraji čepele (*Betula pubescens*)  
 H = krycí chlupy na pokožce svrchní strany čepele (*Betula pubescens*)

**Obr. 1** Ilustrace práškování březového listu (viz zkoušku totožnosti B)

**Detekce.** Postříká se roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině tři skvrny (v pořadí stoupající hodnoty  $R_F$ ): žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin), světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid), v horní třetině chromatogramu je světle modře fluoreskující skvrna (kyselina kávová).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny (rutin, kyselina chlorogenová, hyperosid) odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna rutinu je velmi slabá, skvrna hyperosidu je intenzivní. Také další slabě žlutohnědě fluoreskující skvrny jsou mezi skvrnami odpovídajícími kyselině kávové a kyselině chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Blízko čela rozpouštědla je viditelná červená fluoreskující skvrna (chlorofyly). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mezi touto skvrnou a skvrnou odpovídající kyselině kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku je hnědožlutá skvrna odpovídající kvercetině.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí (2.8.2).** Nejvýše 3 % úlomků jehněd a nejvýše 3 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Zásobní roztok.** 0,200 g práškované drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Kapalina se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml baňky. Vata se přidá ke zbytku v baňce s kulatým dnem a dvakrát se extrahuje 20 ml acetonu R, pokaždé se vaří 10 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit při teplotě místnosti, kapalina se zfiltruje přes chomáček vaty a potom přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se acetonem R promytím baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody R

a protřepává se jednou 15 ml a potom třikrát 10 ml ethyl-acetátu R. Ethyl-acetátové extrakty se spojí v dělicí nálevce, promyjí se dvakrát 50 ml vody R a extrakt se zfiltruje přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem R na 50,0 ml. **Zkoušený roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého RS a zředí se roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml. **Kontrolní roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku při 425 nm;

m – hmotnost drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

## BISTORTAE RHIZOMA

6.0:2384

### Rdesnový oddenek

#### DEFINICE

Je to celý usušený oddenek druhu *Persicaria bistorta* (L.) SAMP. (syn. *Polygonum bistorta* L.) zbavený postranních kořenů, nebo jeho úlomky.

**Obsah.** Nejméně 3,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Oddenek je až 13 cm dlouhý o průměru 2,5 cm. Zbytky kořenů o průměru asi 1 mm nejsou delší než 1 cm.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oddenek je červenohnědý nebo černohnědý, tlustý, zkroucený a vlnitě zprohýbaný. Na jeho vnějším povrchu jsou patrná zaškrcení a načernalé skvrny. Je plochý, na svrchní straně poněkud zploštělý, na spodní straně vypouklý. Na povrchu jsou patrné jizvy po kořenech. Lom je růžovoběžový, s oválnou zónou bělavých teček odpovídajících cévám. Droga může obsahovat i více nebo méně válcovité úlomky až 1 cm dlouhé o průměru asi 0,3 cm, na povrchu červenohnědé, s jizvami po kořenech, na lomu růžově béžové.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu; velmi četné drúzy šťavelanu vápenatého buď samostatně, nebo uvnitř parenchymatických buněk; nepříliš četné síťovitě ztlustlé cévy; vzácně úlomky korku. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku glycerolu R 50% (V/V). Jsou patrná

jednoduchá okrouhlá nebo vejčitá škrobová zrna o průměru asi 10 µm.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml směsi stejných objemových dílů vody R a methanolu R a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 65 °C a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 5 mg fruktosy R a 5 mg katechinu R se rozpustí v 5 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, kyseliny mravenčí bezvodé R a ethyl-acetátu R (5 + 10 + 85).

*Nanášení.* 2 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 7 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká anisaldehydem RS a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
katechin: hnědá skvrna	hnědá skvrna (katechin)
	hnědá skvrna fialová skvrna hnědá skvrna oranžová skvrna
fruktosa: zelená skvrna	zelená skvrna (fruktosa)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Paris polyphylla nebo Paris quadrifolia.** Prášková droga (355) (2.9.12) se pozoruje pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Přítomnost jednotlivých rafidů šřavelanu vápenatého nebo jejich svazků je známkou falsifikace oddenky druhů *Paris polyphylla* SMITH var. *yunnanensis* (FRANCH.) HAND.-MAZZ nebo *Paris polyphylla* SMITH var. *chinensis* (FRANCH.) HARA nebo *Paris quadrifolia* L.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při až 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 1,000 g práškové drogy (180) (2.9.12).

**BOLDI FOLII EXTRACTUM SICCCUM**

6.1:1816

Extrakt z boldovníkového listu suchý

*Synonymum.* Boldovníkový extrakt suchý

**DEFINICE**

Je to extrakt vyrobený z drogy *Boldo folium* (1396).

**Obsah:**

- pro vodné extrakty: nejméně 0,5 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako boldin (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 327,4), počítáno na vysušený extrakt;
- pro ethanolické extrakty: nejméně 1,0 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako boldin (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 327,4), počítáno na vysušený extrakt.

**VÝROBA**

Vyrábí se vhodným postupem z rostlinné drogy a buď vody horké nejméně 65 °C, nebo ethanolického rozpouštědla o odpovídající koncentraci ethanolu 45 % (V/V) až 75 % (V/V).

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Hnědý nebo zelenohnědý hygroskopický prášek.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g se smíchá s 1 ml kyseliny chlorovodíkové R a 20 ml vody R a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Tekutina se převede do dělicí nálevky, zalkalizuje se 2 ml amoniaku zředěného RS1 a protřepává se dvakrát 20 ml dichlormethanu R. Organické vrstvy se spojí a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml methanolu R.

*Porovnávací roztok.* 2 mg boldinu R a 10 mg skopolamin-hydrobromidu R se rozpustí v 5 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů diethylaminu R, methanolu R a toluenu R (10 + 10 + 80).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 3 µl], do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká jodobismutitanem draselným RS2, nechá se sušit 5 min na vzduchu a postříká se dusitanem sodným RS. Pozoruje se po 30 min v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
skopolamin: světle hnědá skvrna	žlutohnědá skvrna oranžovožlutá skvrna
	oranžová skvrna oranžová skvrna
boldin: světle hnědá skvrna	hnědá skvrna (boldin) několik oranžových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,000 g se smíchá s 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Pak se převede do dělicí nálevky a promyje se 10 ml směsí stejných objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *hexanu R*; pH vodné vrstvy se upraví *amoniakem zředěným RS1* na hodnotu 9,5. Po ochlazení se protřepává postupně 100 ml, 50 ml a 50 ml *dichlormethanu R* opatrně tak, aby se nevytvořila emulze. Spojené dolní vrstvy se odpaří za sníženého tlaku do sucha. V 10,0 ml odměrné baňce se zbytek rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 12,0 mg *boldinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

## Kolona:

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 μm).

**Roztok A.** 0,2 ml *diethylaminu R* se smíchá s 99,8 ml *acetonitrilu R*.

**Roztok B.** 0,2 ml *diethylaminu R* se smíchá s 99,8 ml *vody R*, pH se upraví *kyselinou mravenčí bezvodou R* na hodnotu 3.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů roztoku A a roztoku B (16 + 84).

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 304 nm.

**Nástřik.** 20 μl.

**Relativní retence** vztahovaná k *boldinu* (retenční čas asi 6 min). *Isoboldin* asi 0,9; *isokorydin-N-oxid* asi 1,8; *laurotetanin* asi 2,2; *isokorydin* asi 2,8; *N-methyl-laurotetanin* asi 3,2; mohou být přítomny další píky.

**Test způsobilosti,** zkoušený roztok:

- **rozišení:** nejméně 1,0 mezi píkem *isoboldinu* a píkem *boldinu*.

Obsah celkových alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako *boldin*, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(\sum A_i) \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 10}$$

v němž značí:

$\sum A_i$  – součet ploch píků šesti identifikovaných alkaloidů na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku *boldinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *boldinu CRL* použitého pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah *boldinu* v procentech v *boldinu CRL*.

## BOLDO FOLIUM

6.0:1396

## Boldovníkový list

*Synonymum.* Boldi folium

## DEFINICE

Je to celý nebo rozdrobněný usušený list druhu *Peumus boldus* MOLINA.

**Obsah.** Nejméně 0,1 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako *boldin* ( $C_{19}H_{21}NO_4$ ;  $M_r$  327,4), počítáno na bezvodou drogu.

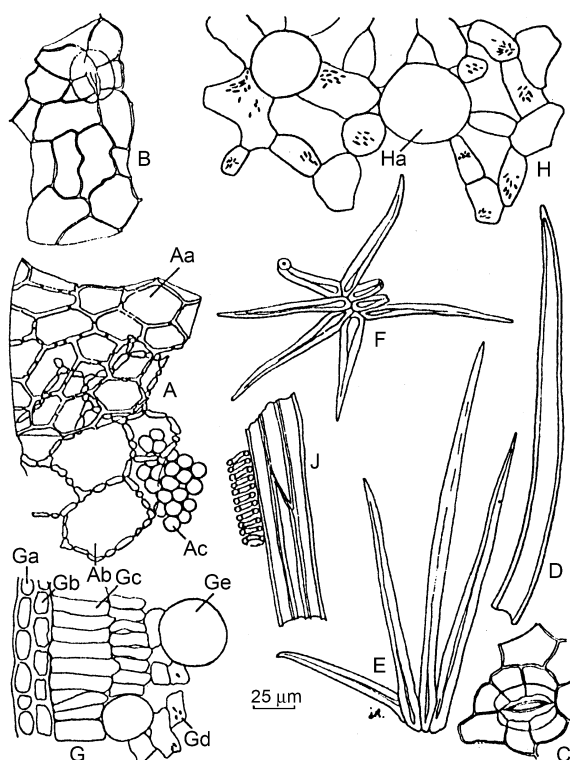
## VLASTNOSTI

Droga má po rozetření charakteristický pach.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** List je vejčitý nebo oválný, obvykle 5 cm dlouhý, krátce řapíkatý, nahoře tupý nebo slabě zašpičatělý nebo hrotitý, na bázi uťatý nebo zaokrouhlený. Čepel je celokrajná, mírně zvlněná, okraj čepele je ztlustlý, více nebo méně podvinutý. Čepel je šedozeleňá, silná, tuhá a křehká. Svrchní strana je drsná s četnými malými vyniklými hrbolky a s vpadlou žilnatinou. Spodní strana je jemně ochmýřená, s hrbolky méně zřetelnými a s vyniklou zpeřenou žilnatinou.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedozeleňá. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky ze svrchní strany listu a pod ní ležící hypodermis z buněk s rovnými nebo mírně zprohýbanými, růžencovitě ztlustlými stěnami; pokožka na spodní straně listu s četnými průduchy provázenými čtyřmi až sedmi podpůrnými buňkami; jednotlivé dvojklanné nebo hvězdotvité uspořádané jednobuněčné krycí chlupy s více nebo méně ztlustlými a zdřevnatělými stěnami; úlomky čepele s dvouřadým palisádovým parenchymem; úlomky houbového mezofylu s četnými velkými okrouhlými siličnými buňkami a parenchymem obsahujícím jemné jehličkovité krystaly; ztlustlá vlákna a zdřevnatělé tečkované parenchymatické buňky provázené cévními svazky.



- A = úločky čepele (plošný pohled) – epidermis svrchní strany (Aa), hypodermis se zprohýbanými a ztlustlými stěnami (Ab), palisádový parenchym (Ac)
- B a C = pokožka na spodní straně čepele listu s průduchy provázenými čtyřmi až sedmi podpůrnými buňkami
- D = jednobuněčné krycí chlupy – jednotlivé
- E = jednobuněčné krycí chlupy – hvězdovitě uspořádané
- G = úločky čepele (příčný řez) – epidermis svrchní strany (Ga), hypodermis (Gb), palisádový parenchym (Gc), houbový parenchym (Gd) obsahující olejové buňky (Ge)
- H = houbový parenchym obsahující jemné jehličkovité krystaly a olejové buňky (Ha)
- F = cévní tkáň s vlákný

**Obr. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškovaného boldovníkového listu (viz zkoušku totožnosti B)

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,5 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a 10 min se ponechá v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes kolonu 3 cm dlouhou o průměru 0,5 cm naplněnou *celulosou pro chromatografii R1*; první mililitr se použije jako zkoušený roztok.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *boldinu R* a 10 mg *skopolamin-hydrobromidu R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *diethylaminu R*, *methanolu R* a *toluenu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 40 µl [nebo 6 µl] zkoušeného roztoku a 20 µl [nebo 2 µl] porovnávacího roztoku, do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2*, suší se na vzduchu 5 min, potom se postříká *dusitanem sodným RS* a po 30 min se pozoruje v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
skopolamin: světle hnědá skvrna	žlutohnědá skvrna
	žlutá skvrna
	hnědá skvrna
boldin: hnědá skvrna	hnědá skvrna (boldin)
	několik skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Silice (2.8.12).** Nejvýše 40 ml/kg, počítáno na bezvodou drogu; 10,0 g čerstvě rozdrobněné drogy a 300 ml *vody R* jako destilační tekutiny se v 1000ml baňce destiluje 3 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 4 % větviček a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Voda (2.2.13).** Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se destilací 20,0 g práškované drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 13,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

**Alkaloidy.** Kapalinná chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepává se 30 min ve vodní lázni při 80 °C. Zfiltruje se a zbytek se smíchá s 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepává se 30 min ve vodní lázni při 80 °C a zfiltruje se. Tento postup se opakuje ještě jednou. Spojené vychladlé filtry se protřepávají 100 ml směsí stejných objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *hexanu R*. Organická vrstva se odstraní, pH vodné vrstvy se upraví *amoniakem zředěným RS1* na hodnotu 9,5 a protřepává se postupně se 100 ml a dvakrát 50 ml *dichlormethanu R*. Spojené dolní vrstvy se odpaří za sníženého tlaku do sucha. V 10,0ml odměrné baňce se zbytek rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok.** Ve 100,0ml odměrné baňce se rozpustí 12 mg *boldinu CRL* v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 10,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Roztok A.** 0,2 ml *diethylaminu R* se smíchá s 99,8 ml *acetonitrilu R*.



**Roztok B.** 0,2 ml *diethylaminu R* se smíchá s 99,8 ml *vody R* a pH se upraví *kyselinou mravenčí bezvodou R* na hodnotu 3.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů roztoku A a roztoku B (16 + 84).

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 304 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Relativní retence** vztažená k boldinu (retenční čas asi 6 min). Isoboldin asi 0,9; isokorydin-*N*-oxid asi 1,8; laurotetanin asi 2,2 min; isokorydin asi 2,8; *N*-methylaurotetanin asi 3,2; mohou být přítomny další píky.

**Test způsobilosti,** zkoušený roztok:

– **rozlišení:** nejméně 1 mezi píkem isoboldinu a píkem boldinu.

Obsah celkových alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako boldin ( $C_{19}H_{21}NO_4$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(\sum A_1) \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 100}$$

v němž značí:

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost *boldinu CRL* v porovnávacím roztoku v gramech;

$\sum A_1$  – součet ploch píků odpovídajících šesti alkaloidům identifikovaným na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku odpovídajícího *boldinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$p$  – obsah *boldinu* v *boldinu CRL* v procentech.

## CALENDULAE FLOS

7.0:1297

### Měsíčkový květ

#### DEFINICE

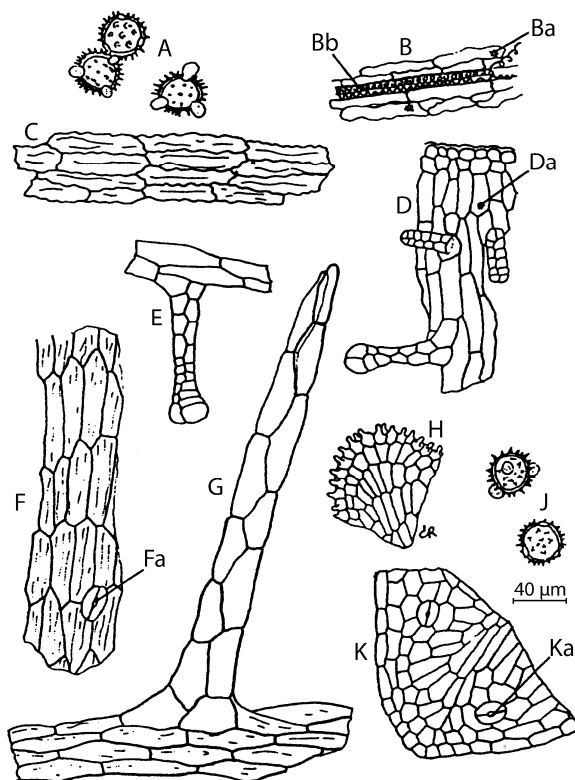
Jsou to celé nebo řezané usušené zcela rozkvetlé květy plnokvětých odrůd druhu *Calendula officinalis* L., květy jsou oddělené od lůžka.

**Obsah.** Nejméně 0,4 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Jazykovité květy se žlutým nebo oranžově žlutým třízubým jazykem asi 3 mm až 5 mm širokým, ve střední části až 7 mm širokým a chlupatou poněkud srpkovitou žlutohnědou nebo oranžovohnědou trubkou s vyniklou čnělkou a dvojklanou blízou, někdy s poněkud ohnutým žlutohnědým nebo oranžovohnědým semeníkem. Trubkovité květy asi 5 mm dlouhé se žlutou, oranžovočervenou nebo červenofialovou pětícípou korunou a žlutohnědou nebo oranžovohnědou trubkou, na spodní části chlupatou, většinou s mírně ohnutým žlutohnědým až oranžovohnědým semeníkem.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky koruny [C, F, K] se světle žlutými olejovými kapkami, některé s poměrně velkými anomocytickými průdchy [Fa, Ka]; krycí chlupy (většinou úlomky) dvouřadé, mnohobuněčné, kuželovité [G] a žláznaté chlupy s mnohobuněčnou nohou [E] velmi četné na bázi koruny [D]; úlomky parenchymu koruny [B] s krystaly a velmi malými drúžami kalcium-oxalátu [Ba, Da] a s malými cévami [Bb]; kulovitá pylová zrna o průměru až asi 40 µm s ostře ostnitou exinou a třemi klíčovými póry [A, J]; někdy úlomky blizny s krátkými bradavčitými papilami [H].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného měsíčkového květu

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované drogy (500) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny kávové R*, 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě teplá deska se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*; suší se 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části skvrna se žlutohnědou fluorescencí (rutin), ve střední části skvrna se světle modrou fluorescencí (kyselina chlorogenová) a v horní části skvrna se světle modrou fluorescencí (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je žlutohnědě fluoreskující skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku, v poloze pod i přímo nad skvrnou rutinu je skvrna se žlutozelenou fluorescencí a skvrna se světle modrou fluorescencí odpovídající polohou a zbarvením kyselin chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad skvrnou odpovídající polohou kyselině kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku je další skvrna se žlutozelenou fluorescencí a skvrna se světle modrou fluorescencí je pod skvrnou kyseliny kávové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % zákrovních listů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (500) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,800 g práškované drogy (500) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 7 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 20 ml *acetonu R*. Směs se vaří 30 min pod zpětným chladičem. Tekutina se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku v baňce s kulatým dnem a vaří se pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 min s 20 ml *acetonu R*. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes chomáček vaty a potom se spojený acetonový roztok zfiltruje přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se *acetonem R* použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-acetátu R*.

Ethyl-acetátové vrstvy se spojí v dělicí nálevce a protřepávají se dvakrát 50 ml *vody R*, extrakt se zfiltruje přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do 50ml odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem R* na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml *chloridu hlinitého RS1* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 425 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

## CAPSICI FRUCTUS

7.0:1859

### Paprikový plod

#### DEFINICE

Je to usušený zralý plod druhu *Capsicum annum* L. var. *minimum* (MILLER) HEISER a drobnoplodých odrůd druhu *Capsicum frutescens* L.

**Obsah.** Nejméně 0,4 % celkových kapsaicinoidů, vyjádřeno jako kapsaicin ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ;  $M_r$  305,4), počítáno na vysušenou drogu.

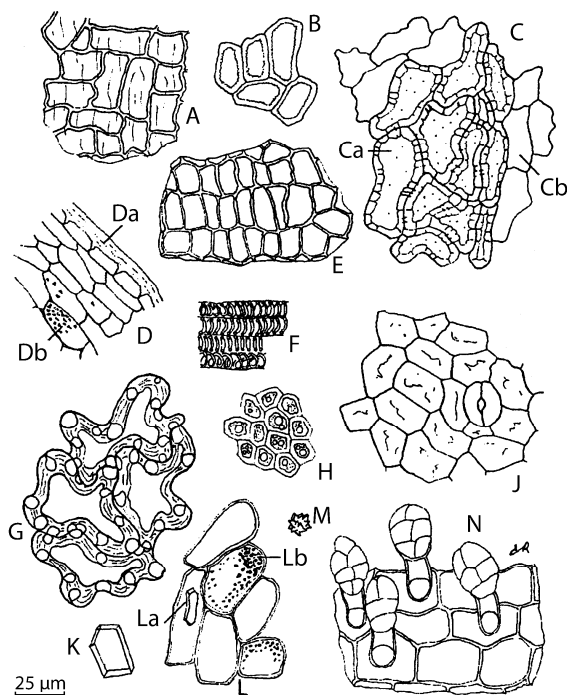
#### VLASTNOSTI

Droga extrémně pálivé chuti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Plod je žlutooranžový nebo červenohnědý, podélně kuželovitý, na konci tupý, asi 1 cm až 3 cm dlouhý, v nejširší části o průměru až asi 1 cm, někdy s přirostlým pětícípým kalichem a přímou stopkou. Perikarp je poněkud svraskalý, lysý, obsahuje asi 10 až 20 plochých ledvinovitých semen 3 mm až 4 mm dlouhých buď volných, nebo přirostlých k načervenalé příhradce.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je oranžový. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky epikarpu v plošném pohledu, s buňkami uspořádanými často v řadách po pěti až sedmi [E], se ztlustlými stěnami, pokud uzavírají stopku [B] a s rovnoměrně rýhovanou kutikulou [A]; úlomky perikarpu v příčném řezu [D] s epikarpem pokrytým silnou kutikulou [Da] a parenchymatickými buňkami často obsahujícími kapky červeného oleje, někdy mikrosférické krystaly kalcium-oxalátu [Db]; úlomky endokarpu [C] s charakteristickými ostrůvkovitými skupinami sklerenchymatických buněk [Ca], které jsou vzájemně odděleny tenkostěnnými parenchymatickými buňkami [Cb]; úlomky semen s osemením tvořeným velkými, zelenožlutými sklereidami s vlnitě zprohýbanými stěnami, stěny buněk jsou na svrchní straně tenké, na vnitřní straně a na bočních stranách nepravidelně ztlustlé a nápadně tečkované [G]; parenchymatické buňky endospermu s kapkami oleje a aleuronovými zrny o průměru 3 μm až 6 μm [H]; někdy úlomky kalicha s vnější pokožkou s anisocytickými průduchy (2.8.3) [J] a s vnitřní pokožkou bez průduchů, s četnými žláznatými chlupy s jednořadou nohou a mnohobuněčnou hlavičkou [N]; mezofyl [L] s četnými idioblasty obsahujícími hranolovité

krystaly kalcium-oxalátu [La] nebo mikrosférické krystaly kalcium-oxalátu [Lb]; izolované krystaly [K] nebo drúzy [M] kalcium-oxalátu; kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlé cévy [F].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového paprikového plodu

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,50 g práškované drogy (500) (2.9.12) se smíchá s 5,0 ml etheru R, třepe se 5 min a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 2 mg kapsaicinu R a 2 mg dihydrokapsaicinu R se rozpustí v 5,0 ml etheru R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem dichlorchin-chlorimidu R (5 g/l) v methanolu R a vystaví se působení par amoniaku do objevení modrých skvrn. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
kapsaicin: modrá skvrna dihydrokapsaicin: modrá skvrna	modrá skvrna (kapsaicin) modrá skvrna (dihydrokapsaicin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nonivamid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 2,5 g práškované drogy (500) (2.9.12) se smíchá se 100 ml methanolu R a po 30 min macerace se vloží na 15 min do ultrazvukové lázně. Zfiltruje se do 100ml odměrné baňky, baňka i filtr se promyjí methanolem R a zředí se jím na 100,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 20,0 mg kapsaicinu CRL a 4,0 mg nonivamidu CRL se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 100,0 ml.

**Kolona:**

– rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii fenylsilylovaný R (5 µm);

– teplota: 30 °C.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů acetonitrilu R a roztoku kyseliny fosforečné R (1 g/l) (40 + 60).

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 225 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Eluční pořadí.** Nordihydrokapsaicin, nonivamid, kapsaicin, dihydrokapsaicin.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem nonivamidu a píkem kapsaicinu.

Obsah nonivamidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot p_1}{F_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost nonivamidu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p_1$  – obsah nonivamidu v nonivamidu CRL v procentech.

**Limit:**

– nonivamid: nejvýše 5,0 % celkového obsahu kapsaicinoidů.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejsou přítomny plody druhu *Capsicum annuum* L. var. *longum* (SENDTN.).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškované drogy (500) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Nonivamid (viz Zkoušky na čistotu).

Celkový obsah kapsaicinoidů v procentech, vyjádřeno jako kapsaicin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \cdot m_4 \cdot p_2}{F_4 \cdot m_3}$$

v němž značí:

- $F_3$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $F_4$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $F_5$  – plochu píku dihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $F_6$  – plochu píku nordihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $m_3$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;  
 $m_4$  – hmotnost kapsaicinu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;  
 $p_2$  – obsah kapsaicinu v kapsaicinu CRL v procentech.

## CAPSICI OLEORESINA RAFFINATA ET QUANTIFICATA

6.0:2336

### Papriková oleoprskyřice čištěná a kvantifikovaná

#### DEFINICE

Je to oleoprskyřice se stanoveným obsahem, vyrobená z drogy *Capsici fructus* (1859).

*Obsah.* 6,5 % až 8,0 % kapsaicinoidů, vyjádřeno jako kapsaicin ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ;  $M_r$  305,4).

#### VÝROBA

Připravuje se z rostlinné drogy a ethanolu 90% (V/V) nebo methanolu 90% (V/V) vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Červený nebo hnědý těkavý extrakt.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 50 mg se rozpustí v 5 ml etheru R.

*Porovnávací roztok.* 2 mg kapsaicinu R a 2 mg dihydrokapsaicinu R se rozpustí v 5 ml etheru R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l], do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem dichlorchinonchlorimidu R (0,25 g/l) v ethyl-acetátu R a vystaví se působení par amoniaku do objevení modrých skvrn. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
kapsaicin: modrá skvrna dihydrokapsaicin: modrá skvrna	modrá skvrna (kapsaicin) slabá modrá skvrna (dihydrokapsaicin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nonivamid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,300 g se rozpustí v 60 ml methanolu R a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 20,0 mg kapsaicinu CRL a 4,0 mg nonivamidu CRL se rozpustí ve 100,0 ml methanolu R.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii fenylsilylovaný R (5  $\mu$ m);
- *teplota:* 30 °C.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů acetonitrilu R a roztoku kyseliny fosforečné R (1 g/l) (40 + 60).

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 225 nm.

*Nástrík.* 10  $\mu$ l.

*Eluční pořadí.* Nordihydrokapsaicin, nonivamid, kapsaicin, dihydrokapsaicin.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem nonivamidu a píkem kapsaicinu.

Obsah nonivamidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot p_1}{F_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $F_1$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $F_2$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené látky v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost nonivamidu CRL v porovnávacím roztoku v gramech;  
 $p_1$  – obsah nonivamidu v nonivamidu CRL v procentech.

*Limit:*

- *nonivamid:* nejvýše 5,0 % celkového obsahu kapsaicinoidů.

**Voda,** semimikrostanovení (2.5.12). Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 5,00 g.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Nonivamid (viz Zkoušky na čistotu).

Obsah kapsaicinoidů v procentech, vyjádřeno jako kapsaicin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \cdot m_4 \cdot p_2}{F_4 \cdot m_3},$$

v němž značí:

$F_3$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_4$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$F_5$  – plochu píku dihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_6$  – plochu píku nordihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$m_3$  – hmotnost zkoušené látky v gramech;

$m_4$  – hmotnost kapsaicinu CRL v porovnávacím roztoku v gramech;

$p_2$  – obsah kapsaicinu v kapsaicinu CRL v procentech.

## CAPSICI TINCTURA NORMATA

6.0:2337

### Papriková tinktura standardizovaná

#### DEFINICE

Je to standardizovaná tinktura vyrobená z drogy *Capsici fructus* (1859) nebo z čištěné a kvantifikované paprikové oleoprskyčice [*Capsici oleoresina raffinata et quantificata* (2336)].

**Obsah.** 90 % až 110 % jmenovitého množství kapsaicinoidů, vyjádřeno jako kapsaicin ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ;  $M_r$  305,4), uvedeného v označení na obalu. Jmenovité množství kapsaicinoidů je 0,020 % až 0,060 %.

#### VÝROBA

Připravuje se z rostlinné drogy nebo oleoprskyčice vhodným postupem za použití ethanolu 70% (V/V) až 85% (V/V).

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Žlutooranžová až červenooranžová tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 10 ml se protřepává s 10 ml hexanu R; použije se dolní vrstva.

**Porovnávací roztok.** 1 mg kapsaicinu R a 1 mg dihydrokapsaicinu R se rozpustí v 5 ml etheru R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu oktadecylsilylovaného pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

**Nanášení.** 20  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l], do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem dichlorchinonchlorimidu R (0,25 g/l) v ethyl-acetátu R a vystaví se působení par amoniaku do objevení modrých skvrn. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
kapsaicin: modrá skvrna dihydrokapsaicin: modrá skvrna	modrá skvrna (kapsaicin) slabá modrá skvrna (dihydrokapsaicin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Nonivamid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 50,0 g se zředí methanolem R na 100,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 20,0 mg kapsaicinu CRL a 4,0 mg nonivamidu CRL se rozpustí ve 100,0 ml methanolu R.

#### Kolona:

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii fenylsilylovaný R (5  $\mu$ m);

– **teplota:** 30 °C.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů acetonitrilu R a roztoku kyseliny fosforečné R (1 g/l) (40 + 60).

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 225 nm.

**Nástřik.** 10  $\mu$ l.

**Eluční pořadí.** Nordihydrokapsaicin, nonivamid, kapsaicin, dihydrokapsaicin.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi píkem kapsaicinu a píkem nonivamidu.

Obsah nonivamidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot p_1}{F_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku nonivamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené tinktury v gramech;

$m_2$  – hmotnost nonivamidu CRL v porovnávacím roztoku v gramech;

$p_1$  – obsah nonivamidu v nonivamidu CRL v procentech.

#### Limit:

– **nonivamid:** nejvýše 5,0 % celkového obsahu kapsaicinoidů.

**Ethanol** (2.9.10). 95 % až 105 % hodnoty uvedené v označení na obalu.

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce *Nonivamid* (viz *Zkoušky na čistotu*).

Obsah kapsaicinoidů v procentech, vyjádřeno jako kapsaicin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_3 + F_5 + F_6) \cdot m_4 \cdot p_2}{F_4 \cdot m_3},$$

v němž značí:

$F_3$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_4$  – plochu píku kapsaicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$F_5$  – plochu píku dihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_6$  – plochu píku nordihydrokapsaicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$m_3$  – hmotnost zkoušené tinktury v gramech;

$m_4$  – hmotnost kapsaicinu CRL v porovnávacím roztoku v gramech;

$p_2$  – obsah kapsaicinu v kapsaicinu CRL v procentech.

## CARTHAMI FLOS

7.0:2386

### Světlicový květ

#### DEFINICE

Je to usušený květ druhu *Carthamus tinctorius* L.

*Obsah.* Nejméně 1,0 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; M<sub>r</sub> 464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oranžovožluté nebo červenooranžové trubkovité obou-pohlavní aktinomorfí květy jsou odděleny od lůžka. Květ je tvořen asi 1 cm dlouhou nitkovitou trubkou, na konci rozdělenou do pěti stejných úzkých kopinatých cípů asi 0,5 cm dlouhých. Z otevřené trubky vyčnívá dutý válec tvořený srostlými žlutými prašníky, uprostřed něho je nitkovitá čnělka, blízko vrcholu ztlustlá.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je oranžovo-žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korunní trubky s pokožkou z protáhlých, mnohohranných, tenkostěnných buněk; úlomky cípů koruny na konci s velkým počtem malých okrouhlých, silně vyniklých papil; úlomky parenchymu obsahující cévní svazky obklopené sekrečními kanálky s červeno-hnědým obsahem; úlomky prašníků z nepravidelných

buněk, se stěnami ztlustlými v charakteristických pružích; úlomky čnělky, jejíž buňky jsou v dolní části protáhlé, buňky v části ukončené ježatou bliznou mají poměrně dlouhé, kuželovité splývavé papily; okrouhlá nebo oválná pylová zrna se třemi klíčovými póry o průměru až 60 μm, s ježovitou exinou; hranolovité krystaly kalcium-oxalátu buď jednotlivě, nebo v parenchymatických buňkách.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R*, vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně a odstředí se.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *rutinu R* a 5 mg *kvercetin dihydrátu R* se rozpustí v 50 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové RS*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 27 + 100).

*Nanášení.* 25 μl, do proužků 15 mm [nebo 10 μl, do proužků 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm [nebo 7 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slaběji zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kvercetin: světle žlutá skvrna	
_____	_____
_____	_____
rutin: světle žlutá skvrna	červená skvrna
	žlutá skvrna
	žlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Zahřívá se 3 min při 100 °C; ještě horká deska se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*; asi 30 min se suší na vzduchu; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slaběji zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kvercetin: oranžově fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna
	zeleně fluoreskující skvrna
	hnědě fluoreskující skvrna
	zeleně fluoreskující skvrna
rutin: žlutě fluoreskující skvrna	žlutě fluoreskující skvrna
	zeleně fluoreskující skvrna
	hnědě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Absorbance (2.2.25).**

A. *Žluté barvivo*. Nejméně 0,40 při 401 nm.

0,1 g práškované drogy (355) (2.9.12) se maceruje 1 h ve 150 ml *vody R* za stálého míchání. Zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla (40) (2.1.2) a zředí se *vodou R*, kterou se nejprve promyje zbytek drogy, na 500,0 ml.

B. *Červené barvivo*. Nejméně 0,40 při 518 nm.

0,25 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 50 ml směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (20 + 80) a zahřívá se 90 min na vodní lázni při 50 °C; nechá se ochladit, zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla (40) (2.1.2) a zředí se směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (20 + 80), kterou se nejprve promyje zbytek drogy, na 100,0 ml.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).**

Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Roztok A.** 0,250 g práškované drogy (180) (2.9.12) se ve 250 ml baňce smíchá s 95 ml *methanolu R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem na vodní lázni. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 5 ml *methanolu R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí a v odměrné baňce se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml roztoku A se v odměrné baňce zředí roztokem *chloridu hlinitého R* (20 g/l) v *methanolu R* na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 ml roztoku A se v odměrné baňce zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Přesně po 15 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 420 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah celkových flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 420 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu při 420 nm je 400.

## CARVI ETHEROLEUM

6.0:1817

## Kmínová silice

*Synonymum.* Carvi aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná ze suchých plodů druhu *Carum carvi* L. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá, bezbarvá nebo žlutá kapalina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 40 µl se rozpustí v 1,0 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *karvonu R* a 5 µl *karveolu R* se rozpustí v 1,0 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagehu F<sub>254</sub>* pro TLC R (5 µm až 40 µm) [(nebo deska s vrstvou *silikagehu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl]; do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 5 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
karvon: zhášeující skvrna	zhášeující skvrna (karvon)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, zejména v dolní třetině je přítomno několik skvrn slabé intenzity.

Horní okraj desky	
	červenofialová skvrna
karvon: červená až oranžovohnědá skvrna	červenofialová skvrna intenzivní červená až oranžovohnědá skvrna (karvon)
karveol: červenofialová skvrna	červenofialová skvrna (karveol) fialovomodrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům těchto píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,904 až 0,920.

**Index lomu** (2.2.6). 1,484 až 1,490.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +65° až +81°, měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0; použije se 5,00 g zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,200 g se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5 µl *β-myrcenu R*, 80 µl *limonenu R*, 5 µl *dihydrokarvonu R*, 100 µl *karvonu R* a 5 µl *karveolu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10 µl *karvonu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *heptanem R* na 10 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;  
– *rozměry:* délka 30 m, vnitřní průměr 0,53 mm;  
– *stacionární fáze:* *makrogol 20 000 R* (tloušťka filmu 1 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R.*

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5 5–68 68–75	60 60 → 250 250
nástříkový prostor detektor		250 260

*Detekce.* Plamenioionizační detektor.

*Nástřík.* 1,0 µl.

*Eluční pořadí.* Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

– *rozlišení:* nejméně 4,5 mezi píkem *β-myrcenu* a píkem *limonenu*.

Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují jednotlivé látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

*Limity:*

– *β-myrcen:* 0,1 % až 1,0 %;  
– *limonen:* 30,0 % až 45,0 %;  
– *trans-dihydrokarvon:* nejvýše 2,5 %;  
– *karvon:* 50,0 % až 65,0 %;  
– *trans-karveol:* nejvýše 2,5 %;  
– *limit zanedbatelnosti:* plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

**Chirální čistota.** Plynová chromatografie (2.2.28).

*Zkoušený roztok.* 20 mg se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg (–)-*karvonu R* a 10 mg *karvonu R1* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;  
– *rozměry:* délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm;  
– *stacionární fáze:* *β-cyklohextrin pro chirální chromatografii modifikovaný R1* (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R.*

*Průtoková rychlost.* 2,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 30.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–80	50 → 170
nástříkový prostor detektor		230 230

*Detekce.* Plamenioionizační detektor.

*Nástřík.* 1 µl.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 2,4 mezi píkem (–)-*karvonu* (první pík) a píkem *karvonu R1* (druhý pík).



Obsah (–)-karvonu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1}{A_1 + A_2} \cdot 100,$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku (–)-karvonu;

$A_2$  – plochu píku karvonu R1.

Limit:

– (–)-karvon: nejvýše 1 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## CARVI FRUCTUS

6.0:1080

### Kmínový plod

#### DEFINICE

Je to celá usušená nažka druhu *Carum carvi* L.

Obsah silice. Nejméně 30 ml/kg bezvodé drogy.

#### VLASTNOSTI

Droga má charakteristický pach po karvonu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Plod je téměř válcovitá dvojnážka, většinou 3 mm až 6,5 mm dlouhá a 1 mm až 1,5 mm široká. Nažky jsou obvykle jednotlivé, šedohnědé nebo hnědé, lysé, většinou srpovitěho tvaru, na obou koncích zašpičatělé, každá s pěti vyniklými úzkými žebry. Pod lupou napříčným řezu mají tvar téměř pravidelného pětiúhelníku, na hřbetní straně se čtyřmi, na poutcové straně se dvěma siličnými kanálky.

B. Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky siličných kanálků, tvořené žlutohnědými až hnědými tenkostěnnými, mnohohrannými sekrečními buňkami, které jsou často provázány vrstvou tenkostěnných příčně protáhlých buněk 8 μm až 12 μm širokých; úlomky oplodí se ztlustlými buňkami a někdy s anomocytickými průduchy (2.8.3); četné úlomky endospermu obsahující aleuronová zrna, kapky mastného oleje a mikrokristaly šťavelanu vápenatého uspořádané v růžici; šroubovitě ztlustlé cévy provázené sklerenchymatickými vlákny; zřídka mohou být přítomny svazky vláken karpoforu; mohou být přítomny skupiny pravoúhlých až obdélníkových sklereid mezokarpu s mírně ztlustlými a tečkovanými stěnami.

C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškováné drogy (710) (2.9.12) se protřepává 2 min až 3 min s 5,0 ml *ethyl-acetátu R* a zfiltruje se přes 2 g *síranu sodného bezvodého R*.

*Porovnávací roztok.* 2 μl *karvonu R* a 5 μl *olivového oleje R* se rozpustí v 1,0 ml *ethyl-acetátu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku 25 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Ve střední části chromatogramu zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku je skvrna karvonu zhášející fluorescenci na světlém pozadí.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 2 min až 4 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Skvrny odpovídající karvonu jsou tmavě oranžovohnědé. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je nad skvrnou karvonu fialová skvrna (triacylglyceroly) odpovídající polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje). Na čele mobilní fáze na chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialová skvrna (terpenické uhlovodíky) a v dolní části chromatogramu jsou další slabě fialovosé nebo nahnědlé skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 10,0 g práškováné drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 10,0 g drogy upráškováne těsně před použitím (710) (2.9.12) se v 500ml baňce destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min s 200 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## CARYOPHYLLI FLORIS ETHEROLEUM

6.0:1091

### Silice hřebíčkovcového květu

*Synonymum.* Caryophylli floris aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z usušených poupat druhu *Syzygium aromaticum* (L.) MERILL et L. M. PERRY (*Eugenia caryophyllus* (C. SPRENG.) BULL. et HARR.) destilací s vodní parou.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá žlutá kapalina, na vzduchu hnědnoucí.

*Rozpustnost.* Mísitelná s dichlormethanem, s toluenem a s mastnými oleji.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**I.:** B.

**2.:** A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 20 μl se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R*.

**Porovnávací roztok.** 15 µl *eugenolu R* a 15 µl *acetyleneugenu R* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC *R*.

**Mobilní fáze.** *Toluen R*.

**Nanášení.** 20 µl zkoušeného roztoku a 15 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Dvakrát v nenasycené komoře po dráze 10 cm; suší se 5 min na vzduchu mezi oběma vyvíjeními.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a skvrny zhášející fluorescenci se označí.

**Hodnocení A.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části skvrna zhášející fluorescenci (*eugenol*) odpovídající polohou skvrně zhášející fluorescenci na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod skvrnou *eugenolu* může být méně intenzivní skvrna zhášející fluorescenci (*acetyleneugenol*) odpovídající polohou skvrně *acetyleneugenu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Detekce B.** Postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Skvrna *eugenolu* na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku je intenzivně hnědofialová a skvrna *acetyleneugenu* na chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialovomodrá. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další zbarvené skvrny; zejména slabě červená skvrna v dolní části a červenofialová skvrna (*β-karyofylen*) v horní části chromatogramu.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenční časy tří hlavních píků retenčním časům tří hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 1,030 až 1,063.

**Index lomu** (2.2.6). 1,528 až 1,537.

**Optická otáčivost** (2.2.7). 0° až -2°; měří se úhel optické otáčivosti.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice** (2.8.7). Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

**Rozpustnost v ethanolu** (2.8.10). 1,0 ml zkoušené látky je dobře rozpustný ve 2,0 ml nebo větším objemu *ethanolu 70% (V/V) R*.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 0,2 g se rozpustí v 10 g *hexanu R*.

**Porovnávací roztok.** 7 mg *β-karyofylenu R*, 80 mg *eugenolu R* a 4 mg *acetyleneugenu R* se rozpustí v 10 g *hexanu R*.

**Kolona:**

– **materiál:** tavený křemen;

– **rozměry:** délka 60 m, vnitřní průměr asi 0,25 mm;

– **stacionární fáze:** makrogol 20 000 *R*.

**Nosný plyn.** *Helium pro chromatografii R*.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1/100.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
	0–8	60
kolona	8–48 48–53	60 → 80 180
nástřikový prostor		270
detektor		270

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřik.** 1,0 µl.

**Eluční pořadí.** Jednotlivé látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi píkem *eugenolu* a píkem *acetyleneugenu*;

– **počet teoretických pater:** nejméně 30 000, počítáno pro pík *β-karyofylenu* při 110 °C.

**Identifikace složek.** K identifikaci látek přítomných ve zkoušeném roztoku se použije porovnání retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Vypočítá se obsah každé z těchto látek v procentech.

Obsah látek se pohybuje v rozmezí:

– *β-karyofylen:* 5,0 % až 14,0 %;

– *eugenol:* 75,0 % až 88,0 %;

– *acetyleneugenol:* 4,0 % až 15,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněna před teplem.

## CARYOPHYLLI FLOS

6.0:0376

Hřebíčkovcový květ

**DEFINICE**

Je to celé poupě druhu *Syzygium aromaticum* (L.) MERILL et L. M. PERRY (*Eugenia caryophyllus* (C. SPRENG.) BULL. et HARR.) sušené tak dlouho, dokud nezíská červenohnědou barvu.

**Obsah silice.** Nejméně 150 ml/kg drogy.

**VLASTNOSTI**

Droga má charakteristický aromatický pach.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Poupě je červenohnědé a skládá se z čtyřhranné stopkaté části, hypanthia, dlouhé 10 mm až 12 mm, o průměru 2 mm až 3 mm, zakončené čtyřmi odstávajícími kališními ústy, které obklopují kulovitou hlavičku o průměru 4 mm až 6 mm. Dvoupouzdrý semeník, který obsahuje četná vajíčka, je uložen v horní části hypanthia. Hlavička je kulovitá nebo kupolovitá, je tvořena čtyřmi překrývajícími se listky korunními, které uzavírají četné dovnitř skloněné tyčinky a krátkou vzpřímenou čnělku, na bázi s terčovitým nektariem. Stiskne-li se hypanthium mezi nehty, uvolňuje se silice.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je tmavohnědý, pach i chuť jsou stejné jako u nerozdrobněné drogy. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky hypanthia s pokožkou a pod ní ležícími vrstvami parenchymu s velkými siličnými nádržkami; krátká vlákna, vyskytující se buď jednotlivě, nebo v malých skupinách, se ztlustlými zdřevnatělými, řidce tečkovanými stěnami; mohutné úlomky parenchymu s drúzami šťavelanu vápenatého; četná trojhranná pylová zrna o průměru asi 15 µm, se třemi klíčovými póry v rozích. Škrobová zrna chybí.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g práškové drogy (500) (2.9.12) se protřepává 15 min se 2 ml *dichlormethanu R*.

Zfiltruje se, filtrát se odpaří opatrně na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *eugenolu R* se rozpustí ve 2 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* *Toluen R*.

*Nanášení.* 10 µl porovnávacího roztoku a 20 µl zkoušeného roztoku, odděleně do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vyvíjení.* Dvakrát v nenasycené komoře po dráze 10 cm; mezi oběma vyvíjeními se suší 5 min na vzduchu.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a skvrny zhášející fluorescenci se označí.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části skvrna zhášející fluorescenci (eugenol) odpovídající polohou skvrně zhášející fluorescenci na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod skvrnou eugenolu může být i méně intenzivní skvrna zhášející fluorescenci odpovídající polohou skvrně acetyleugenolu.

*Detekce B.* Postříká se *anisaldehydem RS*, použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm × 200 mm a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Skvrna eugenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku je intenzivně hnědofialová a skvrna acetyleugenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialovomodrá. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další zbarvené skvrny; zejména slabě červená skvr-

na v dolní části a červenofialová skvrna odpovídající karyofylenu v horní části chromatogramu.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2):

- nejvýše 6 % rozkvetlých pupat, květních stopek a plodů;
- nejvýše 2 % znehodnocené drogy;
- nejvýše 0,5 % ostatních cizích příměsí.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12).

5,0 g drogy se rozetře s 5,0 g *křemeliny R* na jemný homogenní prášek. 4,0 g této směsi se ihned použije k vlastnímu stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min v 250ml baňce se 100 ml *vody R* jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## CENTAURII HERBA

6.0:1301

## Zeměžlučová nať

## DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Centaureum erythraea* RAFN. sensu lato, včetně druhů *Centaureum majus* (H. et L.) ZELTNER a *Centaureum suffruticosum* (GRISEB.) RONN. (syn.: *Erythraea centaurium* PERSOON; *Centaureum umbellatum* GILIBERT; *Centaureum minus* GARS.).

## VLASTNOSTI

Droga hořké chuti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Stonek je dutý, válcovitý, světle zelený až tmavě hnědý, podélně rýhovaný, jen v horní části větvený. Listy jsou přisedlé, celokrajné, vstřícné, podlouhle vejčité až kopinaté, až 3 cm dlouhé; na obou stranách lysé, zelené až hnědavě zelené. Květy jsou uspořádány ve vrcholíkovitých vidlanech. Kalich je trubkovitý, pětičetný, zelený, kališní ústy kopinaté. Koruna je pětičetná, řepicovitá, růžová, korunní cípy asi 5 mm až 8 mm dlouhé, korunní trubka bělavá. Tyčinek je pět, nitky jsou srostlé s korunou. Semeník je svrchní s krátkou čnělkou, široce dvojkannou bliznou a četnými vajíčky. Často jsou přítomné válcovité tobočky asi 7 mm až 10 mm dlouhé, s malými hnědými výrazně drsnými semeny.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý nebo nahnědlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky stonku se zdřevnatělými skupinami vláken provázených úzkými cévami, cévice a někdy i cévy jsou šroubovitě ztlustlé; parenchym dřevě a dřevných paprsků s tečkovanými stěnami; úlomky čepele listu s buňkami pokožky se stěnami zprohýbanými a s rýhovanou kutikulou, zejména na okrajích čepele a v okolí průduchů; četné průduchy, většinou anisocytické (2.8.3); úlomky palisádového mezofylu, každá buňka obsahuje hranolovitý krystal šťavelanu vápenatého nebo řidčeji drúzy šťavelanu vápenatého; úlomky

kalicha a koruny, kde pokožkové buňky kalicha jsou s přímými stěnami a buňky vnitřní pokožky koruny jsou tupě papilózní s kutikulou paprscitě zvrásněnou; části endothecia se síťovitě nebo žebříčkovitě ztlustlými stěnami; žlutá pylová zrna zaobleně trojhranná nebo oválná, o průměru asi 30 µm, se zřetelně tečkovanou exinou a se třemi klíčovými póry; úlomky stěn tobolky složené ze vzájemně se křížících vrstev vláknitých buněk; kapky oleje ze semen, úlomky pokožky osemení s vyniklou hnědou síťovitou strukturou a s tečkovaným povrchem.

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 25 ml *methanolu R* a po 15 min protřepávání se zfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku při teplotě nepřesahující 50 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v malém množství *methanolu R* tak, aby výsledný objem roztoku byl 5 ml; roztok může obsahovat sediment.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *rutinu R* a 1 mg *swertiamarinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 1 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-formiátu R* (4 + 8 + 88).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 5 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** V nenasyčené komoře, po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny.

Horní okraj desky	
swertiamarin: skvrna zhášející fluorescenci	skvrna intenzivně zhášející fluorescenci (swertiamarin)
rutin: skvrna zhášející fluorescenci	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slaběji zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
swertiamarin: hnědá skvrna	hnědá skvrna (swertiamarin)
rutin: žlutá skvrna	hnědošedá skvrna žlutá skvrna
	šedá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %.

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 2000.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

## CENTELLAE ASIATICAE HERBA

6.0:1498

### Nať centely asijské

#### DEFINICE

Je to usušená řezaná nať druhu *Centella asiatica* (L.) URBAN.

**Obsah.** Nejméně 6,0 % celkových derivátů triterpenoidů, vyjádřeno jako asiaticosid (C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>19</sub>; M<sub>r</sub> 959,15), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Listy mají velmi proměnlivou velikost; řapík je obvykle pětikrát až desetkrát, někdy patnáctkrát delší než čepel, která je 10 mm až 40 mm dlouhá a 20 mm až 40 mm, často až 70 mm široká.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou střídavé, často na uzlinách shloučené, jsou ledvinovité nebo okrouhlé, nebo oválně eliptické, s dlanitou žilnatinou, obvykle se sedmi žilkami, okraj čepel je vroubkovaný. Mladé listy naspoďu ochmýřené, starší listy jsou olysalé. Květenství, je-li přítomno, tvoří jednoduchý okolík, většinou tříkvětý, řidčeji dvou- nebo čtyřkvětý. Květy jsou velmi malé (asi 2 mm), pětičetné, semeník spodní; plod je hnědošedá okrouhlá nažka, až 5 mm dlouhá, ze stran silně zploštělá se sedmi až devíti vyniklými zakřivenými žebry.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky pokožky listu s mnohohrannými buňkami a s nepravidelně rýhovanou kutikulou, paracytické průduchy (2.8.3) jsou četnější na spodní straně listu; úlomky pokožky řapíku s protáhlými buňkami; dlouhé, jednobuněčné, jednořadé, někdy mnohobuněčné zprohý-

bané krycí chlupy; mladé lístky; cévy šroubovitě ztlustlé; pryskyřičné kanálky; krystaly a drúzy šťavelanu vápenatého o průměru až 40 µm; svazky úzkých komůrkových vláken stonku; úlomky plodu s vrstvami širokých, parketovitě uspořádaných buněk, cévami kruhovitě ztlustlými a buňkami parenchymu obsahujícími jednoduchá nebo složená škrobová zrna.

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 5,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 50 ml *ethanolu* 30% (V/V) R zahřeje se k varu pod zpětným chladičem a pak se odstředí.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *asiatikosidu* R se rozpustí v *methanolu* R a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu* G pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové* RS, *kyseliny mravenčí bezvodé* R, *vody* R a *ethyl-acetátu* R (11 + 11 + 27 + 100).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem* RS a zahřeje se na 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku je v dolní třetině zelenomodrá skvrna (*asiatikosid*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je pod touto skvrnou patrná fialová skvrna (*madekassosid*); blízko čela mobilní fáze je světle modrá skvrna (*kyselina asiatická*) a těsně pod ní růžovofialová skvrna (*kyselina madekassová*). V dolní polovině chromatogramu zkoušeného roztoku jsou mezi startem a skvrnou odpovídající *madekassosidu* hnědé, šedé a hnědozelené skvrny a nad skvrnou odpovídající *asiatikosidu* hnědožluté nebo světle žluté skvrny.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 7 %, z toho nejvýše 5 % podzemních orgánů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

**Kapalinová chromatografie** (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 5,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se extrahuje 8 h v Soxhletově přístroji se 100 ml *methanolu* R; po ochlazení se extrakt zředí *methanolem* R na 100,0 ml a zfiltruje se přes filtr 0,45 µm; 2,0 ml filtrátu se zředí *methanolem* R na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 20,0 mg *asiatikosidu* R se rozpustí v *methanolu* R, je-li třeba za použití ultrazvukové lázně, a zředí se jím na 20,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem* R na 100,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný* R (5 µm).

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** *acetonitril pro chromatografii* R;

– **mobilní fáze B:** 3 ml *kyseliny fosforečné* R se zředí *vodou* R na 1000 ml.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–65	22	78
65–66	55	45
66–76	95	5
76–85	22	78

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 200 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Relativní retence vztahená k rozpouštědlu.** *Madekassosid* asi 5,8; *asiatikosid* asi 8,1; *kyselina madekassová* asi 17,6; *kyselina asiatická* asi 21,7.

Vypočítá se odezvový faktor  $R_F$  pro *asiatikosid* podle vzorce:

$$R_F = \frac{A_1 \cdot V_1 \cdot 100}{m_1 \cdot HPLC_p},$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku odpovídajícího *asiatikosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$V_1$  – objem porovnávacího roztoku v mililitrech;

$m_1$  – hmotnost *asiatikosidu* v porovnávacím roztoku v miligramech;

$HPLC_p$  – stanovená čistota *asiatikosidu*.

Vypočítá se průměrný odezvový faktor  $\bar{R}_F$  pro *asiatikosid* podle vzorce:

$$\bar{R}_F = \frac{\sum_{i=1}^N R_{fi}}{N},$$

v němž značí:

$\sum_{i=1}^N R_{fi}$  – součet odezvočných faktorů *asiatikosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$N$  – počet nástřiků porovnávacího roztoku ( $N = 4$ , nejméně).

Vypočítá se celkový obsah derivátů triterpenoidů, vyjádřeno jako *asiatikosid* ( $C_{48}H_{78}O_{19}$ ), podle vzorce:

$$\frac{V}{m} \left[ \frac{A + (B \cdot 1,017) + (C \cdot 0,526) + (D \cdot 0,509)}{\bar{R}_F} \right],$$

v němž značí:

$V$  – objem zkoušeného roztoku v mililitrech;

$m$  – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v miligramech;

$A$  – plochu píku odpovídajícího *asiatikosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$B$  – plochu píku odpovídajícího *madekassosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$C$  – plochu píku odpovídajícího *kyselině madekassové* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$D$  – plochu píku odpovídajícího *kyselině asiatické* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$\bar{R}_F$  – průměrný odezvový faktor pro *asiatikosid*.

## CHAMOMILLAE ROMANAE FLOS

6.0:0380

## Květ heřmánku římského

## DEFINICE

Je to usušený úbor plnokvětých kulturních odrůd druhu *Chamaemelum nobile* (L.) ALL. (*Anthemis nobilis* L.).

*Obsah silice.* Nejméně 7 ml/kg vysušené drogy.

## VLASTNOSTI

Úbory jsou bílé nebo žlutošedé, polokulovité, jednotlivé. Na kuželovitém plném lůžku jsou jednotlivé květy, každý s průsvitnou plevinou.

Droga výrazného charakteristického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Úbory mají průměr 8 mm až 20 mm; květní lůžko je plné; bazální část květního lůžka je kryta zákrovem tvořeným dvěma nebo třemi řadami silných, střechovitě se kryjících zákrovních lístků s kožovitými okraji. Většina květů je jazykovitých, ve střední části úboru je několik světle žlutých, trubkovitých květů. Jazykovité květy jsou matně bílé, kopinaté, semeník je spodní, tmavě hnědý; čnělka nitkovitá, blizna dvoulóčná; trubkovité květy mají pěticipou korunu, pět srostlých, zákorunních tyčinek; gyneceum stejné jako u jazykovitých květů.
- B.** Úbor se rozdělí na jednotlivé části. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Všechny části úboru jsou kryty četnými malými, žlutě se lesknoucími žláznatými chlupy. Zákorvní lístky a pleviny mají pokožkové buňky uspořádané v podélných řadách; buňky na bázi jsou ztlustlé, kryté kuželovitými chlupy asi 500 µm dlouhými. Chlupy jsou tvořeny třemi až čtyřmi velmi krátkými, bazálními buňkami a dlouhou, ohnutou, koncovou buňkou širokou asi 20 µm. Koruna jazykovitých květů sestává z papilózních buněk se zvrásněnou kutikulou. Semeníky obou druhů květů mají na bázi jednoráďový prstenec ztlustlých buněk. Květní lůžko a semeníky obsahují malé drúzy šťavelanu vápenatého. Pylová zrna mají průměr asi 35 µm, jsou kulovitá nebo trojhranná, se třemi klíčními póry a ostnitou exinou.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se za protřepávání 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 2,5 mg *apigeninu R* a 2,5 mg *apigenin-7-glukosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *butan-1-olu R* (17 + 17 + 66).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 5 min při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Ještě horká deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* (použije se asi 10 ml na desku 200 mm × 200 mm) a pak stejným objemem roztoku *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methano-*

*lu R.* Nechá se stát 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní třetině skvrna se žlutozelenou fluorescencí (apigenin) a ve střední části skvrna s nažloutlou fluorescencí (apigenin-7-glukosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (apigenin a apigenin-7-glukosid); nad skvrnou apigenin-7-glukosidu je skvrna s nahnědlou fluorescencí (luteolin); těsně pod skvrnou apigenin-7-glukosidu je skvrna s lehce nahnědlou fluorescencí (apiin); těsně pod skvrnou apiinu je skvrna s jasně modrou fluorescencí a pod ní opět skvrna s jasně modrou fluorescencí; na chromatogramu mohou být i další méně výrazné skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Průměr úborů.** Nejvýše 3 % úborů o průměru menším než 8 mm.

**Znehodnocené úbory.** Nejsou přítomny hnědé nebo ztmavlé úbory.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 20,0 g nerozdrobněné drogy se destiluje 3 h rychlostí 3 ml/min až 3,5 ml/min v 500ml baňce s kulatým dnem s 250 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## CHELIDONII HERBA

7.5:1861

## Vlaštovičnicková nať

## DEFINICE

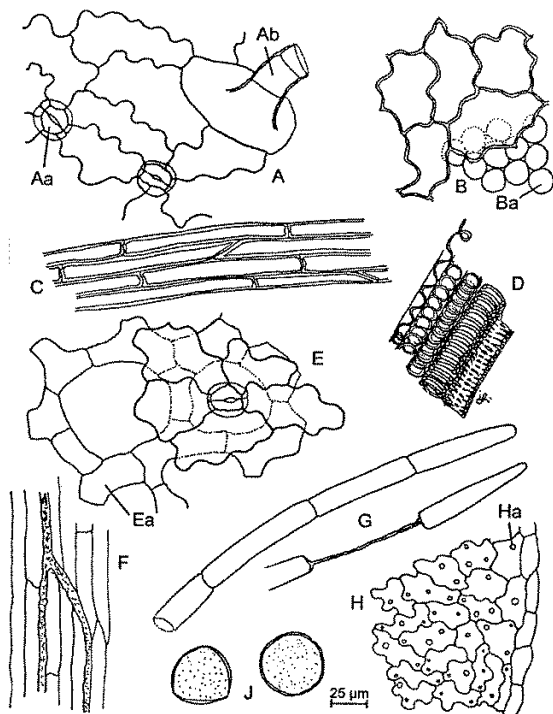
Je to usušená celá nebo řezaná kvetoucí nať druhu *Chelidonium majus* L.

*Obsah.* Nejméně 0,6 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako chelidonin (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>; M<sub>r</sub> 353,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je oblá, rýhovaná, nažloutlá nebo zelenohnědá, roztroušeně chlupatá, o průměru asi 3 mm až 7 mm, dutá, většinou zrnáklá. Lísty jsou tenké, nepravidelně zpeřené, lístky jsou oválné až podlouhlé s okrajem čepele zastříhaně zubatým, koncový lístek je často trojlobý. Lísty jsou na svrchní straně modrozelené a lysé, na spodní straně světlejší a roztroušeně chlupaté, zvláště na žilnatině. Kalich je dvojčetný, lístky kališní jsou silně ploskovypouklé, záhy opadavé; čtyři žluté široce vejčité korunní lístky jsou asi 8 mm až 10 mm dlouhé; četné tyčinky jsou žluté; čnělka je krátká, semeník svrchní; zřídka jsou přítomné nezralé plody – čárkovité tobolky.

**B. Mikroskopické hodnocení (2.8.23).** Prášek je tmavě šedozelený nebo hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné úlomky svrchní pokožky listů z buněk s vlnitými stěnami v plošném pohledu [B], provázené spodní vrstvou palisádového parenchymu [Ba]; četné úlomky spodní pokožky listu v plošném pohledu [A, E] s anomocytickými průduchy (2.8.3) [Aa] a bázemi krycích chlupů [Ab], někdy provázené spodní vrstvou houbového parenchymu [Ea]; úlomky dlouhých, jednořadých, většinou mnohobuněčných krycích chlupů s tenkostěnnými buňkami, někdy zkolažovanými [G]; cévní svazky z listů a stonků tvořené tečkovanými a šroubovitě ztlustlými cévami [D]; skupiny vláken [C]; mléčnice se žlutohnědým obsahem [F]; zřídka úlomky korunních lístků [H] z tenkostěnných buněk obsahujících četné světle žluté kapky oleje [Ha]; okrouhlá pylová zrna o průměru asi 30 μm až 40 μm se třemi klíčovými póry a jemně tečkovanou exinou [J].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové vlašovičkové natě

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** 0,4 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se vaří 30 min s 50 ml *kyseliny octové zředěné RS* ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. K filtrátu se přidá *amoniak 26% R* do silně zásadité reakce a protřepává se 30 ml *dichlormethanu R*. Organická vrstva se vysuší nad *síranem sodným bezvodým R*, zfiltruje se a ve vakuu se odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *papaverin-hydrochloridu R* a 2 mg *červeně methylové R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 96% R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *propan-2-olu R* (1 + 9 + 90).

**Nanášení.** 10 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS*, usuší se na vzduchu, postříká se *dusitanem sodným RS* a znovu se usuší na vzduchu; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny.

Horní okraj desky	
červeň methylová: červená skvrna	hnědá skvrna
	hnědá skvrna
papaverin: šedohnědá skvrna	šedohnědá skvrna
	dvě hnědé skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 10,0 %.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 13,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

**Zkoušený roztok.** 0,750 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se vaří 30 min s 200 ml *kyseliny octové zředěné RS* na vodní lázni za častého protřepávání. Po ochlazení se zředí *kyselinou octovou zředěnou RS* na 250,0 ml a zfiltruje se. Prvních 20 ml filtrátu se odstraní. 30,0 ml filtrátu se smíchá s 6,0 ml *amoniaku 26% R* a 100,0 ml *dichlormethanu R* a protřepává se 30 min. Organická vrstva se oddělí a 50,0 ml se ve 100ml baňce s kulatým dnem odpaří ve vakuu do sucha, při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí za mírného zahřátí v asi 2 ml až 3 ml *ethanolu 96% R*. Roztok se převede do 25ml odměrné baňky, baňka s kulatým dnem se promyje *kyselinou sírovou zředěnou RS* a zředí se jí na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se v 25ml odměrné baňce smíchá s 5,0 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (10 g/l) v *kyselině sírové R*, baňka se uzavře a roztok se opatrně promíchá. Zředí se *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml a baňka se uzavře.

**Kontrolní roztok.** Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok. Ve 25ml odměrné baňce se smíchá 5,0 ml *kyseliny sírové zředěné RS* s 5,0 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (10 g/l) v *kyselině sírové R*. Baňka se uzavře, roztok se opatrně promíchá, zředí se *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml a baňka se uzavře.

Zkoušený i kontrolní roztok se umístí na 10 min na vodní lázeň, pak se ochladí na asi 20 °C a je-li třeba, zředí se kyselinou sírovou *R* na 25,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 570 nm.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako chelidonin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 2,23}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 570 nm;

*m* – hmotnost zkoušené rostlinné drogy v gramech.

Specifická absorbance chelidoninu má hodnotu 933.

## CIMICIFUGAE RHIZOMA

7.5:2069

### Oddenek ploštičnicku

#### DEFINICE

Je to celý nebo rozlámáný usušený oddenek a kořen druhu *Actaea racemosa* L. (synonymum: *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.).

**Obsah.** Nejméně 1,0 % triterpenových glykosidů, vyjádřeno jako monoamonium-glycyrrhizát (C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 840), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A. Droga v celku.** Oddenek je tmavě hnědý, tvrdý, téměř válcovitý někdy uzlinovitý, 2 cm až 15 cm dlouhý, o průměru 1,5 cm až 2,5 cm, s četnými hustě uspořádanými rovnými nebo ohnutými výčnělky, každý na konci s pupenem nebo okrouhlou miskovitou jizvou. Lom je rohovitý, na příčném řezu je patrná tenká zevní kůra, obklopující kruh četných světlých úzkých klínovitých pruhů cévních svazků, které se střídají s tmavšími dřevnými paprsky, a velkou centrální dutinu. Kořeny vyrůstají na spodní straně oddenku, obvykle jsou ulámané, zůstávají po nich okrouhlé jizvy. Kořeny jsou tmavě hnědé o průměru 1 mm až 3 mm, křehké, téměř válcovité nebo tupě čtyřhranné, podlouhle zvrásněné; lom je krátký, na příčném řezu je patrná silná vrstva zevní kůry a tmavě hnědý cylindr, jehož střední část tvoří tři až šest světlejších klínovitých pruhů cévních svazků ve středu spojených a navzájem oddělených širokými nezdřevnatěnými dřevnými paprsky.

**Rozlámáná droga.** Více nebo méně hranaté nepravidelné kousky oddenku a válcovitých kousků kořenů. Úlomky tvrdého, rohovitého oddenku jsou na svrchní straně tmavě hnědé, na řezu světle hnědé, s různou četností proužkované. Úlomky tmavě hnědých víceméně válcovitých kořenů jsou podélně rýhované. Na světlejším příčném řezu je patrné kambium, zřetelně oddělující silnou vrstvu zevní kůry a střední část, kterou tvoří tři až šest světlejších klínovitých pruhů cévních svazků ve středu spojených a navzájem oddělených širokými dřevnými paprsky.

**B. Mikroskopické hodnocení (2.8.23).** Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky tenkostěnného parenchymu; skupiny malých zdřevnatělých cév s hustě uspořádanými dvůrkou, nebo méně často síťovitě ztlustlých; zdřevnatělá tenkostěnná vlákna a parenchym dřeva; úlomky hnědých zkorkovatělých buněk s mírně ztlustlými stěnami. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R* a *vody R*. V práškové droze jsou patrná četná škrobová zrna, kulovitá nebo mnohohranná, jednoduchá nebo dvoučetná nebo trojčetná (někdy až šestičetná); jednotlivá škrobová zrna o průměru 3 μm až 15 μm, uprostřed se šetrbinovitým hilem.

**C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Záměna za *Cimicifuga americana* MICHX., *C. foetida* L., *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM. nebo *C. heracleifolia* KOM. (viz Zkoušky na čistotu).**

**Hodnocení B.** Pro identifikaci skvrny odpovídající oddenku ploštičnicku (*Actaea racemosa*) se použijí chromatogramy dodávané s *oddenkem ploštičnicku HRL* a chromatogramy porovnávacího roztoku (a).

Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a) a (b). Na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a) mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky		
aktein: hnědá skvrna 23- <i>epi</i> -26- -deoxyaktein: hnědá skvrna	aktein: hnědá skvrna	hnědá skvrna (aktein) hnědá skvrna (23- <i>epi</i> -26- -deoxyaktein)
fialová skvrna fialová skvrna hnědá skvrna		fialová skvrna fialová skvrna hnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok (a)</b>	<b>Porovnávací roztok (b)</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 12 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5 %.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 10 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 5 %.

**Záměna za *Cimicifuga americana* MICHX., *C. foetida* L., *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM. nebo**



**C. heracleifolia KOM.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 0,50 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, silně se protřepe, vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně a pak se odstředí. Použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok (a).** K 0,50 g *oddenku ploštičnicku HRL* se přidá 10 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, silně se protřepe, vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně a pak se odstředí. Použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok (b).** 2 mg *akteinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *ethyl-formiátu R* a *toluenu R* (20 + 30 + 50).

**Nanášení.** 2 µl, do proužků 8 mm (viz tabulku 1).

**Vyvíjení.** Po dráze 6 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

– hodnota  $R_F$  skvrny *akteinu* je v rozmezí 0,35 až 0,40 (detekce B).

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná zhášející skvrna intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacím roztoku (a) s hodnotou  $R_F$  v rozmezí 0,2 až 0,35.

**Detekce B.** Postříká se roztokem *kyseliny sírové R 10% (V/V)* v *methanolu R* a zahřívá se 5 min při 100 °C. Nechá se ochladit na teplotu místnosti a pozoruje se v denním světle.

**Padělání s *Cimicifuga americana* MICHX., *C. foetida* L., *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM. nebo *C. heracleifolia* KOM.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) popsaná ve zkoušce Záměna za *Cimicifuga americana* MICHX.,

*C. foetida* L., *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM. nebo *C. heracleifolia* KOM. s následujícími úpravami.

**Porovnávací roztok (c).** 2 mg *cimicifuginu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Nanášení.** 2 µl, porovnávací roztoky (b) a (c); 20 µl, zkoušený roztok a porovnávací roztok (a); do proužků 8 mm (viz tabulku 2).

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

– hodnota  $R_F$  skvrny *akteinu* je v rozmezí 0,35 až 0,40 (detekce B a C).

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Nepřítomnost *C. americana* nad 10 %.

Porovná se chromatogram dodávaný s *oddenkem ploštičnicku HRL* pro *C. americana* s chromatogramy zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná zhášející skvrna s hodnotou  $R_F$  0,3 (skvrny na chromatogramu *C. americana* jsou v malých skupinkách, viz dále). Přítomnost takové skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku indikuje padělání s *C. americana* v rozsahu nad 10 %.

Horní okraj desky	
slabá skvrna dvě slabé skvrny slabá skvrna	slabá skvrna dvě slabé skvrny slabá skvrna
slabá skvrna tmavá skvrna tmavá skvrna	TMAVÁ SKVRNA slabá skvrna tmavá skvrna tmavá skvrna
<b>Porovnávací roztok (a)</b>	<b><i>C. americana</i> (10 %)</b>

**Tab. 1** Schéma nanášení

dráha	1	2	3	4	5	6	7
nanášený objem (µl)	2	2	2	–	2	2	2
roztok	porovnávací roztok (a)	porovnávací roztok (b)	zkoušený roztok	kontrolní roztok	porovnávací roztok (a)	porovnávací roztok (b)	zkoušený roztok

Po vyvíjení se deska rozdělí podél dráhy 4 (kontrolní roztok). Dráhy 1 až 3 se použijí pro zkoušku záměny za *C. americana*, *C. foetida*, *C. heracleifolia* nebo *C. dahurica*. Dráhy 5 až 7 se použijí pro zkoušku totožnosti C (detekce B).

**Tab. 2** Schéma nanášení

dráha	1	2	3	4	5	6	7	8	9
nanášený objem (µl)	20	2	2	20	–	20	2	2	20
roztok	porovnávací roztok (a)	porovnávací roztok (b)	porovnávací roztok (c)	zkoušený roztok	kontrolní roztok	porovnávací roztok (a)	porovnávací roztok (b)	porovnávací roztok (c)	zkoušený roztok

Po vyvíjení a provedení stanovení *C. americana* (detekce A) se deska rozdělí podél dráhy 5 (kontrolní roztok).

Dráhy 1 až 4 se použijí pro zkoušku padělání s *C. foetida* (detekce B).

Dráhy 6 až 9 se použijí pro zkoušku padělání s *C. heracleifolia* a/nebo *C. dahurica* (detekce C).

**Detekce B.** 4,5 g kyseliny borité R se rozpustí ve 150 ml ethanolu bezvodého R (roztok A). 5 g kyseliny šťavelové R se rozpustí v 50 ml ethanolu bezvodého R (roztok B). Roztoky A a B se spojí a dobře promíchají. Deska se postříká tímto čerstvě připraveným roztokem, zahřívá se 5 min při 120 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Nepřítomnost *C. foetida* nad 5 %.

Porovná se chromatogram dodávaný s oddenkem ploštičnicku HRL pro *C. foetida* s chromatogramy zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a), (b) a (c). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná intenzivně fluoreskující skvrna s hodnotou  $R_F$  v rozmezí 0,03 až 0,06 nebo ve stejné poloze jako intenzivně fluoreskující skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (skvrny na chromatogramu *C. foetida* jsou v malých skupinkách, viz dále). Přítomnost jedné nebo obou skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku indikuje padělání s *C. foetida* v rozsahu nad 5 %.

Horní okraj desky			
aktein: slabá bělavá skvrna	aktein: slabá bělavá skvrna		slabá bělavá skvrna (aktein)
namodralá skvrna			namodralá skvrna
nahnědlá skvrna namodralá skvrna		cimifugin: zřetelně fluoreskující skvrna	ZŘETELNĚ FLUORESKUJÍCÍ SKVRNA (CIMIFUGIN) nahnědlá skvrna namodralá skvrna FLUORESKUJÍCÍ SKVRNA
<b>Porovnávací roztok (a)</b>	<b>Porovnávací roztok (b)</b>	<b>Porovnávací roztok (c)</b>	<b><i>C. foetida</i> (5 %)</b>

**Detekce C.** 8 g chloridu antimonitého R se rozpustí ve 200 ml dichlormethanu R; deska se postříká tímto roztokem, 10 min se zahřívá při 120 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení C.** Nepřítomnost *C. heracleifolia* a/nebo *C. dahurica* nad 5 %.

Porovná se chromatogram dodávaný s oddenkem ploštičnicku HRL pro *C. heracleifolia* a *C. dahurica* s chromatogramy zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a) a (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná zřetelně fluoreskující skvrna nad skvrnou akteinu (skvrny na chromatogramu *C. heracleifolia* nebo *C. dahurica* jsou v malých skupinkách, viz dále). Přítomnost takové skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku indikuje padělání s *C. heracleifolia* a/nebo *C. dahurica* v rozsahu nad 5 %.

Horní okraj desky		
aktein: slabá nahnědlá skvrna	aktein: slabá nahnědlá skvrna	ZŘETELNĚ FLUORESKUJÍCÍ SKVRNA slabá nahnědlá skvrna (aktein)
nahnědlá skvrna namodralá skvrna		nahnědlá skvrna namodralá skvrna
<b>Porovnávací roztok (a)</b>	<b>Porovnávací roztok (b)</b>	<b><i>C. heracleifolia</i> (5 %) a/nebo <i>C. dahurica</i> (5 %)</b>

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 4,00 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se převedou do 200ml baňky se šroubovacím uzávěrem, přidá se 50,0 ml směsi stejných objemových dílů methanolu R a vody R a umístí se 45 min ultrazvukové lázně, pak se 15 min třepe a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Porovnávací roztok (a).** 10,0 mg oddenku ploštičnicku pro stanovení obsahu CRL (obsahuje monoamonium-glycyrrhizát) se pomocí ultrazvukové lázně rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí methanolem R na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (c).** 2,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí methanolem R na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (d).** 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí methanolem R na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok (e).** 500 mg extraktu z oddenku ploštičnicku pro test způsobilosti suchého HRL se pomocí ultrazvukové lázně rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10,0 ml, zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm).

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** roztok kyseliny mravenčí bezvodé R (0,1 %) ve vodě R;

– **mobilní fáze B:** roztok kyseliny mravenčí bezvodé R (0,1 %) ve směsi stejných objemových dílů acetonitrilu R a methanolu R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–40	50 → 20	50 → 80
40–41	20 → 5	80 → 95
41–44	5	95

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

Rostlinné drogy a přípravky...

**Detekce.** Detektor rozptylu světla s odpařováním; jako vhodné bylo nalezeno následující nastavení (jestliže má detektor různé parametry nastavení, upraví se nastavení detektoru tak, aby bylo v souladu s kritériem testu způsobilosti pro poměr signálu k šumu):

- nosný plyn: dusík R;
- průtoková rychlost: 0,8 ml/min;
- teplota odpařování: 100 °C;
- teplota rozprašování: 60 °C.

**Nástřik.** 10 µl.

**Identifikace píků.** K identifikace stanovovaných píků se použije chromatogram dodávaný s extraktem oddenku ploštníku pro test způsobilosti suchým HRL a chromatogram porovnávacího roztoku (e).

**Test způsobilosti.**

- poměr signálu k šumu: nejméně 4,0 pro pík monoamonium-glycyrrhizátu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d);
- poměr výšky píku k sedlu: nejméně 3, kde  $H_p$  je výška píku 4 nad základní linií a  $H_v$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku 5 na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Sestrojí se kalibrační křivka logaritmu koncentrací (mg/ml) porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d) na ose  $x$  (korigováno deklarovaným obsahem monoamonium-glycyrrhizátu v oddenku ploštníku pro stanovení obsahu CRL) a logaritmu ploch odpovídajících píků na ose  $y$ .

Vypočítá se obsah každého píku v procentech podle vzorce:

$$\frac{10^4 \cdot 5}{m},$$

v němž značí:

- $A$  – logaritmus koncentrací každého píku na chromatogramu zkoušeného roztoku, určí se z kalibrační křivky;
- $m$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech.

Obsah triterpenových glykosidů v procentech se vypočítá za použití součtu obsahu píků 1 až 12 v procentech.

## CINCHONAE CORTEX

7.0:0174

### Chinovníková kůra

#### DEFINICE

Je to usušená celá nebo nařezaná kůra druhu *Cinchona pubescens* VAHL (*Cinchona succirubra* PAV.), *Cinchona calisaya* (WEDD.), *Cinchona ledgeriana* (MOENS ex TRIMEN) nebo jejich odrůd nebo kříženců.

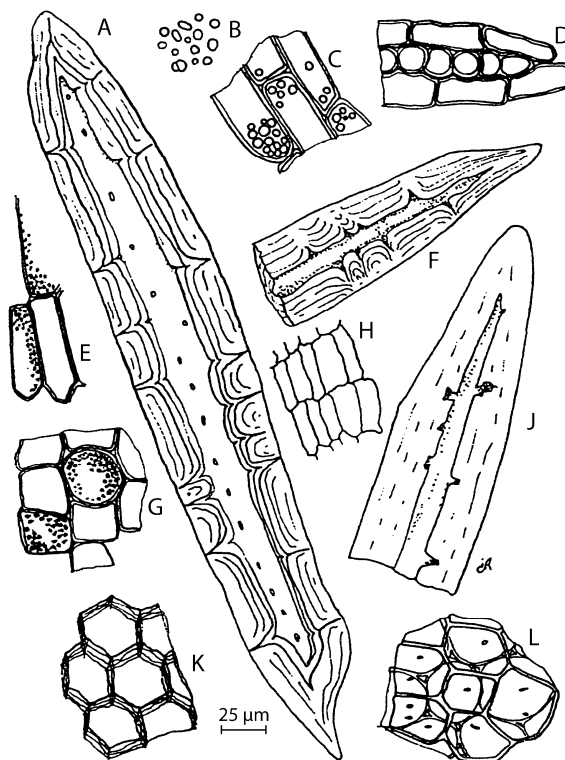
**Obsah.** Nejméně 6,5 % celkových alkaloidů, z toho 30 % až 60 % alkaloidů chininového typu, počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga intenzivně hořké, poněkud svíravé chuti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kůra kmenů a větví je tvořena rourkovitými nebo žlábkovitými 2 mm až 6 mm silnými kusy. Zevní strana je matná, hnědošedá nebo šedá, na povrchu často s lišejníky. Je obvykle drsná, se zřetelnými příčnými prasklinami, podélně zbrzděná nebo vrásčitá a popraskaná. U některých odrůd je zevní vrstva odštěpena. Vnitřní strana je rýhovaná, tmavě červenohnědá. Lom je v zevní části krátký, ve vnitřní části vláknitý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): tenkostěnné buňky korku s červenohnědým obsahem v plošném pohledu [K] a v příčném řezu [H]; žlutá, větvenovitě protáhlá lýková vlákna až 90 µm v průměru a až 1300 µm dlouhá, se silně ztlustlými stěnami, nestejným lumenem a s nápadnými nálevkovitými tečkami, celá [A] nebo úlomky [F, J]; parenchymatické idioblasty jsou vyplněny hranolovitými mikrokristaly kalcium-oxalátu [E, G]; shluky tenkostěnných lýkových parenchymatických buněk [L] s dřevnými paprsky v tangenciálním řezu [D]. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*. V práškové droze jsou patrna nepříliš četná škrobová zrna o průměru 6 µm až 10 µm, většinou jednoduchá, občas složená ze dvou nebo tří zrn, volná [B] nebo uvnitř parenchymatických buněk [C].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové chinovníkové kůry

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,10 g práškové drogy (180) (2.9.12) se ve zkumavce smíchá s 0,1 ml *amoniakku 26% RS* a 5 ml *dichlormethanu R*. Občas se silně protřepe a po 30 min se zfiltruje. Filtrát se odpaří na

vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml *ethanolu bezvodého R*.

**Porovnávací roztok.** 17,5 mg *chininu R*, 2,5 mg *chinidinu R*, 10 mg *cinchoninu R* a 10 mg *cinchonidinu R* se rozpustí v 5 ml *ethanolu bezvodého R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *diethylaminu R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (10 + 20 + 70).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Dvakrát po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

**Detekce A.** Postříká se *kyselinou mravenčí bezvodou R*, nechá se na vzduchu usušit a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny ještě další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
chinidin: jasně modře fluoreskující skvrna	jasně modře fluoreskující skvrna (chinidin)
chinin: jasně modře fluoreskující skvrna	jasně modře fluoreskující skvrna (chinin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Postříká se *zkoumadlem jodoplaticitým R*.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny ještě další skvrny.

Horní okraj desky	
cinchonin: fialová skvrna přecházející do fialovošedé	fialová skvrna přecházející do fialovošedé (cinchonin)
chinidin: fialová skvrna přecházející do fialovošedé	fialová skvrna přecházející do fialovošedé (chinidin)
cinchonidin: intenzivní tmavomodrá skvrna	intenzivní tmavomodrá skvrna (cinchonidin)
chinin: fialová skvrna přecházející do fialovošedé	fialová skvrna přecházející do fialovošedé (chinin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Zkoušený roztok.** 1,000 g práškové drogy (180) (2.9.12) se v 250 ml kuželové baňce smíchá s 10 ml *vody R* a 7 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Zahřívá se 30 min ve vodní lázni. Nechá se ochladit a přidá se 25 ml *dichlormethanu R*, 50 ml *etheru R* a 5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l). Směs se opakovaně 30 min protřepává, pak se přidají 3 g práškového *tragantu R* a protřepává se, dokud roztok není čirý. Zfiltruje se přes chomáček vaty a baňka i vata se propláchnou pětkrát 20 ml směsí objemových dílů *dichlormethanu R* a *etheru R* (1 + 2). Filtráty a promývací tekutiny se spojí a odpaří se do sucha, zbytek se rozpustí v 10,0 ml *ethanolu bezvodého R*. 5,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

**Porovnávací roztoky.** 30,0 mg *chininu R* a 30,0 mg *cinchoninu R* se odděleně rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a každý roztok se zředí stejnou kyselinou na 1000,0 ml.

Změří se absorbance (2.2.25) tří roztoků při 316 nm a 348 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny.

Obsah alkaloidů v procentech se vypočítá podle vzorců:

$$x = \frac{[A_{316} \cdot A_{348c}] - [A_{316c} \cdot A_{348}]}{[A_{316q} \cdot A_{348c}] - [A_{316c} \cdot A_{348q}}} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000},$$

$$y = \frac{[A_{316} \cdot A_{348q}] - [A_{316q} \cdot A_{348}]}{[A_{316c} \cdot A_{348q}] - [A_{316q} \cdot A_{348c}}} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000},$$

v nichž značí:

- m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- x* – obsah alkaloidů chininového typu v procentech;
- y* – obsah alkaloidů cinchoninového typu v procentech;
- A*<sub>316</sub> – absorbanci zkoušeného roztoku při 316 nm;
- A*<sub>348</sub> – absorbanci zkoušeného roztoku při 348 nm;
- A*<sub>316c</sub> – absorbanci porovnávacího roztoku cinchoninu při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku);
- A*<sub>316q</sub> – absorbanci porovnávacího roztoku chininu při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku);
- A*<sub>348c</sub> – absorbanci porovnávacího roztoku cinchoninu při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku);
- A*<sub>348q</sub> – absorbanci porovnávacího roztoku chininu při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku).

Vypočítá se obsah celkových alkaloidů (*x + y*) a relativní obsah alkaloidů chininového typu podle vzorce:

$$\frac{100 \cdot x}{x + y}$$

## CINCHONAE EXTRACTUM FLUIDUM NORMATUM

6.0:1818

Chinovníkový extrakt tekutý standardizovaný

## DEFINICE

Je to tekutý extrakt vyrobený z drogy *Cinchonae cortex* (0174).

*Obsah.* 4,0 % až 5,0 % celkových alkaloidů, z toho 30 % až 60 % alkaloidů chininového typu ( $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ;  $M_r$  324,4).

## VÝROBA

Tekutý standardizovaný extrakt se připravuje vhodným postupem z rostlinné drogy za použití:

- ethanolu 30% (V/V) až ethanolu 90% (V/V) nebo;
- směsi objemových dílů kyseliny chlorovodíkové zředěné, ethanolu 96% (V/V), glycerolu a vody (1 + 2 + 5 + 20).

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědočervená tekutina, hořké svíravé chuti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v 1 ml ethanolu bezvodého R.

*Porovnávací roztok.* 2,5 mg chinidinu R, 10 mg cinchonidinu R, 10 mg cinchoninu R a 17,5 mg chininu R se rozpustí v 5 ml ethanolu bezvodého R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů diethylaminu R, ethyl-acetátu R a toluenu R (10 + 20 + 70).

*Nanášení.* 10 μl [nebo 2 μl], do proužků.

*Vyvíjení.* Dvakrát po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

*Detekce A.* Postříká se roztokem kyseliny mravenčí bezvodé R (50 g/l) a nechá se usušit na vzduchu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
chinidin: zřetelná modře fluoreskující skvrna	zřetelná modře fluoreskující skvrna (chinidin)
chinin: zřetelná modře fluoreskující skvrna	zřetelná modře fluoreskující skvrna (chinin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se zkoumadlem jodoplaticitým R.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
cinchonin: fialovošedá skvrna	fialovošedá skvrna (cinchonin)
chinidin: fialovošedá skvrna	fialovošedá skvrna (chinidin)
cinchonidin: intenzivní tmavomodrá skvrna	intenzivní tmavomodrá skvrna (cinchonidin)
chinin: fialovošedá skvrna	fialovošedá skvrna (chinin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 95 % až 105 % obsahu uvedeného v označení na obalu.

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

**Zbytek po vysušení** (2.8.16). Nejméně 12,0 % pro standardizovaný chinovníkový tekutý extrakt prostý glycerolu a nejméně 30,0 % pro standardizovaný chinovníkový extrakt obsahující glycerol; stanoví se se 2,00 g zkoušeného extraktu.

## STANOVENÍ OBSAHU

*Zkoušený roztok.* Asi 1,000 g se v 250 ml kuželové baňce smíchá s 10 ml vody R a 7 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a zahřívá se 30 min ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 25 ml dichlometanu R, 50 ml etheru R a 5 ml roztoku hydroxidu sodného R (200 g/l). Směs se nechá stát 30 min za častého protřepávání, pak se přidají 3 g upráškováného tragantu R a protřepává se do vzniku čiré směsi. Zfiltruje se přes chomáček vaty a baňka i vata se propláchnou pětkrát 20 ml směsi objemových dílů dichlormethanu R a etheru R (1 + 2). Spojené filtráty a promývací tekutiny se odpaří do sucha a odparek se rozpustí v 10,0 ml ethanolu 96% R. 5,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS a zředí se jí na 1000,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 30,0 mg cinchoninu R se rozpustí v kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS a zředí se jí na 1000,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 30,0 mg chininu R se rozpustí v kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS a zředí se jí na 1000,0 ml.

Změří se absorbance (2.2.25) těchto tří roztoků při 316 nm a 348 nm za použití kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS jako kontrolní tekutiny. Vypočítá se obsah alkaloidů v procentech podle vzorců:

$$n_1 = \frac{[A_1 \cdot A_{2a}] - [A_{1a} \cdot A_2]}{[A_{1b} \cdot A_{2a}] - [A_{1a} \cdot A_{2b}]} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000}$$

$$n_2 = \frac{[A_1 \cdot A_{2b}] - [A_{1b} \cdot A_2]}{[A_{1a} \cdot A_{2b}] - [A_{1b} \cdot A_{2a}]} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000},$$

v nichž značí:

- $m$  – hmotnost tekutého extraktu v gramech;  
 $n_1$  – obsah alkaloidů chininového typu v procentech;  
 $n_2$  – obsah alkaloidů cinchoninového typu v procentech;  
 $A_1$  – absorbanci zkoušeného roztoku při 316 nm;  
 $A_2$  – absorbanci zkoušeného roztoku při 348 nm;  
 $A_{1a}$  – absorbanci porovnávacího roztoku (a) při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg/1000 ml);  
 $A_{1b}$  – absorbanci porovnávacího roztoku (b) při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg/1000 ml);  
 $A_{2a}$  – absorbanci porovnávacího roztoku (a) při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg/1000 ml);  
 $A_{2b}$  – absorbanci porovnávacího roztoku (b) při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg/1000 ml).

Obsah celkových alkaloidů ( $n_1 + n_2$ ) a relativní obsah alkaloidů chininového typu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{n_1 \cdot 100}{n_1 + n_2}.$$

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede složení rozpouštědla použitého při výrobě.

## CINNAMOMI CASSIAE ETHEROLEUM

7.0:1496

### Silice skořicovníku čínského

*Synonymum.* Cinnamomi cassiae aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z listů a mladých větví druhu *Cinnamomum cassia* BLUME (*Cinnamomum aromaticum* NEES) destilací s vodní parou.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutá nebo červenohnědá čirá pohyblivá kapalina, charakteristického pachy připomínajícího cinnamaldehyd.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

#### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 ml se rozpustí v acetonu R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 50  $\mu$ l *trans-cinnamaldehydu* R, 10  $\mu$ l *eugenolu* R a 50 mg *kumarinu* R se rozpustí v acetonu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu* R a *toluenu* R (10 + 90).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Modře fluoreskující skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (kumarin).

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem* RS a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části fialová skvrna (eugenol) a nad ní zelenomodrá skvrna (*trans-cinnamaldehyd*). Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně *trans-cinnamaldehydu* na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídající eugenolu je jen velmi slabá. Jsou přítomny ještě další slabě zbarvené skvrny.

#### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenční časy hlavních píků retenčním časům hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Eugenol může na chromatogramu zkoušeného roztoku chybět.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 1,052 až 1,070.

**Index lomu** (2.2.6). 1,600 až 1,614.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-1^\circ$  až  $+1^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 100  $\mu$ l *trans-cinnamaldehydu* R, 10  $\mu$ l *cinnamyl-acetátu* R, 10  $\mu$ l *eugenolu* R, 10  $\mu$ l *trans-2-methoxycinnamaldehydu* R a 20 mg *kumarinu* R se rozpustí v 1 ml *acetonu* R.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 60 m; vnitřní průměr 0,25 mm;

– *stacionární fáze:* vázaný makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–75	60 → 190
	75–160	190
náštíkový prostor detektor		200
		240

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

Nástřík, 0,2  $\mu$ l.

**Eluční pořadí.** Jednotlivé látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. V závislosti na podmínkách chromatografické analýzy a stavu kolony se může kumarin eluovat před nebo za *trans*-2-methoxycinnamaldehydem. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem *trans*-2-methoxycinnamaldehydu a píkem kumarinu.

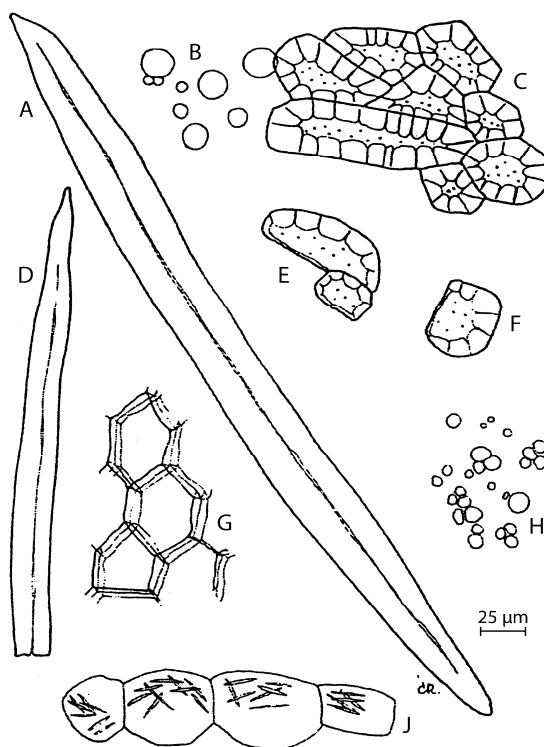
**Identifikace složek.** Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky, které jsou přítomny ve zkoušeném roztoku.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

- *trans*-cinnamaldehyd: 70 % až 90 %;
- cinnamyl-acetát: 1,0 % až 6,0 %;
- eugenol: nejvýše 0,5 %;
- *trans*-2-methoxycinnamaldehyd: 3,0 % až 15 %;
- kumarin: 1,5 % až 4,0 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněna před teplem.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškované skořicovníkové kůry

## CINNAMOMI CORTEX

7.1:0387

### Skořicovníková kůra

#### DEFINICE

Je to usušená kůra mladých větví druhu *Cinnamomum verum* J. S. PRESL zbavená zevní vrstvy korku a parenchymu kůry.

**Obsah silice.** Nejméně 12 ml/kg drogy.

#### VLASTNOSTI

Droga charakteristického, aromatického pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kůra je asi 0,2 mm až 0,8 mm silná, po více kusech stočená do jednoduchých nebo dvojitých rourek. Svrchní strana je hladká, žlutohnědá s nevýraznými jizvami po listech a postranních pupenech, s jemným bělavým podélným rýhovaním. Vnitřní strana je poněkud tmavší, podélně rýhovaná. Lom je krátký, vláknitý.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je nažloutlý nebo červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): okrouhlé sklereidy s tečkovanými, žlábkovitými a mírně ztlustlými stěnami, jednoduché [E, F] nebo ve skupinách [C]; četná bezbarvá jednoduchá vlákna, často celá [A], nebo úlomky [D], s úzkým lumenem a se ztlustlými, zdřevnatělými, řídké tečkovanými stěnami; malé jehličkovité krystaly kalcium-oxalátu v parenchymatických buňkách [J]; velmi četné olejovité kapky [B]. Úlomky korku [G] chybějí nebo jsou patrně jen velmi zřídka. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). V práškové droze jsou patrná četná škrobová zrna [H].

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,1 g práškované drogy (500) (2.9.12) se protřepává 15 min se 2 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří na vodní lázni téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,4 ml *toluenu R*.

**Porovnávací roztok.** 50  $\mu$ l *cinnamaldehydu R* a 10  $\mu$ l *eugenolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu *GF<sub>254</sub> pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** *Dichlormethan R*.

**Nanášení.** 10  $\mu$ l, do proužků (20 mm  $\times$  3 mm).

**Vývjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrny zhášející fluorescenci se označí, potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm a fluoreskující skvrny se označí.

**Hodnocení A.** V ultrafialovém světle při 254 nm je na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku ve střední části zhášející skvrna cinnamaldehydu, těsně nad ní méně intenzivní zhášející skvrna eugenolu.

V ultrafialovém světle při 365 nm je na chromatogramu zkoušeného roztoku světle modře fluoreskující skvrna *o*-methoxycinnamaldehydu a těsně pod ní skvrna odpovídající cinnamaldehydu.

**Detekce B.** Vrstva se postříká *floroglucinolem RS*.

**Hodnocení B.** Skvrna odpovídající cinnamaldehydu je žlutohnědá, skvrna *o*-methoxycinnamaldehydu je fialová.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 500ml baňce za použití 20,0 g drogy upráškované (710) (2.9.12) těsně před použitím a 200 ml *kyseliny chlorovodíkové* 0,1 mol/l RS jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R* a destiluje se nejméně 3 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min.

## CINNAMOMI CORTICIS TINCTURA

6.0:1819

## Tinktura ze skořicovníkové kůry

## DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Cinnamomi cortex* (0387).

## VÝROBA

Připravuje se vhodným postupem z 1 dílu drogy a 5 dílů roztoku ethanolu 70% (V/V).

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá hnědočervená tekutina, charakteristického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 10 ml zkoušené tinktury, 10 ml *chloridu sodného nasyceného RS* a 5 ml *toluenu R* se ve zkumavce se zabroušenou zátkou protřepává 2 min a 10 min se odstřeďuje. Použije se organická vrstva.

*Porovnávací roztok.* 5 µl *eugenolu R*, 25 µl *trans-cinnamaldehydu R* a 5 µl *trans-2-methoxycinnamaldehydu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* *Dichlormethan R*.

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
<i>trans-2-methoxycinnamaldehyd:</i> světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna ( <i>trans-2-methoxycinnamaldehyd</i> )
	nazelenale fluoreskující skvrna (nad startem)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu bezvodém R*. Pozoruje se v den-

ním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	modrá skvrna (terpenické uhlovodíky)
<i>eugenol:</i> modrá skvrna <i>trans-cinnamaldehyd:</i> modrá skvrna	modrá skvrna ( <i>eugenol</i> ) modrá skvrna ( <i>trans-cinnamaldehyd</i> )
<i>trans-2-methoxycinnamaldehyd:</i> oranžovohnědá skvrna (barva postupně bledne)	slabě oranžovohnědá skvrna ( <i>trans-2-methoxycinnamaldehyd</i> )
	dvě nebo tři modré skvrny nad startem
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 64 % (V/V) až 70 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 1,5 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené tinktury.

## CINNAMOMI ZEYLANICI CORTICIS ETHEROLEUM

7.1:1501

## Silice kůry skořicovníku cejlonského

*Synonymum.* *Cinnamomi zeylanici corticis aetheroleum*

## DEFINICE

Je to silice získaná z kůry mladých větví druhu *Cinnamomum zeylanicum* NEES (*Cinnamomum verum* J. S. PRESL) destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá pohyblivá světle žlutá časem červenající kapalina, charakteristického pachu připomínajícího *cinnamaldehyd*.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 50 µl *trans-cinnamaldehydu R*, 10 µl *eugenolu R*, 10 µl *linalolu R* a 10 µl *β-karyofy-*



lenu R se rozpustí v *ethanolu 96 % R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (10 + 90).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Safrol, kumarin a cineol mohou na chromatogramu zkoušeného roztoku chybět.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Relativní hustota** (2.2.5). 1,000 až 1,030.

**Index lomu** (2.2.6). 1,572 až 1,591.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-2^\circ$  až  $+1^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *cineolu R*, 10 µl *linalolu R*, 10 µl *β-karyofylenu R*, 10 µl *safrolu R*, 100 µl *trans-cinnamaldehydu R*, 10 µl *eugenolu R*, 20 mg *kumarinu R*, 10 µl *trans-2-methoxycinnamaldehydu R* a 10 µl *benzyl-benzoátu R* se rozpustí v 1 ml *acetonu R*.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;

– *stacionární fáze:* vázaný makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–75	60 → 190
	75–200	190
nástřikový prostor		200
detektor		240

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Jednotlivé látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. V závislosti na podmínkách chromatografické analýzy a stavu kolony se může kumarin eluovat před nebo za *trans-2-methoxycinnamaldehydem*. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem linalolu a píkem  $\beta$ -karyofylenu.

*Identifikace složek.* Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah jednotlivých složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

– *cineol:* nejvýše 3,0 %;

– *linalol:* 1,0 % až 6,0 %;

– *β-karyofylen:* 1,0 % až 4,0 %;

– *safrol:* nejvýše 0,5 %;

– *trans-cinnaldehyd:* 55 % až 75 %;

– *eugenol:* nejvýše 7,5 %;

– *kumarin:* nejvýše 0,5 %;

– *trans-2-methoxycinnamaldehyd:* 0,1 % až 1,0 %;

– *benzyl-benzoát:* nejvýše 1,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněna před teplem.

**CINNAMOMI ZEYLANICI FOLII  
ETHEREOLEUM**

**7.0:1608**

Silice listu skořicovníku cejlonského

*Synonymum.* Cinnamomi zeylanici folii aetheroleum

**DEFINICE**

Je to silice získaná z listů druhu *Cinnamomum zeylanicum* NEES (*Cinnamomum verum* J. S. PRESL) destilací s vodní parou.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirá pohyblivá červenohnědá nebo tmavohnědá kapalina, charakteristického pachy připomínajícího eugenol.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**1.:** B.

**2.:** A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* Asi 50 µl *trans-cinnamaldehydu R*, 10 µl *eugenolu R*, 10 µl *linalolu R* a 10 µl *β-karyofylenu R* se rozpustí v *ethanolu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (10 + 90).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení.* Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna *trans-cinnamaldehydu* může být velmi slabá, nebo může zcela chybět.

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Píky *cineolu*, *safrolu*, *trans-cinnamaldehydu*, *cinnamyl-acetátu* a *kumarinu* mohou na chromatogramu zkoušeného roztoku chybět.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 1,030 až 1,059.

**Index lomu** (2.2.6). 1,527 až 1,540.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-2,5^\circ$  až  $+2,0^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 10  $\mu$ l *cineolu R*, 10  $\mu$ l *linalolu R*, 10  $\mu$ l  *$\beta$ -karyofylenu R*, 10  $\mu$ l *safrolu R*, 10  $\mu$ l *trans-cinnamaldehydu R*, 10  $\mu$ l *cinnamyl-acetátu*, 100  $\mu$ l *eugenolu R* a 10 mg *kumarinu R* se rozpustí v 1 ml *acetonu R*.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	45
	10–78	45 → 180
	78–88	180
nástříkový prostor		200
detektor		240

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřík.* 0,2  $\mu$ l.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem *linalolu* a píkem  $\beta$ -karyofylenu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezích:

- *cineol:* nejvýše 1,0 %;
- *linalol:* 1,5 % až 3,5 %;
- *$\beta$ -karyofylen:* 1,5 % až 7,0 %;
- *safrol:* nejvýše 3,0 %;
- *trans-cinnamaldehyd:* nejvýše 3,0 %;
- *cinnamyl-acetát:* nejvýše 2,0 %;
- *eugenol:* 70 % až 85 %;
- *kumarin:* nejvýše 1,0 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněna před teplem.

## CITRI ETHEROLEUM

6.0:0620

Citronová silice

*Synonymum.* *Limonis aetheroleum*

#### DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvého oplodí druhu *Citrus limon* (L.) BURM. fil. vhodným mechanickým postupem bez použití tepla.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá těkavá světle žlutá až zelenožlutá tekutina, charakteristického pachu.

Silice se může při nízkých teplotách zakalit.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se smíchá s 1 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *citroptenu R* a 50  $\mu$ l *citralu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (15 + 85).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

Horní okraj desky	
citral: zhášející skvrna	zhášející skvrna (bergamotin)
	zhášející skvrna (citral)
	tmavomodrá skvrna (5-geranyloxy-7-methoxykumarin)
citropten: světlá modře fluoreskující skvrna	světlá modře fluoreskující skvrna (citropten)
	zhášející skvrna (derivát psoralenu)
	zhášející skvrna (biakangelicin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
citral: zhášející skvrna	žlutě fluoreskující skvrna (bergamotin)
	zhášející skvrna (citral)
	jasná modře fluoreskující skvrna (5-geranyloxy-7-methoxykumarin)
citropten: jasná modře fluoreskující skvrna	jasná fialovomodře fluoreskující skvrna (citropten)
	žlutě fluoreskující skvrna (derivát psoralenu)
	oranžová skvrna (biakangelicin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Charakteristické píky na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časem odpovídajícím píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,850 až 0,858.

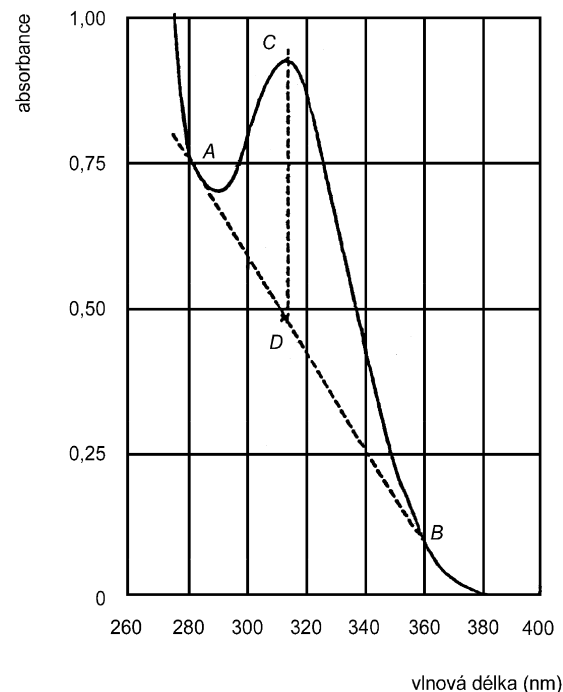
**Index lomu** (2.2.6). 1,473 až 1,476.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +57° až +70°; měří se úhel optické otáčivosti.

**Absorbance** (2.2.25). 0,250 g se rozpustí v *ethanolu* 96% R, zamíchá se a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 260 nm až 400 nm. Není-li k dispozici automatický přístroj, měří se absorbance v intervalech po 5 nm od vlnové délky 260 nm až do oblasti asi 12 nm před předpokládaným absorpčním maximem, následující tři měření se provedou v intervalech po 3 nm a do asi 5 nm za absorpčním maximem se použijí intervaly po 1 nm, do dosažení vlnové délky 400 nm se použijí intervaly po 10 nm.

Absorpční křivka se graficky znázorní tak, aby hodnoty absorbance byly uvedeny na ose y a hodnoty vlnové délky na ose x. Spojí se body A a B (viz obrázek 1). Absorpční maximum C je při (315 ± 3) nm. Z bodu C se vede kolmice na osu x, zjistí se průsečík D s úsečkou AB. Od absorbance C se odečte absorbance v bodu D.

Nalezená hodnota absorbance je 0,20 až 0,96 a nejméně 0,45 pro citronovou silici italského typu.



**Obr. 1** Typické spektrum citronové silice ke zkoušce Absorbance

**Mastné oleje a zpryskyřičnatěle silice** (2.8.7). Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatěle silice v silicích.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 20 µl β-pinenu R, 10 µl sabinenu R, 100 µl limonenu R, 10 µl γ-terpinenu R, 5 µl β-karyofylenu R, 20 µl citralu R, 5 µl α-terpineolu R, 5 µl neryl-acetátu R a 5 µl geranyl-acetátu R se rozpustí v 1 ml acetonu R.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 30 m (může se použít tloušťka filmu 1 µm) až 60 m (může se použít tloušťka filmu 0,2 µm), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

Teplota:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–6	45
	6–21	45 → 90
	21–39	90 → 180
	39–55	180
nástříkový prostor		220
detektor		220

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřík.** 0,5 µl porovnávacího roztoku, 0,2 µl zkoušeného roztoku.

**Eluční pořadí.** Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem β-pinenu a píkem sabinenu a nejméně 1,5 mezi píkem geranialu a píkem geranyl-acetátu.

Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Vypočítá se obsah těchto látek v procentech.

Obsah látek v procentech se pohybuje v následujících rozmezech:

- β-pinén: 7,0 % až 17,0 %;
- sabinén: 1,0 % až 3,0 %;
- limonén: 56,0 % až 78,0 %;
- γ-terpinén: 6,0 % až 12,0 %;
- β-karyofylen: nejvýše 0,5 %;
- neral: 0,3 % až 1,5 %;
- α-terpineol: nejvýše 0,6 %;
- neryl-acetát: 0,2 % až 0,9 %;
- geranial: 0,5 % až 2,3 %;
- geranyl-acetát: 0,1 % až 0,8 %.

**Zbytek po odpaření silic** (2.8.9). 1,8 % až 3,6 %; zahřívá se 4 h na vodní lázni.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem a při teplotě nepřevyšující 25 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné, zda látka obsahuje citronovou silici italského typu.

## CITRI RETICULATAE ETHEROLEUM

7.0:2355

### Mandarinková silice

*Synonymum.* Citri reticulatae aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z oplodí kůry čerstvého plodu druhu *Citrus reticulata* BLANCO vhodným mechanickým postupem bez použití tepla.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Nazelenalá, žlutá nebo červenooranžová kapalina vykazující modrou fluorescenci.

Má charakteristický pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

#### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,1 ml se zředí toluenem R na 1 ml.

**Porovnávací roztok.** 2 µl methyl-N-methylantranilátu R, 4 mg guajazulenu R a 10 mg α-terpineolu R se rozpustí v 10 ml toluenu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (15 + 85).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 2 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení A.** Intenzivní modře fluoreskující skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a fluorescencí skvrně methyl-N-methylantranilátu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

**Detekce B.** Vrstva se postříká roztokem kyseliny fosfomolybdenové R (200 g/l) v ethanolu 96% R a 10 min se zahřívá při 100 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
guajazulen: modrá skvrna	modrá skvrna
	modrá skvrna
	modrá skvrna
α-terpineol: modrá skvrna	modrá skvrna
	modrá skvrna (α-terpineol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Retenční čas charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času charakteristických píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,848 až 0,855.

**Index lomu** (2.2.6). 1,474 až 1,478.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +64° až +75°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatěle silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,20 g se zředí *heptanem R* na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5 µl *α-pinen* *R*, 5 µl *sabinenu R*, 5 µl *β-pinen* *R*, 5 µl *β-myrcenu R*, 5 µl *p-cymenu R*, 70 µl *limonenu R*, 20 µl *γ-terpinenu R* a 5 µl *methyl-N-methyl-anthranilátu R* se zředí *heptanem R* na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl *limonenu R* se rozpustí v 50 ml *heptanu R*. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *heptanem R* na 5,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* poly(difenyldimethylsiloxan *R* (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii *R*.

*Průtoková rychlost.* 1,4 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 70.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–90	50 → 230
nástřikový prostor		250
detektor		250

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1 µl.

*Eluční pořadí.* Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a); zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem *sabinenu* a píkem *β-pinen* a nejméně 1,5 mezi píkem *p-cymenu* a píkem *limonenu*.

*Identifikace složek.* Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Nepřihlíží se k píku *heptanu*.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

- *α-pinen:* 1,6 % až 3,0 %;
- *sabinen:* nejvýše 0,3 %;
- *β-pinen:* 1,2 % až 2,0 %;
- *β-myrcen:* 1,5 % až 2,0 %;
- *p-cymen:* nejvýše 1,0 %;
- *limonen:* 65,0 % až 75,0 %;
- *γ-terpinen:* 16,0 % až 22,0 %;
- *methyl-N-methylanthranilát:* 0,30 % až 0,60 %;
- *limit zanedbatelnosti:* plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

**Zbytek po odpaření silic** (2.8.9). 1,6 % až 4,0 %; stanoví se po zahřívání 4 h na vodní lázni.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## CITRONELLAE ETHEROLEUM

7.0:1609

Citronelová silice

*Synonymum.* Citronellae aetheroleum

**DEFINICE**

Je to silice z čerstvé nebo částečně usušené nadzemní části druhu *Cymbopogon winterianus* JOWITT získaná destilací s vodní parou.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Světle žlutá nebo hnědožlutá kapalina.

Velmi silně páchne po citronellalu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se rozpustí v 10,0 ml *ethanolu 96% R*.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *citronellalu R* se rozpustí v 10,0 ml *ethanolu 96% R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (10 + 90).

*Nanášení.* 5 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny i další skvrny.

Horní okraj desky	
citronellal: fialová skvrna	skvrna odpovídající zbarvením skvrně citronellalu oranžová skvrna (citronellol-geraniol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Charakteristické píky na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časem píkům na chromatogramu porovnávacího roztoku. Neral a geraniol nemusí být na chromatogramu zkoušeného roztoku přítomny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,881 až 0,895.

**Index lomu** (2.2.6). 1,463 až 1,475.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-4^{\circ}$  až  $+1,5^{\circ}$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 25  $\mu$ l limonenu R, 100  $\mu$ l citronellalu R, 25  $\mu$ l citronellyl-acetátu R, 25  $\mu$ l citralu R, 25  $\mu$ l geranyl-acetátu R, 25  $\mu$ l citronellolu R a 100  $\mu$ l geraniolu R se rozpustí v 5 ml hexanu R.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (0,2  $\mu$ m).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–2	80
	2–26	80 → 150
	26–42	150 → 185
	42–49	185 → 250
nástřikový prostor		260
detektor		260

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1  $\mu$ l, porovnávací roztok; 0,2  $\mu$ l, zkoušený roztok.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 1,2 mezi píky geranyl-acetátu a citronellolu.

Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky porovnávacího roztoku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících mezích:

- *limonen:* 1,0 % až 5,0 %;
- *citronellal:* 30,0 % až 45,0 %;
- *citronellyl-acetát:* 2,0 % až 4,0 %;
- *neral:* nejvýše 2,0 %;
- *geranial:* nejvýše 2,0 %;
- *geranyl-acetát:* 3,0 % až 8,0 %;
- *citronellol:* 9,0 % až 15,0 %;
- *geraniol:* 20,0 % až 25,0 %.

## COLAE SEMEN

6.0:1504

## Kolové semeno

## DEFINICE

Je to celé nebo lámané usušené semeno druhu *Cola nitida* (VENT.) SCHOTT et ENDL. (*C. vera* K. SCHUM.) a jeho odrůd nebo druhu *Cola acuminata* (P. BEAUV.) SCHOTT et ENDL. (*Sterculia acuminata* P. BEAUV.), zbavené osemení.

*Obsah.* Nejméně 1,5 % kofeinu ( $M_r$  194,2), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Semeno je oválné, poněkud zaokrouhleně čtyřhranné s deformacemi způsobenými vzájemným otlakem uvnitř plodu; je různé velikosti a hmotnosti, od 5 g do 15 g; zevní strana je tvrdá, hladká a silně tmavohnědá, uvnitř červenohnědá. U druhu *C. nitida* a jeho odrůd tvoří semeno dvě většinou ploskovypuklé části odpovídající dělohám, v komerční droze se vyskytují obvykle odděleně; dělohy jsou 3 cm až 4 cm dlouhé, 2 cm až 2,5 cm široké a 1 cm až 2 cm silné. U druhu *C. acuminata* jsou dělohy menší, rozdělené do čtyř až šesti nepravidelných částí.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). Droga je charakteristická těmito znaky: četná vejčitá nebo ledvinovitá škrobová zrna velikosti 5  $\mu$ m až 25  $\mu$ m, se soustředným vrstvením a paprscitým, mírně mimo střed ležícím hilem; úlomky pletiv děloh s velkými ztlustlými načervenalými mnohohrannými buňkami, naplněnými škrobovými zrny; někdy úlomky osemení.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *ethanolu 60% (V/V) R*, protřepává se 30 min při 40 °C a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok (a).* 25 mg *kofeinu R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 60% (V/V) R*.

*Porovnávací roztok (b).* 50 mg *theobrominu R* se rozpustí v 10 ml mobilní fáze a zfiltruje se.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 13 + 77).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 5 min na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě hlavní skvrny zhářející fluorescenci, které odpovídají polohou skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

*Detekce B.* Vrstva se postříká směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *kyseliny chlorovodíkové R* a potom roztokem připraveným těsně před použitím roz-

puštěním 1 g *jodu R* a 1 g *jodidu draselného R* ve 100 ml *ethanolu 96% R*.

**Hodnocení B.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá červenohnědá hlavní skvrna polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 2,00 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,00 g (*m<sub>1</sub>*) práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 50 ml *methanolu R*, zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 10 ml *methanolu R*, zbytek se smíchá s 50 ml *methanolu R* a předchozí postup se opakuje. Spojené filtráty a promývací tekutiny se v 200ml odměrné baňce zředí *methanolem R* na 200,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se v baňce s kulatým dnem odpaří za sníženého tlaku do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v mobilní fázi, převede se do 50ml odměrné baňky a zředí se stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 30,0 mg (*m<sub>2</sub>*) *kofeinu CRL* a 15,0 mg *theobrominu R* se ve 100,0ml odměrné baňce rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 100,0ml odměrné baňky a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

#### Kolona:

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 μm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (25 + 75).

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 272 nm.

**Nástřik.** Vhodný objem každého roztoku, injektorovou smyčkou.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **rozlišení:** nejméně 2,5 mezi píkem *kofeinu* a píkem *theobrominu*; je-li třeba, upraví se objem *vody R* v mobilní fázi.

Obsah *kofeinu* se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 50}{m_1 \cdot A_2}$$

v němž značí:

- A<sub>1</sub>* – plochu píku *kofeinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A<sub>2</sub>* – plochu píku *kofeinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- m<sub>1</sub>* – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;
- m<sub>2</sub>* – hmotnost *kofeinu CRL* v porovnávacím roztoku v gramech.

## COLOPHONIUM

6.0:1862

### Kalafuna

#### DEFINICE

Je to zbytek zůstávající po destilaci silice z přírodní pryskyřice z různých druhů rodu *Pinus*.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Průsvitné, světle žluté až hnědožluté hranaté kousky nepravidelného tvaru, křehké, sklovité, různých velikostí, na povrchu lasturovitě.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 10 mg *thymolu R* a 10 mg *linalolu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
**Mobilní fáze.** *Dichlormethan R*.

**Nanášení.** 10 μl, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, jinak zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
	červenofialová skvrna červenofialová skvrna
thymol: oranžová skvrna	dvě červenofialové skvrny
linalol: červenofialová skvrna	řada úzkých červenofialových skvrn červenofialová skvrna zasahující na start
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Číslo kyselosti** (2.5.1). 145 až 180; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 0,2 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Nepráškuje se.

## CORIANDRI ETHEROLEUM

6.0:1820

## Koriandrová silice

*Synonymum.* Coriandri aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z plodů druhu *Coriandrum sativum* L. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo slabě žlutá tekutina charakteristického kořenitého pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

## A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 10 µl se rozpustí v 1,0 ml toluenu R.

*Porovnávací roztok.* 10 µl linalolu R a 2 µl geranyl-acetátu R se rozpustí v 1,0 ml toluenu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze přesahující 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 10 min až 15 min při 100 °C až 105 °C; ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
geranyl-acetát: fialovomodrá skvrna	fialovomodrá skvrna (geranyl-acetát)
linalol: intenzivní fialová skvrna	intenzivní fialová skvrna (linalol) fialovomodrá skvrna (geraniol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,860 až 0,880.

**Index lomu** (2.2.6). 1,462 až 1,470.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +7° až +13°, měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 3,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28) metodou normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok (a).* 10 µl α-pinenu R, 10 µl limonenu R, 10 µl γ-terpinenu R, 10 µl p-cymenu R, 10 mg kafuru R, 20 µl linalolu R, 10 µl α-terpineolu R, 10 µl geranyl-acetátu R a 10 µl geraniolu R se rozpustí v 1 ml hexanu R.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl geraniolu R se rozpustí v hexanu R a zředí se jím na 10 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 65.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–75	60 → 190
	75–120	190
nástřikový prostor		220
detektor		240

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

*Pořadí eluce.* Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem linalolu a píkem kafuru.
- Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky porovnávacího roztoku (a) na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Z chromatogramu zkoušeného roztoku se vypočítají obsahy těchto látek v procentech, které se pohybují v mezích:

- α-pinen: 3,0 % až 7,0 %;
- limonen: 1,5 % až 5,0 %;
- γ-terpinen: 1,5 % až 8,0 %;
- p-cymen: 0,5 % až 4,0 %;
- kafr: 3,0 % až 6,0 %;
- linalol: 65,0 % až 78,0 %;
- α-terpineol: 0,1 % až 1,5 %;
- geranyl-acetát: 0,5 % až 4,0 %;
- geraniol: 0,5 % až 3,0 %;
- *limit zanedbatelnosti:* plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**Chirální čistota.** Plynová chromatografie (2.2.28).

*Zkoušený roztok.* 0,02 g se rozpustí v pentanu R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 µl linalolu R a 5 mg borneolu R se rozpustí v pentanu R a zředí se jím na 10 ml.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



**Kolona:**

- materiál: tavený křemen;
- rozměry: délka 25 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- stacionární fáze:  $\beta$ -cyklodextrin pro chirální chromatografii modifikovaný R (tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m).

Nosný plyn. Helium pro chromatografii R.

Průtoková rychlost. 1,3 ml/min.

Dělicí poměr. 1 : 30.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–65	50 → 180
nástřikový prostor		230
detektor		230

Detekce. Plamenionizační detektor.

Nástřik. 1  $\mu$ l.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

- rozlišení: nejméně 5,5 mezi píkem (R)-linalolu (první pík) a píkem (S)-linalolu (druhý pík) a nejméně 2,9 mezi píkem (S)-linalolu a píkem borneolu (třetí pík).

Limity. Procentuální obsah (R)-linalolu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_R}{A_S + A_R} \cdot 100,$$

v němž značí:

$A_S$  – plochu píku odpovídajícího (S)-linalolu;

$A_R$  – plochu píku odpovídajícího (R)-linalolu;

- (R)-linalol: nejvýše 14 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem při teplotě nepřevyšující 25 °C.

**CORIANDRI FRUCTUS**

7.5:1304

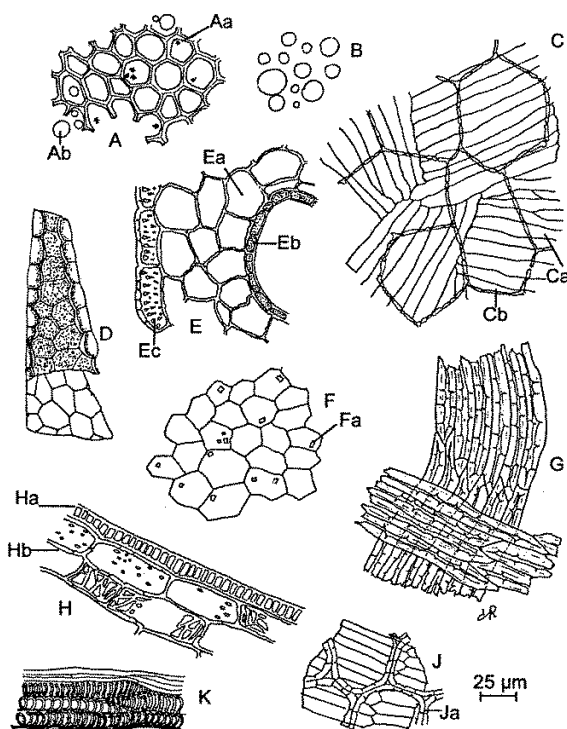
**Koriandrový plod****DEFINICE**

Je to usušená dvounažka druhu *Coriandrum sativum* L.

Obsah silice. Nejméně 3 ml/kg drogy, počítáno na vysušenou drogu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Plod je hnědý nebo světle hnědý, více či méně kulovitý o průměru asi 1,5 mm až 5 mm, nebo vejčitý 2 mm až 6 mm dlouhý. Je to celá dvounažka; nažky jsou obvykle spolu těsně spojeny. Plod je na povrchu lysý, s deseti zvláště výraznými málo výraznými hlavními žebry a osmi pří-  
mými více výraznými vedlejšími žebry. Nažky jsou na vnitřní straně vyduté. Na vrcholu plodu je stylopodium. Někdy nesou malý úlomek plodní stopky.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového koriandrového plodu

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné kapky oleje [B]; úlomky endospermu [A] tvořené malými ztlustlými pravidelnými buňkami, obsahujícími malé drúzy [Aa], mikrokrytaly kalcium-oxalátu a olejové kapky [Ab]; úlomky endokarpu v plošném pohledu [C, J] nebo v příčném řezu [H], tvořené velmi úzkými parketovitě uspořádanými buňkami [Ca, Ha], které jsou obvykle provázány vrstvou tenkostěnných [Cb, Hb] nebo tlustostěnných [Ja] obdélníkovitých sklereid mezokarpu; úlomky sklerenchymatické vrstvy mezokarpu [G] tvořené spleť příčně a kolmo položených, krátkých, silně ztlustlých, tečkovaných, vláknitých buněk; úlomky parenchymu mezokarpu v příčném řezu [E] s malými buňkami s lehce ztlustlými stěnami [Ea], zbytky sekrečních kanálků [Eb] a sklereidy [Ec]; úlomky epikarpu v plošném pohledu [F] s tenkostěnnými mnohohrannými buňkami, z nichž některé obsahují malé hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Fa]; vzácně zbytky sekrečních kanálků s hnědými buňkami v plošném pohledu [D]; zřídka úlomky cévních svazků [K].

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g čerstvě práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml hexanu R, protřepává se 2 min až 3 min a zfiltruje se přes 2 g síranu sodného bezvodého R.

*Porovnávací roztok.* 15  $\mu$ l linalolu R a 25  $\mu$ l oleje olivového R se těsně před použitím rozpustí v 5 ml hexanu R. *Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R. *Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

**Nanášení.** 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Dvakrát po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS* a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

**Hodnocení:** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová nebo šedofialová skvrna (linalol), v horní polovině modrofialová skvrna (triacylglyceroly). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny, které odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; mezi startem a skvrnou odpovídající polohou linalolu jsou fialovošedé nebo nahnědlé skvrny, z nichž jedna je geraniol, a v poloze mezi skvrnami odpovídajícími polohou linalolu a triacylglycerolům mohou být slabě fialovošedé skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Vyhovuje požadavkům zkoušky. Nažky nenesou stopy po napadení hmyzem.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %. 1,000 g práškováné rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 8,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 30,0 g rostlinné drogy hrubě upráškováné těsně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s kulatým dnem s 200 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R*.

## CRATAEGI FOLII CUM FLORE EXTRACTUM FLUIDUM QUANTIFICATUM

6.0:1864

Extrakt z hlohového listu s květem tekutý  
kvantifikovaný

## DEFINICE

Je to tekutý extrakt připravený z drogy *Crataegi folii cum flore (1432)* se stanoveným obsahem flavonoidů.

**Obsah.** 0,8 % až 3,0 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; M<sub>r</sub> 464,4).

## VÝROBA

Extrakt se vyrábí z rostlinné drogy a ethanolu 30% (V/V) až 70% (V/V) vhodným postupem.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkvrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g se rozpustí v *methanolu R*, zředí se jím na 5 ml, protřepe se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethyl-aminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, deska se asi 30 min suší na vzduchu a potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutooranžově fluoreskující skvrna	žlutozeleně fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	žlutooranžově fluoreskující skvrna (hyperosid)
	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
	žlutozeleně fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol (2.9.10).** 95 % (V/V) až 105 % (V/V) hodnoty uvedené v označení na obalu.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** Asi 0,400 g se přesně zváží, rozpustí se v *ethanolu 60% (V/V) R* a zředí se jím na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se pomocí 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) převede do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky, přidá se 10,0 ml roztoku, obsahujícího *kyselinu boritou R* (25,0 g/l) a *kyselinu šťavelovou R* (20,0 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se pomocí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) převede do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml

směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky, přidá se 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm.

Celkový obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,235}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 410 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 405.

## CRATAEGI FOLII CUM FLORE EXTRACTUM SICCCUM

6.6:1865

Extrakt z hlohového listu s květem suchý

### DEFINICE

Připravuje se z drogy *Crataegi folium cum flore* (1432).

*Obsah*, počítáno na vysušený extrakt:

– vodné extrakty: nejméně 2,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4);

– vodně-ethanolové extrakty: nejméně 6,0 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4).

### VÝROBA

Extrakty se vyrábějí z rostlinné drogy vhodným postupem; použije se buď voda, nebo vodně-ethanolový roztok odpovídající nejméně 45% (V/V) ethanolu.

### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Světle hnědý nebo zelenohnědý prášek.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,2 g se suspenduje ve 20 ml *ethanolu 70% (V/V) R* a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok*. 1 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení*. 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm.

*Sušení*. Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce*. Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylyboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutooranžově fluoreskující skvrna	světle žlutě fluoreskující skvrna žlutooranžově fluoreskující skvrna (hyperosid)
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) žlutozeleně fluoreskující skvrna (vitexin 2"-rhamnosid)
rutin: žlutooranžově fluoreskující skvrna	žlutooranžově fluoreskující skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.2.32). Nejvýše 6,0 %; 0,500 g zkoušeného extraktu se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

### STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok*. 0,100 g zkoušeného extraktu se rozpustí v *ethanolu 60% (V/V) R* a zředí se jím na 100,0 ml.

*Zkoušený roztok*. 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha.

Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže 25ml odměrné baňky, přidá se 10,0 ml roztoku obsahujícího *kyselinu boritou R* (25,0 g/l) a *kyselinu šťavelovou R* (20,0 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

*Kontrolní roztok*. 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže 25ml odměrné baňky, přidá se 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml. Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Celkový obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,235}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 410 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech.

Specifická absorbance pro hyperosid má hodnotu 405.

## CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE

6.6:1432

## Hlohový list s květem

## DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky větvi druhu *Crataegus monogyna* JACQ. (LINDM.), *C. laevigata* (POIR.) D.C. (synonyma: *C. oxyacanthoides* THUILL., *C. oxyacantha* auct.) nebo jejich kříženců, nebo řidčeji jiných evropských druhů rodu *Crataegus*, včetně *C. pentagyna* WALDST. et KIT ex WILLD., *C. nigra* WALDST. et KIT. a *C. azarolus* L.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Tmavě hnědé, zdřevnatělé větvičky o průměru 1 mm až 2,5 mm nesou střídavě řapíkaté listy s malými často opadavými palisty a četnými malými bílými květy uspořádanými ve svazcích. Listy jsou laločnaté až peřenodílné, vroubkovaně zubaté nebo téměř celokrajné. *C. laevigata* – list třílaločný, pětílaločný nebo sedmilaločný, tupě nebo vroubkovaně zubatý, úkrojky listu tupé. *C. monogyna* – list peřenodílný se třemi nebo pěti zašpičatělými úkrojky. Listy jsou na svrchní straně tmavě zelené nebo hnědozelené, na spodní straně světlejší, šedo-zelené, s dobře patrnou hustou síťovitou žilnatinou. Listy druhů *C. laevigata*, *C. monogyna* a *C. pentagyna* jsou lysé nebo jen s ojedinělými chlupy, druhy *C. azarolus* a *C. nigra* jsou plstnatě chlupaté. Květy jsou pětičetné, kalich je přirostlý k hnědozelené češuli, kališní cípy jsou volné, nazpět ohnuté. Korunní lístky jsou žlutobílé nebo nahnědlé, volné, okrouhlé nebo široce vejčité, krátce nehetnaté. Tyčinky jsou četné, semeník je spodní, z jednoho až pěti plodolistů, každý plodolist s dlouhou čnělkou uzavírá jedno vajíčko. *C. monogyna* je jednosemenný, *C. laevigata* je dvousemenný nebo třísemenný, *C. azarolus* je dvousemenný nebo třísemenný nebo někdy jen jednosemenný, *C. pentagyna* je pětisemenný, nebo řidčeji čtyřsemenný.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: jednobuněčné krycí chlupy obvykle se ztlustlými stěnami a širokým lumenem, téměř přímé nebo mírně ohnuté, na bázi tečkované; úlomky pokožky listů s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými nebo mnohohrannými a s velkými anomocytickými průduchy (2.8.3), které jsou obklopeny čtyřmi až sedmi sousedními buňkami; parenchymatické buňky mezofylu obsahují drúzy šťavelanu vápenatého o průměru obvykle 10 μm až 20 μm, průvodní vlákna provázející cévy obsahují malé skupinky hranolovitých krystalů šťavelanu vápenatého; úlomky korunních lístků s pokožkou z buněk okrouhlých, mnohohranných, silně papilózních, se ztlustlými stěnami a s kutikulou se zřetelným vlnitým vrášením; úlomky tyčinek s buňkami endothecia pravidelně obloukovitě ztlustlými; úlomky větviček s kolenchymatickými buňkami, tečkovanými cévami a skupinami zdřevnatělých sklerenchymatických

vláken s úzkým lumenem; četná kulovitá až oválná nebo trojhranná pylová zrna o průměru až 45 μm, se třemi klíčovými póry a nevýrazně zrnitou exinou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a 5 min se zahřívá pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 65 °C; ochladí se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2,5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. **Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*. **Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 20 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě teplá deska se postříká roztokem *bifenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. *Nechá se sušit* asi 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutooranžově fluoreskující skvrna	žlutozeleně fluoreskující skvrna (vitexin)
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	žlutooranžově fluoreskující skvrna (hyperosid)
	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
	žlutozeleně fluoreskující skvrna (vitexin-2"-rhamnosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 8 % zdřevnatělých větviček o průměru více než 2,5 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,400 g práškované drogy (250) (2.9.12) se ve 200ml baňce smíchá se 40 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 200ml baňce, přidá se 40 ml *ethanolu 60%*

(V/V) R a znovu se zahřívá 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Nechá se ochladit a zfiltruje se do téže 100ml odměrné baňky. 200ml baňka i filtr se promyjí *ethanolem 60% (V/V) R* a promývací tekutina se přidá do 100ml odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí *ethanolem 60% (V/V) R* na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže 25ml odměrné baňky, přidá se 10,0 ml roztoku, který obsahuje *kyselinu boritou R* (25,0 g/l) a *kyselinu šťavelovou R* (20,0 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové bezvodé R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže 25ml odměrné baňky, přidá se 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml. Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Celkový obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,235}{m},$$

v němž značí:

A – absorbanci při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance pro hyperosid má hodnotu 405.

## CRATAEGI FRUCTUS

6.0:1220

### Hlohový plod

#### DEFINICE

Je to usušený nepravý plod (malvice) druhu *Crataegus monogyna* JACQ. (LINDM.) nebo *Crataegus laevigata* (POIR.) D. C. (*Crataegus oxyacantha* L.) nebo jejich kříženců nebo směs plodů výše uvedených druhů.

**Obsah.** Nejméně 1,0 % prokyanidinů, vyjádřeno jako kyanidin-chlorid (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>6</sub>; M<sub>r</sub> 322,7), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga sladké slizovité chuti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** *Crataegus monogyna* – malvice je vejčitá nebo kulovitá, obvykle 6 mm až 10 mm dlouhá a 4 mm až 8 mm širo-

ká, červenohnědá nebo tmavě červená, na povrchu jamkovitá nebo řidčeji síťkovaná. Nahoře je ukončena pěti vytrvalými nazpět ohnutými kališními ušty, obklopujícími malý vpadlý terč s nevýrazně vystouplým okrajem. Uprostřed terče je blizna s chomáčkem tuhých bezbarvých chlupů na bázi. Dole je malvice protažena v krátkou stopku, nebo častěji je naspodu patrná malá světlá okrouhlá jizva po odlomené stopce. Receptakulum je masité a uzavírá žlutohnědý vejčitý plod s tvrdým ztlustlým oplodím obsahujícím jedno protáhlé světle hnědé hladké lesklé semeno.

*Crataegus laevigata* – malvice je až 13 mm dlouhá, uvnitř se dvěma až třemi z boku zploštělými plody s tvrdým ztlustlým oplodím, na vrcholu s krátkými chlupy. Uprostřed terče na vrcholu plodu jsou často patrné dvě blizny.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: dlouhé jednobuněčné krycí chlupy na konci zúžené a často zakřivené, na povrchu hladké, se silně ztlustlými a zdřevnatělými stěnami ze středu terče; úlomky parenchymatického receptakula, zevní vrstva buněk obsahuje červeně zbarvenou hmotu, některé buňky vnitřní vrstvy obsahují malé drůzy šťavelanu vápenatého; příležitostně i úlomky skupin sklereid a cévních svazků s průvodními vlákny; úlomky oplodí obsahující velké ztlustlé sklereidy s četnými tečkami, některé sklereidy jsou výrazně větvené; řidčeji úlomky osemení s pokožkou složenou ze šestihranných slizových buněk, pod nimi je vrstva buněk obsahujících žlutohnědé barvivo a četné protáhlé krystaly šťavelanu vápenatého; tenkostěnný parenchym endospermu a děloh obsahující aleuronová zrna a kapky oleje.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Nechá se ochladit na teplotu místnosti, zfiltruje se a filtrát se zředí *methanolem R* na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2 mg *kyseliny kávové R*, 5 mg *hyperosidu R* a 5 mg *rutinu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 30 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makroglu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se sušit asi 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině (v pořadí vzestupné hodnoty R<sub>F</sub>) žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin), světle modře

fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid), v horní třetině je světle modře fluoreskující skvrna (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (kyselina chlorogenová, hyperosid a kyselina kávová) a tři slabě načervenalé fluoreskující skvrny, z nichž jedna odpovídá polohou rutinou na chromatogramu porovnávacího roztoku a dvě další jsou nad skvrnou hyperosidu. Nad a pod skvrnou kyseliny kávové jsou další světle modré skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % znehodnocených plodů a nejvýše 2% ostatních cizích příměsí. Nejsou přítomny plody jiných druhů rodu *Crataegus* (*C. nigra* WALDST. et KIT., *C. pentagyna* WALDST. et KIT. ex WILLD. a *C. azarolus* L.), které jsou více než třísemenné.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

2,50 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 30 ml *ethanolu* 70% (V/V) R, vaří se 30 min pod zpětným chladičem a zfiltruje se. Zbytek se promyje 10,0 ml *ethanolu* 70% (V/V) R. Filtrát se smíchá s 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové* RS a 10,0 ml *vody* R a vaří se 80 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje a zbytek se promývá *ethanolem* 70% (V/V) R, dokud není filtrát bezbarvý. Potom se zředí *ethanolem* 70% (V/V) R na 250,0 ml. 50,0 ml tohoto roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem na asi 3 ml a převede se do dělicí nálevky. Baňka se postupně promyje 10 ml a 5 ml *vody* R a promývací tekutiny se převedou do dělicí nálevky. Protřepává se třikrát 15 ml *butan-1-olu* R. Spojené organické vrstvy se zředí *butan-1-olem* R na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (2.2.25) při 545 nm.

Obsah prokyanidinů v procentech, vyjádřený jako cyanidin-chlorid ( $C_{15}H_{11}ClO_6$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 500}{75 \cdot m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 545 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance kyanidin-chloridu má hodnotu 75.

## CURCUMAE XANTHORRHIZAE RHIZOMA

6.0:1441

Oddenek kurkumy žlutokořenné

#### DEFINICE

Je to usušený, na plátky nařezaný oddenek druhu *Curcuma xanthorrhiza* ROXB. (*C. xanthorrhiza* D. DIETRICH).

*Obsah*, počítáno na vysušenou drogu:

– *silice*: nejméně 50 ml/kg;

– *dicinnamoylmethanové deriváty*, vyjádřeno jako kurkumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ;  $M_r$  368,4): nejméně 1,0 %.

#### VLASTNOSTI

Droga má aromatický pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oranžovožluté nebo žlutohnědé či šedohnědé plátky, většinou oloupané, 1,5 mm až 6 mm silné, o průměru 15 mm až 50 mm, zřídka až 70 mm. Úlomky hnědošedého korku jsou přítomny jen zřídka. Droga je napříčným řezu žlutá, uprostřed světlejší s tmavými skvrnami. Lom je krátký, jemně zrnitý.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červeno-hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu* RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky bezbarvého parenchymu s oranžovožlutými nebo žlutohnědými sekrečními buňkami; úlomky síťovité ztlustlých a jiných cév; zřídka úlomky korku a pokožky a úlomky ztlustlých jednobuněčných zašpičatělých chlupů. Pozoruje se pod mikroskopem v *roztoku glycerolu* R 50% (V/V): jsou přítomna četná vrstevnatá, vejčitá až nepravidelná škrobová zrna, asi 30 μm až 50 μm dlouhá a asi 10 μm až 30 μm široká, s mimostředovým hilem a zřetelným koncentrickým vrstvením.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) popsaná ve zkoušce *Curcuma domestica* (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

*Detekce.* Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *dichlorchinonchlorimidu* R (0,4 g/l) v *propan-2-olu* R a vystaví se působení par amoniaku, dokud se skvrna thymolu nezbarví modrofialově.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je téměř uprostřed modrofialová skvrna (thymol) a v dolní části žlutá skvrna (fluorescein). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (xanthorrhizol) v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a dvě žlutohnědé nebo hnědé skvrny (kurkumin a demethoxykurkumin) v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami thymolu a fluoresceinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Curcuma domestica.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g čerstvě práškované drogy (500) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu* R, protřepává se 30 min a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *fluoresceinu* R a 10 mg *thymolu* R se rozpustí v 10 ml *methanolu* R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové* R a *toluenu* R (20 + 80).

*Nanášení.* 10 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové* R a *acetanhydridu* R (1 + 9) a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žlutočerveně fluoreskující skvrna (bisdemethoxykurkumin) v poloze odpovídající poloze těsně nad zelenomodře fluoreskující skvrnou fluoresceinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 120 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (500) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice.** Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 500ml baňce s 5,0 g čerstvě práškové drogy (500) (2.9.12) a 200 ml vody R jako destilační tekutiny, do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu R. Destiluje se 3 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

**Dicinnamoylmethanové deriváty.** 0,100 g práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá se 60 ml kyseliny octové ledové R a zahřívá se 60 min ve vodní lázni při 90 °C. Pak se přidají 2,0 g kyseliny borité R a 2,0 g kyseliny šťavelové R a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 90 °C. Po ochlazení se zředí kyselinou octovou ledovou R na 100,0 ml a protřepe se. 5,0 ml čiré supernatantní tekutiny se zředí kyselinou octovou ledovou R na 50,0 ml. Měří se absorpance (2.2.25) při 530 nm za použití kyseliny octové ledové R jako kontrolní tekutiny.

Obsah dicinnamoylmethanových derivátů v procentech, vyjádřeno jako kurkumin (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 0,426}{m}$$

v němž značí:

A – absorpance při 530 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorpance kurkuminu má hodnotu 2350.

## CYAMOPSISIDIS SEMINIS PULVIS

6.6:1218

### Guar

#### DEFINICE

Je to mletý endosperm semen druhu *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) TAUB. Obsahuje převážně guarový galaktomannan.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Bílý nebo téměř bílý prášek.

**Rozpustnost.** Rozpuštěním ve vodě se tvoří sliz o různé viskozitě, prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem v glycerolu R. Droga (125) (2.9.12) je tvořena hruškovitými až vejčitými buňkami, obvykle izolovanými, se silně ztlustlými stěnami, uprostřed s poněkud protáhlým lumenem a zrnitým obsahem a menšími mnohohrannými buňkami s tenčími stěnami, buňky jsou izolované nebo ve shlucích.

- B.** Ke 2 g se v kuželové baňce rychle přidá 45 ml vody R a 30 s se intenzivně promíchává. Po 5 min až 10 min se vytvoří lepkavý gel, který při obrácení baňky nevytéká.
- C.** Suspenze 0,1 g v 10 ml vody R se smíchá s 1 ml roztoku tetraboritanu sodného R (10 g/l); rychle se vytvoří gel.
- D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 10 mg se v silnostěnné odstředivaci zkumavce přidají 2 ml roztoku kyseliny trifluoroctové (100 g/l) a intenzivně se protřepává, aby se rozpustil vznikající gel, zkumavka se uzavře a směs se 1 h zahřívá při 120 °C. Hydrolyzát se odstředí, čirá supernatantní tekutina se opatrně převede do 50ml baňky, přidá se 10 ml vody R a odpaří se do sucha za sníženého tlaku. K získanému čirému filmu se přidá 0,1 ml vody R a 0,9 ml methanolu R. Odstředěním se oddělí amorfni sraženina. Supernatantní tekutina se zředí methanolem R na 1 ml, je-li to třeba.

**Porovnávací roztok.** 10 mg galaktosy R a 10 mg mannosy R se rozpustí ve 2 ml vody R a zředí se methanolem R na 20 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagehu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (15 + 85).

**Nanášení.** 5 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Detekce.** Postříká se zkoumadlem aminohippurovým R a suší se 5 min při 120 °C.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní části dvě zřetelně oddělené nahnědlé skvrny (v pořadí zvyšující se hodnoty R<sub>F</sub> odpovídají galaktose a mannose). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny odpovídající galaktose a mannose.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Tragant, slizy rostlin rodu Sterculia, agar, algináty, karagenan.** K malému množství zkoušené látky se přidá 0,2 ml čerstvě připravené červeně rutheniové RS. Buněčné stěny se při pozorování pod mikroskopem nebarví červeně.

**Bílkovina.** Nejvýše 8,0 %; provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou (2.5.9) za použití 0,170 g. Výsledek se násobí faktorem 6,25.

**Zjevná viskozita** (2.2.10). 85 % až 115 % viskozity uvedené v označení na obalu. 1,00 g vysušené látky se zvlhčí 2,5 ml propan-2-olu R a za míchání se zředí vodou R na 100,0 ml. Po 1 h se stanoví viskozita za použití rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 100 s<sup>-1</sup>.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 15,0 %. 1,000 g se 5 h suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 1,8 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>4</sup> CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>2</sup> CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede zjevná viskozita roztoku (10 g/l) v milipascalsekundách.

## FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Následující část poskytuje informace o těch charakteristikách látky, které se uznávají jako významné kontrolní parametry z hlediska jedné nebo více funkcí látky použité jako pomocná (viz obecnou stať 5.15). Tato část není povinnou částí článku a není nutné ověřovat tyto charakteristiky k prokázání shody. Jejich kontrolou se však může přispět k jakosti léčivých přípravků zlepšením shodnosti výrobního postupu a účinku přípravku při použití. Tam, kde se uvádějí kontrolní metody, jedná se o metody uznávané pro daný účel, ale mohou se použít i jiné metody. Kdekoliv se udávají výsledky jednotlivých charakteristik, musí se uvést použitá kontrolní metoda.

Následující charakteristiky mohou být významné pro guar použitý jako látka zvyšující viskozitu nebo pojivo.

**Zdánlivá viskozita.** Viz Zkoušky na čistotu.

## CYNARAE FOLII EXTRACTUM SICCCUM

6.6:2389

Extrakt z artyčokového listu suchý

## DEFINICE

Připravuje se z drogy *Cynarae folium* (1866).

*Obsah.* Nejméně 0,6 % kyseliny chlorogenové ( $C_{16}H_{18}O_9$ ;  $M_r$  354,3), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Extrakt se vyrábí z rostlinné drogy vhodným postupem za použití vody o teplotě nejméně 80 °C.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Světle hnědý nebo hnědý amorfni prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu* 60% (V/V) R, 5 min se nechá v ultrazvukové lázni a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *luteolin-7-glukosidu* R a 5 mg *kyseliny chlorogenové* R se rozpustí v 10 ml *methanolu* R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé* R, *kyseliny octové ledové* R, *vody* R a *ethyl-acetátu* R (11 + 11 + 27 + 100).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 13 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Deska se zahřívá 5 min při 100 °C a ještě teplá se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu* R (10 g/l) v *methanolu* R a pak roztokem *makrogolu 400* R (50 g/l)

v *methanolu* R. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí fluoreskujících skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	světle modře fluoreskující skvrna
luteolin-7-glukosid: žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna	žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna (luteolin-7-glukosid)
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.8.17). Nejvýše 6,0 %.

*Celkový popel* (2.4.16). Nejvýše 30,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů *methanolu* R a *vody* R (30 + 70).

*Zkoušený roztok.* 30,0 mg extraktu se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5,0 mg *kyseliny chlorogenové* CRL se rozpustí v 50,0 ml *methanolu* R. 5,0 ml tohoto roztoku se v odměrné baňce smíchá s 5 ml *methanolu* R a zředí se *vodou* R na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 30 mg extraktu z *artyčokového listu suchého standardizovaného* HRL se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 25,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel* pro chromatografii *oktadecylsilylovaný* R (5 µm);

– *teplota:* 40 °C.

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné* R a *vody* R (0,5 + 99,5);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné* R a *acetonitrilu* R (0,5 + 99,5).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	92	8
1–20	92 → 75	8 → 25
20–33	75	25
33–35	75 → 0	25 → 100

*Průtoková rychlost.* 1,2 ml/min.



Detekce. Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

Nástřik. 25 µl.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (b):

– poměr výšky píku *k* sedlu: nejméně 2,5, kde  $H_p$  je výška píku eluujícího se těsně po kyselině chlorogenové nad základní linií a  $H_s$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku kyseliny chlorogenové nad základní linií;

– získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s extraktem z artyčokového listu suchým standardizovaným HRL.

Obsah kyseliny chlorogenové ( $C_{16}H_{18}O_9$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,125}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v miligramech;

$m_2$  – hmotnost kyseliny chlorogenové CRL použité k přípravě porovnávacího roztoku (a) v miligramech;

$p$  – obsah kyseliny chlorogenové v procentech v kyselině chlorogenové CRL.

## CYNARAE FOLIUM

7.3:1866

### Artyčokový list

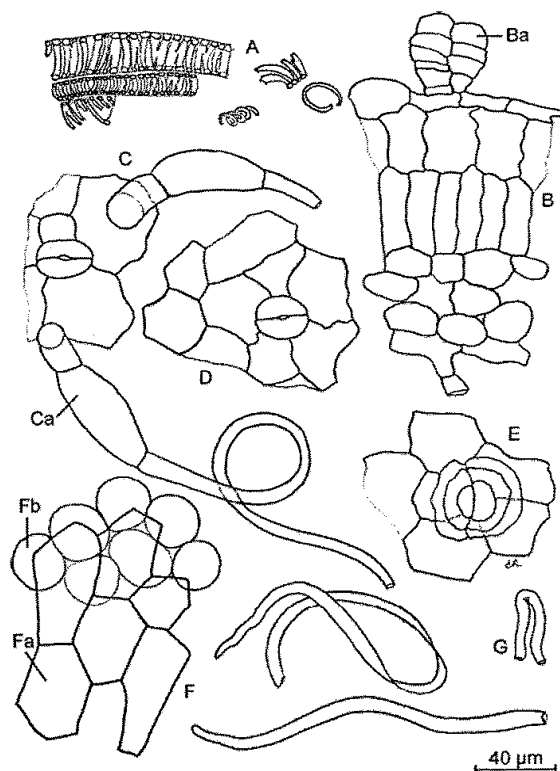
#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Cynara scolymus* L.

Obsah. Nejméně 0,8 % kyseliny chlorogenové ( $C_{16}H_{18}O_9$ ;  $M_r$  354,3), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** List je až 70 cm dlouhý a 30 cm široký. Čepel je přenoklaná, od vrcholu až těsně (1 cm až 2 cm) k řapíku jsou na obou stranách čepel velké hluboké úkrojky, v dolní části je list pilovitý; všechny úlomky čepel jsou na okraji zřetelně zubaté, na špičce pichlavé, bez ostnů. Čepel je na svrchní straně zelená s jemnými bělavými chlupy, spodní strana je světle zelená nebo bílá, plstnatě chlupatá s dlouhými zamotanými chlupy. Řapík a hlavní žilky jsou na svrchní straně ploché, na spodní straně zřetelně vyniklé, podélně rýhované, na obou stranách se zřetelnými chlupy.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového artyčokového listu

**B.** Droga se upráškuje (1000) (2.9.12). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky čepel listu v plošném pohledu; pokožka listu na svrchní straně [F] z buněk se stěnami rovnými nebo mírně zprohýbanými [Fa], provázená palisádovým parenchymem [Fb]; pokožka na spodní straně [C] z buněk se stěnami více zprohýbanými; četné anomocytické průduchy (2.8.3) na obou stranách listu [D], mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy tvořící zplstnatělou hmotu většinou v podobě úlomků [Ca] s krátkou několikabuněčnou nohou a velmi dlouhou, úzkou, často zprohýbanou koncovou buňkou, ostatní chlupy jsou tvořeny čtyřmi až šesti válcovitými buňkami; velmi zřídka žláznaté chlupy s krátkou nohou a jednořadou nebo dvouřadou hlavičkou v plošném pohledu [E] nebo v příčném řezu [Ba], četné úlomky krycích chlupů [G]; úlomky čepel listu v příčném řezu [B]; četné úlomky cévní tkáně z řapíku a žilek [A].

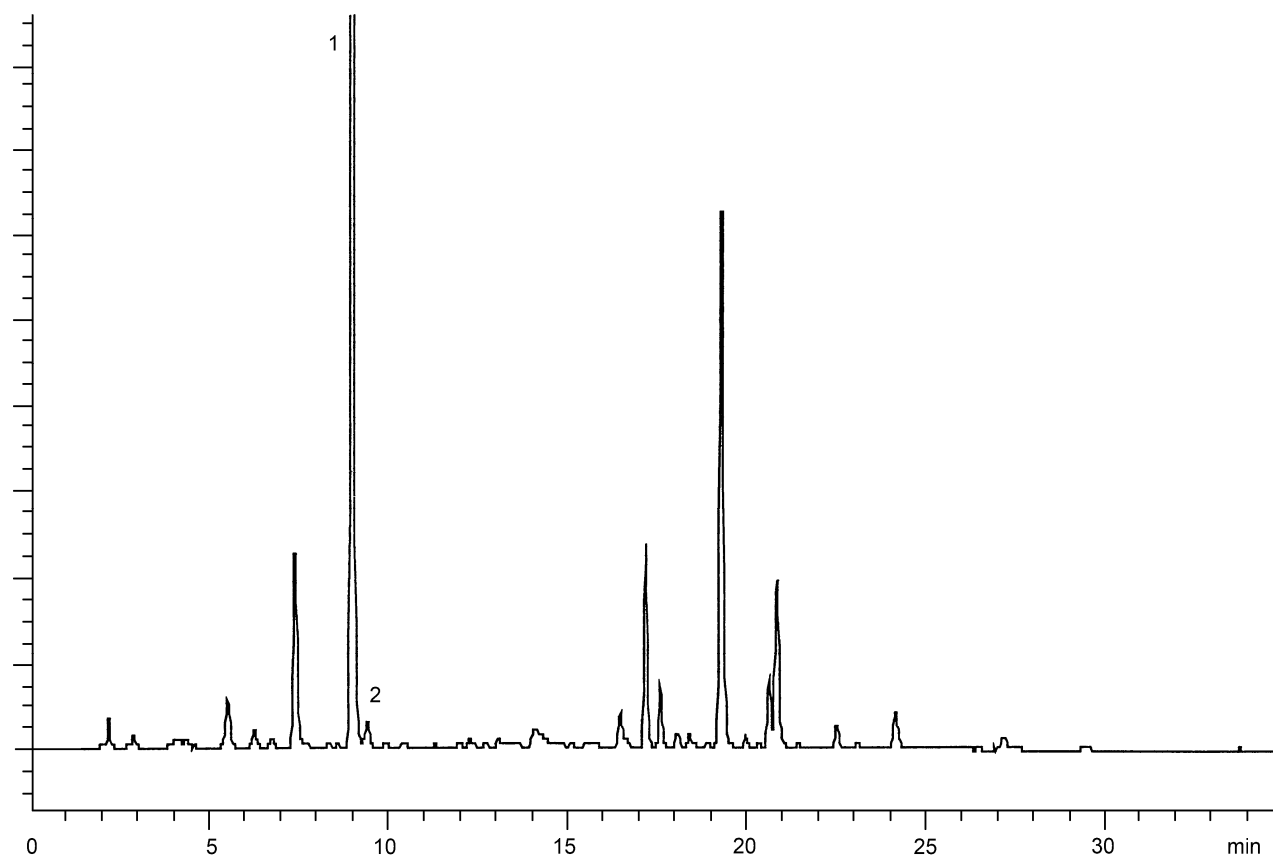
**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 2,0 g práškové rostlinné drogy (1000) (2.9.12) se smíchají se 20 ml ethanolu 60% (V/V) R. Nechá se stát 2 h za občasného promíchání a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg luteolin-7-glukosidu R a 5 mg kyseliny chlorogenové CRL se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové R, vody R a ethylacetátu R (11 + 11 + 27 + 100).



1 = kyselina chlorogenová

2 = neznámá látka

**Obr. 2** Chromatogram ke zkoušce Stanovení obsahu v artyčokovém listu: zkoušený roztok

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

**Nanášení.** 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 13 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Deska se zahřívá 5 min při 100 °C a ještě teplá se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	světle modře fluoreskující skvrna
luteolin-7-glukosid: žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna	žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna (luteolin-7-glukosid)
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 20,0 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,500 g práškované rostlinné drogy (1000) (2.9.12) se smíchá s 50,0 ml *methanolu R* a zahřívá se pod zpětným chladičem 1 h na vodní lázni při 70 °C. Odstředí se a supernatantní tekutina se převede do 200ml odměrné baňky. Postup se opakuje ještě jednou. Spojené supernatantní tekutiny se zředí *vodou R* na 200,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *kyseliny chlorogenové CRL* se rozpustí v 50,0 ml *methanolu R*. 5,0 ml tohoto roztoku se v odměrné baňce smíchá s 5 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 20,0 ml.

#### Kolona:

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);

– **teplota:** 40 °C.

#### Mobilní fáze:

– **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (0,5 + 99,5);

– **mobilní fáze B:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *acetonitrilu R* (0,5 + 99,5).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	92	8
1–20	92 → 75	8 → 25
20–33	75	25
33–35	75 → 0	25 → 100

Průtoková rychlost. 1,2 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

Nástrík. 25 µl.

Test způsobilosti, zkoušený roztok:

- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu uvedenému na obrázku 2;
- rozlišení: nejméně 2,0 mezi píkem kyseliny chlorogenové a následujícím píkem (pík č. 2).

Obsah kyseliny chlorogenové (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost kyseliny chlorogenové CRL v porovnávacím roztoku v gramech;
- $p$  – obsah kyseliny chlorogenové v procentech v kyselině chlorogenové CRL.

## CYNOSBATI FRUCTUS

7.5:1510

### Šípek

*Synonymum.* Rosae pseudo-fructus

#### DEFINICE

Je to usušený nepravý plod se zbytky suchého kalicha druhu *Rosa canina* L., *R. pendulina* L. a jiných druhů rodu *Rosa*, zbavený nažek.

*Obsah.* Nejméně 0,3 % kyseliny askorbové (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>;  $M_r$  176,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Úlomky dužnaté duté češule se zbytky redukováného kalicha. Češule je světle růžová až oranžově růžová, svrchní strana je vypouklá, lesklá, silně svaštělá, vnitřní strana je světlejší s roztroušenými pentlicovitými chlupy.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je oranžovo-žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky češule s pokožkou na svrchní straně z buněk krytých silnou kutikulou s oranžovo-žlutým ob-

sahem; pokožka na vnitřní straně složená z tenkostěnných buněk obsahujících shluky krystalů a občas i hranoly calcium-oxalátu; roztroušené zdřevnatělé buňky, rovnostěnné buňky se ztlustlými tečkovanými stěnami tvořícími bázi chlupů; četné dlouhé jednobuněčné chlupy až 2 mm dlouhé a 30 µm až 45 µm silné, ostře zašpičatělé se silně ztlustlými stěnami kryté voskovitou kutikulou na povrchu někdy spirálovitě rýhovanou; četné oranžovo-žluté chromatofory.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se protřepává 30 min s 25 ml *ethanolu 96% R* a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *kyseliny askorbové R* se rozpustí v 5,0 ml *ethanolu 60% (V/V) R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *acetonu R*, *kyseliny octové ledové R*, *methanolu R* a *toluenu R* (5 + 5 + 20 + 70).

*Nanášení.* 20 µl zkoušeného roztoku a 2 µl porovnávacího roztoku.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna zářející fluorescencí odpovídající polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Vrstva se postříká roztokem *natrium-dichlorfenolindofenolátu R* (0,2 g/l) v *ethanolu 96% R* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je bílá skvrna na růžovém pozadí (kyselina askorbová) odpovídající polohou a zbarvením hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v blízkosti čela mobilní fáze intenzivní oranžovo-žlutá skvrna a v horní třetině žlutá skvrna (karotenoidy).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkoušený roztok.* 0,500 g čerstvě práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se v baňce s kulatým dnem smíchá s 50,0 ml roztoku 1,0 g *kyseliny šťavelové R* v 50,0 ml *methanolu R*, vaří se 10 min pod zpětným chladičem, ochladí se ve vodě s ledem na teplotu 15 °C až 20 °C a zfiltruje se (filtrát se použije také pro roztok A). 2,0 ml filtrátu se převedou do 50ml kuželové baňky a za stálého mírného protřepávání po každém přidavku se postupně přidají 2,0 ml *natrium-dichlorfenolindofenolátu RS*, přesně po 60 s 0,5 ml roztoku *thiomočoviny R* (100 g/l) v *ethanolu 50% (V/V) R* a 0,7 ml *dinitrofenylhydrazin-kyseliny sírové RS*. Zahřívá se 75 min pod zpětným chladičem při

50 °C a ihned se umístí na 5 min do vody s ledem. Za intenzivního míchání ve vodě s ledem se po dobu 90 s až 120 s přidává po kapkách 5,0 ml směsi 12 ml vody R a 50 ml kyseliny sírové R. Nechá se 30 min stát při teplotě místnosti a změří se absorbance (2.2.25) při 520 nm za použití roztoku A jako kontrolního roztoku.

**Roztok A.** 2,0 ml filtrátu získaného při přípravě zkoušeného roztoku se upraví podle postupu v odstavci Zkoušený roztok s tím, že se *dinitrofenylhydrazin-kyselina sírová RS* přidá těsně před měřením absorbance.

**Porovnávací roztok.** 40,0 mg kyseliny askorbové R se rozpustí v čerstvě připraveném roztoku kyseliny šťavelové R (20 g/l) v methanolu R a zředí se stejným roztokem na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem kyseliny šťavelové R (20 g/l) v methanolu R na 100,0 ml (použije se také k přípravě roztoku B). 2,0 ml tohoto roztoku se upraví podle postupu pro filtrát v odstavci Zkoušený roztok. Měří se absorbance (2.2.25) při 520 nm za použití roztoku B jako kontrolního roztoku.

**Roztok B.** 2,0 ml porovnávacího roztoku získaného při přípravě roztoku A.

Obsah kyseliny askorbové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{2,5 \cdot A_1 \cdot m_2}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – absorbanci zkoušeného roztoku;

$A_2$  – absorbanci porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost použité kyseliny askorbové v gramech.

## DIGITALIS PURPUREAE FOLIUM

7.2:0117

### List náprstníku červeného

#### DEFINICE

Je to usušený list druhu *Digitalis purpurea* L.

**Obsah.** Nejméně 0,3 % kardenolidů, vyjádřeno jako digoxin ( $C_{41}H_{64}O_{13}$ ;  $M_r$  765), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga nevýrazného, ale charakteristického pachu.

Celý list je asi 10 cm až 40 cm dlouhý a 4 cm až 15 cm široký. Čepel je vejčité kopinatá nebo široce vejčitá. Křídlatý řapík je dlouhý jako čtvrtina délky čepel.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

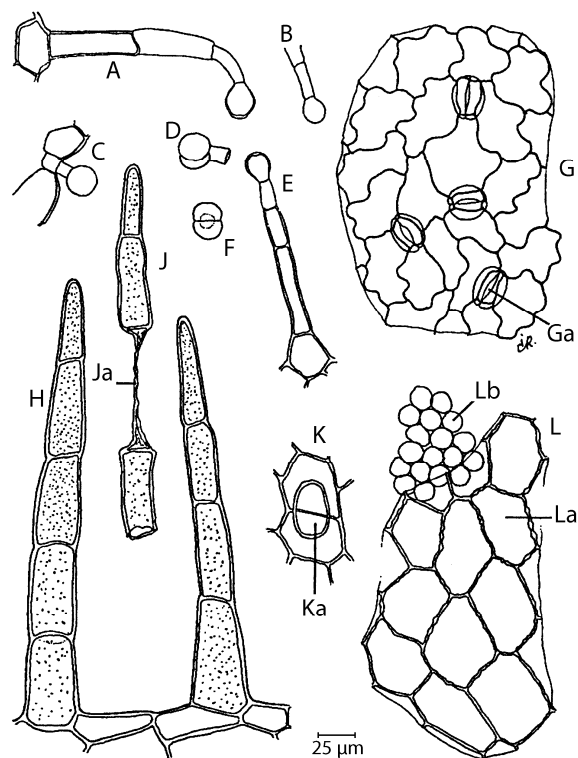
**A.** List je křehký, často rozdrčený. Na svrchní straně je zelený, na spodní straně šedozelený. Na konci je zašpičatělý; okraj má nepravidelně vroubkovaný, zubatý nebo pilovitý, na bázi je sbíhavý. Žilnatina je zpeřená. Postranní žilky jsou vyniklé zvláště na spodní straně listu a svírají s hlavní žilkou úhel asi 45° a na okrajích čepel anastomozují, tenoučké žilky končí v každém jednotlivém zubu čepel, v dolní části se sbíhají do křídlatého řapíku. Listy jsou na svrchní straně svažité, chlupaté,

na spodní straně s vyniklou síťovitou žilnatinou, hustě chlupaté.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky svrchní pokožky v plošném pohledu [L, K] s buňkami s hladkou kutikulou a s mírně ztlustlými antiklinálními stěnami rovnými nebo mírně vlnitě zprohýbanými [La], někdy s jizvami po krycích chlupech [Ka], doprovázené palisádovým parenchymem [Lb]; úlomky spodní pokožky v plošném pohledu [G] s výrazně vlnitě zprohýbanými buňkami a anomocytickými průduchy (2.8.3); chlupy dvou typů: a) jednořadé špičaté nežláznaté chlupy obvykle třibuněčné až pětibuněčné [H, J], často s jednou nebo více kolabovanými buňkami [Ja], stěny buněk většinou jemně bradavčité nebo jemně rýhované; b) žláznaté chlupy obvykle s jednobuněčnou [C, D], občas s vícebuněčnou jednořadou nohou [A, B, E] a jednobuněčnou [A, B, C, E] nebo dvoubuněčnou hlavičkou v bočním pohledu [D] a v plošném pohledu [F] nebo výjimečně až čtyřbuněčnou hlavičkou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá s 20 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a 10 ml *octanu olovnatého RS*. Vaří se 2 min, nechá se ochladit a odstředí se. Supernatantní tekutina se protřepe dvakrát 15 ml *chloroformu R*; je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. 10 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R*.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového listu náprstníku červeného

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

*Porovnávací roztok.* 5 mg *purpureaglykosidu A CRL*, 2 mg *purpureaglykosidu B CRL*, 5 mg *digitoxinu R* a 2 mg *gitoxinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (7,5 + 10 + 75).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Do odpaření rozpouštědel.

*Detekce.* Postříká se směsí objemových dílů roztoku *chloraminu T R* (10 g/l) a roztoku *kyseliny trichloroctové R* (250 g/l) v *ethanolu 96% R* (2 + 8), pak se 10 min zahřívá při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části světle modře fluoreskující skvrna (*purpureaglykosid B*), těsně nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (*purpureaglykosid A*), ve střední části chromatogramu je světle modře fluoreskující skvrna (*gitoxin*) a nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (*digitoxin*). Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

- D.** 5 ml chloroformového roztoku ze Zkoušky totožnosti C se odpaří na vodní lázni do sucha. K odparku se přidají 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*; do 5 min vzniká červenofialové zbarvení.
- E.** 5 ml chloroformového roztoku ze Zkoušky totožnosti C se odpaří na vodní lázni do sucha. K odparku se přidají 3 ml *xanthidolu RS* a zahřívá se 3 min na vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejsou přítomny listy lysé nebo jen roztroušeně chlupaté, při plošném pohledu s pokožkovými buňkami s tečkovanými antiklinálními stěnami (*Digitalis lanata*).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 6,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

0,250 g práškované drogy (180) (2.9.12) se protřepává 1 h s 50,0 ml *vody R*. Pak se přidá 5,0 ml roztoku *octanu olovnatého R* (150 g/l), protřepe se a po několika minutách se přidá 7,5 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (40 g/l), zfiltruje se přes skládaný filtr. 50,0 ml filtrátu se vaří 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni s 5 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové* (150 g/l HCl). Roztok se převede do dělicí nálevky; baňka se promyje dvakrát 5 ml *vody R*; spojené tekutiny se protřepávají třikrát 25 ml

*chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a roztok se zředí *chloroformem R* na 100,0 ml. 40,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 7 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, přidají se 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. Současně se připraví porovnávací roztok následujícím způsobem: 50,0 mg *digitoxinu CRL* se rozpustí v *ethanolu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *ethanolem 96% R* na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml *vody R* a 3 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové* (150 g/l HCl). Vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni; dále se postupuje výše uvedeným způsobem. Absorbance (2.2.25) obou roztoků se měří při 540 nm několikrát v průběhu 12 min tak, aby bylo dosaženo maxima. Jako kontrolní tekutina se použije směs 7 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*.

Z naměřených hodnot absorbancí a koncentrací roztoků se vypočítá obsah kardenolidů v procentech, vyjádřeno jako digitoxin.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## DRYNARIAE RHIZOMA

7.5:2563

### Oddenek drynarie fortuneovy

#### DEFINICE

Je to usušený oddenek druhu *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM., který může být zbavený plevinovitých šupin.

*Obsah.* Nejméně 0,5 % naringinu ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ ;  $M_r$  580,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Dlouhý zploštělý lamelovitý oddenek je často zkroucený a rozvětvený, 5 cm až 15 cm dlouhý a 1 cm až 1,5 cm silný. Povrch je buď úplně pokrytý tmavě hnědými plevinovitými šupinami (*rhizoma cum ramenta*) nebo, je lysý s tmavými skvrnami (*rhizoma sine ramenta*). Na svrchní a obou bočních stranách jsou patrné okrouhlé vějířovitě uspořádané jizvy, zřídka s vějířovitými bázemi, na spodní straně jsou jizvy nebo zbytky vláknitých kořenů. Tkáň je světlá, křehká, snadno se láme. Řez je červenohnědý, centrální cylindr tvoří kruh malých žlutých teček.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky parenchymu s mnohohrannými buňkami s pravidelně mírně ztlustlými tečkovanými stěnami; schodovitě ztlustlé zděvnatělé cévy o proměnlivém průměru až do 60 µm; úlomky plevinovitých šupin ze tkání tvořených četnými červenohnědými buňkami výrůstků na okrajích plevinovitých šupin (*rhizoma cum ramenta*).

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R*, vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně, pak se ochladí a odstředí se. Použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *naringinu R* a 1 mg *hyperosidu R* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové RS*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 26 + 100).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků 8 mm.

**Vyvíjení.** Po dráze 6 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *chloridem hlinitým RSI* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 366 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutá skvrna naringin: modrobílá skvrna	modrobílá skvrna (naringin) modrobílá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 13,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 2,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,100 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se disperguje v roztoku *methanolu R* 50% (V/V) a zředí se jím na 10,0 ml, zváží se a vloží se na 45 min do ultrazvukové lázně. Nechá se ochladit a znovu se zváží. Hmotnost se doplní roztokem *methanolu R* 50% (V/V) na počáteční hodnotu, silně se protřepe a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok (a).** 10,0 mg *naringinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 5,0 mg *neohesperidinu R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (c).** 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny octové RS* 0,4% (V/V) (18 + 82).

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 283 nm.

**Nástřik.** 20 µl; zkoušený roztok a porovnávací roztoky (b) a (c).

**Doba záznamu.** Dvojnásobek retenčního času *naringinu*.

**Retenční časy.** *Naringin* asi 9 min, *neohesperidin* asi 12 min.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

– **rozišení:** nejméně 5,0 mezi píkem *naringinu* a píkem *neohesperidinu*.

**Obsah naringinu (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:**

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 20}$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku *naringinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>2</sub> – plochu píku *naringinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku (c);

*m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

*m*<sub>2</sub> – hmotnost *naringinu CRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

*p* – obsah *naringinu* v *naringinu CRL* v procentech.

**ECHINACEAE ANGUSTIFOLIAE RADIX**

6.0:1821

**Kořen třapatky úzkolisté****DEFINICE**

Jsou to celé nebo řezané, usušené kořeny a oddenky druhu *Echinacea angustifolia* DC.

**Obsah.** Nejméně 0,5 % *echinakosidu* (C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>O<sub>20</sub>; *M*<sub>r</sub> 786,5), počítáno na vysušenou drogu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**1.:** *A, B a C.*

**2.:** *A, B a D.*

**A.** Kořenová hlava o průměru až asi 30 mm, jen s několika lodyžními bázemi. Kořeny o průměru až asi 15 mm, nejsou příliš četné, jsou válcovité nebo lehce zmáčklé, někdy šroubovitě zkroucené, svrchní strana je světle hnědá až žlutohnědá. Lom je krátký, tmavě hnědý s paprscitou strukturou.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úzká zdřevnatělá vlákna (až asi 800 µm dlouhá a o průměru

50 µm) jsou uspořádaná v dlouhých svazcích obklopených fyto melaninem; zdřevnatělé cévy síťovitě nebo schodovitě ztlustlé (o průměru až asi 60 µm); četné sklereidy, jednotlivé nebo častěji ve skupinách po dvou až deseti, jsou většinou protáhlé až pravouhlé (o délce až asi 150 µm a šířce 40 µm) s mezibuněčnými dutinami vyplněnými fyto melaninem; úlomky balzámových kanálek (o průměru 80 µm až 150 µm) se žlutooranžovým až červenohnědým obsahem; skupiny čtvercových až obdélníkových buněk (asi 30 µm až 45 µm) ze svrchní vrstvy kořenů; četné tenkostěnné buňky parenchymu s tečkovanými stěnami obsahující sférokristaly inulinu.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky *Echinacea purpurea* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být mezi skvrnami echinakosidu a cynarinu přítomny další slabé tmavomodře fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: silně modře fluoreskující skvrna	
cynarin: silně nazelenale fluoreskující skvrna	nazelenale fluoreskující skvrna (cynarin)
echinakosid: silně nazelenale fluoreskující skvrna	silně nazelenale fluoreskující skvrna (echinakosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

D. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu.

**Hodnocení.** Jeden hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá echinakosidu, menší pík odpovídá cynarinu. Píky odpovídající kyselině kávové, kyselině kaftarové a kyselině chlorogenové jsou menší nebo mohou chybět.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %.

**Echinacea purpurea.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a extrahuje se 5 min v ultrazvukové lázni. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *echinakosidu R*, 1 mg *cynarinu R* a 0,5 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (3 + 3 + 9 + 15).

**Nanášení.** 25 µl [nebo 5 µl] zkoušeného roztoku a 10 µl [nebo 2 µl] porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Asi 10 min v proudu studeného vzduchu a pak 2 min při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká deska se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (5 g/l) v *ethyl-acetátu R* a pozoruje se po 30 min v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrná nazelenale fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze těsně pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku a žádná nazelenale fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze pod skvrnou cynarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou jen slabé tmavomodře fluoreskující skvrny mezi skvrnami echinakosidu a cynarinu.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá ve 100ml odměrné baňce s 80 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml. Suspenze se promíchá a nechá se několik minut stát do usazení viditelných částic. Vhodné množství roztoku se před nástřikem zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kyseliny chlorogenové CRL* a 10,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 10,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);
- **teplota:** 35 °C.

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (1 + 999);
- **mobilní fáze B:** *acetonitril R*.

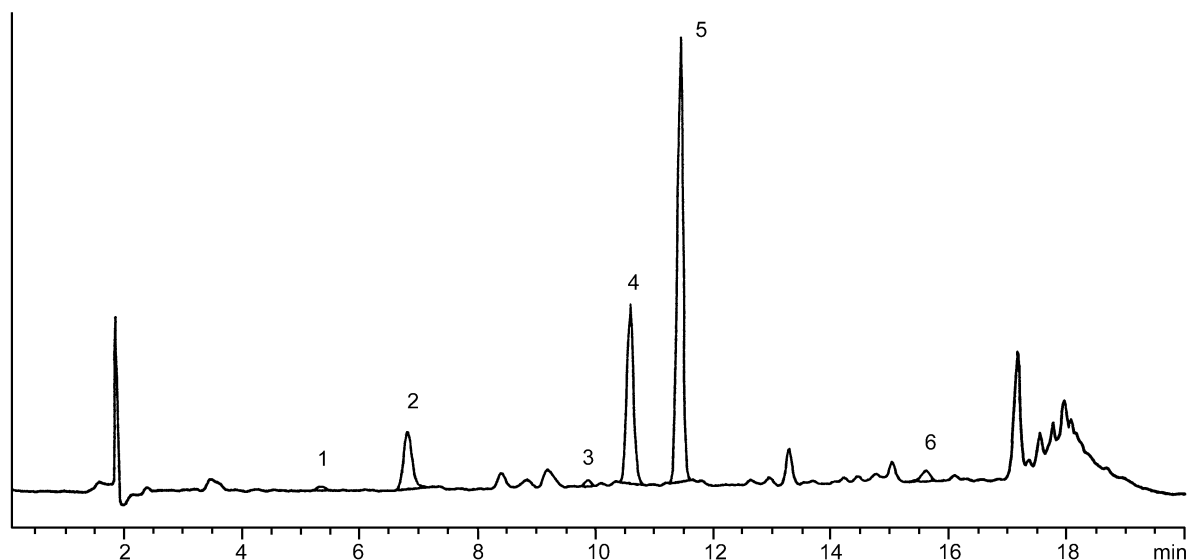
Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0	90	10
0–13	90 → 78	10 → 22
13–14	78 → 60	22 → 40
14–14,5	60	40

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Relativní retence** vztažená ke kyselině chlorogenové. Kyselina kaftarová asi 0,8; kyselina kávová asi 1,5; cynarin asi 1,6; echinakosid asi 1,7; kyselina cichorová asi 2,3.



1 = kyselina kaftarová  
4 = cynarin

2 = kyselina chlorogenová  
5 = echinakosid

3 = kyselina kávová  
6 = kyselina cichorová

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Stanovení obsahu echinakosidu v kořeni třapatky úzkolisté

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 10 mezi píkem kyseliny kávové a píkem kyseliny chlorogenové.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují píky kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové na chromatogramu zkoušeného roztoku. Za použití chromatogramu na obrázku 1 se identifikují píky echinakosidu a cynarinu na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah echinakosidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 2,221}{A_2 \cdot C_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku echinakosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
  - $A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
  - $C_1$  – koncentraci zkoušeného roztoku v miligramech na mililitr;
  - $C_2$  – koncentraci kyseliny chlorogenové v porovnávacím roztoku v miligramech na mililitr;
- 2,221 – korelační faktor mezi píkem kyseliny chlorogenové a píkem echinakosidu.

#### SKLADOVÁNÍ

Droga se skladuje nerozdrobněná.

## ECHINACEAE PALLIDAE RADIX

6.0:1822

Kořen třapatky bledé

#### DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané, usušené kořeny a oddenky druhu *Echinacea pallida* NUTT.

Obsah. Nejméně 0,2 % echinakosidu ( $C_{35}H_{46}O_{20}$ ;  $M_r$  786,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oddenek a kořeny jsou válcovité, někdy šroubovitě zkroucené, podélně zvrásněné nebo hluboce brázdité o průměru 4 mm až 20 mm; svrchní strana je červenohnědá až šedohnědá.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedohnědý až světle žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: krátká zdřevnatělá vlákna (100  $\mu$ m až 300  $\mu$ m dlouhá, o průměru až asi 80  $\mu$ m), jednotlivá nebo spojená do dlouhých svazků, někdy vyplněná fyto melaninem; zdřevnatělé, síťovitě nebo schodovitě ztlustlé cévy (o průměru až asi 70  $\mu$ m); četné sklereidy, jednotlivé nebo v malých skupinách po méně než deseti, proměnlivého tvaru, okrouhlé až pravoúhlé nebo nepravidelné, někdy silně protáhlé a vláknité o délce až 400  $\mu$ m; všechny sklereidy jsou propojeny prostorami obsahujícími černý fyto melanin; úlomky balzámových kanálků (o průměru až 240  $\mu$ m) se žlutooranžovým obsahem; skupiny čtvercových až obdélníkových buněk ze svrchní vrstvy (asi 40  $\mu$ m  $\times$  80  $\mu$ m); četné tenkostěnné buňky parenchymu s tečkovanými stěnami obsahují sférokrytaly inulinu.
- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Jiné druhy rodu *Echinacea* a *Parthenium integrifolium* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být také přítomna slabě zbarvená skvrna na čele mobilní fáze.



Horní okraj desky	
	zelenohnědá až hnědá skvrna žlutá skvrna fialová skvrna
$\beta$ -sitosterol: fialová až růžová skvrna <i>N</i> -isobutyl-dodekatetraenamid: šedomodrá skvrna	fialová až růžová skvrna ( $\beta$ -sitosterol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>
	tmavá šedomodrá skvrna

**D.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu.

*Hodnocení.* Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá píku echinakosidu. Píky odpovídající kyselině kaftarové, kyselině kávové, cynarinu, kyselině chlorogenové a kyselině cichorové jsou menší nebo mohou chybět.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %.

#### Jiné druhy rodu *Echinacea* a *Parthenium integrifolium*.

Tenkvrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *dichlormethanu R* a extrahuje se 5 min v ultrazvukové lázni. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 1 mg  $\beta$ -sitosterolu *R* a objem *N*-isobutyl-dodekatetraenamidu *RS* odpovídající 1 mg *N*-isobutyl-dodekatetraenamidu *R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se

jím na 5,0 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu *F<sub>254</sub>* pro TLC *R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu *F<sub>254</sub>* pro TLC *R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé *R*, cyklohexanu *R*, ethyl-acetátu *R* a toluenu *R* (0,9 + 3 + 6 + 24).

*Nanášení.* 25  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l] zkoušeného roztoku a 10  $\mu$ l [nebo 4  $\mu$ l] porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 5 cm].

*Sušení.* Asi 10 min v proudě studeného vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 3 min při 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrná šedomodrá skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *N*-isobutyl-dodekatetraenamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku a žádná modrá skvrna v poloze odpovídající poloze fialové skvrny  $\beta$ -sitosterolu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

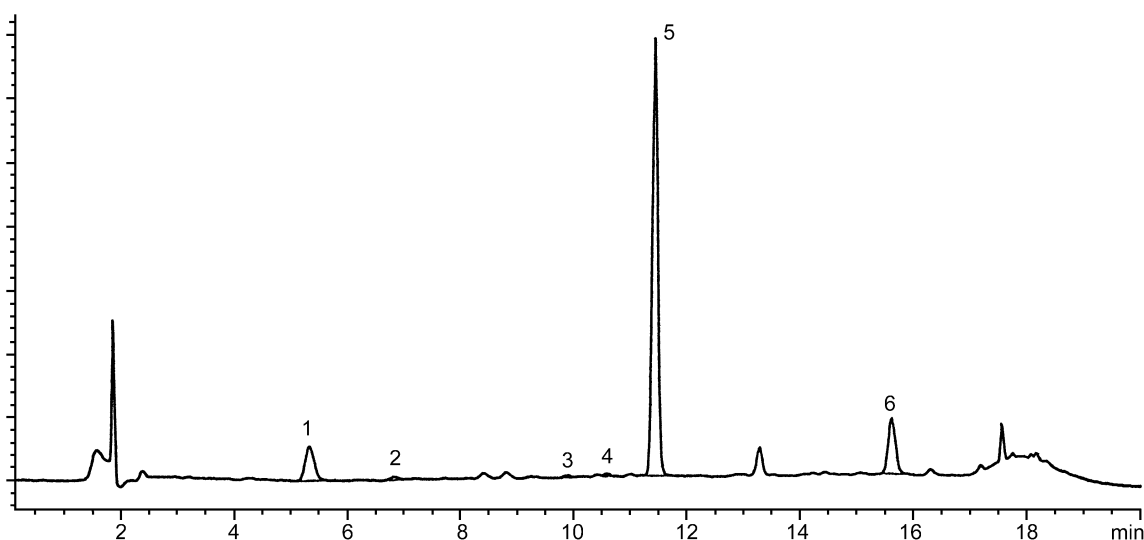
**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá ve 100ml odměrné baňce s 80 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml. Suspenze se promíchá a nechá se několik minut stát do usazení viditelných částic. Vhodné množství roztoku se před nástřikem zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45  $\mu$ m).



1 = kyselina kaftarová

2 = kyselina chlorogenová

3 = kyselina kávová

4 = cynarin

5 = echinakosid

6 = kyselina cichorová

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Stanovení obsahu echinakosidu v kořeni třapatky bledé

*Porovnávací roztok.* 10,0 mg kyseliny chlorogenové CRL a 10,0 mg kyseliny kávové R se rozpustí v ethanolu 70% (V/V) R, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se ethanolom 70% (V/V) R na 10,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí ethanolom 70% (V/V) R na 100,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm);
- *teplota:* 35 °C.

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů kyseliny fosforečné R a vody R (1 + 999);
- *mobilní fáze B:* acetonitril R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0	90	10
0–13	90 → 78	10 → 22
13–14	78 → 60	22 → 40
14–20	60	40

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

*Nástřik.* 10 µl.

*Relativní retence* vztažená ke kyselině chlorogenové (retenční čas asi 7 min). Kyselina kaftarová asi 0,8; kyselina kávová asi 1,5; cynarin asi 1,6; echinakosid asi 1,7; kyselina cichorová asi 2,3.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 10 mezi píkem kyseliny kávové a píkem kyseliny chlorogenové.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují píky kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové na chromatogramu zkoušeného roztoku. Za použití chromatogramu na obrázku 1 se identifikují píky echinakosidu, kyseliny kaftarové a kyseliny cichorové na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah echinakosidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 2,221}{A_2 \cdot C_1},$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku echinakosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $C_1$  – koncentraci zkoušeného roztoku v miligramech na mililitr;
- $C_2$  – koncentraci kyseliny chlorogenové v porovnávacím roztoku v miligramech na mililitr;
- 2,221 – korelační faktor mezi píkem kyseliny chlorogenové a píkem echinakosidu.

**SKLADOVÁNÍ**

Droga se skladuje nerozdrobněná.

## ECHINACEAE PURPUREAE HERBA

6.0:1823

### Nať třapatky nachové

**DEFINICE**

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH.

*Obsah.* Nejméně 0,1 % kyseliny kaftarové ( $C_{13}H_{12}O_9$ ;  $M_r$  312,2) a kyseliny cichorové ( $C_{22}H_{18}O_{12}$ ;  $M_r$  474,3) (součet obsahů), počítáno na vysušenou drogu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: A, B a C.

2.: A, B a D.

**A.** Vytrvalá bylina 60 cm až 150 cm, zřídka až 180 cm vysoká. Lodyha je zelená až červená, přímá, chudě větvená. Listy jsou střídavé, oválné až oválně kopinaté, nepravidelně zubaté, na obou stranách drsné, tmavozelené s vyniklou světle zelenou žilnatinou; čepel listu je silná, lesklá. Listy zákrovu jsou uspořádány ve dvou nebo třech řadách. Lůžko úboru je plné, mírně vypouklé. Každý z obvodových fialově zbarvených jazykovitých květů (4 cm až 6 cm) i vnitřních fialovorůžových trubkovitých květů je provázen načervenalým, špičatým, kožovitým listenem, který přesahuje trubkovité květy. Kalich je redukovaný na velmi krátkou korunku, jeden z kališních lístků je až 1 mm dlouhý.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: bělavě zelené skupiny vláken 150 µm až 200 µm dlouhých, o průměru 10 µm až 15 µm, někdy s černě zbarveným obsahem; úlomky listů z plošného pohledu s anomocytickými nebo anizocytickými průduchy (2.8.3) (asi 35 µm až 40 µm dlouhými); jednořadé krycí chlupy nebo jejich úlomky tvořené většinou třemi nebo čtyřmi buňkami se ztlustlými stěnami, koncová buňka je zřetelně delší než ostatní; úlomky listů s buňkami pokožky růžicovitě uspořádanými okolo báze krycích chlupů; jednořadé žláznaté chlupy z buněk s velmi tenkými stěnami; tečkované parenchymatické buňky ze střední části stonku, stejně jako tečkované protáhlé buňky z mezokarpu nažek; úlomky parenchymu semen s olejovými kapkami; úlomky pokožky jazykovitých květů z červených až fialových papílnatých buněk; okrouhlá pylová zrna o průměru 30 µm až 40 µm s ostnitou exinou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškováné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a extrahuje se 5 min v ultrazvukové lázni, odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 0,5 mg kyseliny kávové R a 0,5 mg kyseliny chlorogenové R se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *2-butan-onu R* a *ethyl-acetátu R* (3 + 3 + 9 + 15).

**Nanášení.** 25  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l] zkoušeného roztoku a 10  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l] porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Asi 10 min v proudu studeného vzduchu a pak 2 min při 100 °C.

**Detekce.** Ještě horká deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (5 g/l) v *ethyl-acetátu R* a pozoruje se po 30 min v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě modře fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: silně modře fluoreskující skvrna	silně červeně fluoreskující skvrna modře fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: silně modře fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna slabě žlutooranžově fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu.

**Hodnocení.** Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá kyselině cichorové, menší pík odpovídá kyselině kaftarové. Píky odpovídající kyselině kávové a kyselině chlorogenové jsou menší, nebo mohou chybět.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá ve 100ml odměrné baňce s 80 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a pak se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml. Suspenze se promíchá a pak se nechá několik minut stát do usazení viditelných částic.

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kyseliny chlorogenové CRL* a 10,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 10,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m);

– **teplota:** 35 °C.

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (1 + 999);

– **mobilní fáze B:** *acetonitril R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0	90	10
0–13	90 → 78	10 → 22
13–14	78 → 60	22 → 40
14–20	60	40

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

**Nástřik.** 10  $\mu$ l.

**Relativní retence** vztažená ke kyselině chlorogenové (retenční čas asi 7 min). Kyselina kaftarová asi 0,8; kyselina kávová asi 1,5; cynarin asi 1,6; echinakosid asi 1,7; kyselina cichorová asi 2,3.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– **rozlišení:** nejméně 5 mezi píkem kyseliny kávové a píkem kyseliny chlorogenové.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují píky kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové na chromatogramu zkoušeného roztoku. Za použití chromatogramu na obrázku 1 se identifikují píky kyseliny kaftarové a kyseliny cichorové.

Obsah kyseliny kaftarové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 0,881}{A_2 \cdot C_1}$$

obsah kyseliny cichorové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_3 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 0,695}{A_2 \cdot C_1}$$

v nichž značí:

$A_1$  – plochu píku kyseliny kaftarové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;

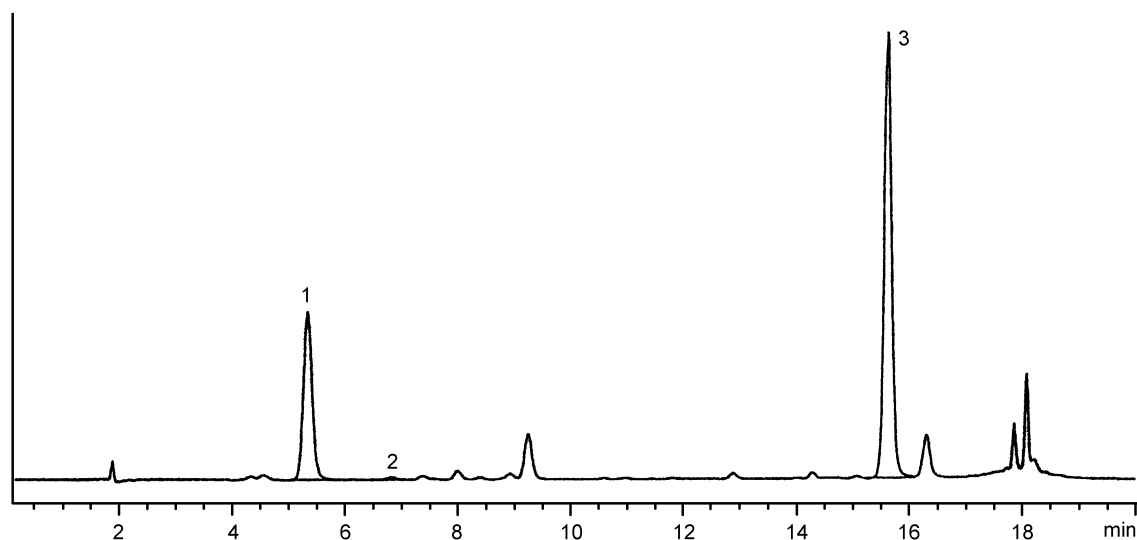
$A_3$  – plochu píku kyseliny cichorové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$C_1$  – koncentraci zkoušeného roztoku v miligramech na mililitr;

$C_2$  – koncentraci kyseliny chlorogenové v porovnávacím roztoku v miligramech na mililitr;

0,695 – korelační faktor píku založený na pozorované odezvě kapalinové chromatografie;

0,881 – korelační faktor mezi píkem kyseliny kaftarové a kyseliny chlorogenové.



1 = kyselina kaftarová

2 = kyselina chlorogenová

3 = kyselina cichorová

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Stanovení obsahu kyseliny kaftarové a kyseliny chlorogenové v nati třapatky nachové

## SKLADOVÁNÍ

Droga se skladuje nerozdrobněná.

## ECHINACEAE PURPUREAE RADIX

6.0:1824

## Kořen třapatky nachové

## DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané usušené kořeny a oddenky druhu *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH.

*Obsah.* Nejméně 0,5 % kyseliny kaftarové ( $C_{13}H_{12}O_9$ ;  $M_r$  312,2) a kyseliny cichorové ( $C_{22}H_{18}O_{12}$ ;  $M_r$  474,3) (součet obsahů), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: A, B, C a E.

2.: A, B, D a E.

- A.** Oddenek je asi 15 cm dlouhý, rozvětvený, na povrchu červenohnědý až tmavohnědý s mnoha lodyžními báze-mi; uvnitř je vláknitý a bílý. Četné kořeny jsou spirálovitě zkroucené světle až tmavohnědé, s jemným příčným strukturováním na svrchní straně.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutý až narůžověle běžový. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: četná světle hnědá vřetenovitá vlákna bez černě zbarveného obsahu (fytomelanin), která jsou spojena dohromady v dlouhé svazky; zřídka sklereidy z oddenků a kořenů vyskytující se obvykle jednotlivě, sklereidy oddenků jsou izodiametrické o průměru asi 60  $\mu$ m s černě zbarveným obsahem, sklereidy kořenů asi 50  $\mu$ m až 120  $\mu$ m dlouhé bez černě zbarveného obsahu; sekreční nádržky o průměru až 180  $\mu$ m, se žlutými kapkami oleje; čtvercové až obdélníkovité buňky ze svrchních vrstev, některé s načervenalými stěna-

mi; dvůrkovitě tečkované cévy z oddenků, o průměru 30  $\mu$ m až 40  $\mu$ m.

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Jiné druhy rodu *Echinacea* a *Parthenium integrifolium* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být těsně pod střední částí chromatogramu přítomny další slabě nazelenale zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: silně modře fluoreskující skvrna	silně modře fluoreskující skvrna
cynarin: silně nazelenale fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna
echinakosid: silně nazelenale fluoreskující skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

- D.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu.  
*Hodnocení.* Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá kyselině cichorové, menší pík odpovídá kyselině kaftarové. Píky odpovídající kyselině kávové a kyselině chlorogenové jsou menší, nebo mohou chybět.
- E.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *dichlormethanu R* a míchá se 5 min

v ultrazvukové lázni. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 1 mg  $\beta$ -sitosterolu *R* a objem *N*-isobutylldodekatetraenamidu *RS* odpovídající 1 mg *N*-isobutylldodekatetraenamidu *R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé *R*, cyklohexanu *R*, ethyl-acetátu *R* a toluenu *R* (0,9 + 3 + 6 + 24).

**Nanášení.** 25  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Asi 10 min v proudě studeného vzduchu.

**Detekce.** Deska se na 1 s ponoří do *anisaldehydu RS* a suší se 3 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
$\beta$ -sitosterol: fialová nebo růžová skvrna <i>N</i> -isobutylldodekatetraenamid: šedomodrá skvrna	modrofialová skvrna fialová nebo růžová skvrna ( $\beta$ -sitosterol) šedomodrá skvrna ( <i>N</i> -isobutylldodekatetraenamid)
	tmavá šedomodrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

##### Jiné druhy rodu *Echinacea* a *Parthenium integrifolium*.

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a míchá se 5 min v ultrazvukové lázni. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *echinakosidu R*, 1 mg *cynarinu R* a 0,5 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé *R*, vody *R*, 2-butanonu *R* a ethyl-acetátu *R* (3 + 3 + 9 + 15).

**Nanášení.** 10  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l] zkoušeného roztoku a 5  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l] porovnávacího roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Asi 10 min v proudě studeného vzduchu a pak 2 min při 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká deska se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (5 g/l) v *ethyl-acetátu R* a pozoruje se po 30 min v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není nazelenale fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *echinakosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku ani nazelenale fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *cynarinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní polovině jen velmi slabě tmavě modře fluoreskující skvrny.

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 3 %.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá ve 100ml odměrné baňce s 80 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml. Suspenze se promíchá a nechá se několik minut stát do usazení viditelných částic.

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kyseliny chlorogenové CRL* a 10,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R*, 15 min se míchá v ultrazvukové lázni a zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 10,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml.

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii *oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m);
- teplota: 35 °C.

**Mobilní fáze:**

- mobilní fáze A: směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (1 + 999);
- mobilní fáze B: *acetonitril R*.

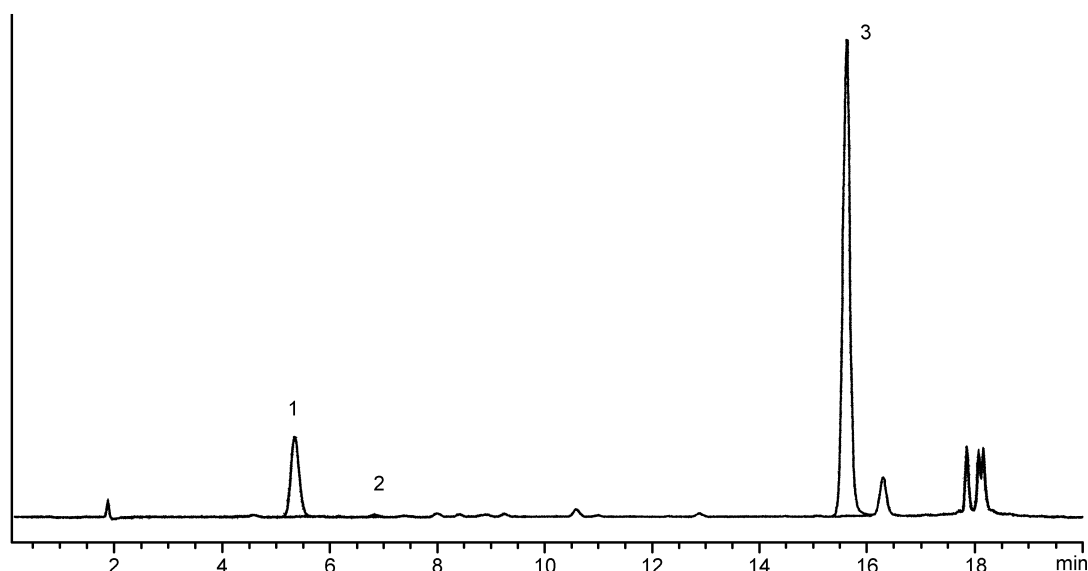
Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0	90	10
0–13	90 → 78	10 → 22
13–14	78 → 60	22 → 40
14–20	60	40

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

**Nástřik.** 10  $\mu$ l.

**Relativní retence** vztažená ke kyselině chlorogenové (retenční čas asi 7 min). Kyselina kaftarová asi 0,8; kyselina kávová asi 1,5; cynarin asi 1,6; *echinakosid* asi 1,7; kyselina cichorová: asi 2,3.



1 = kyselina kaftarová

2 = kyselina chlorogenová

3 = kyselina cichorová

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Stanovení obsahu kyseliny kaftarové a kyseliny chlorogenové v kořeni třapatky nachové

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 5 mezi píkem kyseliny kávové a píkem kyseliny chlorogenové.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují píky kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Za použití chromatogramu na obrázku 1 se identifikují píky kyseliny kaftarové a kyseliny cichorové.

Obsah kyseliny kaftarové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 0,881}{A_2 \cdot C_1}$$

Obsah kyseliny cichorové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_3 \cdot C_2 \cdot 100 \cdot 0,695}{A_2 \cdot C_1}$$

v nichž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny kaftarové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $A_3$  – plochu píku kyseliny cichorové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $C_1$  – koncentraci usušené rostlinné drogy ve zkoušeném roztoku v miligramech na mililitr;
- $C_2$  – koncentraci kyseliny chlorogenové CRL v porovnávacím roztoku v miligramech na mililitr;
- 0,695 – korelační faktor píku založený na pozorované odezvě kapalinové chromatografie;
- 0,881 – korelační faktor mezi píkem kyseliny kaftarové a kyseliny chlorogenové.

#### SKLADOVÁNÍ

Droga se skladuje nerozdrobněná.

## ELEUTHEROCOCCI RADIX

7.0:1419

### Eleuterokokový kořen

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek s kořeny druhu *Eleutherococcus senticosus* (RUPR. et MAXIM.) MAXIM. **Obsah.** Nejméně 0,08 % eleutherosidu B ( $M_r$  372,4) a eleutherosidu E ( $M_r$  742,7) (součet obsahů).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oddenek je uzlovitý, nepravidelně válcovitý, o průměru 1,5 cm až 4,0 cm. Povrch je hrboletý, podélně rýhovaný, šedohnědý až černohnědý. Kůra asi 2 mm silná těsně přiléhá ke dřevu. Jádrové dřevo je světle hnědé, splintové dřevo je světle žluté. Lom v kůře je jemně vláknitý, ve dřevě, zejména v jeho vnitřní části hrubě vláknitý. Na spodní straně oddenku jsou četné válcovité a uzlovité kořeny 3,5 cm až 15 cm dlouhé, o průměru 0,3 cm až 1,5 cm, které jsou na povrchu hladké, šedohnědé až černohnědé. Kůra asi 0,5 mm silná těsně přiléhá ke světle žlutému dřevu. Lom je nevýrazně vláknitý. Na místech, kde je odstraněna kůra, je kořen žlutohnědý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: četné skupiny zdřevnatělých vláken se ztlustlými stěnami; úlomky síťovité a tečkovaně ztlustlých cév se širokým lumenem; skupiny sekrečních kanálků o průměru až 20  $\mu\text{m}$ , s hnědým obsahem; parenchymatické buňky obsahující drůzy kalcium-oxalátu o průměru 10  $\mu\text{m}$  až 50  $\mu\text{m}$ . Při pozorování v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)* jsou patrná malá škrobová zrna, v obrysu okrouhlá až mírně trojhranná, jednoduchá nebo dvojčetná až trojčetná.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem, ochladí se a zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí ve 2,5 ml směsi objemových dílů *vody R* a *ethanolu 50% (V/V) R* (5 + 20) a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 2,0 mg *eskulinu R* a 2,0 mg *katalpolu R* se rozpustí ve 20 ml směsi objemových dílů *vody R* a *ethanolu 50% (V/V) R* (2 + 8).

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (4 + 30 + 70).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení A.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní polovině modře fluoreskující skvrna (eskulin).

**Detekce B.** Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a současně se pozoruje v denním světle.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
eskulin: modře fluoreskující skvrna (zaznamenaná při 365 nm)	hnědá skvrna (eleutherosid B)
katalpol: fialovohnědá skvrna	červenohnědá skvrna (eleutherosid E)
	dvě hnědé skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** K 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem přidá 30 ml

směsi stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R* a 30 min se zahřívá ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla (2.1.2) do 250ml baňky s kulatým dnem. Tento postup se opakuje dvakrát za použití zbytku na filtru místo práškové drogy. Oba podíly filtrátu se převedou do stejné 250ml baňky s kulatým dnem a odpaří se za sníženého tlaku na asi 10 ml. Tato supernatantní tekutina se kvantitativně převede do 20ml odměrné baňky, zředí se směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R* na 20,0 ml a zfiltruje se přes nylonový filtr (velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok (a).** 10 mg *kyseliny ferulové R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 10 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 20,0 ml.

**Porovnávací roztok (c).** 1 ml porovnávacího roztoku (a) se převede do 25ml odměrné baňky, zředí se směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 25,0 ml a zfiltruje se přes nylonový filtr (velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok (d).** 1 ml porovnávacího roztoku (a) a 1 ml porovnávacího roztoku (b) se převedou do 25ml odměrné baňky, zředí se směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 25,0 ml a zfiltruje se přes nylonový filtr (velikost pórů 0,45 µm).

**Předkolona:**

- **rozměry:** délka 4 mm, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (0,5 + 99,5);
- **mobilní fáze B:** *acetonitril pro chromatografii R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	90	10
5–27	90 → 80	10 → 20
27–30	80 → 50	20 → 50
30–35	50	50

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

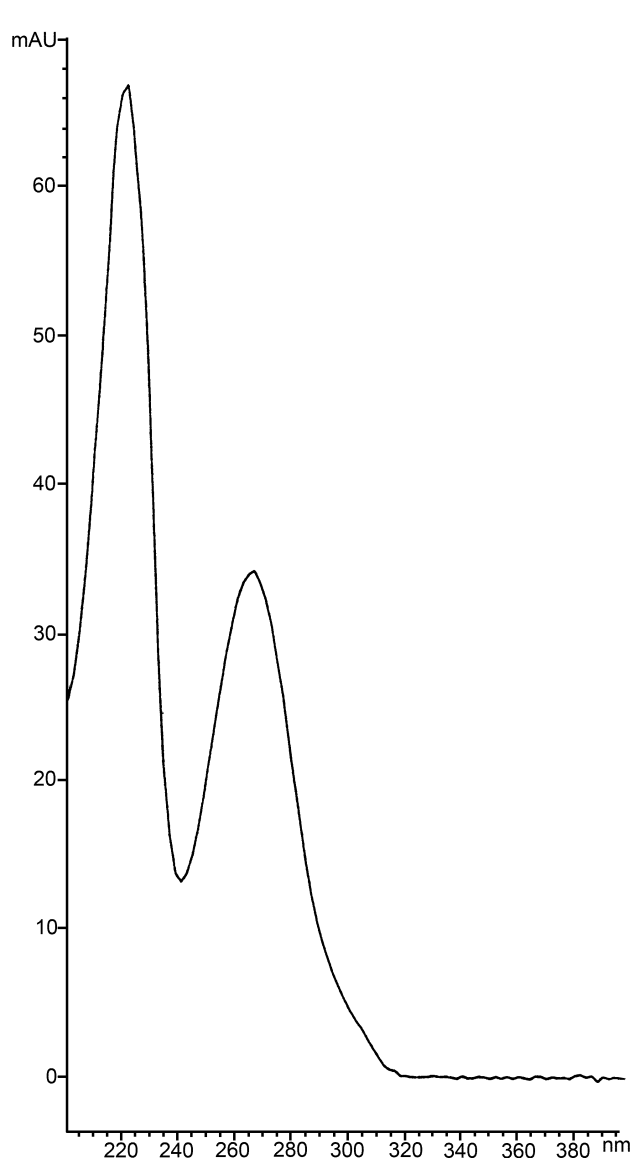
**Nástřík.** 20 µl; zkoušený roztok a porovnávací roztoky (c) a (d).

**Retenční čas.** Eleutherosid B asi 10 min; eleutherosid E asi 22 min.

Pík eleutherosidu B a pík eleutherosidu E se určí za použití UV spekter uvedených na obrázcích 1 a 2.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (d):

- **rozlišení:** nejméně 15 mezi pikem kyseliny kávové a pikem kyseliny ferulové.



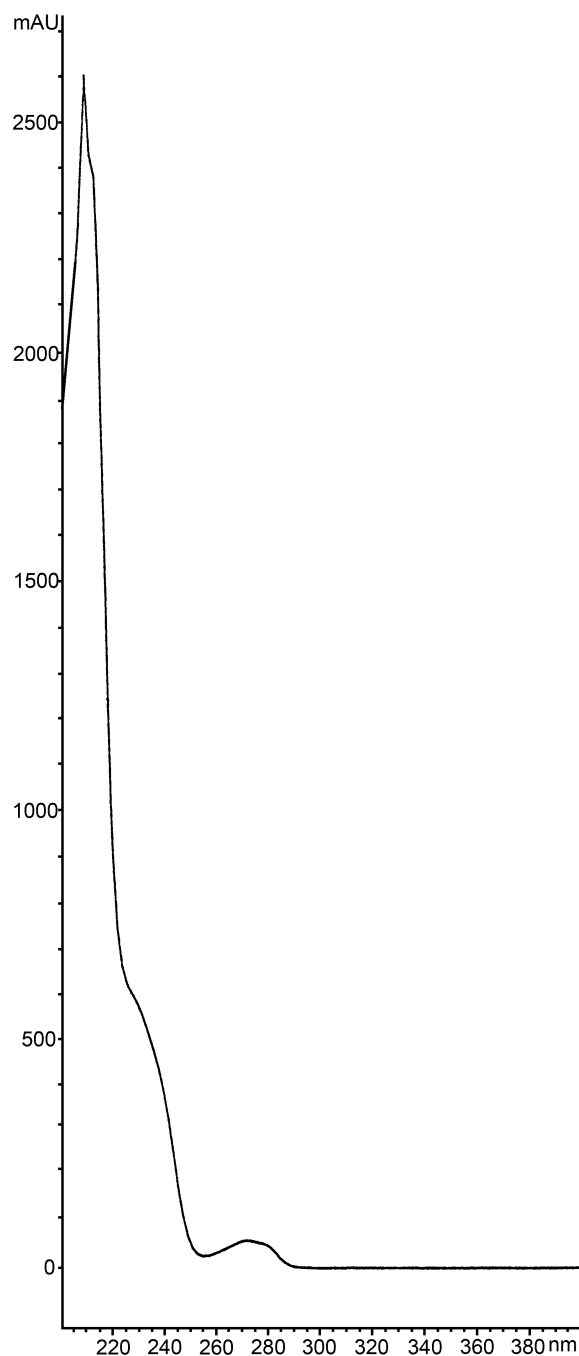
**Obr. 1** UV spektrum eleutherosidu B pro zkoušku Stanovení obsahu v eleuterokokovém kořeni

Obsah eleutherosidu B a eleutherosidu E (součet obsahů) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_B \cdot C \cdot 0,73 \cdot 2)}{(A_R \cdot m)} + \frac{(A_E \cdot C \cdot 1,90 \cdot 2)}{(A_R \cdot m)},$$

v němž značí:

- $A_B$  – plochu píku eleutherosidu B na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_E$  – plochu píku eleutherosidu E na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_R$  – plochu píku kyseliny ferulové na chromatogramu porovnávacího roztoku (c);
- $C$  – koncentraci kyseliny ferulové v porovnávacím roztoku (c) v mikrogramech na mililitr;
- $m$  – hmotnost zkoušené drogy v miligramech.



**Obr. 2** UV spektrum eleutherosidu E pro zkoušku Stanovení obsahu v eleuterokokovém kořeni



## EPHEDRAE HERBA

6.7:2451

## Chvojníková nať

*Synonymum.* Ephedra herba

## DEFINICE

Jsou to sušené metlaté větvičky druhu *Ephedra sinica* STAPF, *Ephedra intermedia* SCHRENK et C.A. MEY. nebo *Ephedra equisetina* BUNGE.

*Obsah.* Nejméně 1,0 % efedrinu ( $C_{10}H_{15}NO$ ;  $M_r$  165,2), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Tenké válcovité světle zelené nebo žlutozelené větvičky až asi 30 cm dlouhé o průměru 1 mm až 3 mm; podélně rýhované a mírně drsné, s internodií proměnlivé délky v rozmezí 1 cm až 6 cm; vstřícné křížmostojné listy jsou redukovány do šupin obklopujících lodyhy, listy tvoří drobnou šupinku 1,5 mm až 4 mm dlouhé se dvěma (řidčeji se třemi) cípy, trojúhelníkovitě zašpičatělými, na hrotech šedobílými, na bázi trubkovitými, červenohnědě až černohnědě zbarvenými. Lom je mírně vláknitý.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky v plošném pohledu tvoří pravouhlé buňky a četné průduchy na obou koncích lehce vpadlé, vedlejší buňky jsou velké, široce oválné; úlomky pokožky na příčném řezu z buněk se ztlustlou kutikulou, některé buňky jsou vystouplé; vlákna ve skupinách nebo jednotlivá se ztlustlými obvykle zdřevnatělými stěnami; úlomky zdřevnatělé tkáně složené z malých cévic s dvojtečkami, šroubovitě ztlustlých cév a skupin sklereid; skupiny parenchymu, některé se ztlustlými a tečkovanými stěnami; roztroušené hranolovité krystaly šřavelanu vápenatého.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 0,5 ml *amoniaku 26% R* a 10 ml *dichlormethanu R*. Vaří se 1 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Nechá se ochladit, zfiltruje se a filtrát se odpaří do sucha; zbytek se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *efedrin-hydrochloridu CRL* a 1 mg *indan-2-amin-hydrochloridu R* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 5 + 20).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 1  $\mu$ l], do bodů o průměru 5 mm [nebo 2 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem *ninhydrinu R* (2 g/l) v *ethanolu 96% R*, 10 min se zahřívá při 110 °C a ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
indan-2-amin: purpurově červená skvrna	purpurově červená skvrna může být přítomna
efedrin: purpurově červená skvrna na rozhraní mezi střední a dolní třetinou	purpurově červená skvrna (efedrin) na rozhraní mezi střední a dolní třetinou
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejméně 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejméně 9,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,200 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 25,0 ml *methanolu R*, zváží se a na 45 min se vloží do ultrazvukové lázně. Nechá se ochladit, zváží se a doplní se *methanolem R* na původní hmotnost, dobře se protřepe a zfiltruje se. 1,0 ml filtrátu se nanese na malý sloupec (o průměru 1 cm) naplněný 1,50 g *oxidu hlinitého neutrálního R* (60  $\mu$ m až 210  $\mu$ m). Eluuje se směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R*. Asi 9 ml eluátu se jímá do 10,0 ml odměrné baňky, přidá se 0,5 ml *kyseliny fosforečné R* a zředí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10,0 mg *efedrin-hydrochloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 1 mg *efedrin-hydrochloridu CRL* a 1 mg *terbutalin-sulfátu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *acetonitrilu R1* a roztoku *kyseliny fosforečné R* 0,1% (V/V) (15 + 85).

*Průtoková rychlost.* 2,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 207 nm.

*Nástřik.* 10  $\mu$ l.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času efedrinu.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozlišení:* nejméně 3,5 mezi píkem terbutalinu a píkem efedrinu.

Obsah efedrinu ( $C_{10}H_{15}NO$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 165,2}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 201,7}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku efedrinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_2$  – plochu píku efedrinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité pro přípravu zkoušeného roztoku, v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost *efedrin-hydrochloridu CRL* použité pro přípravu porovnávacího roztoku (a), v gramech;  
 $p$  – obsah efedrin-hydrochloridu v *efedrin-hydrochloridu CRL* v procentech.

## EQUISETI HERBA

7.4:1825

### Přesličková nat'

#### DEFINICE

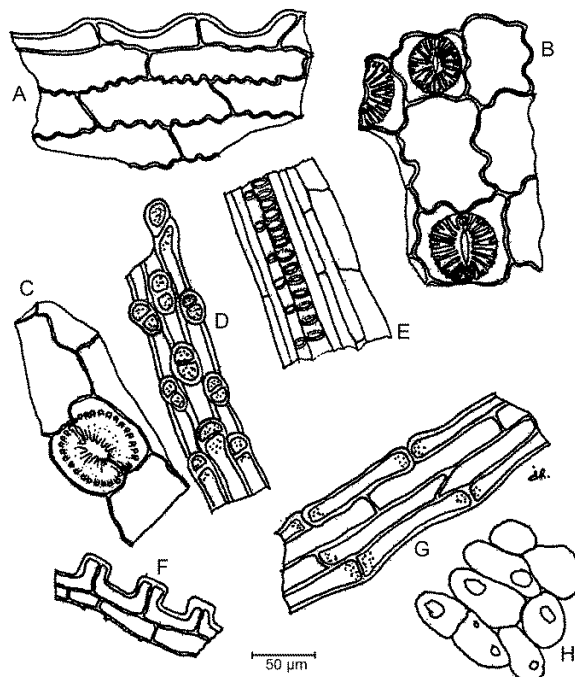
Je to celá nebo řezaná usušená sterilní nadzemní část druhu *Equisetum arvense* L.

*Obsah.* Nejméně 0,3 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako isokvercitosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Světle zelené nebo šedozelené úlomky rýhované hlavní lodyhy, větvi s podélnými ostrými žebry a přeslenitými listy na bázi srostlými v pochvě. Úlomky jsou na omak tuhé, křehké, při roztírání vržou. Hlavní lodyha má průměr asi 1,0 mm až 4,5 mm, je dutá, tvoří nodia v intervalu asi 1,5 cm až 4,5 cm a internodia se 4 až 14 (nebo více) zřetelnými podélnými rýhami. Centrální dutina je 25 % až 50 % průměru hlavní lodyhy. Lodyha je široce přeslenitě větvená, větve jsou vzpřímené, obvykle jednoduché, o průměru asi 1 mm, se 3 až 5 podélnými velmi ostrými žebry vycházejícími z nodia; na konci každého žebra je pod pokožkou vyčnívající zřetelný kolenchymatický uzlík. Větve nejsou duté. Lístky jsou malé, čárkovité, na bázi přeslenitě srostlé, počet zubů odpovídá počtu lodyžních žebor, jednotlivé zuby (často hnědé) jsou kopinaté trojúhelníkovité. První článek větve je vždy delší než lodyžní pochva.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky v plošném pohledu [B, C] složené z pravouhlých buněk ve dvou až čtyřech řadách, s vlnitými stěnami a paracytickými průduchy (2.8.3); dvě podpůrné buňky v úrovni pokožky s paprskovitými žebry, které kryjí svěrací buňku; malé křemičité částičky roztroušené na povrchu podpůrných buněk jsou četnější na okraji, kde tvoří výrazný kruh [C]; dvoubuněčné papily na žebrech, méně zřetelné na hlavní lodyze [A], velké a pravouhlé na podélných větvích [F]; po-

kožka hlavní lodyhy z podlouhlých buněk [G] v plošném pohledu, pokožka sekundárních větví s dvoubuněčnými papilami podobnými dvojici malých buněk oddělených velkou buňkou [D] v plošném pohledu; úlomky parenchymu z velkých buněk [H] a skupiny dlouhých nezdřevnatělých vláken s úzkým lumenem; malé šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlé cévy [E].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové přesličkové natě

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky *Equisetum palustre* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku (b) a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: zelenomodře fluoreskující skvrna	dvě červeně fluoreskující skvrny
hyperosid: oranžově fluoreskující skvrna	dvě zelenomodře fluoreskující skvrny
rutin: oranžově fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna
	dvě zelenomodře fluoreskující skvrny
<b>Porovnávací roztok (b)</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Equisetum palustre.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27). *Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a 10 min se zahřívá ve vodní lázni při 60 °C za občasného protřepávání, nechá se ochladit a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok (a).* Ke 100,0 mg *Equisetum palustre HRL* se přidá 10 ml *methanolu R*, 10 min se zahřívá ve vodní lázni při 60 °C za občasného protřepávání, nechá se ochladit a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok (b).* 1,0 mg *kyseliny kávové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (7,5 + 7,5 + 18 + 67).

*Nanášení.* 5 µl, do proužků 8 mm.

*Vyvíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* V proudu studeného vzduchu, 5 min.

*Detekce.* Zahřívá se 3 min při 100 °C. Ještě teplá deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se usušit v proudu studeného vzduchu a po 10 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Test způsobilosti.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou těsně nad startovní linií dvě zelenavě fluoreskující skvrny.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou zelenavě fluoreskující skvrny těsně nad startovní linií intenzivnější než odpovídající skvrny (charakteristické pro *E. palustre*) na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). 3,0 % až 15,0 %.

**Celkový popel** (2.4.16). 12,0 % až 27,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok.* 0,800 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Droga i chomáček vaty se vloží zpět do varné baňky a vaří se pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 min se 20 ml *acetonu R*. Nechá se ochladit a zfiltruje se pokračně přes chomáček vaty do baňky. Ochlazené spojené acetonové extrakty se zfiltrují přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se *acetonem R* použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-acetátu R*. Spojené horní vrstvy se promyjí dvakrát 50 ml *vody R*, zfiltruje se

přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem R* na 50,0 ml.

*Zkoušený roztok.* 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml *chloridu hlinitého RS1* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

*Kontrolní roztok.* 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako isokverciterosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 425 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance isokverciterosidu má hodnotu 500.

## EUCALYPTI ETHEROLEUM

6.8:0390

## Blahovičnicková silice

*Synonymum.* Eucalypti aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvých listů nebo čerstvých koncových větví různých druhů rodu *Eucalyptus* bohatých na 1,8-cineol, zejména *Eucalyptus globulus* LABILL., *Eucalyptus polybractea* R. T. BAKER. a *Eucalyptus smithii* R. T. BAKER., destilací s vodní parou a následným čištěním.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá nebo světle žlutá kapalina.

*Pach.* Po 1,8-cineolu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 50 µl *cineolu R* a 20 µl *α-terpineolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (10 + 90).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do 10mm [nebo 6mm] proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny v čele mobilní fáze a na úrovni  $\alpha$ -terpineolu.

Horní okraj desky	
1,8-cineol: fialovohnědá skvrna	intenzivní fialovohnědá skvrna (1,8-cineol)
$\alpha$ -terpineol: fialovohnědá skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Charakteristické píky  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu,  $\alpha$ -felandrenu, limonenu a 1,8-cineolu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčními časy těmto pikům na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny píky sabinenu a kafru.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,906 až 0,927.

**Index lomu** (2.2.6). 1,458 až 1,470.

**Optická otáčivost** (2.2.7). 0° až +10°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Rozpustnost v ethanolu** (2.8.10). Rozpouští se v pěti objemových dílech ethanolu 70% (V/V) R.

**Aldehydy.** 10 ml zkoušené látky se převede do zkumavky se zabroušenou zátkou o vnitřním průměru 25 mm a délce 150 mm, přidá se 5 ml toluenu R a 4 ml hydroxylaminhydrochloridu v ethanolu RS. Silně se protřepe a ihned se titruje hydroxidem draselným 0,5 mol/l v ethanolu 60% VS do změny červeného zbarvení na žluté. V titraci se pokračuje za protřepávání; bodu ekvivalence se dosáhne, jestliže se po důkladném třepání po dobu 2 min a následném oddělení vrstev nezmění žluté zbarvení dolní vrstvy. Reakce je ukončena asi do 15 min. Stanovení se opakuje s dalšími 10 ml zkoušené látky. Jako porovnávací roztok pro bod ekvivalence se použije ztitrovaný roztok z prvního stanovení, ke kterému se přidá 0,5 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu 60% VS. Při druhé titraci se spotřebují nejvýše 2,0 ml hydroxidu draselného 0,5 mol/l v ethanolu 60% VS.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 200  $\mu$ l se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 10  $\mu$ l  $\alpha$ -pinenu R, 5  $\mu$ l  $\beta$ -pinenu R, 5  $\mu$ l sabinenu R, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -felandrenu R, 10  $\mu$ l limonenu R, 50  $\mu$ l cineolu R a 5 mg kafru R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 5  $\mu$ l limonenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 50,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí heptanem R na 5,0 ml.

**Kolona:**

- **materiál:** tavený křemen;
- **rozměry:** délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m).

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5	60
	5–33	60 → 200
	33–38	200
nástříkový prostor		220
detektor		220

**Detekce.** Plamenionizační detektor.

**Nástřík.** 1  $\mu$ l.

**Eluční pořadí.** Jednotlivé látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (a):

- **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi pikem limonenu a pikem cineolu.

**Identifikace složek.** Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah jednotlivých složek v procentech. Obsahy v procentech jsou v rozmezích:

- $\alpha$ -pinen: 0,05 % až 10,0 %;
- $\beta$ -pinen: 0,05 % až 1,5 %;
- sabinen: nejvýše 0,3 %;
- $\alpha$ -felandren: 0,05 % až 1,5 %;
- limonen: 0,05 % až 15,0 %;
- 1,8-cineol: nejméně 70,0 %;
- kafr: nejvýše 0,1 %;
- **limit zanedbatelnosti:** plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## EUCALYPTI FOLIUM

6.0:1320

### Blahovičnickový list

**DEFINICE**

Je to celý nebo řezaný usušený list ze starších výhonků druhu *Eucalyptus globulus* LABILL.

**Obsah,** počítáno na bezvodou drogu:

- **silice:** nejméně 20 ml/kg neřezané drogy;
- **silice:** nejméně 15 ml/kg řezané drogy.

**VLASTNOSTI**

Droga má aromatický pach po cineolu.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Listy většinou šedo zelené, poměrně silné, protáhlé, oválné, mírně srpovitě zahnuté, většinou až 25 cm dlouhé a až 5 cm široké. Řapík je zkroutený, silně vrásčitý, 2 cm až 3 cm, řidčeji 5 cm dlouhý. Kožovité tuhé listy jsou celokrajné, lysé, se žlutozelenou střední žilkou. Postranní žilky anastomozují v blízkosti okraje čepele. Čepele je rovná a poněkud ztlustlá. Na obou stranách čepele jsou drobné nepravidelně roztroušené bradavčité tmavě hnědé skvrny. V procházejícím světle mohou být patrné malé siličné žlázy.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedo zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky lysé čepele, buňky pokožky malé, ztlustlé, kryté silnou kutikulou, četné anomocytické průduchy (2.8.3) o průměru více než 80 µm, občas skupiny hnědých korkových buněk o průměru 300 µm zbarvených uprostřed hnědočerně; úlomky monofaciálního mezofylu na obou stranách čepele s dvěma až třemi řadami palisádového parenchymu, uprostřed víceřadý houbový parenchym z protáhlých buněk orientovaných stejně jako buňky palisádového parenchymu, obsahující krystaly a drúzy šťavelanu vápenatého; úlomky mezofylu s velkými schizogenními siličnými nádržkami.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g čerstvě práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *toluenu R*, protřepává se 2 min až 3 min a pak se zfiltruje přes asi 2 g *síranu sodného bezvodého R*.

*Porovnávací roztok.* 50 µl *cineolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (10 + 90).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

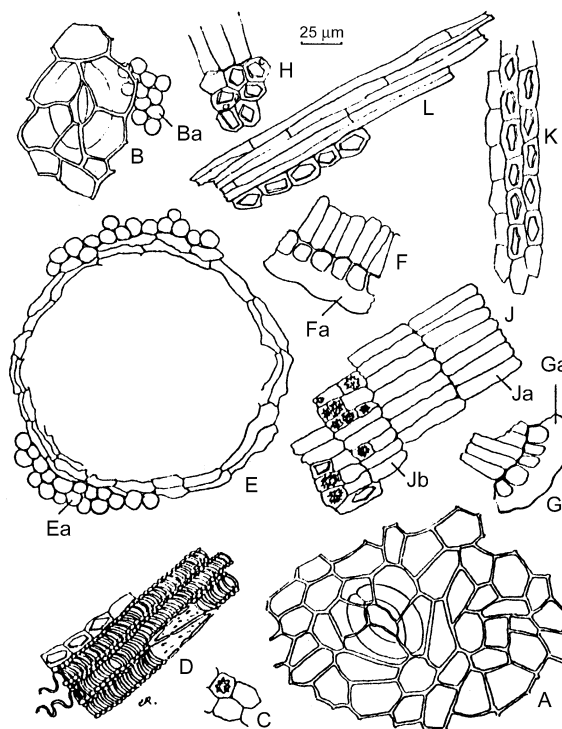
*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna odpovídající *cineolu*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně *cineolu* na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v blízkosti čela mobilní fáze intenzivní fialová skvrna (uhlovodíky) a mohou být přítomny další slabší skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % ztmavých a hnědých listů, nejvýše 5 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí. Nejsou přítomny srdčité nebo vejčité přisedlé listy z mladých výhonků, s četnými žlázkami na obou stranách, které jsou v procházejícím světle patrné jako body. Stanoví se s 30 g drogy.



- A = ztlustlé buňky pokožky a anomocytické průduchy – plošný pohled  
 B = ztlustlé buňky pokožky a anomocytické průduchy doprovázené palisádovým parenchymem (Ba) – plošný pohled  
 C = buňky parenchymu s drúzami šťavelanu vápenatého  
 D = cévní tkáň  
 E = schizogenní siličné žlázy doprovázené palisádovým parenchymem (Ea)  
 F a G = buňky pokožky kryté silnou kutikulou (Fa a Ga) – boční pohled  
 H a J = buňky palisádového parenchymu (Ja) doprovázené houbovým parenchymem (Jb) s krystaly a drúzami šťavelanu vápenatého  
 K = buňky s krystaly šťavelanu vápenatého  
 L = vlákna

**Obř. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškové drogy *blahovičnickového listu* (viz zkoušku totožnosti B)

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 10,0 g čerstvě řezané drogy se v 500ml baňce s kulatým dnem destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min se směsí 200 ml *vody R* a 100 ml *glycerolu R* jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R*.

## FAGOPYRI HERBA

6.0:2184

## Pohanková nať

## DEFINICE

Je to celá nebo řezaná nať druhu *Fagopyrum esculentum* MOENCH sbíraná v časné fázi kvetení před vytvořením plodů a ihned usušená.

**Obsah.** Nejméně 4,0 % rutinu ( $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ ;  $M_r$  664,6), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je válcovitá, dutá, jemně podélně rýhovaná, o průměru asi 2 mm až 6 mm, hnědozelená nebo načervenalá, slabě větvená, v internodiích ztlustlá; listy jsou uspořádány na lodyze šroubovitě, každý list je opatřen suchomázdřitou botkou; listy jsou na povrchu lysé, v oblasti botky mohou být krátké bílé chlupy. Listy jsou tmavozelené, na spodní straně světlejší, až 7 cm široké a 11 cm dlouhé, šípovité nebo srdčité, téměř pětiúhelníkovité se dvěma široce okrouhlými cípy; dolní listy jsou řapíkaté, horní přisedlé nebo objímavé; čepel je lysá, okraj slabě zvlněný s drobnými červenohnědými výčnělky; stejné výčnělky jsou na žilnatině na horní straně listu. Květenství je vrcholičnatá lata, jednotlivé květy jsou 1 mm až 2 mm dlouhé, o průměru 6 mm, s pěti volnými bílými nebo načervenalými korunními lístky.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je tmavozelený s malým množstvím hnědých, růžových nebo bělavě zbarvených částic. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky lodyhy a čepele listu, na plošném pohledu buňky lodyhy protáhlé, na zevní straně rýhované, buňky čepele listu mnohohranné s četnými anomocytickými průduchy; někdy úlomky listové čepele a pokožky nad žilnatinou s vejčitě až okrouhle papilnatými, často načervenalými výčnělky, se ztlustlými rýhovanými stěnami; četné drúzy šťavelanu vápenatého o průměru 25  $\mu$ m až 100  $\mu$ m a malé hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého roztroušené v mezofylu listu, v parenchymu lodyhy jsou uspořádány v podélných řadách; úlomky zdřevnatělé tkáně s dvůrkovitě tečkovanými nebo síťovitě ztlustlými cévami a tenkostěnnými tečkovanými vlákny; někdy úlomky koruny s papilnatou pokožkou; pylová zrna okrouhlá o průměru asi 50  $\mu$ m, s tečkovanou exinou a třemi klíčovými póry.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5,0 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem, ochladí se a zfiltruje.  
*Porovnávací roztok.* 10 mg *hyperosidu R* a 10 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (1 + 1 + 8).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Postříká se roztokem *difenylboryloxyethyl-aminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a následně roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, suší se asi 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	dvě červeně fluoreskující skvrny jedna až dvě světle modře fluoreskující skvrny
hyperosid: oranžově fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna oranžově fluoreskující skvrna dvě modře fluoreskující skvrny
rutin: oranžovožlutě fluoreskující skvrna	oranžovožlutě fluoreskující skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné drogy a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 30 ml roztoku *methanolu R 80% (V/V)* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem, pak se směs extrahuje 15 min v ultrazvukové lázni. Po ochlazení se zředí roztokem *methanolu R 80% (V/V)* na 50,0 ml a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok (a).* 25,0 mg *rutosidu trihydrátu CRL* se rozpustí v roztoku *methanolu R 80% (V/V)* a zředí se jím na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 20,0 mg *troxerutinu R* a 5,0 mg *kvercitrinu R* se rozpustí v roztoku *methanolu R 80% (V/V)* a zředí se jím na 50,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m);

– *teplota:* 30 °C.

**Mobilní fáze:**

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R*, jejíž pH se upraví *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2, (50 + 950);
- *mobilní fáze B:* směs objemových dílů *vody R*, jejíž pH se upraví *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2,0, a *acetonitrilu R* (95 + 905).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–6	94	6
6–16,5	94 → 85	6 → 15
16,5–22	85 → 76	15 → 24
22–25	76 → 59	24 → 41
25–27	59 → 94	41 → 6

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 350 nm.

*Nástrik.* 10 µl.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

- *eluční pořadí:* jsou-li chromatogramy zaznamenávány za předepsaných podmínek, eluují se látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku (b);
- *rozlišení:* nejméně 3 mezi pikem troxerutinu a pikem kvercitrinu.

Za použití retenčního času na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se určí pik odpovídající rutině na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah rutin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1} \cdot \frac{100}{100 - d}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku rutině na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku rutosidu trihydrátu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *rutosidu trihydrátu CRL* v gramech;
- $p$  – čistotu *rutosidu trihydrátu CRL* v procentech;
- $d$  – ztrátu sušením v procentech.

**FILIPENDULAE ULMARIAE HERBA**

**6.0:1868**

**Nať tužebníku jilmového**

**DEFINICE**

Je to celý nebo řezaný, usušený kvetoucí vrcholek nati druhu *Filipendula ulmaria* (L.) MAXIM. (*Spiraea ulmaria* L.).

*Obsah těkavých látek.* Nejméně 1 ml/kg vysušené drogy.

**VLASTNOSTI**

Droga má po rozdrobnění aromatický pach po methyl-salicylátu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Lodyha o průměru až 5 mm je zelenohnědá, tuhá, hranatá, s výjimkou horní části dutá, s pravidelnými, přímými, podélnými rýhami. Listy jsou přetřhaně lichozpeřené, řapíkaté, se dvěma červenohnědými hranatými palisty. List je složen ze tří až devíti párů nepravidelně zubatých lístků, některé z lístků jsou malé, vějířovité. Lístky jsou tmavozelené, na svrchní straně lysé, na spodní straně světlejší, plstnaté, často stříbřité. Koncový, trojlaločný lístek je největší. Žilnatina je hnědá, na spodní straně vyniklá. Květenství je složité, složené z velkého počtu květů uspořádaných v nepravidelně vrcholičnaté latě (kruželovité květenství). Květy jsou krémově bílé o průměru asi 3 mm až 6 mm; kalich je složen z pěti tmavozelených, po odkvětu dolů sehnutých lístků, na bázi vrůstajících do vpadlého lůžka; pět lístků korunních volných, snadno opadavých, světle žlutých, obvejčitých, naspodu zřetelně zúžených; velký počet tyčinek s okrouhlými prašníky, tyčinky vyčnívají z koruny; semeník je složen ze čtyř až šesti plodolistů, každý s krátkou čnělkou a kulovitou bliznou; plodolisty jsou navzájem stočené a tvoří žlutohnědé, šroubovitě stočené souplodí. V droze jsou často přítomné nerozvítené květy. Mohou být přítomny šroubovitě stočené plody, obsahující hnědá semena.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: jednobuněčné krycí chlupy dvojího typu, jedny velmi dlouhé, zkroucené, s tenkými stěnami, na konci tečkované, druhé kratší kuželovité, se ztlustlými stěnami, na bázi ztlustlé; někdy žláznaté hlavičkovité chlupy s jednobuněčnou až třibuněčnou jednořadou nohou a mnohobuněčnou hlavičkou s hustým hnědým obsahem; úlomky listů a kališních lístků z buněk se zprohýbanými stěnami, anomocytické průduchy (2.8.3) jen na spodní straně, v mezofylu drúzy šťavelanu vápenatého; pokožka korunních lístků z tenkostěnných buněk, na povrchu často bradavčitě vychlípených; četná kulovitá pylová zrna se třemi klíčovými póry a jemně tečkovanou exinou; úlomky vláknité vrstvy prašníků z hvězdovitě ztlustlých buněk; úlomky parenchymu semeníků z drobných buněk, obsahujících hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky šroubovitě a kruhovitě ztlustlých cév z listů a lodyh.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* Xylenový roztok ze zkoušky Stanovení obsahu.  
*Porovnávací roztok.* 0,1 ml *methyl-salicylátu R* a 0,1 ml *salicylaldehydu R* se rozpustí v *xylenu R* a zředí se jím na 5 ml.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *hexanu R* a *tolueny R* (50 + 50).  
*Nanášení.* 10 µl, do proužků.  
*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.  
*Sušení.* Na vzduchu.  
*Detekce.* Postříká se 3 ml *chloridu železitého RS3* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
methyl-salicylát: fialovohnědá skvrna	fialovohnědá skvrna (methyl-salicylát)
salicylaldehyd: fialovohnědá skvrna	fialovohnědá skvrna (salicylaldehyd)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí** (2.8.2). Nejvýše 5,0 % lodyh o průměru více než 5 mm a nejvýše 2,0 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 50,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 1000 ml baňce se 300 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* jako destilační tekutiny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylemu R*.

## FOENICULI AMARI FRUCTUS

6.0:0824

### Plod fenyklu obecného pravého

#### DEFINICE

Je to usušená dvojnážka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* MILLER ssp. *vulgare* var. *vulgare*.

#### Obsah:

- *silice*: nejméně 40 ml/kg bezvodé drogy;
- *anethol*: nejméně 60,0 % v silici;
- *fenchon*: nejméně 15,0 % v silici.

#### VLASTNOSTI

Plod fenyklu obecného pravého je zelenohnědý, hnědý nebo zelený.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Dvojnážka je téměř válcovitého tvaru s okrouhlou bází a užším vrcholem, s velkým stylopodiem. Většinou je 3 mm až 12 mm dlouhá a 3 mm až 4 mm široká. Nažky, obvykle jednotlivé, jsou lysé. Každá má pět vyčnívajících, lehce rýhovaných žeber. Na příčném řezu mohou být pod lupou patrné čtyři kanálky na straně dorzální a dva na straně poutcové.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedoohnědý až šedožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: žluté úlomky širokých sekrečních kanálků, tvořené mnohohrannými sekrečními buňkami se žlutohně-

dými stěnami často provázenými vrstvou tenkostěnných, mnohohranných, příčně protáhlých buněk 2 µm až 9 µm širokých, které jsou parketovitě uspořádány; síťovitý parenchym mezokarpu; četné svazky vláken ze žeber, často provázené úzkými šroubovitě ztlustlými cévami; velmi četné úlomky endospermu obsahující aleuronová zrna a velmi malé drúzy šťavelanu vápenatého; někdy také svazky vláken karpoforu.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,3 g čerstvě práškované drogy (1400) (2.9.12) se protřepává 15 min s 5,0 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se, filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 50 µl *anetholu R* a 10 µl *fenchonu R* se rozpustí v 5,0 ml *hexanu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *hexanu R* a *toluenu R* (20 + 80).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Ve střední části chromatogramů je skvrna *anetholu* zhášeující fluorescenci.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *kyselinou sírovou R* a zahřívá se 5 min až 10 min při 140 °C, dokud se v dolní třetině chromatogramů neobjeví žlutá skvrna *fenchonu*.

*Hodnocení B.* Ve střední části chromatogramů je fialová skvrna *anetholu*.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině červenohnědá skvrna (terpeny).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Estragol.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Směs *silice* a *xylemu R* získaná ve zkoušce *Silice* (viz Stanovení obsahu), se zředí *xylenem R* použitým k promývání přístroje na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *estragolu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylemu R*.

#### Kolona:

- *rozměry*: délka 30 m až 60 m, vnitřní průměr 0,3 mm;
- *stacionární fáze*: *makrogol 20 000 R*.

*Nosný plyn.* *Dusík pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 0,40 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 200.

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–4	60
	4–26	60 → 170
	26–41	170
nástříkový prostor		220
detektor		270

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.



Nástřík. 1 µl.

Limity:

– *estragol*: nejvýše 5,0 % v silici získané ve Stanovení obsahu.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1,5 % stopek a nejvýše 1,5 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 80 ml/kg; stanoví se se 20,0 g práškové drogy (710) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

STANOVENÍ OBSAHU

**Silice**. Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). Droga se rozdrtí na hrubý prach (1400) (2.9.12) a 5,0 g se ihned použije ke stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 200 ml vody R jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

**Anethol a fenchon**. Plynová chromatografie (2.2.28) popsána ve zkoušce *Estragol* (viz Zkoušky na čistotu) s následující úpravou.

*Porovnávací roztok*. 5 mg *fenchonu R* a 5 mg *anetholu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R*.

*Eluční pořadí*. Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## FOENICULI AMARI FRUCTUS ETHEROLEUM

6.0:1826

Silice plodu fenyklu obecného pravého

*Synonyma*. *Foeniculi amari fructus aetheroleum*,  
Silice plodu fenyklu hořkého

DEFINICE

Je to silice získaná ze zralých plodů druhu *Foeniculum vulgare* MILLER ssp. *vulgare* var. *vulgare* destilací s vodní parou.

*Obsah*:

- fenchon: 12,0 % až 25,0 %;
- *trans*-anethol: 55,0 % až 75,0 %.

VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina charakteristického pachu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,1 ml se rozpustí v 5 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok*. 10 µl *fenchonu R* a 80 µl *anetholu R* se rozpustí v 5 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení*. 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu 96% R* a zahřívá se 15 min při 150 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: tmavomodrá až tmavofialová skvrna	tmavomodrá až tmavofialová skvrna (anethol)
fenchon: modrá nebo modrošedá skvrna	modrá nebo modrošedá skvrna (fenchon)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Retenční časy charakteristických piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům piků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,961 až 0,975.

**Index lomu** (2.2.6). 1,528 až 1,539.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +10,0° až +24,0°; měří se úhel optické otáčivosti.

**Chromatografický profil**. Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok*. 0,20 ml se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok*. 20 µl *α-pinenu R*, 20 µl *limonenu R*, 50 µl *fenchonu R*, 20 µl *estragolu R*, 100 µl *anetholu R* a 20 µl *anisaldehydu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

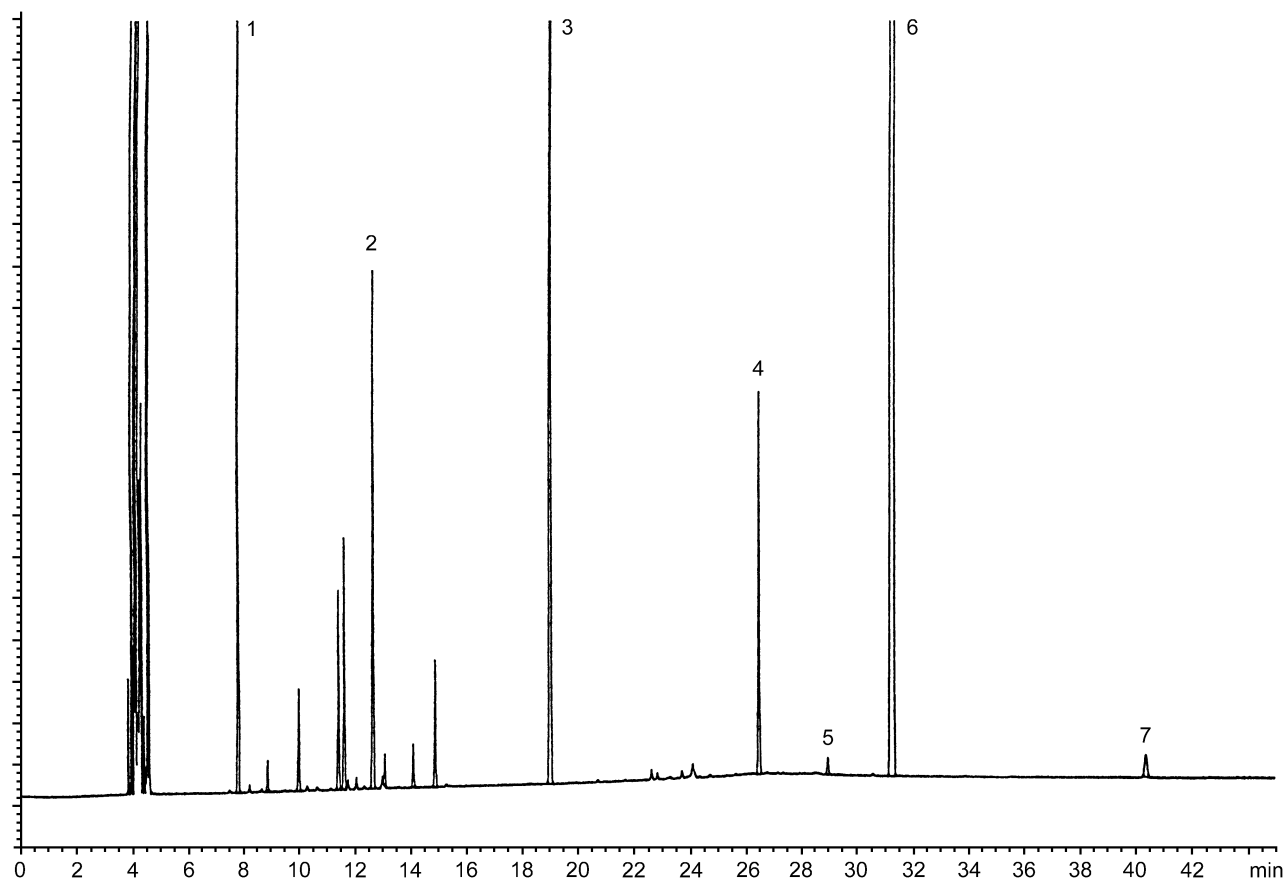
*Kolona*:

- *materiál*: tavený křemen;
- *rozměry*: délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze*: *makrogol 20 000 R* (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn*. *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost*. 1 ml/min.

*Dělicí poměr*. 1 : 200.



1 =  $\alpha$ -pinen                      2 = limonen                      3 = fenchon                      4 = estragol  
5 = *cis*-anethol                      6 = *trans*-anethol                      7 = anisaldehyd

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v Silici plodu fenyklu hořkého

Teplota:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–4	60
	4–26	60 → 170
	26–41	170
nástřikový prostor		220
detektor		270

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1,0  $\mu$ l.

*Eluční pořadí.* Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 5,0 mezi pikem estragolu a pikem *trans*-anetholu.

Za použití retenčních časů získaných z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku a pík *cis*-anetholu se identifikuje za použití obrázku 1 (nepřihlíží se k piku heptanu).

Vypočítají se obsahy těchto látek v procentech, které se pohybují v mezích:

- $\alpha$ -pinen: 1,0 % až 10,0 %;
- limonen: 0,9 % až 5,0 %;
- fenchon: 12,0 % až 25,0 %;
- estragol: nejvýše 6,0 %;

- *cis*-anethol: nejvýše 0,5 %;
  - *trans*-anethol: 55,0 % až 75,0 %;
  - anisaldehyd: nejvýše 2,0 %.
- Poměr obsahu  $\alpha$ -pinenu k obsahu limonenu je větší než 1,0.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných zcela naplněných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## FOENICULI AMARI HERBAE ETHEROLEUM

7.0:2380

Silice z natě fenyklu obecného pravého

*Synonyma.* Foeniculi amari herbae aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z nadzemních částí druhu *Foeniculum vulgare* MILLER ssp. *vulgare* var. *vulgare* sklizených v době zralosti destilací vodní parou

#### VLASTNOSTI

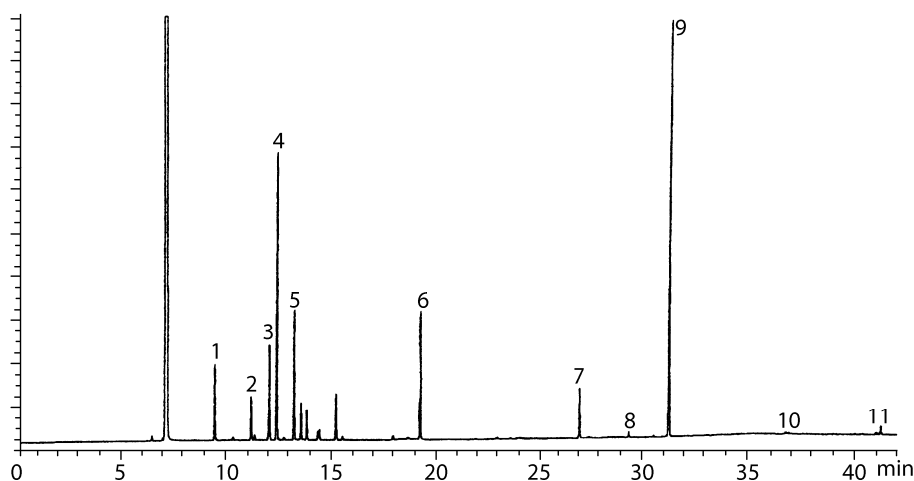
*Vzhled.* Čirá světle nebo intenzivně žlutá kapalina.

Pach po anýzu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

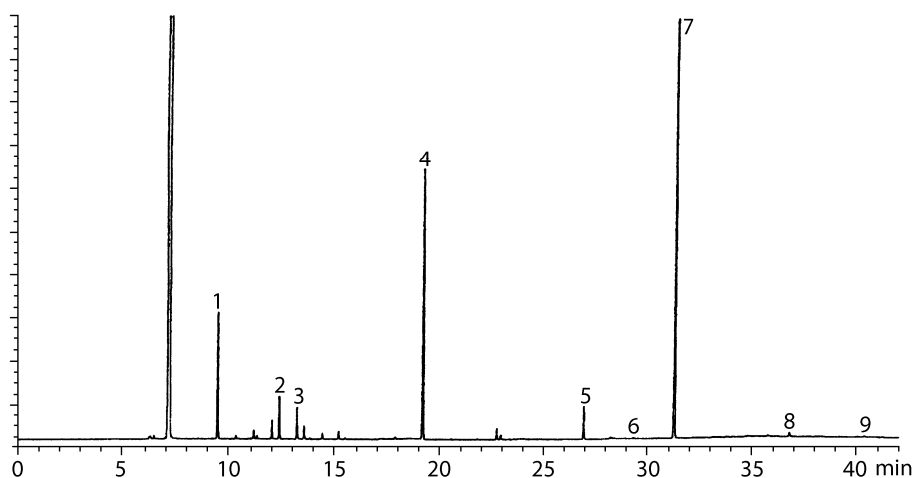
1.: B.

2.: A.



- 1 =  $\alpha$ -pinen
- 2 =  $\beta$ -pinen
- 3 =  $\beta$ -myrcen
- 4 =  $\alpha$ -felandren
- 5 = limonen
- 6 = fenchon
- 7 = estragol
- 8 = *cis*-anethol
- 9 = *trans*-anethol
- 10 = anisaldehyd
- 11 = anýzový keton

**Obr. 1** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v silici z natě fenyklu obecného pravého, španělského typu



- 1 =  $\alpha$ -pinen
- 2 =  $\alpha$ -felandren
- 3 = limonen
- 4 = fenchon
- 5 = estragol
- 6 = *cis*-anethol
- 7 = *trans*-anethol
- 8 = anisaldehyd
- 9 = anýzový keton

**Obr. 2** Chromatogram pro zkoušku Chromatografický profil v silici z natě fenyklu obecného pravého, tasmanického typu

#### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 ml se rozpustí v 5 ml toluenu R.

*Porovnávací roztok.* 10  $\mu$ l fenchonu R a 40  $\mu$ l anetholu R se rozpustí v 5 ml toluenu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 3  $\mu$ l], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 8 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se čerstvě připraveným roztokem kyseliny fosfomolybdenové R (200 g/l) v ethanolu 96% R a zahřívá se 15 min při 150 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: tmavomodrá nebo tmavofialová skvrna	tmavomodrá nebo tmavofialová skvrna (anethol)
fenchon: modrá nebo modrošedá skvrna	někdy světle modrá nebo modrošedá skvrna (fenchon)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení:*

- *španělský typ:* retenční časy charakteristických píků  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu,  $\beta$ -myrcenu,  $\alpha$ -felandrenu, limonenu, fenchonu, estragolu a *trans*-anetholu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- *tasmanický typ:* retenční časy charakteristických píků  $\alpha$ -pinenu,  $\alpha$ -felandrenu, limonenu, fenchonu, estragolu a *trans*-anetholu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5):

- španělský typ: 0,877 až 0,921;
- tasmánský typ: 0,940 až 0,973.

**Index lomu** (2.2.6):

- španělský typ: 1,487 až 1,501;
- tasmánský typ: 1,512 až 1,538.

**Optická otáčivost** (2.2.7), měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky:

- španělský typ: +42° až +68°;
- tasmánský typ: +11° až +35°.

**Rozpustnost v ethanolu** (2.8.10):

- španělský typ: 1 objemový díl je rozpustný ve 2 a více objemových dílech ethanolu 90% (V/V) R.
- tasmánský typ: 1 objemový díl je rozpustný v 10 a více objemových dílech ethanolu 85% (V/V) R.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

Zkoušený roztok. 0,20 ml se rozpustí v acetonu R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20 µl α-pinenu R, 10 µl β-pinenu R, 20 µl β-myrcenu R, 20 µl α-felandrenu R, 20 µl limonenu R, 40 µl fenchonů R, 10 µl estragolu R, 40 µl anetholu R, 10 µl anisaldehydu R a 10 µl anýzového ketonu R se rozpustí v acetonu R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 µl anetholu R se rozpustí ve 25,0 ml acetonu R. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí acetonem R na 20,0 ml.

**Kolona:**

- materiál: tavený křemen;
- rozměry: délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- stacionární fáze: makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

Nosný plyn. Helium pro chromatografii R.

Průtoková rychlost. 1 ml/min.

Dělicí poměr. 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–35	70 → 210
	35–42	210
nástříkový prostor		250
detektor		270

Detekce. Plamenoionizační detektor.

Nástřík. 1 µl.

Eluční pořadí. Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku; zaznamenají se retenční časy těchto látek.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (a):

- rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem β-myrcenu a píkem α-felandrenu.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se na chromatogramu zkoušeného roztoku identifikují složky příslušející danému typu zkoušené silice; pík cis-anetholu se identifikuje za použití obrázků 1 a 2.

Stanoví se obsah jednotlivých složek v procentech.

Pro silici z natě fenyklu obecného pravého, španělského typu jsou limity v následujících rozmezích:

- α-pinen: 2,0 % až 8,0 %;
- β-pinen: 1,0 % až 4,0 %;
- β-myrcen: 1,0 % až 12,0 %;
- α-felandren: 1,0 až 25,0 %;
- limonen: 8,0 % až 30,0 %;
- fenchon: 7,0 % až 16,0 %;
- estragol: 2,0 % až 7,0 %;
- cis-anethol: nejvýše 0,5 %;
- trans-anethol: 15,0 % až 40,0 %;
- anisaldehyd: nejvýše 1,0 %;
- anýzový keton: nejvýše 0,05 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,025 %).

Pro silici z natě fenyklu obecného pravého, tasmánského typu jsou limity v následujících rozmezích:

- α-pinen: 2,0 % až 11,0 %;
- α-felandren: 1,0 až 8,5 %;
- limonen: 1,0 % až 6,0 %;
- fenchon: 10,0 % až 25,0 %;
- estragol: 1,5 % až 6,0 %;
- cis-anethol: nejvýše 0,5 %;
- trans-anethol: 45,0 % až 78,0 %;
- anisaldehyd: nejvýše 1,0 %;
- anýzový keton: nejvýše 0,05 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,025 %).

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede, zda je silice španělského nebo tasmánského typu.

**FOENICULI DULCIS FRUCTUS**

7.1:0825

**Plod fenyklu obecného sladkého****DEFINICE**

Je to usušená dvojnažka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* MILLER ssp. *vulgare* var. *dulce* (MILLER) BATTANDIER et TRABUT.

**Obsah:**

- silice: nejméně 20 ml/kg bezvodé drogy;
- anethol: nejméně 80,0 % v silici.

**VLASTNOSTI**

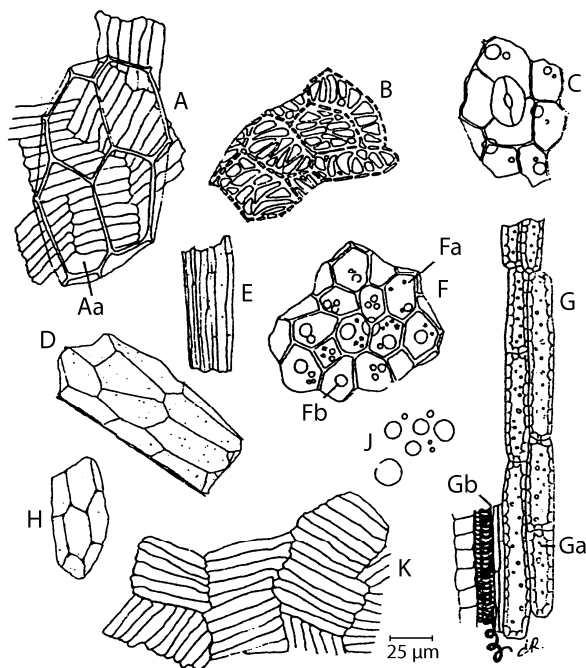
Plod je světle zelený nebo světle žlutohnědý.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- Dvojnažka je téměř válcovitého tvaru s okrouhlou bází a užším vrcholem s velkým stylopodiem. Většinou je 3 mm až 12 mm dlouhá a 3 mm až 4 mm široká. Nažky, obvykle jednotlivé, jsou lysé. Každá má pět vyčnívajících, lehce rýhovaných žeber. Na příčném řezu mohou

být pod lupou patrné čtyři kanálky na straně dorzální a dva na straně poutcové.

- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedohnědý nebo šedožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): žluté úlomky širokých sekrečních kanálků, často tvořené mnohohrannými sekrečními buňkami se žlutohnědými stěnami [D, H]; síťovitý parenchym mezokarpu [B]; četné svazky vláken [G] ze žebér [Ga], často provázené úzkými šroubovitě ztlustlými cévami [Gb]; velmi četné úlomky endospermu [F] obsahující aleuronová zrna [Fb] a velmi malé drúzy kalcium-oxalátu [Fa]; svazky vláken karpoforu [E]; úlomky endokarpu v plošném pohledu [K, A]



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového plodu feykyku obecného sladkého

z tenkostěnných příčně protáhlých buněk 2 µm až 9 µm širokých, parketovitě uspořádaných, občas doprovázených vnitřní vrstvou mezokarpu [Aa]; úlomky epikarpu s průduchy a s kapkami oleje [C]; velmi četné kapky oleje [J].

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,3 g čerstvě práškové drogy (1400) (2.9.12) se 15 min protřepává s 5,0 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 60 µl *anetholu R* se rozpustí v 5,0 ml *hexanu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *hexanu R* a *toluenu R* (20 + 80).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků 20 mm × 3 mm.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna zhášeující fluorescenci odpovídající anetholu.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *kyselinou sírovou R*, zahřívá se 5 min při 140 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramech je ve střední části fialová skvrna odpovídající anetholu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině červenohnědá skvrna (terpeny).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Estragol a fenchon.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Směs *silice a xylenu R* získaná ve zkoušce Stanovení obsahu, *silice* se zředí *xylemem R* použitým k promývání přístroje na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *estragolu R* a 5 mg *fenchonu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R*.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 30 m až 60 m, vnitřní průměr 0,3 mm;  
– *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Dusík pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 0,40 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 200.

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–4	60
	4–26	60 → 170
	26–41	170
nástřikový prostor		220
detektor		270

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1 µl.

*Limity:*

– *estragol:* nejvýše 10,0 % v *silici*;

– *fenchon:* nejvýše 7,5 % v *silici*.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1,5 % stopek a nejvýše 1,5 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 80 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (710) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice.** Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 500ml baňce s kulatým dnem za použití 10,0 g drogy rozdrcené na hrubý prach (1400) (2.9.12) a ihned použité ke stanovení 200 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R* a destiluje se nejméně 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

**Anethol.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsaná ve zkoušce Estragol a fenchon (viz Zkoušky na čistotu) s následující úpravou.

Porovnávací roztok. 5 mg anetholu R se rozpustí v 0,5 ml xylenu R.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## FRANGULAE CORTEX

7.1:0025

### Krušinová kůra

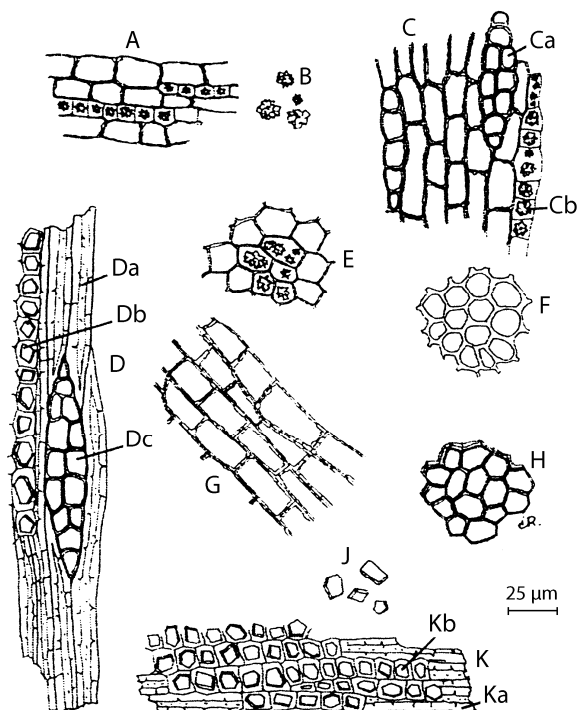
#### DEFINICE

Je to usušená kůra nebo její úlomky z kmenů a větví druhu *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* MILL.).

Obsah. Nejméně 7,0 % glukofrangulinů, vyjádřeno jako glukofrangulin A ( $C_{27}H_{30}O_{14}$ ;  $M_r$  578,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Zprohýbané, většinou ploché nebo svinuté úlomky nebo jednoduché až dvojité rourkovité kousky obvykle 0,5 mm až 2 mm silné, proměnlivé délky a šířky, na zevní straně šedohnědé nebo tmavohnědé, podélně svrstělé, s četnými našedlými, příčně protáhlými lenticelami. Po odstranění zevních vrstev je kůra tmavě červená, vnitřní strana je oranžovohnědá až červenohnědá, hladká, s jemným podélným rýhováním. Alkalickými roztoky se barví červeně. Lom je krátký, na vnitřní straně vláknitý.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je nažloutlý nebo červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné svazky lýkových vláken, v šikmém řezu [D] nebo v podélném řezu



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové krušinové kůry

[K], částečně zdřevnatělé, ve skupinách [Da, Ka] s kormůrkami obsahujícími hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Db, Kb], občas dřevové paprsky [Dc]; červenohnědé úlomky korku [H]; úlomky parenchymu lýka v podélném řezu [G] obsahující drúzy krystalů kalcium-oxalátu [A, E] nebo v šikmém řezu [C] zahrnující dřevové paprsky [Ca] a buňky obsahující drúzy krystalů kalcium-oxalátu [Cb]; několik úlomků kolenchymu [F]; izolované drúzy [B] a hranolovité krystaly [J] kalcium-oxalátu.

- C.** Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce A Jiné druhy rodu *Rhamnus*, anthrony (viz Zkoušky na čistotu); pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. *Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině dvě oranžovohnědé skvrny (glukofranguliny) a v horní třetině dvě až čtyři červené skvrny (franguliny, které nejsou vždy zřetelně oddělené, a nad nimi frangula-emodin).
- D.** Asi 50 mg práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá s 25 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni. Nechá se ochladit, protřepe se 20 ml etheru R a vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 10 ml amoniaku zředěného RS1; vodná vrstva se zbarví červenofialově.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Jiné druhy rodu *Rhamnus*; anthrony.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,5 g práškové drogy (180) (2.9.12) se přidá 5 ml ethanolu 70% (V/V) R a zahřeje se k varu. Ochladí se a odstředí. Supernatantní tekutina se ihned slijí a použije se do 30 min.

*Porovnávací roztok.* 20 mg aloinu R se rozpustí v ethanolu 70% (V/V) R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (dvě desky).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, methanolu R a ethyl-acetátu R (13 + 17 + 100).

**A. Nanášení.** 10 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu, 5 min.

*Detekce.* Postříká roztokem hydroxidu draselného R (50 g/l) v ethanolu 50% (V/V) R a suší se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části hnědožlutá skvrna odpovídající aloinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna fluoreskující intenzivně žlutě nebo skvrna fluoreskující oranžově nebo načervenalé odpovídající polohou poloze skvrny aloinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**B. Nanášení.** 10 μl; zkoušený roztok, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu, nejvýše 5 min.

*Detekce.* Postříká se ihned roztokem *modři nitrotetrazo-liové R* (5 g/l) v *methanolu R* a ihned se pozoruje.

*Hodnocení.* Na chromatogramu nejsou žádné fialové nebo šedomodré skvrny.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,250 g práškované drogy (180) (2.9.12) se odváží do předem zvážené baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem. Přidá se 25,0 ml *methanolu R* 70% (V/V), promíchá se a zváží. Zahřívá se 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem, po ochlazení se znovu zváží a doplní se *methanolem R* 70% (V/V) na původní hmotnost. Pak se zfiltruje, 5,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 50 ml *vody R* a 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Protřepe se pětkrát 20 ml *petroletheru R*. Po oddělení vrstev se vodná vrstva převede do 100ml odměrné baňky. Spojené petroletherové vrstvy se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*. Tato voda se použije k promytí dělicí nálevky a spojí se s vodnou vrstvou v odměrné baňce. Přidá se 5 ml roztoku *uhlíčitánu sodného R* (50 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Petroletherová vrstva se odstraní. 40,0 ml vodného roztoku se převede do 200ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem. Přidá se 20 ml roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) a zahřívá se 20 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 20 min za častého protřepávání do rozpuštění sraženiny. Nechá se ochladit, směs se převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, kterým byla vždy nejprve promyta baňka. Spojené etherové vrstvy se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*, etherové vrstvy se převedou do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Měří se absorbance (2.2.25) při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah glukofrangulinů v procentech, vyjádřeno jako glukofrangulin A (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>), podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 3,06}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance glukofrangulinu A má hodnotu 204.

## FRANGULAE CORTICIS EXTRACTUM SICCCUM NORMATUM

6.5:1214

Extrakt z kůry krušiny suchý standardizovaný

#### DEFINICE

Je to suchý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Frangulae cortex* (0025).

*Obsah.* 15,0 % až 30,0 % glukofrangulinů, vyjádřeno jako glukofrangulin A (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>; M<sub>r</sub> 578,5), počítáno na vysušený extrakt. Zjištěný obsah se liší od obsahu uvedeného v označení na obalu nejvýše o ±10 %.

#### VÝROBA

Vyrábí se z rostlinné drogy a ethanolu [50% až 90% (V/V)] vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutohnědý jemný prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,05 g se smíchá s 5 ml *ethanolu* 70% (V/V) *R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se odstředí a supernatantní tekutina se ihned slije a použije se do 30 min.

*Porovnávací roztok.* 20 mg *aloinu R* se rozpustí v *ethanolu* 70% (V/V) *R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (13 + 17 + 100).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu, 5 min.

*Detekce.* Postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *ethanolu* 50% (V/V) *R* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se ihned po zahřátí.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině červenohnědá skvrna odpovídající *aloinu*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině dvě oranžovohnědé skvrny (glukofranguliny) a v horní třetině dvě až čtyři červené skvrny (franguliny, které nejsou vždy zřetelně oddělené, a nad nimi skvrna frangulaemodinu).

**B.** K asi 25 mg se přidá 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni. Nechá se ochladit, protřepe se 20 ml *etheru R* a vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 10 ml *amoniaku zředěného RSI*; vodná vrstva se zbarví červenofialově.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 5,0 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>4</sup> CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>2</sup> CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

## STANOVENÍ OBSAHU

Provádí se za chránění před přímým světlem.

0,100 g se v předem zvážené baňce s kulatým dnem se zabroušenou zátkou smíchá s 25,0 ml roztoku *methanolu R 70% (V/V)*, promíchá se a znovu se zváží. Baňka se zahřívá 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem při 70 °C. Nechá se ochladit, zváží se a doplní se roztokem *methanolu R 70% (V/V)* na původní hmotnost. Zfiltruje se, 5,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 50 ml *vody R* a 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Protřepe se pětkrát 20 ml *petroletheru R1*. Po oddělení vrstev se vodná vrstva převede do 100ml odměrné baňky. *Petroletherové* vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml *vody R*. Tato voda se použije k promytí dělicí nálevky a spojí se s vodným roztokem v odměrné baňce. Přidá se 5 ml roztoku *uhlíčitánu sodného R (50 g/l)* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. *Petroletherová* vrstva se odstraní. 40,0 ml vodného roztoku se převede do 200ml baňky s kulatým dnem se zabroušenou zátkou. Přidá se 20 ml roztoku *chloridu železitého R (200 g/l)* a zahřívá se 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 20 min za častého protřepávání do rozpuštění sraženiny. Nechá se ochladit, směs se převede do dělicí nálevky a protřepává se třikrát 25 ml *etheru R*, kterým byla nejprve promyta baňka. Spojené etherové vrstvy se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*. Etherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R (5 g/l)* v *methanolu R*. Měří se absorbance (2.2.25) při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah glukofrangulinů v procentech, vyjádřeno jako glukofrangulin A (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 3,06}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného přípravku v gramech.

Specifická absorbance glukofrangulinu A má hodnotu 204, počítáno na základě specifické absorbance aloinu.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede obsah glukofrangulinů.

## FRAXINI FOLIUM

7.5:1600

Jasanový list

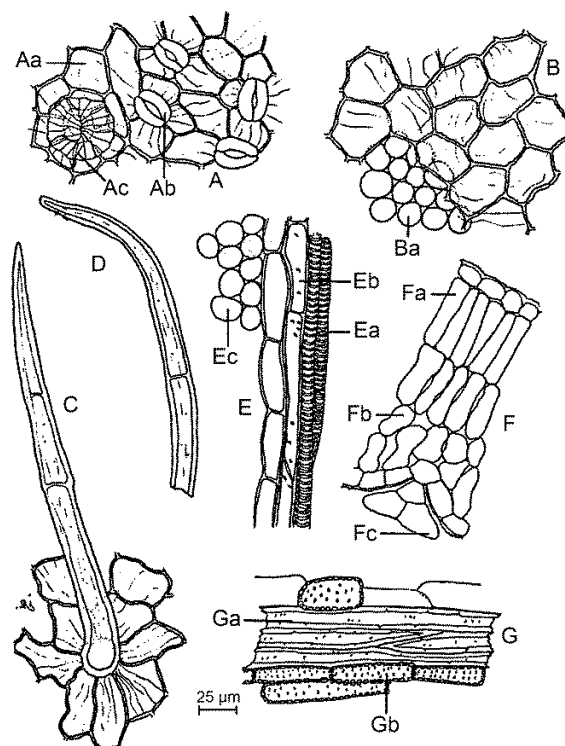
## DEFINICE

Jsou to usušené listy druhu *Fraxinus excelsior* L. nebo *Fraxinus angustifolia* VAHL (syn. *Fraxinus oxyphylla* M. BIEB) nebo jejich kříženců, nebo jejich směs.

**Obsah.** Nejméně 2,5 % celkových derivátů kyseliny hydroxykořicové, vyjádřeno jako kyselina chlorogenová (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>; M<sub>r</sub> 354,3), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je složen z lístků, které jsou často jednotlivé, oddělené od řapíku. Lístek je asi 6 cm dlouhý a 3 cm široký, přisedlý nebo krátce řapíkatý, protáhlý, kopinatý, často na bázi nepravidelný, na vrcholu zašpičatělý; čepel lístku má jemně pilovitý okraj. Svrchní strana lístku je tmavozelená, spodní strana šedozelená. Střední žilka a postranní žilky jsou bělavé, na spodní straně čepelky vyniklé.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky svrchní pokožky čepelky lístku v plošném pohledu [B] s některými buňkami s rýhovanou kutikulou, doprovázené palisádovým parenchymem [Ba]; úlomky spodní pokožky čepelky lístku v plošném pohledu [A] s buňkami s jemnou rýhovanou kutikulou [Aa] a četnými anomocytickými průduchy [Ab] (2.8.3), vzácně štítovitě žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a žláznatou hlavičkou tvořenou paprskovitě uspořádanými buňkami [Ac]; úlomky čepelky lístku v příčném řezu [F] se dvěma vrstvami palisádového parenchymu [Fa] a houbovým parenchymem [Fb], někdy žláznaté chlupy usazené v pokožce [Fc]; zřídka mnohobuněčné jednořadé kuželovité krycí chlupy tvořené buňkami se ztlustlými stěnami a rýhovanou kutikulou, buď s buňkami pokožky [C], nebo jejich úlomky [D]; úlomky cévních svazků lístku [E] tvořené spirálovitými cévami [Ea], krátkými vlákny [Eb] a někdy palisádovým parenchymem [Ec]; úlomky cévních svazků žilek [G] tvořené vlákny [Ga], někdy provázené buňkami z dřevných paprsků se ztlustlými tečkovanými stěnami [Gb].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového jasanového listu



C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Fraxinus ornus* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Intenzita skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku může velmi záviset na přítomnosti *F. excelsior*, *F. angustifolia*, jejich kříženců nebo na jejich koncentraci ve směsi. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (akteosid) může být přítomna světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
rutin: oranžově fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna oranžově fluoreskující skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměši** (2.8.2). Nejvýše 3,0 % stonků a nejvýše 2,0 % ostatních cizích příměsí.

**Fraxinus ornus.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 20 ml *methanolu R*, míchá se 10 min magnetickým míchadlem a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *rutinu R* a 5 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 4 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Zahřívá se 3 min při 100 °C, ještě teplá vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a suší se na vzduchu. Postříká se roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R* a suší se na vzduchu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** V horní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou žádné intenzivní světle modře fluoreskující skvrny.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Zkoušený roztok (a).** 0,300 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 95 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, vaří se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem a nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 5 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, filtrát a promývací tekutina se spojí v odměrné baňce a zředí se *ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok (b).** 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se ve zkumavce smíchá se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS* a 2 ml roztoku připraveného rozpuštěním 10 g *dusitanu sodného R* a 10 g *molybdenanu sodného R* ve 100 ml *vody R*, potom se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml; promíchá se. Ihned se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku (b) při 525 nm za použití porovnávacího roztoku připraveného takto: 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se smíchá se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS* a se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Obsah celkových derivátů kyseliny hydroxyskořicové v procentech, vyjádřeno jako kyselina chlorogenová (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 5,3}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci zkoušeného roztoku při 525 nm;

*m* – hmotnost zkoušené rostlinné drogy v gramech.

Specifická absorbance kyseliny chlorogenové při 525 nm má hodnotu 188.

## FUCUS

6.0:1426

### Chaluha

*Synonymum.* Fucus vel Ascophyllum

#### DEFINICE

Jsou to úlomky usušené stélky druhu *Fucus vesiculosus* L. nebo *Fucus serratus* L. nebo *Ascophyllum nodosum* Le JOLIS.

**Obsah.** 0,03 % až 0,2 % celkového jodu (*A<sub>r</sub>* 126,9), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má slanou slizovitou chuť a nepříjemný mořský pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Rohovité černohnědé až zelenohnědé úlomky jsou někdy pokryté bílým náletem. Stélka je tvořena pentlicovitými vidličnatě větvenými čepelemi s vyniklým středním žebrem (nepravé cévy).

*Fucus vesiculosus:* stélka listovitá celokrajná, někdy s vejčitými vzduchovými plovacími měchýřky umístěnými jednotlivě nebo v páru. Na konci vejčitých, mírně rozšířených větví stélky jsou četné rozmnožovací orgány (tzv. konceptakula).

*Fucus serratus*: stélka listovitá s okrajem zubatým, bez plovacích měchýřků. Větve nesoucí konceptakula jsou méně vyduté.

*Ascophyllum nodosum*: stélka nepravidelně větvená, bez středního žebra, s jednotlivými vzduchovými měchýřky vejčitého tvaru. Na konci malých větví jsou srpkovitá konceptakula.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky povrchové tkáně s pravidelnými izodiametrickými buňkami s hnědým obsahem a úlomky vnitřní tkáně s bezbarvými protáhlými buňkami uspořádanými v dlouhá vlákna, mezi nimiž jsou velké slizové dutiny. Někdy jsou patrné ztlustlé buňky pseudocév uspořádané v řadách za sebou i v uzavřených skupinách.
- C.** 1 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 20 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R 2% (V/V)*. Důkladně se protřepe a zfiltruje se. Zbytek se promyje 10 ml *vody R* a zfiltruje se. Ke zbytku se přidá 10 ml roztoku *uhlíčitanu sodného R* (200 g/l), protřepe se a odstředí, pH čiré supernatantní tekutiny se upraví *kyselinou sírovou R* na hodnotu 1,5; pomalu vzniká bílá vločkovitá sraženina.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Arsen** (2.4.27). Nejvýše 90 µg/g.

**Kadmium** (2.4.27). Nejvýše 4 µg/g.

**Olovo** (2.4.27). Nejvýše 5 µg/g.

**Rtuť** (2.4.27). Nejvýše 0,1 µg/g.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 6.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 24 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Celkový jod.** 1,000 g práškové drogy se ve vysokém křemenném kelímku smíchá s 5 ml *vody R* a 5 g *hydroxidu draselného R*. Směs se promíchá hořčičovou tyčinkou a zahřívá se na vodní lázni. Pak se přidá 1 g *uhlíčitanu draselného R*, promíchá se, přidá se špička hořčičové tyčinky se zbytky drogy a suší se nejprve na vodní lázni a pak nad přímým plamenem. Teplota žihání se postupně zvyšuje nejvýše do 600 °C. Nechá se ochladit, přidá se 20 ml *vody R* a za míchání skleněnou tyčinkou se zahřeje opatrně k varu. Horká směs se zfiltruje přes neskládaný filtr do kuželové baňky. Zbytek se promyje čtyřikrát 20 ml horké *vody R*, kelímek a filtr 50 ml horké *vody R*. Takto získané roztoky se spojí, nechají se ochladit a neutralizují se *kyselinou sírovou zředěnou RS* za použití *oranže methylové RS*. Přidají se 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 1 ml *bromové vody R*; roztok je žlutý. Po 5 min se přidá 0,6 ml roztoku *fenolu R* (50 g/l); roztok je čirý. Okyselí se 5 ml *kyselinou fosforečnou R*, přidá se 0,2 g *jodidu draselného R* a nechá se stát 5 min za chránění před světlem. Titruje se *thiosíranem*

*sodným 0,01 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* odpovídá 0,2115 mg jodu.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvedou přítomné druhy chaluhy.

## FUMARIAE HERBA

6.8:1869

### Zeměděmová nať

#### DEFINICE

Je to celá nebo rozlámaná usušená nať druhu *Fumaria officinalis L.*, sklizená v době plného květu.

**Obsah.** Nejméně 0,40 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako protopin ( $C_{20}H_{19}NO_5$ ;  $M_r$  353,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je dutá, hranatá, světle zelená nebo zelenohnědá. Listy jsou střídavé, dvakrát zpeřené se dvěma nebo třemi úkrojky, koncový úkrojek je kopinatý až obvejčitý; listy jsou na obou stranách zelenomodré, lysé. Květy jsou drobné, uspořádané v řídkém hroznu; květ je krátce stopkatý, opatřený listenem; květy jsou růžové až nachově červené, na vrcholu tmavě purpurové až hnědé; kalich je krátký dvoučetný, kališní lístky petaloidní. Koruna je čtyřčetná trubkovitá, horní plátek je mírně ostruhatý. Tyčinky jsou dvoubratré, srostlé do dvou skupin po třech tyčinkách. Zelenohnědé nepukavé plody, nažky, jsou kulovité nebo kýlnaté, svraskalé nebo na konci slabě vmáčklé, každý plod obsahuje malé hnědé semeno.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listu v plošném pohledu se svrchní pokožkou z buněk nepravidelně mnohohranných, některé z nich obsahují velmi malé sférokristaly; buňky spodní pokožky mají stěny více zprohýbané; anomocytické průduchy (2.8.3) jsou na obou stranách listu; koncové buňky na okrajích čepele jsou protaženy v tupé papily; skupiny zdřevnatělých vláken a síťovitě a dvůrkovitě ztlustlých cév lodyhy; úlomky pokožky koruny z mnohohranných buněk se zprohýbanými až vlnitými stěnami, papily chybějí; pylová zrna jsou kulovitá, o průměru asi 30 µm s tečkovanou exinou a šesti velkými klíčními póry; mnohohranné buňky oplodí se ztlustlou, bradavčitou kutikulou.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se míchá 15 min s 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*, pak se zfiltruje. Filtrát se zředí *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* na 20 ml. Přidá se 1 ml *amoniaku 26% R* a 10 ml *ethyl-acetátu R*, promíchá se a odstředí. Použije se horní organická vrstva. Extrakce se opakuje ještě jednou. Spojené organické vrstvy se vysuší *síranem*

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

sodným bezvodým R a za sníženého tlaku se odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *protopin-hydrochloridu R* a 5 mg *chininu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu 96% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (2 + 6 + 40 + 52).

**Nanášení.** 30 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny další modře fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
_____	čtyři modře fluoreskující skvrny
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	zelenomodře fluoreskující skvrna
_____	_____
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Vrstva se postříká směsí objemových dílů *jodobismutitanu draselného RS2*, *kyseliny octové RS* a *vody R* (1 + 2 + 10) do objevení oranžových skvrn na žlutém pozadí.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny další méně intenzivní oranžové skvrny.

Horní okraj desky	
_____	oranžová skvrna (protopin)
_____	dvě oranžové skvrny
_____	_____
_____	_____
_____	slabá oranžová skvrna
_____	_____
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Kadmium** (2.4.27). Nejvýše 1,5 µg/g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

5,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1* a 50 ml *ethyl-acetátu R*, protřepává se 15 min a zfiltruje se. Postup se opakuje stejným způsobem a filtráty se spojí. Spojené filtráty se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se smíchá s 50 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a rozpouští se 10 min v ultrazvukové lázni. Pak se zfiltruje, filtrát se zředí *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* na 100 ml. *Amoniakem 26% R* se upraví pH roztoku na hodnotu 9 až 10, přidá se 50 ml *ethyl-acetátu R* a opatrně se protřepe. Horní organická vrstva se oddělí, je-li třeba odstředěním. Postup se opakuje stejným způsobem. Spojené organické vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a odpaří se za sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí ve 100 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20).

## GENTIANAE RADIX

6.0:0392

### Hořcový kořen

#### DEFINICE

Jsou to usušené úlomky kořenů a oddenků druhu *Gentiana lutea L.*

#### VLASTNOSTI

Droga má charakteristický pach a přetrvávající výrazně hořkou chuť.

Droga je tvořena jednoduchými nebo rozvětvenými válcovitými kusy kořenů a oddenků různé délky, zpravidla o průměru 10 mm až 40 mm, v oblasti kořenové hlavy až 80 mm.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Na povrchu je hnědošedý, na příčném řezu nažloutlý nebo červenožlutý, ne však červenohnědý. Kořen je podélně vrásčitý, obvykle s jizvami po postranních kořenech. Rozvětvený oddenek má kruhovitě, hustě uspořádané listové jizvy, často i terminální pupen. Oddenek a kořen se sušením stávají drobné s krátkým lomem. Snadno vlhnu a dají se pak ohýbat. Na hladkém příčném řezu je patrná kůra zasahující přibližně až do jedné třetiny průměru kořene. Od nevýrazně paprskového, převážně parenchymatózního dřeva je oddělena zřetelně patrným kambiem.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý nebo žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korku tvořeného tenkostěnnými žlutohnědými buňkami a ztlustlými kolenchymatickými buňkami (feloderm); úlomky parenchymatických buněk kůry a dřeva s mírně ztlustlými stěnami, obsahující kapky oleje a malé hranolovité a jehlicovité krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky zdřevnatělých cév šroubovitě nebo síťovitě ztlustlých.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 25 ml *methanolu R*, 15 min se protřepává a pak se zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého

tlaku při teplotě nepřesahující 50 °C. Odparek se rozpustí v malém množství *methanolu R* do konečného objemu 5 ml roztoku; v roztoku může zůstat usazenina. *Porovnávací roztok*. 5 mg *fenazonu R* a 5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-formiátu R* (4 + 8 + 88).

*Nanášení*. 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. V nenasyčené komoře po dráze 8 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce A*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
fenazon: zhášející skvrna	výrazná zhášející skvrna
_____	slabá zhášející skvrna (amarogentin)
_____	_____
hyperosid: zhášející skvrna	výrazná zhášející skvrna (gentiopikrosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B*. Postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R* a pak čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (2 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *ethanolu bezvodého R* a *vody R* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
_____	výrazná tmavě fialová skvrna
_____	fialovočervená skvrna (amarogentin)
_____	_____
hyperosid: hnědočervená skvrna	slabá světle hnědá skvrna (gentiopikrosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Jiné druhy rodu *Gentiana***. Hodnotí se chromatogramy získané ve Zkoušce totožnosti C, detekce B.

*Hodnocení*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou těsně nad skvrnou amarogentinu žádné fialové skvrny.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 10 000.

**Látky extrahovatelné vodou**. Nejméně 33 %; 5,0 g práškové drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 200 ml vroucí vody R a nechá se 10 min stát za občasného protřepávání. Nechá se ochladit, zředí se vodou R na 200,0 ml a zfiltruje se. 20,0 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejméně 0,165 g.

## GENTIANAE TINCTURA

6.0:1870

### Hořcová tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z hořcového kořene [*Gentianae radix* (0392)].

#### VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z jednoho dílu rozdrčené drogy a pěti dílů ethanolu 70% (V/V).

#### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Žlutohnědá nebo červenohnědá tekutina, silně hořké chuti.

#### ZKOUŠKA TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. Zkoušená tinktura.

*Porovnávací roztok*. 5 mg *fenazonu R* a 5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-formiátu R* (4 + 8 + 88).

*Nanášení*. 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 8 cm, v nenasyčené komoře.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce A*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
fenazon: zhášející skvrna	výrazná zhášející skvrna
_____	slabá zhášející skvrna (amarogentin)
_____	_____
hyperosid: zhášející skvrna	výrazná zhášející skvrna (gentiopikrosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B*. Postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* 10% (V/V) v *methanolu R* a pak čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (2 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *ethanolu bezvodého R* a *vody R* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	výrazná tmavě fialová skvrna fialovočervená skvrna (amarogentin)
hyperosid: hnědočervená skvrna	slabá světle hnědá skvrna (gentiopikrosid)
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 62 % (V/V) až 67 % (V/V).

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 1000.

**Zbytek po vysušení** (2.8.16). Nejméně 5 %; stanoví se se 3,00 g tinktury.

## GINKGO EXTRACTUM SICCCUM RAFFINATUM ET QUANTIFICATUM

6.1:1827

Jinanový extrakt suchý čištěný a kvantifikovaný

*Synonymum.* Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum

#### DEFINICE

Je to čištěný a kvantifikovaný suchý extrakt vyrobený z drogy *Ginkgo folium* (1828).

*Obsah*, počítáno na vysušený extrakt:

- flavonoidy, vyjádřeno jako flavonové glykosidy ( $M_r$  756,7): 22,0 % až 27,0 %;
- bilobalid: 2,6 % až 3,2 %;
- ginkgolidy A, B a C: 2,8 % až 3,4 %;
- kyseliny ginkgolové: nejvýše 5 µg/g.

#### VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z rostlinné drogy za použití organických rozpouštědel a jejich směsí s vodou, fyzikálními separačními postupy a dalšími vhodnými metodami.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Světle žlutohnědý prášek nebo drolivá hmota.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 20,0 mg se smíchá s 10 ml směsí objemových dílů vody R a methanolu R (2 + 8).

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg kyseliny chlorogenové R a 3,0 mg rutinu R se rozpustí ve 20 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové R, vody R a ethyl-acetátu R (7,5 + 7,5 + 17,5 + 67,5).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 5 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 17 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Ještě horká vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R; nechá se sušit asi 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	modře fluoreskující skvrna několik slabě zbarvených skvrn
	hnědě fluoreskující skvrna zeleně fluoreskující skvrna intenzivní světle modře fluoreskující skvrna někdy překrytá zelenohnědě fluoreskující skvrnou
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	
rutin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	jedna nebo dvě zeleně fluoreskující skvrny jedna nebo dvě žlutohnědě fluoreskující skvrny
	několik zeleně a žlutohnědě fluoreskujících skvrn
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Flavonoidy.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,200 g se rozpustí ve 20 ml methanolu R. Přidá se 15,0 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a 5 ml vody R a zředí se methanolem R na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 10ml lahvičky z hnědého skla. Lahvička se uzavře dobře těsnicí pryžovou zátkou, zajistí se hliníkovým uzávěrem a zahřívá se 25 min na vodní lázni. Nechá se ochladit na 20 °C.

*Porovnávací roztok.* 10,0 mg kvercetin dihydrátu CRL se rozpustí ve 20 ml methanolu R. Přidá se 15,0 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a 5 ml vody R a zředí se methanolem R na 50,0 ml.

*Kolona:*

- rozměry: délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm);
- teplota: 25 °C.

*Mobilní fáze:*

- mobilní fáze A: roztok kyseliny fosforečné R (0,3 g/l), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 2,0;
- mobilní fáze B: methanol R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	60	40
1–20	60 → 45	40 → 55
20–21	45 → 0	55 → 100
21–25	0	100

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, při 370 nm.

Nástřík. 10 µl.

Relativní retence vztažená ke kvercetin (retenční čas asi 12,5 min). Kemferol asi 1,4; isorhamnetin asi 1,5.

Test způsobilosti, zkoušený roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem kempferolu a píkem isorhamnetinu.

Stanoví se součet ploch včetně všech píků mezi píkem kvercetin a píkem isorhamnetinu na chromatogramu zkoušeného roztoku (viz obrázek 1).

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako flavonové glykosidy, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_1 \cdot 2,514 \cdot p}{F_2 \cdot m_2},$$

v němž značí:

$F_1$  – součet ploch všech píků mezi píkem kvercetin a píkem isorhamnetinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku kvercetin na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost kvercetin dihydrátu CRL v porovnávacím roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;

$p$  – obsah kvercetin bezvodého v procentech v kvercetin dihydrátu CRL.

**Terpenové laktony.** Kapalinová chromatografie (2.2.29). Zkoušený roztok. 0,120 g se v 25ml kádince rozpustí mícháním v 10 ml tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 5,8. Roztok se převede na chromatografickou kolonu o délce asi 0,15 m a vnitřním průměru asi 30 mm, naplněnou 15 g křemelinou pro chromatografii R. Kádinka se promyje dvakrát 5 ml tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 5,8 a promývací tekutiny se převedou na chromatografickou kolonu. Nechá se stát 15 min. Sloupec se promyje 100 ml ethyl-acetátu R a eluát se odpaří do sucha při tlaku nepřevyšujícím 4 kPa ve vodní lázni při 50 °C. Zbytek rozpouštědla se odstraní proudem vzduchu. Zbytek po odpaření se rozpustí v 2,5 ml mobilní fáze.

Porovnávací roztok (a). 30,0 mg benzylalkoholu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,120 g jinanového extraktu suchého pro identifikaci píků CRL se v 25ml kádince rozpustí mícháním v 10 ml tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 5,8 a postupuje se, jak je uvedeno ve zkoušeném roztoku.

Kolona:

– rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktysilylovaný R (5 µm);

– teplota: 25 °C.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů tetrahydrofuranu R, methanolu R a vody R (10 + 20 + 75).

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Refraktometrický detektor udržovaný na 35 °C.

Nástřík. 100 µl.

Identifikace píků. K identifikaci píků bilobalidu a ginkgolidů A, B a C se použije chromatogram dodávaný s jinanovým extraktem suchým pro identifikaci píků CRL a chromatogram porovnávacího roztoku (b).

Test způsobilosti:

– chromatogram porovnávacího roztoku (b) odpovídá chromatogramu dodávanému s jinanovým extraktem suchým pro identifikaci píků CRL.

Obsah bilobalidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_1 \cdot p \cdot 0,025 \cdot 1,20}{F_5 \cdot m_2},$$

obsah ginkgolidu A v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_2 \cdot m_1 \cdot p \cdot 0,025 \cdot 1,22}{F_5 \cdot m_2},$$

obsah ginkgolidu B v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_3 \cdot m_1 \cdot p \cdot 0,025 \cdot 1,19}{F_5 \cdot m_2},$$

obsah ginkgolidu C v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_4 \cdot m_1 \cdot p \cdot 0,025 \cdot 1,27}{F_5 \cdot m_2},$$

v nichž značí:

$F_1$  – plochu píku bilobalidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku ginkgolidu A na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_3$  – plochu píku ginkgolidu B na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_4$  – plochu píku ginkgolidu C na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_5$  – plochu píku benzylalkoholu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$m_1$  – hmotnost benzylalkoholu CRL v porovnávacím roztoku (a) v gramech;

$m_2$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;

$p$  – obsah benzylalkoholu v benzylalkoholu CRL v procentech.

Celkový obsah ginkgolidů A, B a C v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$G_A + G_B + G_C,$$

v němž značí:

$G_A$  – obsah ginkgolidu A v procentech;

$G_B$  – obsah ginkgolidu B v procentech;

$G_C$  – obsah ginkgolidu C v procentech.

**Kyseliny ginkgolové.** Kapalinová chromatografie (2.2.29). Zkoušený roztok. 0,500 g práškového zkoušeného extraktu se rozpustí v 8 ml methanolu R, je-li třeba, použije se

ultrazvuková lázeň a zředí se stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. Je-li třeba, roztok se odstředí.

*Porovnávací roztok.* 10,0 mg kyselin ginkgolových CRL se rozpustí v 8 ml methanolu R, je-li třeba, použije se ultrazvuková lázeň a zředí se stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí methanolem R na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 µm);
- *teplota:* 35 °C.

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* 0,1 ml kyseliny trifluoroctové R se zředí vodou R na 1000 ml;
- *mobilní fáze B:* 0,1 ml kyseliny trifluoroctové R se zředí acetonitrilem R na 1000 ml.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–30	25 → 10	75 → 90
30–35	10	90
35–36	10 → 25	90 → 75
36–45	25	75

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, při 210 nm.

*Nástřik.* 50 µl.

*Identifikace složek.* K identifikaci piků kyselin ginkgolových C13, C15 a C17 se použije chromatogram dodávaný s kyselinami ginkgolovými CRL a chromatogram zkoušeného roztoku.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

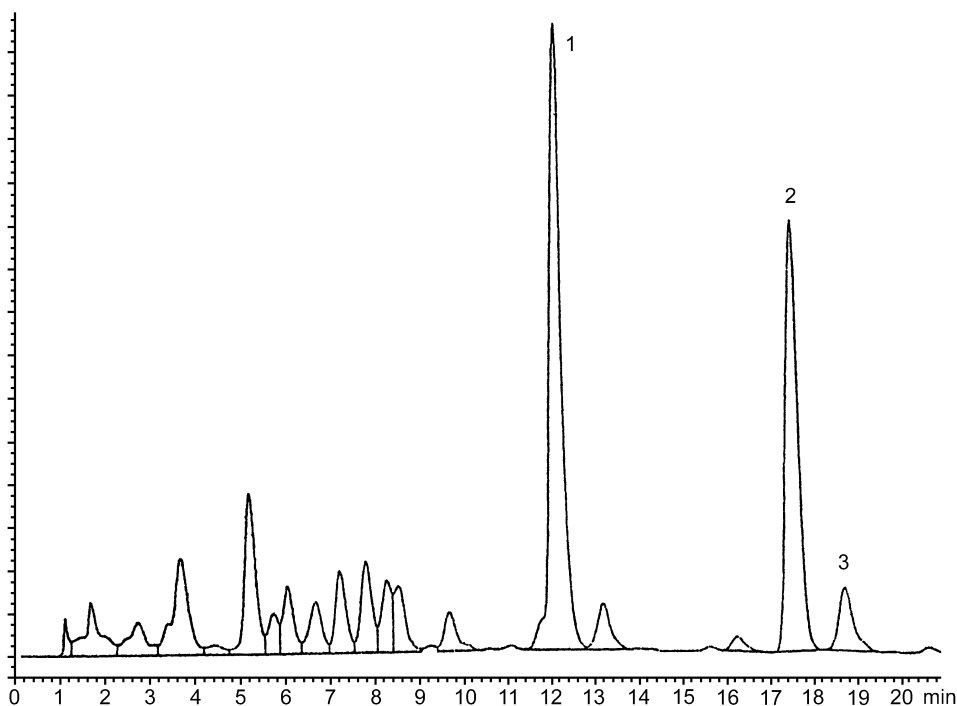
- *rozlišení:* nejméně 2,0 mezi píkem kyseliny ginkgolové C13 a píkem kyseliny ginkgolové C15;
- *faktor symetrie:* 0,8 až 2,0 pro píky kyselin ginkgolových C13, C15 a C17.

Obsah kyselin ginkgolových v µg/g, vyjádřeno jako kyselina ginkgolová C17 se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 2000}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – součet ploch piků kyselin ginkgolových C13, C15 a C17 na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A$  – plochu piku kyseliny ginkgolové C17 na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost kyselin ginkgolových CRL použitých pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;
- $p$  – obsah kyseliny ginkgolové C17 v kyselinách ginkgolových CRL v procentech.



1 = kvercetin

2 = kemferol

3 = isorhamnetin

**Obr. 1** Chromatogram pro Stanovení obsahu flavonoidů v jinanovém extraktu suchém čištěném a kvantifikovaném

## GINKGO FOLIUM

7.0:1828

## Jinanový list

## DEFINICE

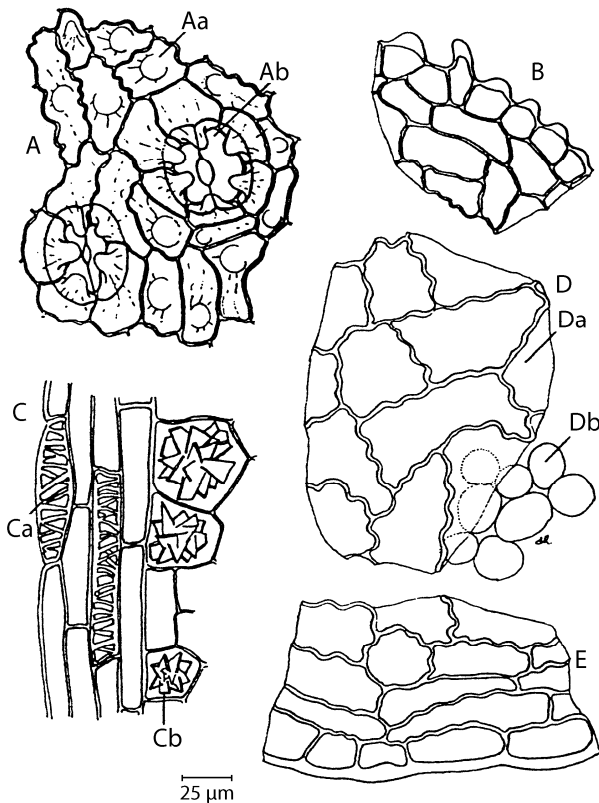
Je to usušený list druhu *Ginkgo biloba* L., celý nebo jeho úlomky.

**Obsah.** Nejméně 0,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako flavonové glykosidy ( $M_r$  756,7), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** List je našedlý nebo žlutozelený nebo žlutohnědý na svrchní straně poněkud tmavší než na spodní straně. Řapík je asi 4 cm až 9 cm dlouhý. Čepel listu je asi 4 cm až 10 cm široká, vějířovitá, zpravidla dvouřadová nebo někdy nedělená (bez laloků). List je na obou stranách lysý, žilnatina je dichotomická, na obou stranách čepelky vyniklá, žilky se od báze paprčovitě rozbíhají. Čepel je na horním okraji celokrajná, s nepravidelným zářezem různé velikosti, s nepravidelnými laloky nebo bez laloků. Boční části čepelky jsou celokrajné, k bázi zúžené.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je našedlý nebo žlutozelený nebo žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): nepravidelné úlomky čepelky listu [A, B, D, E]; pokožka svrchní strany listu v plošném pohledu [D] a v příčném řezu [E] složená z protáhlých buněk s nepravidelně vlnitě zprohýbanými stěnami [Da], často doprovázená palisádovým parenchymem [Db]; pokožka spodní strany listu



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového jinanového listu

v plošném pohledu [A] a v příčném řezu [B] složená z malých buněk s jemně proužkovanou kutikulou, všechny buňky jsou mírně papilózní [Aa], s průduchy asi 60 µm dlouhými, hluboce vpadlými, obklopenými šesti až osmi podpůrnými buňkami; úlomky cévních svazků z řapíku a žilek [C] se dřevem [Ca] a parenchymem, některé buňky obsahují četné, různě velké drúzy kalcium-oxalátu [Cb].

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškové drogy (710) (2.9.12) se smíchají s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Nechá se ochladit na teplotu místnosti a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R* a 3,0 mg *rutinu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (7,5 + 7,5 + 17,5 + 67,5).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 17 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak stejným objemem roztoku *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se asi 30 min sušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další méně intenzivně fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	žlutohnědě fluoreskující skvrna
	zeleně fluoreskující skvrna
	dvě žlutohnědě fluoreskující skvrny
	intenzivní světle modře fluoreskující skvrna někdy překrytá zelenohnědě fluoreskující skvrnou
kyselina chlorogenová:	
světle modře fluoreskující skvrna	
	zeleně fluoreskující skvrna
rutin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	
	dvě žlutohnědě fluoreskující skvrny
	zeleně fluoreskující skvrna
	žlutohnědě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>



## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí (2.8.2).** Nejvýše 5 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 11,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Flavonoidy.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 2,500 g práškované drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 50 ml roztoku *acetonu R* 60% (V/V) a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem, pak se zfiltruje a filtrát se uchová. Zbytek drogy se extrahuje 40 ml roztoku *acetonu R* 60% (V/V) ještě jednou stejným způsobem a opět se zfiltruje. Filtráty se spojí a zředí se roztokem *acetonu R* 60% (V/V) na 100,0 ml. 50,0 ml tohoto roztoku se odpařuje do odstranění acetonu a pomocí 30 ml *methanolu R* se převede do 50,0 ml lahvičky. Přidá se 4,4 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a odstředí se. 10 ml supernatantní tekutiny se převede do 10 ml lahvičky z hnědého skla, která se uzavře pryžovou zátkou, zajistí se hliníkovým uzávěrem a zahřívá se 25 min na vodní lázni. Nechá se ochladit na teplotu místnosti.

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kvercetin dihydrátu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*, přidá se 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 5 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 50,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);
- **teplota:** 25 °C.

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** *roztok kyseliny fosforečné R* (0,3 g/l) s pH upraveným na hodnotu 2,0;
- **mobilní fáze B:** *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	60	40
1–20	60 → 45	40 → 55
20–21	45 → 0	55 → 100
21–25	0	100

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 370 nm.

**Nástržik.** 10 µl.

**Relativní retence** vztahovaná ke *kvercetin* (retenční čas asi 12,5 min). *Kempferol* asi 1,4; *isorhamnetin* asi 1,5.

**Test způsobilosti:**

- **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi píkem *kempferolu* a píkem *isorhamnetinu*.

Nepřihlíží se k píkům, které se eluují před píkem *kvercetin* nebo po píku *isorhamnetinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako flavonové glykosidy se vypočítá podle vzorce:

$$2 \cdot \frac{F_1 \cdot m_1 \cdot 2,514 \cdot p}{F_2 \cdot m_2}$$

v němž značí:

- $F_1$  – součet ploch všech významných píků na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $F_2$  – plochu píku odpovídajícího *kvercetin* na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost *kvercetin* použitého pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost zkoušené drogy použité pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;
- $p$  – obsah *kvercetin* bezvodého v *kvercetin dihydrátu R* v procentech.

## GINSENG RADIX

6.0:1523

## Všehojojvý kořen

## DEFINICE

Je to usušený celý nebo řezaný kořen druhu *Panax ginseng* C. A. MEYER, který se označuje jako bílý všehojojvý kořen; po úpravě parou a následném vysušení se označuje jako červený všehojojvý kořen.

**Obsah.** Nejméně 0,40 % celkového obsahu ginsenosidu Rg1 (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>·2H<sub>2</sub>O; M<sub>r</sub> 837,05) a ginsenosidu Rb1 (C<sub>54</sub>H<sub>92</sub>O<sub>23</sub>·3H<sub>2</sub>O; M<sub>r</sub> 1163,35), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Hlavní kořen je větvenovitý nebo válcovitý, někdy větvený, až asi 20 cm dlouhý a o průměru až 2,5 cm. Může být zkroucen nebo stočen nazpět. Povrch bílého všehojojvého kořene je světle žlutý až smetanově bílý, červeného všehojojvého kořene hnědočervený podélně vrásčitý. Na kořenové hlavě mohou být patrné zbytky stonku. Lom je krátký. Na příčném řezu je patrná široká vnější vrstva s rozptýlenými oranžovočervenými pryskyřičnými kanálky a jemně paprscitá střední část. V dolní části bílého všehojojvého kořene jsou četné jemné tenké kořínky, které u červeného všehojojvého kořene chybí.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky tenkostěnných parenchymatických buněk a velkých sekrečních kanálků obsahujících žlutohnědou pryskyřici, nezdřevnatělé cévice a částečně zdřevnatělé šroubovitě nebo síťovitě ztlustlé cévy vyskytující se jednotlivě nebo v malých skupinách; roztroušené drúzy šřavelanu vápenatého. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R* a *vody R*; jsou patrná velmi četná jednoduchá, dvoučetná nebo trojčetná škrobová zrna o průměru 1 µm až 10 µm. V červeném všehojojvém kořeni jsou škrobová zrna často deformovaná a poškozovaná účinkem páry, nebo mohou chybět.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se vaří 15 min pod zpětným chladičem s 10 ml roztoku *methanolu R* 70% (V/V). Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *escinu R* a 5,0 mg *arbutinu R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo 2 µm až 10 µm].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R*, *vody R* a *butan-1-olu R* (25 + 50 + 100), směs se oddělí po 10 min stání. Použije se horní vrstva.

**Nanášení.** 20 µl [nebo 4 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** V nenasyčené komoře po dráze 10 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °C až 110 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
arbutin: hnědá skvrna	fialová skvrna (ginsenosid Rg1 a Rg2) slabě fialová skvrna (ginsenosid Rf) fialová skvrna (ginsenosid Re)  fialová skvrna (ginsenosid Rd) slabě fialová skvrna
escin: šedá skvrna	fialová skvrna (ginsenosid Rc) fialová skvrna (ginsenosid Rb1 a Rb2)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKA NA ČISTOTU

**Panax quinquefolium.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je pik odpovídající ginsenosidu Rf (viz obrázek 1). V případě záměny za *Panax quinquefolium* není pik odpovídající ginsenosidu Rf přítomen.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Asi 50 g drogy se upráškuje (355) (2.9.12). 1,00 g práškové drogy se smíchá se 70 ml roztoku *methanolu R* 50% (V/V) ve 250 ml baňce s kulatým dnem, přidá se několik zrněk pemzy a vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se odstředí, supernatantní tekutina se oddělí a zbytek se extrahuje ještě jednou za výše uvedených podmínek. Supernatantní tekutiny se spojí a odpaří se za sníženého tlaku do sucha při teplotě nepřevyšující 60 °C. Zbytek se převede do 20,0 ml směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (20 + 80). 2,0 ml tohoto roztoku se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (20 + 80) na 10,0 ml a před nástříkáním se zfiltruje přes vhodný membránový filtr (0,45 µm).

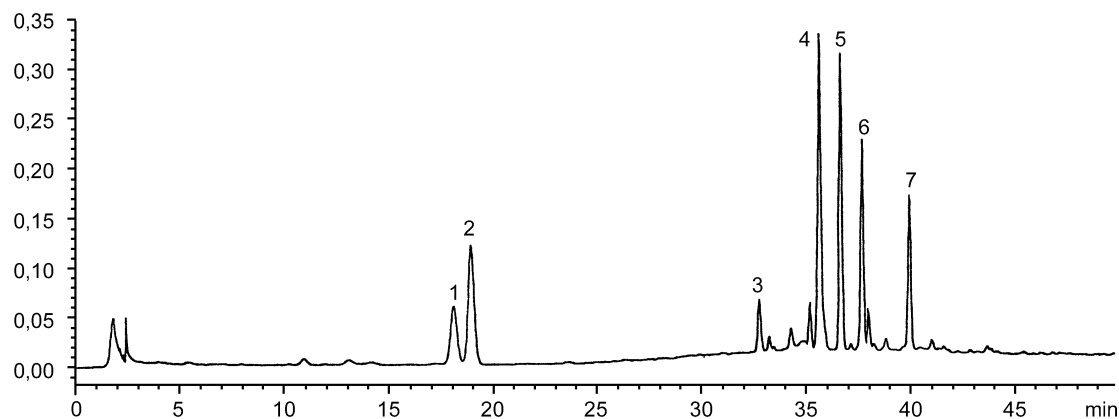
**Porovnávací roztok.** 3,0 mg *ginsenosidu Rg1 R*, 3,0 mg *ginsenosidu Re R*, 3,0 mg *ginsenosidu Rf R* a 3,0 mg *ginsenosidu Rb1 R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);
- **teplota:** 35 °C.

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** *voda R* s pH upraveným *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2;
- **mobilní fáze B:** *acetonitril R*.



1 = ginsenosid Rg1

3 = ginsenosid Rf

5 = ginsenosid Rc

7 = ginsenosid Rd

2 = ginsenosid Re

4 = ginsenosid Rb1

6 = ginsenosid Rb2

**Obr. 1** Chromatogram zkoušeného roztoku pro Stanovení obsahu ve všehožovém kořeni

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–8	80	20
8–40	80 → 60	20 → 40
40–45	60 → 40	40 → 60
45–47	40 → 0	60 → 100
47–52	0	100
52–55	0 → 80	100 → 20

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 203 nm.

Ustavení rovnováhy. 20 min.

Nástržik. 20 µl.

Eluční pořadí. Pořadí je dáno složením porovnávacího roztoku; retenční časy těchto látek se zaznamenají.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,0 mezi píkem ginsenosidu Rg1 a píkem ginsenosidu Re.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku se určí pík ginsenosidu Rb1 a pík ginsenosidu Rg1.

Vypočítá se obsah ginsenosidu Rb1 a ginsenosidu Rg1 v procentech podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p_1}{A_3 \cdot m_1 \cdot 100} + \frac{A_2 \cdot m_3 \cdot p_2}{A_4 \cdot m_1 \cdot 100},$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku ginsenosidu Rb1 na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku ginsenosidu Rg1 na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_3$  – plochu píku ginsenosidu Rb1 na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$A_4$  – plochu píku ginsenosidu Rg1 na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost ginsenosidu Rb1 v porovnávacím roztoku v miligramech;

$m_3$  – hmotnost ginsenosidu Rg1 v porovnávacím roztoku v miligramech;

$p_1$  – obsah ginsenosidu Rb1 ve zkoumadle v procentech;

$p_2$  – obsah ginsenosidu Rg1 ve zkoumadle v procentech.

## GRAMINIS RHIZOMA

7.1:1306

### Pýrový oddenek

#### DEFINICE

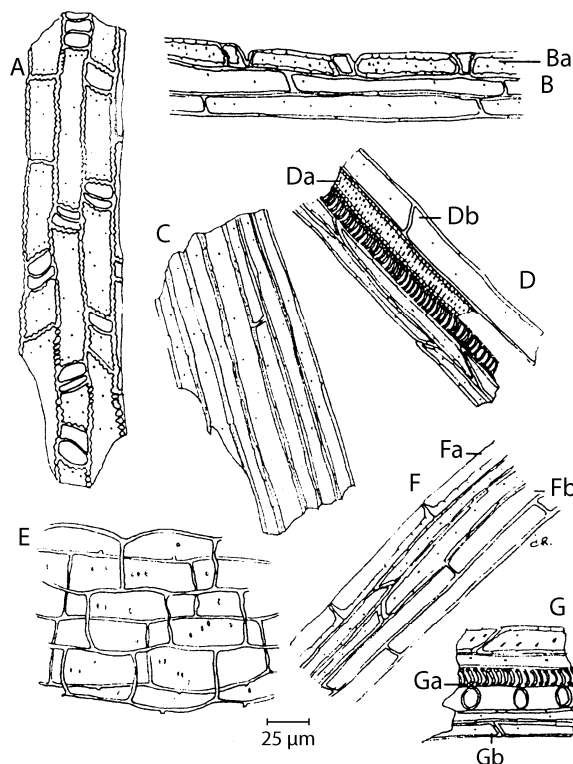
Je to celý nebo řezaný omytý a usušený oddenek druhu *Agropyron repens* (L.) P. BEAUV. (*Elymus repens* (L.) GOULD), zbařený adventivních kořenů.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Lesklé nažloutlé, světle hnědé nebo žlutohnědé kousky oddenku 2 mm až 3 mm silné, podélně rýhované. Nodia (kolénka) se zbytky velmi tenkých více nebo méně větvených kořenů a s bělavými nebo nahnědlými šupinovitými listy; internodia (články) jsou více než 6 cm dlouhá,

podélně rýhovaná, uvnitř dutá. Na příčném řezu nodii je patrná nažloutlá dřev.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je bělavě žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky z plošného pohledu [A] kryté silnou kutikulou, buňky pokožky jsou pravouhlé a protáhlé, se stěnami ztlustlými, tečkovanými, mírně vlnitě zprohýbanými, obvykle se vzájemně střídají s malými tenkostěnnými okrouhlými nebo téměř čtvercovými buňkami; úlomky v příčném řezu [B]; s pokožkou [Ba] provázenou ztlustlými buňkami hypodermis; úlomky v příčném řezu [F] s buňkami endodermis s podkovovitě ztlustlými stěnami [Fa] doprovázené pericyclikými vlákny [Fb]; četné úlomky mírně ztlustlých vláken [C]; skupiny cév [D, G] se šterbinovitými tečkami [Da] nebo cév šroubovitě a prstencovitě ztlustlých [Ga] doprovázených vláken [Db, Gb]; četné úlomky korového parenchymu a dřev se slabě ztlustlými a tečkovanými buňkami [E].



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného pýrového oddenku

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Cynodon dactylon*, *Imperata cylindrica*. Droga se pozoruje pod mikroskopem v *jodu RS1*. Nejsou patrná modře zbarvená škrobová zrna.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 15 % šedočerných kousků oddenků v řezané droze.

**Látky extrahovatelné vodou.** Nejméně 25 %; 5,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 200 ml vroucí vody R a nechá se 10 min stát za občasných protřepávání. Nechá se ochladit, zředí se vodou R na 200,0 ml a zfiltruje

se. 20,0 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek po vysušení váží nejméně 0,125 g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 1,5 %.

## GUMMIRESINA MYRRHA

6.0:1349

Myrhovníková klejoprskyřice

*Synonymum.* Myrrha

### DEFINICE

Je to na vzduchu ztvrdlá klejoprskyřice získaná po nařízení nebo samovolným vytékáním z kmenů a větví druhu *Commiphora molmol* ENGLER a/nebo jiných druhů rodu *Commiphora*.

### VLASTNOSTI

Droga má hořkou chuť.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Světle nebo tmavě oranžovohnědá nepravidelná nebo okrouhlá zrna nebo kousky různé velikosti s různě zbarvenými částicemi. Na povrchu jsou většinou pokryty šedým nebo žlutohnědým prachem.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědavě žlutý nebo červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: jen malé množství úlomků tkáně matečné rostliny, včetně červenohnědých úlomků korku; mnohohranné až podlouhlé sklereidy, s výrazně ztlustlými tečkovanými zdřevnatělými stěnami a hnědým obsahem, jednotlivé nebo ve skupinách; úlomky tenkostěnného parenchymu a sklerenchymatických vláken; nepravidelné hranolovité nebo mnohohranné krystaly šťavelanu vápenatého o velikosti asi 10 µm až 25 µm.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Commiphora mukul* (viz Zkoušky na čistotu).  
*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a současně se pozoruje v denním světle.  
*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině oranžovočervená skvrna (thymol) a ve střední části fialová skvrna (anethol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní fialová skvrna převyšující ostatní skvrny velikostí a intenzitou (furanoidesma-1,3-dien) nad skvrnou anetholu na chromatogramu porovnávacího roztoku; fialová skvrna odpovídající polohou skvrně anetholu na chromatogramu porovnávacího roztoku; dvě intenzivní fialové skvrny (horní je kurzerenon a spodní je 2-methoxyfuranodien) odpovídající polohou skvrně thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného

roztoku mohou být přítomny další většinou fialové skvrny.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Commiphora mukul.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5,0 ml *ethanolu 96% R* a zahřívá se 2 min až 3 min na vodní lázni. Ochladí se a zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *thymolu R* a 40 µl *anetholu R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 96% R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (2 + 98).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou v dolní třetině skvrny s modrou nebo fialovou fluorescencí.

**Látky nerozpustné v ethanolu.** Nejvýše 70 %; 1,00 g práškované drogy (250) (2.9.12) se smíchá se 30 ml *ethanolu 96% R* a 10 min se intenzivně protřepává. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes předem zvážený filtr ze slinutého skla (16) (2.1.2) tak, aby sediment zůstal v baňce. Postup se opakuje ještě dvakrát se 20 ml *ethanolu 96% R*, sediment se kvantitativně převede na filtr a baňka se vypláchne *ethanolem 96% R*. Filtr se zbytkem se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C a pak se zváží.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

## HAMAMELIDIS FOLIUM

Vilínový list

7.0:0909

### DEFINICE

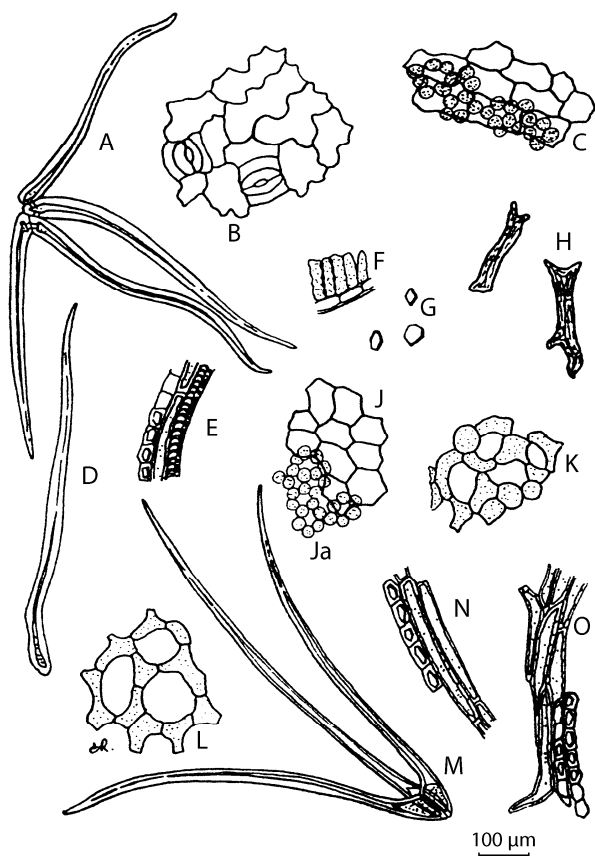
Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Hamamelis virginiana* L.

*Obsah.* Nejméně 3 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je zelený nebo zelenohnědý, často rozlámaný, zmačkaný nebo slisovaný na více nebo méně kompaktní hmotu. Čepel listu je široce vejčitá až obvejčitá, na bázi šikmá, nesouměrná, na konci zašpičatělá, zřídka tupá. Okraje čepele jsou hrubě pilovité nebo zubaté. Žilnatina je zpeřená, na spodní straně listu vyniklá. Postranní žilky (obvykle čtyři až šest párů) svírají s hlavní žilkou ostrý úhel a na okraji čepele se ohýbají, jemné žilky tak často svírají s postranními žilkami pravý úhel.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz

obrázek 1): úlomky svrchní pokožky s buňkami s anti-klinálními stěnami vlnitě zprohýbanými v plošném pohledu [C, J], často doprovázené malými válcovitými buňkami palisádového parenchymu v plošném pohledu [Ja] nebo podlouhlými buňkami v příčném řezu [F]; úlomky spodní pokožky s průduchy převážně paracytickými (2.8.3) v plošném pohledu [B], které mohou být doprovázené nepravidelně tvarovanými buňkami houbového mezofylu [K, L]; hvězdovité krycí chlupy, buď celé nebo polámané [A, D, M], složené ze čtyř až dvanácti jednobuněčných větví na bázi srostlých; jednotlivé buňky jsou protáhlé, kuželovité, zakřivené, obvykle až 250 µm dlouhé, se ztlustlými stěnami, s dobře patrným lumenem, často s hnědě zbarveným obsahem; vlákna zdřevnatělá se ztlustlými stěnami, jednotlivá nebo ve skupinách, provázená komůrkovými vlákny s hranolovitými krystaly kalcium-oxalátu [N, O]; sklereidy, často protáhlé na jednom nebo obou koncích, 150 µm až 180 µm dlouhé, celé nebo jejich úlomky [H]; úlomky kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlých cév [E]; jednotlivé hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [G].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového vlnivého listu

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *ethanolu 60% (V/V) R*, protřepává se 15 min a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok (a).* 30 mg *taninu R* se rozpustí v 5 ml *ethanolu 60% (V/V) R*.

*Porovnávací roztok (b).* 5 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v 5 ml *ethanolu 60% (V/V) R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-formiátu R* (10 + 10 + 80).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Suší se 10 min při 100 °C až 105 °C, potom se nechá ochladit.

*Detekce.* Postříká se *chloridem železitým RS2* do objevení se modrošedých skvrn (fenolické sloučeniny).

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní třetině hlavní skvrna v poloze odpovídající poloze hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a druhá úzká skvrna v horní části v poloze odpovídající poloze hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ve střední části další slabě zbarvené skvrny.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 7 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí; stanoví se s 50 g drogy.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 4 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 2,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,750 g práškové drogy (180) (2.9.12).

**HARPAGOPHYTI EXTRACTUM SICCCUM**

**6.0:1871**

**Harpagofytový extrakt suchý**

**DEFINICE**

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Harpagophyti radix* (1095).

*Obsah.* Nejméně 1,5 % harpagosidu ( $C_{24}H_{30}O_{11}$ ;  $M_r$  494,5), počítáno na vysušený extrakt.

**VÝROBA**

Vyrábí se vhodným postupem z rostlinné drogy a vody, nebo vodně-ethanolického rozpouštědla o koncentraci odpovídající nejvýše *ethanolu 95% (V/V)*.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Světle hnědý prášek.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *harpagosidu R* a 2,5 mg *fruktosy R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (8 + 15 + 77).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** V proudu horkého vzduchu.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem *floroglucinolu R* (10 g/l) v *ethanolu 96% R* a pak *kyselinou chlorovodíkovou R*, zahřívá se 5 min až 10 min při 80 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
harpagosid: zelená skvrna	zelená skvrna (harpagosid)
fruktosa: žlutošedá skvrna	žlutá skvrna světle zelená skvrna může být přítomna žlutošedá skvrna (fruktosa) hnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,350 g se přidá k 90 ml *methanolu R* ve 100ml odměrné baňce a na 20 min se vloží do ultrazvukové lázně. Ochladí se na teplotu místnosti a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. Zfiltruje se přes membránový filtr (0,2 µm).

**Porovnávací roztok.** Obsah lahvičky *harpagosidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (50 + 50).

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 278 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Doba záznamu.** Trojnásobek retenčního času *harpagosidu*.

**Retenční čas.** *Harpagosid* asi 7 min.

Obsah *harpagosidu* v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 1000}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku *harpagosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku *harpagosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *harpagosidu* obsaženého v lahvičce *harpagosidu CRL* v gramech.

## HARPAGOPHYTI RADIX

7.0:1095

### Harpagofytový kořen

#### DEFINICE

Je to řezaný usušený hlíznatý sekundární kořen druhu *Harpagophytum procumbens* DC. a/nebo *Harpagophytum zeyheri* DECNE.

**Obsah.** Nejméně 1,2 % *harpagosidu* ( $C_{24}H_{30}O_{11}$ ;  $M_r$  494,5), počítáno na vysušenou drogu.

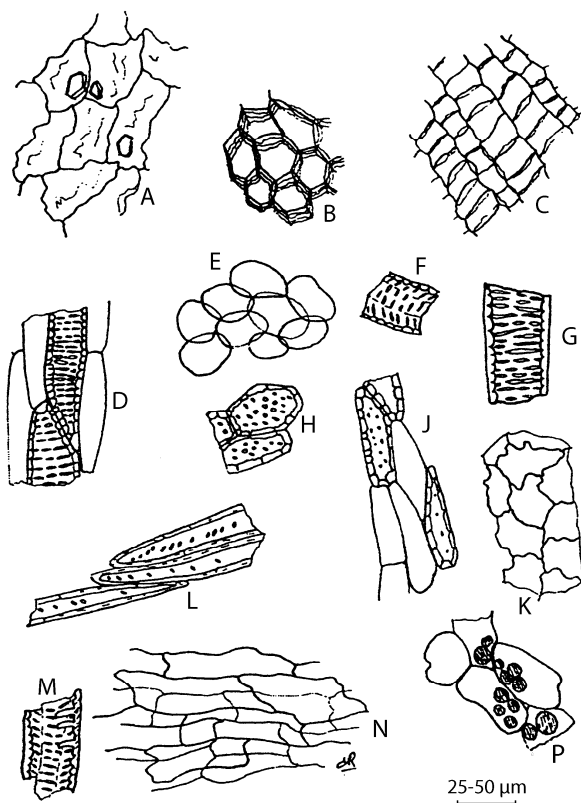
#### VLASTNOSTI

Droga je šedohnědá nebo tmavohnědá.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Silné plátky vějířovitého nebo okrouhlého tvaru nebo hrubě nalámané kotouče, na povrchu tmavší, podélně brázdité. Na světlejší řezné ploše je patrné tmavé kambium a zřetelně paprskovitě uspořádané dřevní svazky. Centrální válec má jemné soustředné vrstvení. Pod lupou jsou na řezu patrná žlutá nebo hnědočervená zrna.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky korku se žlutohnědými tenkostěnnými buňkami v plošném pohledu [B] a v příčném řezu [C]; úlomky korového parenchymu s velkými tenkostěnnými buňkami [E, K, N, P], které někdy obsahují červenohnědá zrna inkluzí a jednotlivé žluté kapky [P]; úlomky sířovitě ztlustlých nebo tečkovaných cév [D, F, G, M] a úlomky zdřevnatělého parenchymu [L], někdy doprovázené cévami z centrálního válce; hranolovité krystaly [A] a vzácně malé jehlice kalcium-oxalátu v parenchymu. Práškováná droga může také obsahovat pravoúhlé nebo mnohohranné sklereidy s tmavě červenohnědým obsahem [H, J]. Parenchym se roztokem *floroglucinolu* v *kyselině chlorovodíkové* barví zeleně.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového harpagofytového kořene

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se zahřívá 10 min na vodní lázni při 60 °C s 10 ml *methanolu R*. Zfiltruje se a filtrát se odpaří za sníženého tlaku a teploty nepřevyšující 40 °C na asi 2 ml.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *harpagosidu R* a 2,5 mg *fruktosy R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (2 μm až 10 μm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (8 + 15 + 77).

**Nanášení.** 20 μl [nebo 5 μl], do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 7,5 cm].

**Sušení.** V proudu teplého vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další zřetelné skvrny, převážně nad skvrnou *harpagosidu*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
harpagosid: zhášející skvrna	zhášející skvrna ( <i>harpagosid</i> )
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Vrstva se postříká roztokem *floroglucinolu R* (10 g/l) v *ethanolu 96% R* a pak *kyselinou chlorovodíkovou R*, zahřívá se 5 min až 10 min při 80 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další žluté nebo hnědé skvrny nad skvrnou *harpagosidu*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
harpagosid: zelená skvrna	zelená skvrna ( <i>harpagosid</i> )
fruktosa: žlutošedá skvrna	žlutá skvrna světle zelená skvrna může být přítomna žlutošedá skvrna ( <i>fruktosa</i> ) hnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Škrob.** Prášková droga (355) (2.9.12) se pozoruje pod mikroskopem ve *vodě R*. Přidá se *iod RS1*; nezbarví se modře.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** K 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 100,0 ml *methanolu R*. Třepe se 4 h a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Porovnávací roztok.** Obsah lahvičky *harpagosidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (50 + 50).

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 278 nm.

**Nástřik.** 10 μl.

**Doba záznamu.** Trojnásobek retenčního času *harpagosidu*.

**Retenční čas.** *Harpagosid* asi 7 min.

Obsah *harpagosidu* v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 1000}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku *harpagosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

- $A_2$  – plochu píku harpagosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost *harpagosidu CRL* v porovnávacím roztoku v gramech.

## HEDERAE FOLIUM

7.0:2148

### Břečťanový list

#### DEFINICE

Je to zjara sbíraný celý nebo řezaný usušený list druhu *Hedera helix* L.

*Obsah.* Nejméně 3,0 % hederakosidu C ( $C_{59}H_{96}O_{26}$ ;  $M_r$  1221), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Listy jsou kožovité, 4 cm až 10 cm dlouhé a široké, na bázi srdčité. Čepel je celokrajná, dlanitě trojlaločná až pětilaločná, s víceméně trojúhelníkovitými laloky. Svrchní strana listu je tmavozelená se světlejší paprsciitou žilnatinou, spodní strana více šedozelená, se zřetelně vyniklou žilnatinou. Řapíky jsou dlouhé, válcovité, podélně rýhované, o průměru asi 2 mm. Řapíky a čepele mladších listů jsou roztroušeně bíle chlupaté, starší listy jsou lysé. Někdy mohou být přítomny i celokrajné vejčité kosníkovité až široce kopinaté 3 cm až 8 cm dlouhé listy z kvetoucích větví.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listů v plošném pohledu na obou stranách s buňkami pokožky s antiklinálními stěnami zprohýbanými až vlnitě zprohýbanými, ztlustlými, se silnou kutikulou; četné průduchy jen na spodní straně listů; průduchy jsou většinou anomocytické, někdy však i anisocytické (2.8.3), některé z vedlejších buněk mohou mít jemně rýhovanou kutikulu; roztroušené krycí hvězdrovitě chlupy jsou složené ze čtyř až osmi jednobuněčných větví na bázi rostlých; úlomky na příčném pohledu s jednořadým až třířadým (obvykle dvouřadým) palisádovým parenchymem, velmi řídký houbový mezofyl obsahuje někdy velké slizové buňky; v celém mezofylu jsou drúzy kalcium-oxalátu o průměru asi 40  $\mu$ m; skupiny zdřevnatělých vláken a cév ze žilnatiny.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,50 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C. Ochladí se a zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *hederakosidu C R* a 1,0 mg  *$\alpha$ -hederinu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *acetonu R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (4 + 20 + 20 + 30).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l, do proužků 15 mm.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Postříká se *kyselinou sírovou v ethanolu RS* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	zelená skvrna
$\alpha$ -hederin: purpurová skvrna	velmi slabá purpurová skvrna ( $\alpha$ -hederin) široká žlutá skvrna dvě až tři purpurové nebo zelené skvrny
hederakosid C: purpurová skvrna	purpurová skvrna (hederakosid C)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 10 % jinak zbarvené drogy, nejvýše 10 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80).

*Zkoušený roztok.* 1,00 g práškované drogy (355) (2.9.12) se v 250ml baňce s kulatým dnem smíchá s 50 ml rozpouštěcí směsi a zahřívá se 1 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 80 °C. Ochladí se a zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Vata se zbytkem drogy se smíchá s 30 ml rozpouštěcí směsi a znovu se zahřívá 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 80 °C. Po ochlazení se zfiltruje a oba filtráty se spojí. Baňka s kulatým dnem i filtr se promyjí rozpouštěcí směsí, která se použije na doplnění odměrné baňky přesně na 100,0 ml. Roztok se před použitím zfiltruje přes vhodný membránový filtr.

*Porovnávací roztok.* Množství *tinkury z brečťanového listu standardizované CRL* odpovídající 3,0 mg hederakosidu C se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze:* vhodný *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m).

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (140 + 880), pH se upraví *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2,0;

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



– mobilní fáze B: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R a acetonitrilu R (2 + 998).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	100	0
5–6	100 → 94	0 → 6
6–40	94 → 60	6 → 40
40–41	60 → 0	40 → 100
41–55	0	100

Průtoková rychlost. 1,5 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 205 nm.

Nástřík. 20 µl.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– retenční čas: hederakosid C asi 20 min; je-li třeba, upraví se časové intervaly gradientu.

Obsah hederakosidu C v procentech, vztaženo na vysušenou drogu, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot 20 \cdot p}{F_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku hederakosidu C na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku hederakosidu C na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gamech;

$m_2$  – hmotnost tinktury z břečťanového listu standardizované CRL použité k přípravě porovnávacího roztoku v gamech;

$p$  – obsah hederakosidu C v tinktuře z břečťanového listu standardizované CRL v procentech.

## HIBISCI SABDARIFFAE FLOS

6.1:1623

### Květ ibišku súdánského

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený kalich a kalíšek druhu *Hibiscus sabdariffa* L. sklizený v době zralosti.

Obsah. Nejméně 13,5 % kyselin, vyjádřeno jako kyselina citronová (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; M<sub>r</sub> 192,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má kyselou chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

A. Kalich je v dolní polovině džbánkovitý, v horní polovině s pěti dlouhými zašpicatělými nazpět ohnutými cípy. Každý cíp má uprostřed nápadnou, mírně vyniklou žilku a ztlustlou nektarovou žlázku o průměru asi 1 mm. Kalíšek tvoří osm až dvanáct malých opakvejitých lístků, které jsou přirostlé k bázi kalicha. Kalich a kalíšek jsou

masité suché křehké světle červené až tmavě fialovočervené, jen na bázi vnitřní strany jsou světlejší.

B. Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červený až fialovočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: převažují červeně zbarvené úlomky parenchymu s četnými drúzami šťavelanu vápenatého a řidčeji se slizovými dutinami; někdy mnohohranné buňky pokožky s průduchy anizocytického typu (2.8.3); četné úlomky svazků cévních se šroubovitě a síťovitě ztlustlými cévami; sklerenchymatická vlákna se širokým lumenem; řidčeji čtvercové až obdélníkové buňky parenchymu s tečkovanými stěnami; úlomky jednobuněčných ohnutých krycích chlupů s hladkými stěnami a občas i žláznatých chlupů; kulovitá pylová zrna s ostnitou exinou.

C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml ethanolu 60% (V/V) R, protře-pává se 15 min a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 2,5 mg červeně chinaldinové R a 2,5 mg modře sulfanové R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) nebo [deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

Mobilní fáze. Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, butan-1-olu R (10 + 12 + 40).

Nanášení. 5 µl, do proužků 10 mm [nebo 2 µl, do proužků 8 mm].

Vyvíjení. Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

Sušení. Na vzduchu.

Detekce. Pozoruje se ihned v denním světle.

Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
červeň chinaldinová: oranžovočervená skvrna	intenzivní fialová skvrna
modř sulfanová: modrá skvrna	intenzivní fialomodrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Cizí příměsi (2.8.2). Nejvýše 2 % úlomků plodů (červeně zbarvené stopky a části pětípouzdré toboleky se žlutošedě zbarveným oplodím, jehož tenké stěny tvoří četné vrstvy vláken probíhajících různými směry; plochá ledvinovitá, na povrchu tečkovaná semena).

Ztráta sušením (2.2.32). Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

Celkový popel (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Mohutnost vybarvení.** 100 g hrubě práškové drogy (1400) (2.9.12) se zhomogenizuje. Asi 10 g této směsi se upráškuje (355) (2.9.12). 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce smíchá s 25 ml vroucí vody R a zahřívá se 15 min na vodní lázni za častého protřepávání. Horká směs se zfiltruje do 50ml odměrné baňky; 100ml baňka i filtr se promyjí třikrát 5 ml teplé vody R. Po ochlazení se zředí vodou R na 50 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí vodou R na 50 ml. Měří se absorbance (2.2.25) při 520 nm za použití vody R jako kontrolní tekutiny. Absorbance neřezané drogy je nejméně 0,350 a absorbance řezané drogy je nejméně 0,250.

#### STANOVENÍ OBSAHU

1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 100 ml vody prosté oxidu uhličitého R, protřepává se 15 min a pak se zfiltruje. 50,0 ml filtrátu se smíchá se 100 ml vody prosté oxidu uhličitého R a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20) do dosažení hodnoty pH 7,0. 1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS odpovídá 6,4 mg kyseliny citronové.

## HYDRASTIDIS RADIX

### Vodilkový kořen

7.0:1831

*Synonymum.* Hydrastis rhizoma

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek a kořen druhu *Hydrastis canadensis* L.

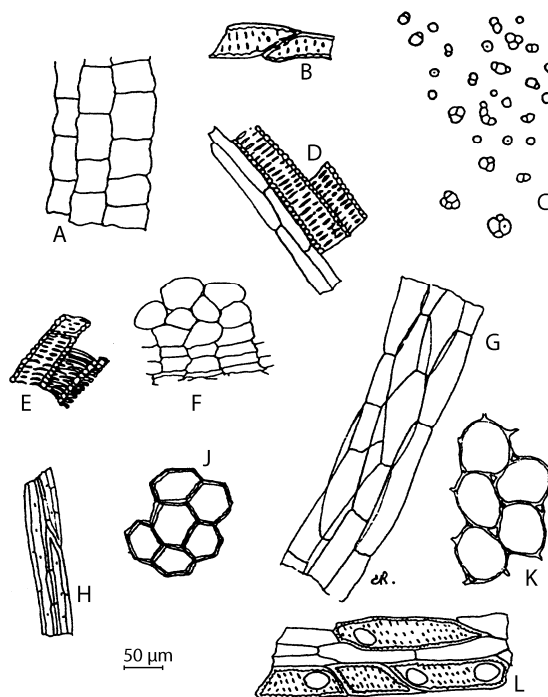
*Obsah,* počítáno na vysušenou drogu:

- *hydrastin* (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>; M<sub>r</sub> 383,4): nejméně 2,5 %;
- *berberin* (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 336,4): nejméně 3,0 %.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oddenek je zkroucený a uzlinovitý, asi 5 cm dlouhý a 5 mm až 10 mm silný. Na povrchu je nažloutlý nebo hnědošedý, nepravidelně rýhovaný, se zbytky četných tenkých drátovitých kořenů; na svrchní straně jsou patrné bazální části stonku a listové jizvy. Lom je krátký, pryskyřičnatý. Oddenek je na příčném řezu žlutohnědý s širokou kůrou, s asi dvanácti až dvaceti zřetelně oddělenými cévními svazky uspořádanými v kruhu a s velkou centrální dřevní.
- B.** Droga se upráškuje (180) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné tenkostěnné úlomky parenchymu [A, G, K]; někdy úlomky žlutohnědého korku z oddenku a kořenů v plošném pohledu [J] nebo v příčném řezu [F]; skupiny malých cév, s nápadnou perforací v šikmých koncích stěn [L] a s jednoduchými nebo ohraničenými štěrbinovitými otvory [B, D, E]; málo časté skupiny tenkostěnných tečkovaných vláken [H], obvykle provázených cévami; četná vejčitá nebo kulovitá zrnka oranžovohnědé hmoty. Pozoruje se pod mikroskopem

v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). V práškové droze jsou patrná četná škrobová zrna [C], většinou jednoduchá, někdy však složená až ze čtyř zrn; zrna jsou malá, kulovitá nebo vejčitá o průměru až asi 10 μm, někdy s malým, okrouhlým nebo štěrbinovitým hilem.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového vodilkového kořene

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 250 mg práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá se 4 ml směsi objemových dílů vody R a *methanolu R* (20 + 80), vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně a zfiltruje se. Zbytek se promyje dvakrát 2 ml *methanolu R*. Spojené roztoky se zředí *methanolem R* na 20 ml.

*Porovnávací roztok.* Těsně před použitím se rozpustí 5 mg *hydrastin-hydrochloridu R* a 5 mg *berberin-um-chloridu R* ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

*Nanášení.* 20 μl [nebo 2 μl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
berberin: jasně žlutě fluoreskující skvrna hydrastin: tmavě modře fluoreskující skvrna	jasně žlutě fluoreskující skvrna (berberin) tmavě modře fluoreskující skvrna (hydrastin)
	jasně modře fluoreskující skvrna (hydrastinin) tmavě modře fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 4,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 50 ml roztoku *amoniaku 26% R* (10 ml/l) v *ethanolu 96% R* a směs se vaří 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na teplotu místnosti a zfiltruje se přes chomáček vaty do baňky. Vata se zbytkem drogy se vloží zpět do baňky s kulatým dnem a extrakce se opakuje ještě dvakrát se 30 ml roztoku *amoniaku 26% R* (10 ml/l) v *ethanolu 96% R*, vaří se 10 min pod zpětným chladičem a zfiltruje se přes chomáček vaty do stejné baňky použité při předchozí extrakci. Spojené filtráty se zfiltrují přes papírový filtr do 250ml baňky s kulatým dnem, varná baňka i filtr se promyjí 20 ml roztoku *amoniaku 26% R* (10 ml/l) v *ethanolu 96% R*. Filtrát se odpaří ve vakuu ve vodní lázni při 55 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 50,0 ml mobilní fáze. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok.** Těsně před použitím se rozpustí 10,0 mg *hydrastin-hydrochloridu CRL* a 10,0 mg *berberinium-chloridu CRL* v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 µm).

**Mobilní fáze.** 9,93 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí v 730 ml *voďy R*, přidá se 270 ml *acetonitrilu R* a promíchá se.

**Průtoková rychlost.** 1,2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 235 nm.

**Nástrik.** 10 µl.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **eluční pořadí:** při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uve-

deném ve složení porovnávacího roztoku; zaznamenají se retenční časy těchto látek;

- **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi píkem hydrastinu a píkem berberinu.

Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky přítomné ve zkoušeném roztoku.

Obsah jednotlivých alkaloidů (hydrastinu a berberinu) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1} \cdot 2,5,$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku hydrastinu nebo berberinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku hydrastinu nebo berberinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost hydrastin-hydrochloridu nebo berberinium-chloridu v porovnávacím roztoku v gramech;
- $p$  – obsah hydrastinu v *hydrastin-hydrochloridu CRL* nebo berberinu v *berberinium-chloridu CRL* v procentech.

## HYPERICI HERBA

6.2:1438

## Třezalková nat'

## DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Hypericum perforatum* L., sklizené v době květu.

**Obsah.** Nejméně 0,08 % celkových hypericinů, vyjádřeno jako hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ;  $M_r$  504,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Větvený a holý stonek se dvěma více nebo méně vyniklými podélnými rýhami. Listy vstřícné, přisedlé, vejčité oválné, 15 mm až 30 mm dlouhé, bez palistů. Na okrajích listů žlásky, které se jeví jako černé tečky, celý povrch listů je pokryt četnými malými silně průsvitavými siličnými nádržkami, které jsou viditelné proti světlu. Květy pravidelné, uspořádané v koncovém širokém vrcholiku vidlanů. Pět zelených kališních lístků s ušty kopinatými, na okrajích s černými žlázkami (siličnými nádržkami); pět oranžovožlutých korunních lístků, na okrajích též s černými žlázkami; četné oranžově žluté tyčinky srostlé ve třech svazečcích a tři pestíky s červenými čnělkami.

Droga může také obsahovat nezralé a zralé plody a semena. Nezralé plody jsou zelené nebo nažloutlé, semena jsou bělavá. Někdy mohou být přítomné zralé plody; jsou to suché, trojpodzdré tobolky s četnými semeny, hnědé, široce nebo mírně vejčité, 5 mm až 10 mm dlouhé, se široce čárkovitými nebo tečkovanými žlázkami, nepravidelně rozbrázděné sekrečními kanálky. Zralá semena jsou 1 mm až 1,3 mm dlouhá, válcovitá nebo

trojhranná, na obou vrcholech tupě špičatá, hnědá nebo téměř černá, jemně podélně tečkovaná.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky mnohohranných buněk pokožky se stěnami růžencovitě ztlustlými a paracytickými nebo anomocytickými průduchy (2.8.3); úlomky listu a kalicha s velkými olejovými nádržkami a červeně zbarvenými pigmentovými buňkami; tenkostěnné protáhlé buňky pokožky koruny s rovnými nebo vlnitými antiklinálními stěnami; cévy a cévice s tečkovanými stěnami a skupiny ztlustlých vláken; úlomky čtyřhranného zdřevnatělého tečkovaného parenchymu; vláknitá vrstva prašníků a protáhlé, tenkostěnné buňky tyčinky s ryhovanou kutikulou; četná pylová zrna se třemi klíčními póry a hladkou exinou, jednotlivá nebo shloučená; drúzy šřavelanu vápenatého. Prášek může také obsahovat úlomky plodu, exokarp pevný s buňkami okrouhle mnohohrannými; endokarp s tupými tenkostěnnými vlákny; bělavé nebo hnědé úlomky osemení, se ztlustlými hexagonálními nebo okrouhle mnohohrannými buňkami; úlomky výživné tkáně a zárodku; četné kapky oleje.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (500) (2.9.12) se míchá s 10 ml *methanolu R* 10 min ve vodní lázni při 60 °C a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *rutinu R* a 5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (6 + 9 + 90).

*Nanášení.* 10 µl zkoušeného roztoku a 5 µl porovnávacího roztoku, do 10mm proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Postříká se roztokem *difenylboryloxyethyl-aminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*; po 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině skvrna *rutinu* a nad ní skvrna *hyperosidu*, obě skvrny fluoreskují žlutooranžově. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině červenooranžově fluoreskující skvrny (*rutin* a *hyperosid*) a v dolní části horní třetiny chromatogramu je skvrna *pseudo-hypericinu* a nad ní skvrna *hypericinu*, obě fluoreskují červeně. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další žlutě nebo modře fluoreskující skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % stonků o průměru více než 5 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (500) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkoušený roztok.* 0,800 g práškové drogy (500) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá se 60 ml směsí objemových dílů *vody R* a *tetrahydrofuranu R* (20 + 80) a vloží se magnetické míchadlo. Směs se vaří 30 min ve vodní lázni při 70 °C pod zpětným chladičem. Odstředí se (2 min při 700 g) a supernatantní tekutina se převede do 250ml baňky. Zbytek drogy se smíchá s 60 ml směsí objemových dílů *vody R* a *tetrahydrofuranu R* (20 + 80). Směs se opět zahřívá 30 min pod zpětným chladičem. Odstředí se (2 min při 700 g) a supernatantní tekutina se převede do téže odměrné baňky. Spojené roztoky se odpaří do sucha. Zbytek se převede 15 ml *methanolu R* do 25ml odměrné baňky za pomoci ultrazvuku. 250ml baňka se promyje *methanolem R*; promývací tekutina se přidá k roztoku v odměrné baňce a spojené tekutiny se zředí *methanolem R* na 25,0 ml. Opět se odstředí, 10 ml roztoku se zfiltruje přes stříkačku s filtrem (0,2 µm), první 2 ml filtrátu se odstraní. 5,0 ml filtrátu se převede do odměrné baňky a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.

*Kontrolní kapalina.* *Methanol R*.

Měří se absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 590 nm proti kontrolní kapalině.

Obsah celkových hypericinů v procentech, vyjádřeno jako hypericin (C<sub>30</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 125}{m \cdot 870}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 590 nm;

*m* – hmotnost drogy v gramech.

Specifická absorbance hypericinu má hodnotu 870.

## HYPERICI HERBAE EXTRACTUM SICCCUM QUANTIFICATUM

6.3:1874

Extrakt z třezalkové natě suchý kvantifikovaný

#### DEFINICE

Je to suchý extrakt se stanoveným obsahem vyrobený z drogy *Hyperici herba* (1438).

*Obsah*, počítáno na vysušený extrakt:

– celkové hypericiny, vyjádřeno jako hypericin (C<sub>30</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; M<sub>r</sub> 504,5): 0,10 % až 0,30 %;

– flavonoidy, vyjádřeno jako rutin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 610,5): nejméně 6,0 %;

– hyperforin (C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 536,8): nejvýše 6,0 % a ne více než obsah uvedený v označení na obalu.

#### VÝROBA

Extrakt se vyrábí z rostlinné drogy a ethanolu 50% (V/V) až 80% (V/V) nebo methanolu 50% (V/V) až 80% (V/V) vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědošedý prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. 0,25 g se disperguje v 5 ml methanolu R.

Porovnávací roztok. 5 mg rutinu R a 5 mg hyperosidu R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

Mobilní fáze. Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R a ethyl-acetátu R (6 + 9 + 90).

Nanášení. 10 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

Vyvíjení. Po dráze 10 cm [nebo 7,5 cm].

Sušení. 10 min při 100 °C až 105 °C.

Detekce. Postříká se roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R. Po asi 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	žlutooranžově fluoreskující skvrna dvě červeně fluoreskující skvrny (hypericin a pseudohypericin)
	tři žlutooranžově fluoreskující skvrny
hyperosid: žlutooranžově fluoreskující skvrna	žlutooranžově fluoreskující skvrna (hyperosid) žlutě a modře fluoreskující skvrny, mohou se vzájemně překrývat
rutin: žlutooranžově fluoreskující skvrna	žlutooranžově fluoreskující skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## STANOVENÍ OBSAHU

**Celkové hypericiny.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

Zkoušený roztok. 70,0 mg se za použití ultrazvuku rozpustí ve 25,0 ml methanolu R a roztok se odstředí. Roztok se vystaví na asi 8 min působení xenonové lampy při asi 765 W/m<sup>2</sup>.

Porovnávací roztok. Množství extraktu z třezalkové natě suchého kvantifikovaného CRL odpovídající 0,15 mg hypericinu se za použití ultrazvuku rozpustí ve 25,0 ml methanolu R a odstředí se. Roztok se vystaví na asi 8 min působení xenonové lampy při asi 765 W/m<sup>2</sup>.

Kolona:

– rozměry: délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm);  
– teplota: 40 °C.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů ethyl-acetátu R, roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R (15,6 g/l), jehož pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 2, a methanolu R (39 + 41 + 160).

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 590 nm.

Nástřik. 20 µl.

Doba záznamu. 15 min.

Identifikace piků. K identifikaci piků pseudohypericinu a hypericinu se použije chromatogram dodávaný s extraktem z třezalkové natě suchým kvantifikovaným CRL a chromatogram porovnávacího roztoku.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s extraktem z třezalkové natě suchým kvantifikovaným CRL;  
– rozlišení: nejméně 2 mezi pikem pseudohypericinu a pikem hypericinu.

Obsah celkových hypericinů v procentech, vyjádřeno jako hypericin (C<sub>30</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p}{A_3 \cdot m_1}$$

v němž značí:

A<sub>1</sub> – plochu píku pseudohypericinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>2</sub> – plochu píku hypericinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>3</sub> – plochu píku hypericinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

m<sub>2</sub> – hmotnost extraktu z třezalkové natě suchého kvantifikovaného CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

p – obsah hypericinu v extraktu z třezalkové natě suchém kvantifikovaném CRL v procentech.

**Hyperforin a flavonoidy.** Kapalinová chromatografie (2.2.29). Zkouška se provádí za chránění před světlem.

Rozpouštěcí směs. Směs objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80).

Zkoušený roztok. 75,0 mg se rozpustí ve 20,0 ml rozpouštěcí směsi za použití ultrazvuku a odstředí se.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg rutosidu trihydrátu CRL se rozpustí ve 200,0 ml rozpouštěcí směsi.

Porovnávací roztok (b). 75,0 mg extraktu z třezalkové natě suchého kvantifikovaného CRL se rozpustí ve 20,0 ml rozpouštěcí směsi za použití ultrazvuku a odstředí se.

Kolona:

– rozměry: délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (3 µm).

**Mobilní fáze:**

- mobilní fáze A: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R a vody R (3 + 1000);
- mobilní fáze B: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R a acetonitrilu R (3 + 1000).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)	Průtoková rychlost (ml/min)
0–8	82	18	0,8
8–18	82 → 47	18 → 53	0,8
18–18,1	47 → 3	53 → 97	0,8
18,1–19	3	97	0,8 → 1,2
19–29	3	97	1,2
29–30	3 → 82	97 → 18	1,2

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor při 360 nm, potom při 275 nm po vyevaluování biapigeninu (asi 22 min).

**Nástřik.** 10 µl.

**Identifikace píků.** K identifikaci píků rutinu, hyperosidu, isokvercitosidu, kvercitosidu, kvercetin, biapigeninu, hyperforinu a adhyperforinu se použije chromatogram dodávaný s extraktem z třezalkové natě suchým kvantifikovaným CRL a chromatogram porovnávacího roztoku (b).

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s extraktem z třezalkové natě suchým kvantifikovaným CRL;
- rozlišení: nejméně 2,0 mezi píkem rutinu a píkem hyperosidu a nejméně 2,0 mezi píkem hyperforinu a píkem adhyperforinu.

Obsah hyperforinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_4 \cdot m_4 \cdot p \cdot 2,3}{A_5 \cdot m_3 \cdot 10}$$

v němž značí:

- $A_4$  – plochu píku hyperforinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_5$  – plochu píku rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- $m_3$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_4$  – hmotnost rutosidu trihydrátu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- 2,3 – korekční faktor pro přepočítání mezi hyperforinem a rutinem;
- $p$  – obsah rutinu v rutosidu trihydrátu CRL v procentech.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako rutin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_4 \cdot p \cdot (A_6 + A_7 + A_8 + A_9 + A_{10} + A_{11})}{m_3 \cdot A_5 \cdot 10}$$

v němž značí:

- $A_5$  – plochu píku rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- $A_6$  – plochu píku rutinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

- $A_7$  – plochu píku hyperosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_8$  – plochu píku isokvercitosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_9$  – plochu píku kvercitosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_{10}$  – plochu píku kvercetin na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_{11}$  – plochu píku biapigeninu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $m_3$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_4$  – hmotnost rutosidu trihydrátu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- $p$  – obsah rutinu v rutosidu trihydrátu CRL v procentech.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede obsah hyperforinu.

**IPECACUANHAE EXTRACTUM FLUIDUM NORMATUM****6.0:1875****Hlavněkový extrakt tekutý standardizovaný****DEFINICE**

Je to tekutý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Ipecacuanhae radix* (0094).

**Obsah.** 1,80 % až 2,20 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin (C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 480,65).

**VÝROBA**

Vyrábí se vhodným postupem z drogy a ethanolu [60% (V/V) až 80% (V/V)].

**VLASTNOSTI**

**Vzhled.** Tmavě hnědá tekutina.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml se zředí ethanolem 70% (V/V) R na 50 ml. Ke 2,0 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml vody R, 0,1 ml amoniaku 26% R, 10 ml etheru R a protřepe se. Horní vrstva se oddělí, vysuší se asi 2 g síranu sodného bezvodého R a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg emetin-hydrochloridu CRL a 3 mg cefaelin-hydrochloridu CRL se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů amoniaku 26% R, methanolu R, ethyl-acetátu R a toluenu R (2 + 15 + 18 + 65).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Postříká se roztokem jodu R (5 g/l) v ethanolu 96% R, zahřívá se 10 min při 60 °C, nechá se 30 min chladnout a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
_____	_____
_____	_____
emetin: žlutá skvrna cefaelin: světle hnědá skvrna	žlutá skvrna (emetin) světle hnědá skvrna (cefaelin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
_____	_____
_____	_____
emetin: intenzivně žlutě fluoreskující skvrna	intenzivně žlutě fluoresku- jící skvrna (emetin) světle modře fluoreskující skvrna (cefaelin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

U tekutého extraktu z kořene druhu *Cephaelis acuminata* jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrny emetinu a cefaelinu podobné velikosti.

U tekutého extraktu z kořene druhu *Cephaelis ipecacuanha* je na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna emetinu mnohem větší než skvrna cefaelinu.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 95 % až 105 % hodnoty uvedené v označení na obalu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

1,00 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu* 70% (V/V) R a pomocí skleněné tyčinky se převede na chromatografickou kolonu asi 0,2 m dlouhou o vnitřním průměru asi 15 mm, obsahující 8 g *oxidu hlinitého zásaditého* R. Po vsáknutí do vrstvy oxidu hlinitého se baňka, skleněná tyčinka a vnitřní stěny kolony omyjí třikrát 2 ml *ethanolu* 70% (V/V) R. Eluuje se po částech 40 ml *ethanolu* 70% (V/V) R tak, aby nedošlo k rozvíření nebo vysušení povrchu vrstvy oxidu hlinitého. Eluáty se spojí a odpaří se na vodní lázni na asi 10 ml. Nechá se ochladit a přidá se 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové* 0,02 mol/l VS a 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého* R. Přebytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným* 0,02 mol/l VS za použití 0,15 ml *červeně methylové směsného indikátoru* RS.

Provede se slepá zkouška, při níž se zkoušený extrakt nahradí 10,0 ml *ethanolu* o koncentraci uvedené v označení na obalu.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové* 0,02 mol/l VS odpovídá 4,807 mg celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin (C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

## IPECACUANHAE PULVIS NORMATUS

6.2:0093

### Hlavněkový kořen práškovaný standardizovaný

#### DEFINICE

Je to práškovaný (180) (2.9.12) kořen hlavěnky, jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo práškové drogy s nižším obsahem alkaloidů.

*Obsah.* 1,9 % až 2,1 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin (C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 480,7), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Světle šedý nebo žlutohnědý prášek, nevýrazného pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu* RS.

Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: parenchymatické buňky; rafidy šťavelanu vápenatého až 80 μm dlouhé, buď ve svazcích, nebo rozptýlené ve formě písku; úlomky cévic a cév, zpravidla 10 μm až 20 μm v průměru, s ohraničenými dvířky; delší cévy a sklereidy z oddenku. Pozoruje se v roztoku *glycerolu* R 50% (V/V). V parenchymatických buňkách jsou patrná škrobová zrna buď jednotlivá, nebo dvoučetná až osmičetná, jednotlivá škrobová zrna u *Cephaelis ipecacuanha* o průměru až 15 μm, u *Cephaelis acuminata* o průměru až 22 μm. Při hodnocení v *glycerolu* 85% R mohou být patrné krystaly laktosy.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se smíchá ve zkumavce s 0,05 ml *amoniaku* 26% R a 5 ml *etheru* R a směs se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou. Po 30 min stání se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 2,5 mg *emetin-dihydrochloridu* CRL a 3 mg *cefaelin-dihydrochloridu* CRL se rozpustí v *methanolu* R a zředí se jím na 20 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC* R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku* 26% R, *methanolu* R, *ethyl-acetátu* R a *toluenu* R (2 + 15 + 18 + 65).

*Nanášení.* 10 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Postříká se roztokem *jodu* R (5 g/l) v *ethanolu* 96% R, zahřívá se 10 min při 60 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení A.* Na chromatogramech zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku je v dolní části žlutá skvrna (emetin) a pod ní světle hnědá skvrna (cefaelin).

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Skvrna emetinu fluoreskuje intenzivně žlutě, skvrna cefaelinu fluoreskuje světle modře. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další, méně výrazné fluoreskující skvrny.

*C. acuminata* hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, fluorescencí a veli-

kostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*C. ipecacuanha* se liší od výše uvedeného druhu tím, že skvrna cefaelinu na chromatogramu zkoušeného roztoku je výrazně menší než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

7,5 g se odváží do suché baňky, přidá se 100 ml etheru *R* a protřepává se 5 min. Pak se přidá 5 ml amoniaku zředěného *RSI* a protřepává se 1 h. Přidá se 5 ml vody *R* a znovu se intenzivně protřepe. Etherová vrstva se slije přes chomáček vaty. Zbytek v baňce se promyje dvakrát 25 ml etheru *R* a každý etherový podíl se slije přes stejný chomáček vaty. Spojené etherové podíly se oddestilují. Zbytek se rozpustí ve 2 ml ethanolu 90% (*V/V*) *R*, odpaří se do sucha a odparek se suší 5 min při 100 °C. Zbytek po odpaření se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 5 ml předem zneutralizovaného ethanolu 90% (*V/V*) *R*. Přidá se 15,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l *VS*, 0,5 ml červeně methylové směšného indikátoru *R* a nadbytek kyseliny se titruje hydroxidem sodným 0,1 mol/l *VS*.

1 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l *VS* odpovídá 24,03 mg celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## IPECACUANHAE RADIX

6.0:0094

### Hlavěnkový kořen

#### DEFINICE

Jsou to usušené úlomky kořene a oddenku druhu *Cephaelis ipecacuanha* (BROT.) A. RICH., známého jako Matto Grosso ipecacuanha nebo druhu *Cephaelis acuminata* KARSTEN, známého jako Costa Rica ipecacuanha, nebo směs obou druhů. Hlavními alkaloidy jsou emetin a cefaelin.

**Obsah.** Nejméně 2,0 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin ( $C_{29}H_{40}N_2O_4$ ;  $M_r$  480,7), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga slabého pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** *C. ipecacuanha*. Kořen zpravidla tvoří zkroucené úlomky, tmavě červenohnědé nebo velmi tmavohnědé, zřídka více než 15 cm dlouhé nebo 6 mm silné, zevně hustě prstencovitě zaškrkované. Lom je v kůře krátký, ve dřevě tříštivý. Na příčném řezu je široká našedlá kůra a úzká homogenní hustá vrstva dřeva. Oddenek je zpra-

vidla kratší, většinou spojený s kořeny. Je válcovitý, až 2 mm v průměru, jemně podélně vrásčitý s dření, která zaujímá asi jednu šestinu průměru.

*C. acuminata*. Kořen podobný jako u *C. ipecacuanha*, liší se však v následujících znacích: je často až 9 mm silný, na povrchu šedohnědý nebo červenohnědý, příčná zúžení zpravidla ve vzdálenostech 1 mm až 3 mm, jsou asi 0,5 mm až 1 mm široká. Zúžení je patrné přibližně na polovině obvodu, v krajním případě není patrné vůbec.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle šedý nebo žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu *RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: parenchymatické buňky; rafidy šťavelanu vápenatého až 80 μm dlouhé, buď ve svazcích, nebo rozptýlené ve formě písku; úlomky cévic a cév zpravidla 10 μm až 20 μm v průměru, s ohraničenými dvůrkami; delší cévy a sklereidy z oddenku. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku glycerolu *R* 50% (*V/V*). V parenchymatických buňkách jsou patrná škrobová zrna buď jednotlivá, nebo dvoučetná až osmičetná, u *C. Ipecacuanha* o průměru až 15 μm, u *C. acuminata* o průměru až 22 μm.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,1 g práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá ve zkumavce s 0,05 ml amoniaku 26% *R* a 5 ml etheru *R* a směs se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou. Po 30 min stání se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg emetin-dihydrochloridu *CRL* a 3 mg cefaelin-dihydrochloridu *CRL* se rozpustí v methanolu *R* a zředí se jím na 20 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů amoniaku 26% *R*, methanolu *R*, ethyl-acetátu *R* a toluenu *R* (2 + 15 + 18 + 65).

**Nanášení.** 10 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Postříká se roztokem jodu *R* (5 g/l) v ethanolu 96% *R*, zahřívá se 10 min při 60 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení A.** Na chromatogramech zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku je v dolní části žlutá skvrna (emetin) a pod ní světle hnědá skvrna (cefaelin).

**Detekce B.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Skvrna emetinu fluoreskuje intenzivně žlutě, skvrna cefaelinu fluoreskuje světle modře. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další, méně výrazné fluoreskující skvrny.

*C. acuminata* hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, fluorescencí a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*C. ipecacuanha* liší se od výše uvedeného druhu tím, že skvrna cefaelinu na chromatogramu zkoušeného roztoku je výrazně menší než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.



## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

7,50 g práškované drogy (180) (2.9.12) se odváží do suché baňky, přidá se 100 ml etheru R a protřepává se 5 min. Pak se přidá 5 ml amoniaku zředěného RSI a protřepává se 1 h. Přidá se 5 ml vody R a znovu se intenzivně protřepe. Etherová vrstva se slije přes chomáček vaty. Zbytek v baňce se promyje dvakrát 25 ml etheru R a každý etherový podíl se slije přes stejný chomáček vaty. Spojené etherové podíly se oddestilují. Zbytek se rozpustí ve 2 ml ethanolu 90% (V/V) R, odpaří se do sucha a odparek se suší 5 min při 100 °C. Zbytek po odpaření se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 5 ml předem zneutralizovaného ethanolu 90% (V/V) R. Přidá se 15,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS a titruje se hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za použití 0,5 ml červeně methylové směšného indikátoru R. 1 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS odpovídá 24,03 mg celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## IPECACUANHAE TINCTURA NORMATA

6.0:1530

## Hlavěnková tinktura standardizovaná

## DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Ipecacuanhae radix* (0094).

**Obsah.** 0,18 % až 0,22 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin (C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 480,65).

## VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z drogy a ethanolu 70% (V/V).

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutohnědá tekutina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Ke 2,0 ml se přidají 2 ml vody R, 0,1 ml amoniaku 26% R, 10 ml etheru R a protřepe se. Etherová vrstva se oddělí, vysuší se nad asi 2 g síranu sodného bezvodého R a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg emetin-hydrochloridu CRL a 3 mg cefaelin-hydrochloridu CRL se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů amoniaku 26% R, methanolu R, ethyl-acetátu R a toluenu R (2 + 15 + 18 + 65).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

**Detekce A.** Postříká se roztokem jodu R (5 g/l) v ethanolu 96% R, zahřívá se 10 min při 60 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
emetin: žlutá skvrna cefaelin: světle hnědá skvrna	žlutá skvrna (emetin) světle hnědá skvrna (cefaelin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
emetin: intenzivně žlutě fluoreskující skvrna	intenzivně žlutě fluoreskující skvrna (emetin) světle modře fluoreskující skvrna (cefaelin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

U tinktury z kořene druhu *Cephaelis acuminata* jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrny emetinu a cefaelinu podobné velikosti.

U tinktury z kořene druhu *Cephaelis ipecacuanha* je na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna emetinu mnohem větší než skvrna cefaelinu.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Obsah ethanolu** (2.9.10). 95 % až 105 % obsahu uvedeného v označení na obalu.

## STANOVENÍ OBSAHU

10,00 g se převede na chromatografickou kolonu délky asi 0,2 m a vnitřního průměru asi 15 mm naplněnou 8 g oxidu hlinitého zásaditého R. Po vsáknutí do vrstvy oxidu hlinitého se vnitřní stěna kolony omyje třikrát 2 ml ethanolu 70% (V/V) R. Eluuje se po částech 40 ml ethanolu 70% (V/V) R tak, aby nedošlo k rozvíření nebo vysušení povrchu vrstvy oxidu hlinitého. Eluáty se spojí a odpaří se na vodní lázni na asi 10 ml. Nechá se ochladit a přidá se 10,0 ml kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS a 20 ml vody prosté oxidu uhličitého R. Přebytek kyseliny se titruje hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS za použití 0,15 ml červeně methylové směšného indikátoru RS.

Provede se slepá zkouška, při níž se zkoušená tinktura nahradí 10,0 ml ethanolu o koncentraci uvedené v označení na obalu.

1 ml kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS odpovídá 4,807 mg celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin ( $C_{29}H_{40}N_2O_4$ ).

## ISATIDIS RADIX

7.3:2566

### Kořen borytu barvířského

#### DEFINICE

Je to usušený kořen druhu *Isatis tinctoria* L. (syn. *Isatis indigotica* FORTUNE) sbíraný na podzim.

**Obsah.** Nejméně 1,0 % argininu ( $C_6H_{14}N_4O_2$ ;  $M_r$  174,2), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořen je kuželovitý, mírně zkroucený, 10 cm až 20 cm dlouhý, o průměru 0,5 cm až 1 cm, na povrchu šedožlutý nebo hnědožlutý, podélně zvrásněný, s příčnými bradavčitými výrůstky, s vedlejšími kořeny nebo s jizvami po nich. Kořenová hlava je mírně rozšířená, s tmavě zelenými nebo tmavě hnědými přeslenovitě uspořádanými bázemi řapíků a s četnými hrbolky. Lom je žlutobílý, v kůře hnědý nebo tmavě hnědý, ve dřevě žlutý nebo hnědý.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je bíložlutý nebo žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korku složené z pěti až osmi tenkostěnných vrstev; úlomky dřeva se síťovitou strukturou; tenkostěnné oválné parenchymatické buňky. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). V prášku jsou patrná četná jednotlivá nebo složená (dvočetná, trojčetná nebo čtyřčetná) škrobová zrna o průměru 1,5  $\mu$ m až 3,4  $\mu$ m, s hilem ve tvaru bodu, štěrbiny nebo ve tvaru V.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* K 0,5 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *ethanolu* 70% (V/V) R a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.  
*Porovnávací roztok.* 4 mg *argininu R* a 4 mg *cystein-hydrochloridu R* se rozpustí v 1 ml *ethanolu* 70% (V/V) R.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *acetonitrilu R* (2 + 8 + 30).  
*Nanášení.* 4  $\mu$ l, do proužků 10 mm [nebo 8 mm].  
*Vývíjení.* Po dráze 8,5 cm [nebo 6 cm].  
*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se vystaví na 5 min působení par *amoniaku* 26% R, pak se postříká *ninhydrinem RS4* a zahřívá se 3 min při 120 °C.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
cystein: hnědá skvrna	výrazná hnědá skvrna
arginin: hnědá skvrna	hnědá skvrna
	hnědá skvrna (arginin) světle hnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 9,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* K 0,100 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 20 ml *ethanolu* 70% (V/V) R, vloží se na 20 min do ultrazvukové lázně, zfiltruje se a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v *ethanolu* 70% (V/V) R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 25,0 mg *argininu CRL* se rozpustí v *ethanolu* 70% (V/V) R a zředí se jím na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 3,0 mg *cystein-hydrochloridu R* se rozpustí v 6,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *ethanolem* 70% (V/V) R na 10,0 ml.

*Porovnávací roztoky (c), (d), (e), (f), (g) a (h).* Porovnávací roztok (a) se zředí na šest koncentrací argininu v rozsahu předpokládané hodnoty ve zkoušeném roztoku.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R* (3  $\mu$ m);

– *teplota:* 30 °C.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny trifluoroctové R* a *vody R* (0,2 + 99,8).

*Průtoková rychlost.* 0,2 ml/min.

*Detekce.* Detektor rozptylu světla s odpařováním; jako vhodné bylo nalezeno následující nastavení (jestliže má detektor různé parametry nastavení, upraví se nastavení detektoru tak, aby bylo v souladu s kritériem testu způsobilosti pro poměr signálu k šumu):

– *nosný plyn:* *dusík R*;

– *tlak:* 330 kPa;

– *teplota odpařování:* 80 °C.

*Nástřik.* 10  $\mu$ l.

*Doba záznamu.* 25 min.

**Test způsobilosti:**

- rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem cysteinu a píkem argininu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b);
- poměr signálu k šumu: nejméně 50 pro pík argininu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Sestrojí se kalibrační křivka za použití logaritmu koncentrací (mg/10 ml) porovnávacích roztoků (c), (d), (e), (f), (g) a (h) na ose *x* (korigováno deklarovaným obsahem argininu CRL) a logaritmu ploch odpovídajících píků na ose *y*.

Obsah argininu (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{10^4}{m \cdot 10}$$

v němž značí:

- A* – logaritmus koncentrace argininu ve zkoušeném roztoku, odečtený z kalibrační křivky;
- m* – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech.

**JUNIPERI ETHEROLEUM****7.0:1832****Jalovcová silice***Synonymum.* Juniperi aetheroleum**DEFINICE**

Je to silice získaná ze zralých nefermentovaných plodů druhu *Juniperus communis* L. destilací s vodní parou. Může se přidat vhodná antioxidační látka.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Pohyblivá bezbarvá nebo nažloutlá kapalina, charakteristického pachu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI****1.:** B.**2.:** A.**A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se rozpustí v 5 ml heptanu R.

*Porovnávací roztok.* 20 mg  $\alpha$ -terpineolu R a 20  $\mu$ l terpinen-4-olu R se rozpustí ve 25 ml heptanu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se při 100 °C až 105 °C do objevení skvrn. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
	intenzivní hnědofialová skvrna
	hnědá skvrna
	fialovorůžová skvrna
terpinen-4-ol: hnědofialová skvrna	hnědofialová skvrna (terpinen-4-ol)
	fialová skvrna
$\alpha$ -terpineol: fialová nebo hnědofialová skvrna	fialová nebo hnědofialová skvrna ( $\alpha$ -terpineol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).**

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Relativní hustota (2.2.5).** 0,857 až 0,876.

**Index lomu (2.2.6).** 1,471 až 1,483.

**Optická otáčivost (2.2.7).** –15° až –0,5°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo peroxidové (2.5.5).** Nejvýše 20.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice (2.8.7).** Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 60 mg se rozpustí v trimethylpentanu R a zředí se jím na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 25  $\mu$ l  $\alpha$ -pinenu R, 25  $\mu$ l sabinenu R, 25  $\mu$ l  $\beta$ -pinenu R, 25  $\mu$ l  $\beta$ -myrcenu R, 25  $\mu$ l  $\alpha$ -fellandrenu R, 25  $\mu$ l limonenu R, 25  $\mu$ l terpinen-4-olu R, 25  $\mu$ l bornyl-acetátu R a 25  $\mu$ l  $\beta$ -karyofyleny R se smíchá s trimethylpentanem R a zředí se jím na 25,0 ml.

**Kolona:**

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 30 m (může se použít tloušťka filmu 1  $\mu$ m) až 60 m (může se použít tloušťka filmu 0,2  $\mu$ m), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;

– *stacionární fáze:* poly(difenyldimethyl)siloxan R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 2,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–1	60
	1–58	60 → 230
nástříkový prostor		250
detektor		250

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástrík.* 0,5 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem sabinenu a píkem β-pinenu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Nepřihlíží se k píku trimethylpentanu a k pikům s plochou menší než 0,01 % celkové plochy.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

- α-pinen: 20 % až 50 %;
- sabinen: nejvýše 20 %;
- β-pinen: 1,0 % až 12 %;
- β-myrcen: 1,0 % až 35 %;
- α-fellandren: nejvýše 1,0 %;
- limonen: 2,0 % až 12 %;
- terpinen-4-ol: 0,5 % až 10 %;
- bornyl-acetát: nejvýše 2,0 %;
- β-karyofylen: nejvýše 7,0 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## JUNIPERI FRUCTUS

7.2:1532

### Jalovcový plod

*Synonymum.* Juniperi pseudo-fructus

#### DEFINICE

Je to zralý usušený nepravý plod (galbulus) druhu *Juniperus communis* L.

*Obsah silice.* Nejméně 10 ml/kg bezvodé drogy.

#### VLASTNOSTI

Droga má výrazný aromatický pach, zvláště po rozdrčení.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Zdužnatělá šiška podobající se bobuli (galbulus) je kulovitá o průměru až 10 mm, fialovohnědá nebo černohnědá, často modře oviněná. Je tvořena třemi masitými plodními šupinami. Na temeni plodu je třípaprsčitý šev s nezřetelnými hrboly mezi jednotlivými paprsky. Na bázi plodu je často zbytek stopky. Vnitřní, parenchymatická část je drolivá, nahnědlá, obsahuje tři nebo zřídka dvě malá podlouhlá ostře trojhranná nahoře zašpičatělá na spodu mírně zaoblená velmi tvrdá semena. Semena jsou přirostlá vnější stranou bazální části k parenchymu plodní šupiny. Semena jsou na zevní straně obklopena velkými, oválnými siličnými nádržkami s lepkavou pryskyřicí.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky plodních šupin z buněk se stěnami ztlustlými, tečkovanými, bezbarvými, vyplněnými hně-

dou lepkavou hmotou; anomocytické průduchy (2.8.3) jen zřídka; úlomky pokožky z temene plodu s dutinami a zubovitými buňkami; úlomky hypodermis s kolenchymatickými ztlustlými buňkami; úlomky mezokarpu s velkými tenkostěnnými, většinou okrouhlými, parenchymatickými buňkami s velkými mezibuněčnými dutinami a nepravidelnými velkými žlutými idioblasty se šterbinovitými dvůrky (soudečkové buňky); úlomky schizogenních siličných buněk; úlomky osemení se ztlustlými, tečkovanými bezbarvými sklereidami, z nichž každá obsahuje jeden nebo několik hranolovitých krystalů kalcium-oxalátu; úlomky endospermu a zárodku s tenkostěnnými buňkami obsahujícími mastný olej a aleuronová zrna.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Směs silice a xyleny ze Stanovení obsahu se zředí *hexanem R* na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 4,0 mg *guajazulenu R* a 50 µl *cineolu R* se rozpustí v 10 ml *hexanu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *tolueny R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní polovině červená skvrna (guajazulen) a v dolní polovině hnědofialová nebo šedofialová skvrna (cineol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní fialová skvrna (monoterpeny a seskviterpeny) v poloze odpovídající poloze skvrny guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku, červenofialová skvrna v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku, šedofialová skvrna (terpinen-4-ol) v poloze odpovídající poloze těsně pod skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod ní modrá skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být slabě fialová skvrna polohou odpovídající poloze cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % nezralých nebo jinak zbarvených plodů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 120 ml/kg; stanoví se s 20,0 g čerstvě rozdrčené drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 500ml baňce s kulatým dnem za použití 20,0 g hrubě upráškované drogy (pomocí vhodného mlynku těsně před stanovením) a 200 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xyleny R* a destiluje se nejméně 90 min rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

## LAVANDULAE ETHEROLEUM

6.8:1338

## Levandulová silice

*Synonymum.* Lavandulae aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z kvetoucích vrcholků druhu *Lavandula angustifolia* MILLER (*Lavandula officinalis* CHAIX) destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá nebo světle žlutá čirá kapalina, charakteristického pachu.

*Pach.* Po linalyl-acetátu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 20 µl se rozpustí v 1 ml toluenu R.

*Porovnávací roztok.* 10 µl linalolu R, 10 µl cineolu R a 10 µl linalyl-acetátu R se rozpustí v 1 ml toluenu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 8 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další fialovočervené nebo zelenohnědé skvrny mezi skvrnou linalyl-acetátu a čelem rozpouštědla.

Horní okraj desky	
	fialovočervená nebo zelenohnědá skvrna
linalyl-acetát: fialová nebo hnědá skvrna	fialová nebo hnědá skvrna (linalyl-acetát) fialovočervená skvrna
1,8-cineol: fialovohnědá skvrna	možná slabá fialovohnědá skvrna (1,8-cineol)
linalol: fialová nebo hnědá skvrna	fialová nebo hnědá skvrna (linalol) slabá žlutohnědá skvrna několik nerozlišených skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,878 až 0,892.

**Index lomu** (2.2.6). 1,455 až 1,466.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-12,5^\circ$  až  $-6,0^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 200 µl se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5 µl limonenu R, 5 µl cineolu R, 5 µl oktan-3-onu R, 5 mg kafiru R, 40 µl linalolu R, 50 µl linalyl-acetátu R, 10 µl terpinen-4-olu R, 5 µl lavandulyl-acetátu R, 5 µl lavandulolu R a 5 mg  $\alpha$ -terpineolu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl limonenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 50,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí heptanem R na 5,0 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;

– *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–15	70
	15–70	70 → 180
nástřikový prostor		220
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1 µl.

*Eluční pořadí.* Jednotlivé látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

– *rozlišení:* nejméně 1,4 mezi píkem terpinen-4-olu a píkem lavandulyl-acetátu.

Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah jednotlivých látek v procentech. Obsahy v procentech jsou v rozmezích:

- limonen: nejvýše 1,0 %;
- 1,8-cineol: nejvýše 2,5 %;
- oktan-3-on: 0,1 % až 5,0 %;
- kafr: nejvýše 1,2 %;
- linalol: 20,0 % až 45,0 %;
- linalyl-acetát: 25,0 % až 47,0 %;
- terpinen-4-ol: 0,1 % až 8,0 %;
- lavandulyl-acetát: nejméně 0,2 %;
- lavandulol: nejméně 0,1 %;
- $\alpha$ -terpineol: nejvýše 2,0 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**Chirální čistota.** Plynová chromatografie (2.2.28).

**Zkoušený roztok.** 0,02 g se rozpustí v pentanu R a zředí se jím na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 10  $\mu$ l linalolu R (směs (R)-linalolu a (S)-linalolu), 5 mg borneolu R a 10  $\mu$ l linalyl-acetátu R (směs (R)-linalyl-acetátu a (S)-linalyl-acetátu) se rozpustí v pentanu R a zředí se jím na 10 ml.

**Kolona:**

- materiál: tavený křemen;
- rozměry: délka 25 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- stacionární fáze:  $\beta$ -cyklohextrin pro chirální chromatografii modifikovaný R (tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m).

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,3 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 30.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–65	50 → 180
nástříkový prostor		230
detektor		230

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřík.** 1  $\mu$ l.

**Eluční pořadí.** (R)-linalol, (S)-linalol, borneol, (R)-linalyl-acetát, (S)-linalyl-acetát; v závislosti na pracovních podmínkách a stavu kolony se borneol může eluovat před nebo za (S)-linalolem.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- rozlišení: nejméně 5,5 mezi píkem (R)-linalolu a píkem (S)-linalolu; nejméně 2,9 mezi píkem (S)-linalolu a píkem borneolu; nejméně 2,0 mezi píkem (R)-linalyl-acetátu a píkem (S)-linalyl-acetátu.

Obsah specifikovaných S-enantiomerů v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_S}{A_S + A_R} \cdot 100,$$

v němž značí:

$A_S$  – plochu píku odpovídající S-enantiomeru;

$A_R$  – plochu píku odpovídající R-enantiomeru.

**Limity:**

- (S)-linalol: nejvýše 12 %;
- (S)-linalyl-acetát: nejvýše 1 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## LAVANDULAE FLOS

7.1:1534

### Levandulový květ

**DEFINICE**

Je to usušený květ druhu *Lavandula angustifolia* P. MILL. (*L. officinalis* CHAIX.)

**Obsah silice.** Nejméně 13 ml/kg bezvodé drogy.

**VLASTNOSTI**

Droga má výrazný aromatický pach.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

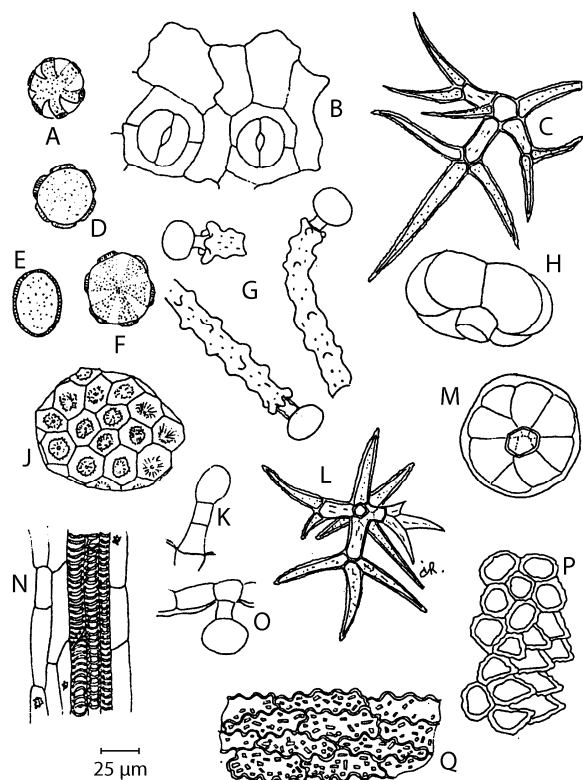
1.: A, B a D.

2.: A, B a C.

**A.** Květ je krátce stopkatý, kalich je trubkovitý, modrošedý, nahoře poněkud rozšířený, pětičetný. Čtyři z ušů jsou velmi krátké, pátý je malý, okrouhlý, koruna je modrá s horním dvojlaločným pyskem, spodním trojlaločným pyskem, se čtyřmi dvoumocnými tyčinkami s vejčitými prašníky.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je modrošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): jedno nebo mnohobuněčné přeslenitě větvené krycí chlupy [C, L]; žláznaté chlupy s krátkou nohou a osmibuněčnou hlavičkou typu *Lamiaceae* z bočního pohledu [H], z plošného pohledu [M]; žláznaté chlupy s jednobuněčnou [O] nebo mnohobuněčnou [K] nohou a jednobuněčnou hlavičkou; žláznaté chlupy s dlouhou nepravidelnou (uzlinovitou) nohou a jednobuněčnou hlavičkou, oddělenou od nohy intermediální buňkou s hladkou kutikulou; podobné žláznaté chlupy s věncem malých kulovitých buněk umístěných těsně pod intermediální buňkou [G]; úlomky bradavčité pokožky z vnitřní strany koruny z plošného pohledu [J], z bočního pohledu [P]; úlomky pokožky kalicha z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými, obsahující hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Q]; kulovitá pylová zrna o průměru asi 45  $\mu$ m a s exinou se šesti šterbinovitými klíčovými póry a šesti lištovitými paprscitě uspořádanými ztenčeninami [A, D, E, F]; zřídka úlomky pokožky s průduchy, většinou diacytického typu (2.8.3) [B]; úlomky cévní tkáně se šroubovitě ztlustlými cévami provázané parenchymem, s některými buňkami obsahujícími malé drúzy kalcium-oxalátu [N].

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového levandulového květu

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *hexanu R*, protřepává se 5 min a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *linalolu R* a 10 µl *linalyl-acetátu R* se rozpustí v 5 ml *hexanu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině šedomodrá skvrna (*linalol*) a ve střední třetině šedomodrá skvrna (*linalyl-acetát*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny v poloze odpovídající poloze skvrn *linalolu* a *linalyl-acetátu* a mezi těmito skvrnami je červenofialová skvrna (*epoxydihydrokaryofylen*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ještě další skvrny.

**D.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Jiné druhy a odrůdy rodu *Lavandula* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy pěti hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi těmito píky jsou největší píky *linalolu* a *linalyl-acetátu*.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Jiné druhy a odrůdy rodu *Lavandula*.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml směsi silice a xylenu ze zkoušky Stanovení silic v rostlinných drogách se zředí *hexanem R* na 5 ml, přidá se 1 g *síranu sodného bezvodého R*, protřepe se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 0,1 g *limonenu R*, 0,2 g *cineolu R*, 0,05 g *kafru R*, 0,4 g *linalolu R*, 0,6 g *linalyl-acetátu R* a 0,2 g *α-terpineolu R* se rozpustí ve 100 ml *hexanu R*.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 *R*.

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–15	70
	15–70	70 → 180
nástřikový prostor		220
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* Stejný objem každého roztoku.

*Eluční pořadí.* Látky se eluují v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku; zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem *limonenu* a píkem *cineolu*;
- *počet teoretických pater:* nejméně 30 000, počítáno pro pík *limonenu* při 110 °C.

Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikuje šest složek porovnávacího roztoku přítomných ve zkoušeném roztoku (nepřehlíží se k píkům odpovídajícím *hexanu* a *xylenu*).

*Limit:*

- *kafr:* nejvýše 1 %.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 20,0 g drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 1000ml baňce s kulatým dnem za použití 20,0 g drogy a 500 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R* a destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

## LAVANDULAE LATIFOLIAE ETHEROLEUM

7.0:2419

Silice levandule širokolisté  
*Synonymum. Spicae aetheroleum*

### DEFINICE

Je to silice získaná z kvetoucích vrcholků druhu *Lavandula latifolia* MEDIK. destilací s vodní parou.

### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá pohyblivá, světle žlutá nebo zelenožlutá kapalina.

Má charakteristický pach po cineolu a kafru.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

#### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 20 µl se rozpustí v 1 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 10 µl *cineolu R*, 10 µl *linalolu R* a 10 µl *linalyl-acetátu R* se rozpustí v 1 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 8 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	růžová skvrna
linalyl-acetát: fialová nebo hnědá skvrna	může být přítomna slabě fialová nebo hnědá skvrna (linalyl-acetát) růžová skvrna
cineol: fialovohnědá skvrna	intenzivní fialovohnědá skvrna (cineol)
linalol: fialová nebo hnědá skvrna	intenzivní fialová nebo hnědá skvrna (linalol) našedlá nebo nahnědlá skvrna slabě fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků limonenu, cineolu, kafru, linalolu, linalyl-acetátu,  $\alpha$ -terpineolu a *trans*- $\alpha$ -bisabolenu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,894 až 0,907.

**Index lomu** (2.2.6). 1,461 až 1,468.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-7^\circ$  až  $+2^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,5; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

**Rozpustnost v ethanolu** (2.8.10). 1,0 ml zkoušené látky je dobře rozpustný, někdy s opalescencí, ve 3,0 ml *ethanolu 70% (V/V) R*.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 200 µl se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 200 µl *silice levandule širokolisté CRL* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl *limonenu R* se rozpustí v 50,0 ml *heptanu R*. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *heptanem R* na 5,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–15 15–70	70 70 → 180
nástřikový prostor		220
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1 µl.

*Identifikace píků.* K identifikaci píků limonenu, cineolu, kafru, linalolu, linalyl-acetátu,  $\alpha$ -terpineolu a *trans*- $\alpha$ -bisabolenu se použije chromatogram dodávaný se *silicí levandule širokolisté CRL* a chromatogram porovnávacího roztoku (a).

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému se *silicí levandule širokolisté CRL*;
- *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem cineolu.



Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících mezích:

- limonen: 0,5 % až 3,0 %;
- cineol: 16,0 % až 39,0 %;
- kafr: 8,0 % až 16,0 %;
- linalol: 34,0 % až 50,0 %;
- linalyl-acetát: nejvýše 1,6 %;
- $\alpha$ -terpineol: 0,2 % až 2,0 %;
- trans- $\alpha$ -bisabolen: 0,4 % až 2,5 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

#### SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## LEONURI HERBA

6.0:1833

### Srdečnicková nať

*Synonymum.* Leonuri cardiaca herba

#### DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Leonurus cardiaca* L.

*Obsah.* Nejméně 0,2 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kousky lodyhy jsou pýřité, podélně rýhované, čtyřhranné, duté, až asi 10 mm široké; listy jsou vstřícné, křížmostojné, řapíkaté, v paždí horních listů je asi šest až dvanáct malých květů uspořádaných v přisedlé lichopřesleny tvořící dlouhý listnatý klas. Spodní listy okrouhle jsou vejčité, třílaločné až pětílaločné, řidčeji až sedmílaločné, nepravidelně zubaté. Horní listy a listeny jsou celokrajné nebo lehce třílaločné, kopinaté, s pilovitým okrajem, na bázi klínovité, svrchní strana listu je zelená, roztroušeně chlupatá, spodní strana je světlejší, hustě chlupatá, s vyniklou, dlaniť uspořádanou, síťovitou žilnatinou. Květy mají trubkovitě nálevkovitý kalich 3 mm až 5 mm dlouhý s pěti tuhými nazpět ohnutými ústy, korunu se dvěma pysky, horní pysk je růžový, na svrchní straně huňatý, spodní pysk je červeně skvrnitý, čtyři tyčinky jsou vlnatě chlupaté.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listu s jednořadým palisádovým parenchymem, který zasahuje téměř do středu listu, a řídkým houbovým parenchymem; úlomky pokožky listu: svrchní pokožka z buněk s rovnými antiklinálními stěnami a proužkovanou kutikulou; spodní pokožka z buněk se stěnami zprohýbanými; průduchy diacytického typu (2.8.3) čtenější na spodní straně listu; žláznaté chlupy s krátkou jednobuněčnou nohou a kulovitou hlavičkou, složenou z osmi až šestnácti buněk nebo s jednobuněčnou hlavičkou; krycí chlupy kuželovité, jednořadé, dvoubuněčné až osmibuněčné, až asi 300  $\mu$ m dlouhé někdy až 1500  $\mu$ m dlouhé, na povrchu s bradavčitou nebo proužkovanou kutikulou, příčné stěny buněk mírně

ztlustlé; úlomky kalicha s malými drúzami štavelanu vápenatého; okrouhlá pylová zrna o průměru asi 25  $\mu$ m až 30  $\mu$ m, se třemi klíčovými póry, třemi štěrbinami a hladkou exinou; ztlustlá, zdřevnatělá vlákna, šroubovitě a kruhovitě ztlustlé cévy lodyhy; někdy hnědé úlomky oplodí s jednotlivými krystaly štavelanu vápenatého.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R* a 5 min se zahřívá za protřepávání ve vodní lázni při 65 °C; po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 5 mg žlutí naftolové *S R* a 2,0 mg katalpolu *R* se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagehu pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (20 + 20 + 60).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *dimethylaminobenzaldehydem RS2* (použije se 5 ml na čtvercovou desku o straně 200 mm) a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C do objevení skvrn. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další nevýrazné šedomodré skvrny.

Horní okraj desky	
	široká bílá skvrna šedomodrá skvrna (iridoid)
žlutí naftolová <i>S</i> : intenzivní žlutá skvrna katalpol: šedomodrá skvrna	jedna nebo dvě šedomodré skvrny (iridoid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2 % hnědých nebo žlutých listů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok.* 1,00 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do 100ml baňky. Chomáček vaty se vloží zpět ke zbytku do varné baňky a extrahuje se dvakrát 20 ml *acetonu R* vždy 10min varem pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, každý extrakt se zfiltruje přes chomáček vaty baňky. Po ochlazení se

spojené acetonové extrakty zfiltrují přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se *acetone* R, předem použitým k promytí baňky a papírového filtru, na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody* R a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-acetátu* R. Spojené ethyl-acetátové vrstvy se v dělicí nálevce promyjí dvakrát 50 ml *vody* R, zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého* R do odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem* R na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** K 10,0 ml základního roztoku se přidá 1 ml *chloridu hlinitého RS1* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové* R 5% (V/V) v *methanolu* R na 25,0 ml.

**Kontrolní kapalina.** 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové* R 5% (V/V) v *methanolu* R na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolní kapalině.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 425 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

## LEVISTICI RADIX

6.0:1233

### Libečkový kořen

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek a kořen druhu *Levisticum officinale* KOCH.

**Obsah** (počítáno na vysušenou drogu):

– silice: nejméně 4,0 ml/kg (celá droga);

– silice: nejméně 3,0 ml/kg (řezaná droga).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oddenek a dlouhé kořeny jsou často podélně rozpůlené. Oddenek je krátký o průměru až 5 cm, světle šedohnědý nebo žlutohnědý, jednohlavý nebo vícehlavý; kořeny jsou málo větvené, zbarvené shodně s oddenkem, jsou až 1,5 cm silné a až asi 25 cm dlouhé; lom je obvykle hladký; na lomu je patrná velmi široká žlutobílá kůra a úzké hnědožluté dřevo.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu* RS. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: buňky korku při plošném pohledu mnohohranné nebo okrouhlé s hnědým obsahem; mohutný parenchym z buněk většinou tenkostěnných, okrouhlých, ale i z buněk se stěnami mírně ztlustlými; skupiny náhradních vláken s nezdřevnatělými stěnami a charakteristickou síťovitou strukturou; úlomky větších, síťovitě ztlustlých cév o průměru až 125 μm; úlomky siličných kanálků o průměru až 180 μm. Pozoruje se pod mikroskopem

v roztoku *glycerolu* R 50% (V/V): jsou patrná jednoduchá okrouhlá nebo vejčitá škrobová zrna o průměru až asi 12 μm a četná větší složená zrna.

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky *Angelicae radix* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
eugenol (označeno při 254 nm)	intenzivně světle modře nebo bíle fluoreskující skvrna
kumarin (označeno při 254 nm)	intenzivně světle modře nebo bíle fluoreskující skvrna
	jedna nebo dvě méně intenzivně světle modře nebo bíle fluoreskující skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Angelicae radix.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g čerstvě práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu* R, vaří se 30 s, ochladí se a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *kumarinu* R a 25 μl *eugenolu* R se rozpustí v 10 ml *methanolu* R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu* F<sub>254</sub> pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *dichlormethanu* R a *toluenu* R (50 + 50).

**Nanášení.** 20 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** Dvakrát po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Označí se zhášející skvrny odpovídající eugenolu a kumarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v dolní třetině modře nebo žlutě fluoreskující skvrna.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %; stanoví se s 50 g zkoušené drogy.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 40,0 g drogy upráškované (500) (2.9.12) těsně před stanovením se destiluje 4 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 2000ml baňce s 500 ml vody R a deseti kapkami *parafinu tekutého R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## LICHEN ISLANDICUS

6.8:1439

## Lišejník islandský

## DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená stélka druhu *Cetraria islandica* (L.) ACHARIUS *sensu lato*.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Stélka, až 15 cm dlouhá nepravidelně vidličnatě větvená, je tvořena hladkými, žlábkovitými nebo téměř plochými tuhými křehkými proužky, 0,3 cm až 1,5 cm širokými a asi 0,5 mm silnými, občas zubatými, na okrajích brvitými (pyknidie). Svrchní strana stélky je nazeleňalá nebo zelenohnědá, spodní strana šedobílá nebo světle hnědá s bělavými vpadlými skvrnami (tzv. dýchací otvory). V paždí terminálních cípů stélky jsou velmi zřídka patrná hnědá miskovitá apothecia.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky pseudoparenchymu, který je tvořen ve vnější korové části ztlustlými hyfami s úzkým lumenem a v následující vrstvě hyfami se širokým lumenem, které se volně prolétají; v dřevnaté části jsou mezi hyfami nazelenalé nebo nahnědlé buňky řasy o průměru až 15 µm; někdy úlomky okraje stélky s pohárkovitými nebo válcovitými spermogoniemi o průměru až asi 160 µm a délce až asi 400 µm.

**C.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml vody R a vaří se 2 min až 3 min. Šedohnědý roztok po vychladnutí tvoří gel, který se *jodem RS* barví modře.

**D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *acetonu R* a zahřívá se 2 min až 3 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *anetholu R* a 5 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *acetonu R*, *methanolu R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *toluenu R* (5 + 5 + 10 + 80).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 4 µl] zkoušeného roztoku a 10 µl [nebo 2 µl] porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabší skvrny.

Horní okraj desky	
anethol: modrá nebo modrofialová skvrna	šedomodrá skvrna
	dvě slabé šedomodré skvrny slabá šedohnědá nebo šedá skvrna
kyselina kávová: šedomodrá skvrna	šedofialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Olovo** (2.4.27). Nejvýše 10,0 µg/g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 3,0 %.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 4,5; stanoví se s práškovanou drogou (355) (2.9.12).

## LINI SEMEN

7.1:0095

## Lněné semeno

## DEFINICE

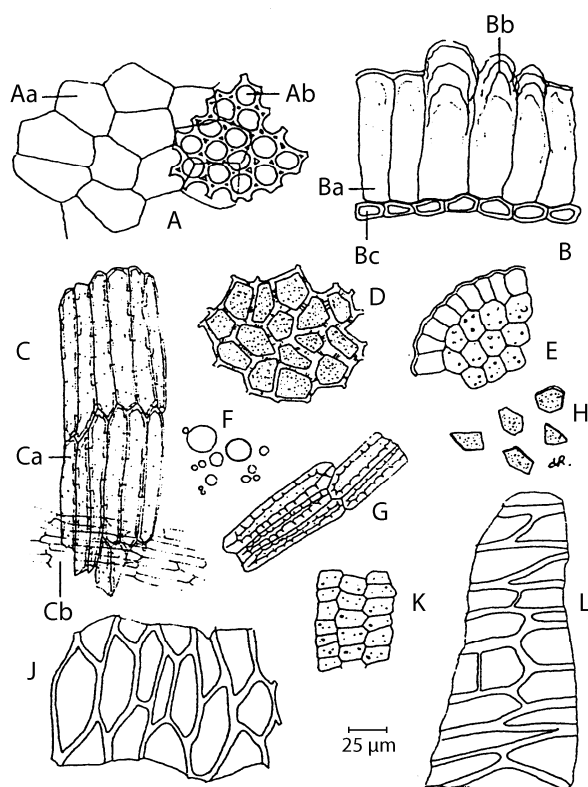
Je to usušené zralé semeno druhu *Linum usitatissimum* L.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Semena jsou plochá, podlouhle vejčitá. Osemení je tmavě červenohnědé nebo žluté, hladké a lesklé. Semena jsou 4 mm až 6 mm dlouhá, 2 mm až 3 mm široká, 1,5 mm až 2 mm silná. Na jednom konci jsou zaokrouhlená, na druhém vybíhající v kosý hrot a blízko něho je jako nevýrazná prohloubenina hilum. Pod lupou je patrný jemně jamkovitý povrch. Uvnitř semene je tenký, bělavý endosperm a zárodek, který je tvořen dvěma velkými plochými nažloutlými olejovými děložami. Zárodečný kořínek je orientován proti hilu.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je na omak mastný. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito

znaky (viz obrázek 1): úlomky vnějšího osemení [A, B] s buňkami, které jsou mnohohranné z plošného pohledu [Aa] nebo zúžené v příčném řezu [Ba] a obsahují sliz [Bb]; úlomky podpokožkové kolenchymatické vrstvy v příčném řezu [Bc] nebo z plošného pohledu [Aa] s okrouhlými buňkami s trojúhelníkovitými intercelulárními prostory, často se sklerenchymatickou vrstvou podlouhlých buněk s tenkostěnnými a tečkovanými stěnami [Ca]; některé se silně ztlustlými a tečkovanými stěnami [G]; úlomky, z plošného pohledu [C], skládající se z hyalinní vrstvy s tenkostěnnými buňkami [Cb] často provázenými podlouhlými sklereidami, se kterými svírají téměř pravé úhly [Ca]; úlomky vnitřní pokožky osemení, z plošného pohledu [D], složené z mírně ztlustlých mnohohranných buněk vyplněných oranžově hnědým pigmentem; malé mnohostěnné částičky pigmentu [H]; četné úlomky parenchymu osemení, s velkými, slabě a pravidelně ztlustlými buňkami z plošného pohledu [J, L]; parenchym endospermu [K] a děloh [E] obsahující aleuronová zrna a kapky oleje; velmi četné izolované kapky oleje [F].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového líného semene

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 10,0 % semen s poškozeným osemením a nejvýše 1,5 % ostatních cizích příměsí.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 4.

**Kadmium** (2.4.27). Nejvýše 0,5 µg/g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 8,0 %; 1,000 g práškováné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

## LIQUIRITIAE EXTRACTUM FLUIDUM ETHANOLICUM NORMATUM

7.3:1536

Lékořicový extrakt tekutý ethanolický standardizovaný

*Synonymum.* Lékořicový extrakt tekutý lihový standardizovaný

#### DEFINICE

Je to tekutý standardizovaný extrakt vyrobený z rostlinné drogy *Liquiritiae radix* (0277).

*Obsah.* 3,0 % až 5,0 % kyseliny 18β-glycyrrhizové ( $C_{42}H_{62}O_{16}$ ;  $M_r$  822,9).

#### VÝROBA

Vyrábí se z rostlinné drogy a ethanolu 70% (V/V) postupem vhodným pro tekuté extrakty.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tmavohnědá čirá tekutina.

Má nevýrazný charakteristický pach a sladkou chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g se smíchá v 50ml baňce s kulatým dnem se 16,0 ml vody R a 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové RS a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr a baňka se suší 60 min při 105 °C. Filtr se vloží do baňky, přidá se 20 ml etheru R a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 40 °C pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 5,0 ml etheru R.

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg kyseliny glycyrrhetové R a 5,0 mg thymolu R se rozpustí v 5 ml etheru R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů amoniaku 26% R, vody R, ethanolu 96% R a ethyl-acetátu R (1 + 9 + 25 + 65).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu, 5 min.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku je v dolní polovině skvrna žhářející fluorescenci (kyselina glycyrrhetová).

*Detekce B.* Postříká se anisaldehydem RS, suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová skvrna (kyselina glycyrrhetová) a v horní třetině červená skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní polovině fialová skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny glycyrrhetové na chromatogramu porovnávacího roztoku a v horní třetině je žlutá skvrna (isolikvirigenin) v poloze odpovídající poloze pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 52 % (V/V) až 65 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

**Ochratoxin A** (2.8.22). Nejvýše 80 µg v kilogramu extraktu.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *vody R* (8 + 92).

*Zkoušený roztok.* 1,000 g se zředí rozpouštěcí směsí na 100 ml a odstředí se. 2,0 ml supernatantní tekutiny se zředí rozpouštěcí směsí na 10,0 ml.

*Základní roztok.* 0,130 g *amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL* se rozpustí v rozpouštěcí směsí a zředí se jí na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5,0 ml základního roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10,0 ml základního roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* 15,0 ml základního roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 100,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku *kyseliny octové ledové R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (6 + 30 + 64).

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

*Nástrik.* 10 µl.

Sestrojí se kalibrační křivka za použití hmotností *amonium-glycyrrhizátu* v porovnávacích roztocích (v gramech) na ose *x* a ploch odpovídajících píků na ose *y*.

Za použití retenčních časů a ploch píků na chromatogramech porovnávacích roztoků se identifikuje a stanoví plocha píku *kyseliny 18β-glycyrrhizové* na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah *kyseliny 18β-glycyrrhizové* (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$A \cdot \frac{5}{m} \cdot B \cdot \frac{823}{840},$$

v němž značí:

*A* – hmotnost odpovídající *amonium-glycyrrhizátu* ve zkoušeném roztoku odečtenou z kalibrační křivky v gramech;

*B* – deklarovaný obsah *amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL* v procentech;

*m* – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech;

823 – molekulovou hmotnost *kyseliny 18β-glycyrrhizové*;

840 – molekulovou hmotnost *amonium-glycyrrhizátu* (bezvodého).

LIQUIRITIAE EXTRACTUM SICCUM  
AD SAPORANDUM

7.3:2378

## Lékořicový extrakt suchý pro aromata

## DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z rostlinné drogy *Liquiritiae radix* (0277).

*Obsah.* 5,0 až 7,0 % *kyseliny 18β-glycyrrhizové* (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 822,9), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z řezané rostlinné drogy a vody.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutohnědý nebo hnědý prášek.

Má velmi sladkou chuť.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *methanolu R* (50 + 50).

*Zkoušený roztok.* 0,30 g se smíchá se 30 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 60 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se směs protřepe dvakrát 20 ml *ethyl-acetátu R*. Spojené organické vrstvy se zfiltrují přes filtr pokrytý *síranem sodným bezvodým R*. Filtrát se odpaří ve vakuu do sucha a zbytek se rozpustí ve 2,0 ml rozpouštěcí směsí.

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg *kyseliny glycyrrhetové R* a 5,0 mg *thymolu R* se rozpustí v 5,0 ml rozpouštěcí směsí.

*Stacionární fáze.* *Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R*, *ethanolu 96% R* a *ethyl-acetátu R* (1 + 9 + 25 + 65).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 10 µl]; do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 7 cm].

*Sušení.* Na vzduchu, 5 min.

*Detekce.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
thymol: červená skvrna	žlutá skvrna
_____	_____
_____	_____
kyselina glycyrrhetová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina glycyrrhetová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 7,0 %.

**Ochratoxin A** (2.8.22). Nejvýše 80 µg v kilogramu extraktu. Maximální hodnota se týká čistého nezředěného extraktu. Pokud se použijí pomocné látky ke zředění extraktu, měla by se i úměrně snížit maximální hodnota.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80).

*Zkoušený roztok.* 0,200 g se ve 150 ml zabroušené kuželové baňce smíchá se 100,0 ml rozpouštěcí směsi a vloží se na 2 min do ultrazvukové lázně. Zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

*Porovnávací roztok.* 50,0 mg *amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL* se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (6 + 30 + 64).

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

*Nástřik.* 10 µl.

*Doba záznamu.* Trojnásobek retenčního času kyseliny 18β-glycyrrhizové.

*Retenční čas.* Kyselina 18β-glycyrrhizová asi 9 min.

*Identifikace piků.* K identifikaci piků kyseliny 18β-glycyrrhizové a kyseliny 18α-glycyrrhizové se použije chromatogram dodávaný s *amonium-glycyrrhizátem (pro HPLC) CRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- chromatogram porovnávacího roztoku odpovídá chromatogramu dodávanému s *amonium-glycyrrhizátem (pro HPLC) CRL*,
- *rozlišení:* nejméně 2,0 mezi pikem kyseliny 18β-glycyrrhizové a pikem kyseliny 18α-glycyrrhizové.

Obsah kyseliny 18β-glycyrrhizové (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,979}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5}$$

v němž značí:

- A*<sub>1</sub> – plochu píku kyseliny 18β-glycyrrhizové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A*<sub>2</sub> – plochu píku kyseliny 18β-glycyrrhizové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitého pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;
- m*<sub>2</sub> – hmotnost *amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL* použitého pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;

- p* – obsah kyseliny 18β-glycyrrhizové v *amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL* v procentech;
- 0,979 – přepočítávací faktor mezi pikem kyseliny glycyrrhizové a *amonium-glycyrrhizátu*.

## LIQUIRITIAE RADIX

7.3:0277

## Lékořicový kořen

## DEFINICE

Je to usušený neloupaný nebo loupaný, celý nebo řezaný kořen a výběžky druhu *Glycyrrhiza glabra* L. a/nebo *Glycyrrhiza inflata* BAT. a/nebo *Glycyrrhiza uralensis* FISCH.

*Obsah.* Nejméně 4,0 % kyseliny 18β-glycyrrhizové (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>; *M*<sub>r</sub> 822,9), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořen je málo větvený; kůra je hnědá nebo hnědošedá, s podélnými rýhami a se zbytky postranních kořenů. Válcovité výběžky o průměru 1 cm až 2 cm jsou na svrchní straně podobné kořeni, ale příležitostně s malými pupeny. Lom kořene a výběžků je zrnitý a vláknitý. Vrstva korku je tenká, vrstva sekundárního lýka silná, světle žlutá, s paprscitou strukturou. Žlutě zbarvené dřevo je kompaktní, s paprscitou strukturou. Výběžek má uprostřed dřev, která u kořene chybí. U loupaného kořene chybí zevní část kůry.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je světle žlutý nebo mírně našedlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky žlutých silnostěnných vláken 700 µm až 1200 µm dlouhých, o průměru 10 µm až 20 µm, s tečkovaným luminem, často provázených komůrkovými vlákny s krystaly kalcium-oxalátu, které jsou 10 µm až 35 µm dlouhé a 2 µm až 5 µm široké. Stěny cév jsou žluté, 5 µm až 10 µm silné, zdřevnatělé s četnými dvůrkatými ztenčeninami a štěrbínovitými otvory; úlomky korku s tenkostěnnými buňkami a jednotlivými krystaly kalcium-oxalátu; krystaly kalcium-oxalátu se nacházejí i v úlomcích parenchymu. U loupaného kořene úlomky korku chybí. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R* a *vody R*. V práškové droze jsou jednoduchá okrouhlá nebo oválná škrobová zrna o průměru 2 µm až 20 µm.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 0,50 g práškové rostlinné drogy (180) (2.9.12) se v 50 ml baňce s kulatým dnem smíchá se 16,0 ml *vody R* a 4,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje. Filtr a baňka se suší 60 min při 105 °C. Filtr se vloží do baňky, přidá se 20,0 ml *etheru R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem při 40 °C, po ochlazení se zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml *etheru R*.

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg kyseliny glycyrrhetové R a 5,0 mg thymolu R se rozpustí v 5,0 ml etheru R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů amoniaku 26% R, vody R, ethanolu 96% R a ethyl-acetátu R (1 + 9 + 25 + 65).

*Nanášení.* 10 µl.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu, 5 min.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku je v dolní polovině skvrna zhášejší fluorescenci (kyselina glycyrrhetová).

*Detekce B.* Postříká se anisaldehydem RS, suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová skvrna (kyselina glycyrrhetová) a v horní třetině červená skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní polovině fialová skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny glycyrrhetové na chromatogramu porovnávacího roztoku a v horní třetině žlutá skvrna (isolikvirigenin) v poloze odpovídající poloze pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 % pro neloupanou drogu a nejvýše 6,0 % pro loupanou drogu.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 % pro neloupanou drogu a nejvýše 0,5 % pro loupanou drogu.

**Ochratoxin A** (2.8.22). Nejvýše 20 µg na kilogram rostlinné drogy.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,000 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se ve 150ml zabroušené kuželové baňce smíchá se 100,0 ml roztoku amoniaku 17,5% RS (8 g/l) a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Část tekutiny se odstředí a 1,0 ml supernatantní tekutiny se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 5,0 ml. Zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm), filtrát se použije jako zkoušený roztok.

*Roztok A.* 0,130 g amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL se rozpustí v roztoku amoniaku 17,5% RS (8 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 10,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* 15,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku kyseliny octové ledové R, acetonitrilu R a vody R (6 + 30 + 64).

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

*Nástřik.* 10 µl.

Sestrojí se kalibrační křivka za použití hmotností amonium-glycyrrhizátu v porovnávacích roztocích (v gramech) na ose x a ploch odpovídajících píků na ose y.

Za použití retenčních časů a ploch píků na chromatogramech porovnávacích roztoků se identifikuje a stanoví plocha píku kyseliny 18β-glycyrrhizové (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>) na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah kyseliny 18β-glycyrrhizové (C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$A \cdot \frac{5}{m} \cdot B \cdot \frac{823}{840}$$

v němž značí:

*A* – hmotnost odpovídající amonium-glycyrrhizátu ve zkoušeném roztoku odečtenou z kalibrační křivky v gramech;

*B* – deklarovaný obsah amonium-glycyrrhizátu (pro HPLC) CRL v procentech;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

823 – molekulovou hmotnost kyseliny 18β-glycyrrhizové;

840 – molekulovou hmotnost amonium-glycyrrhizátu (bezvodého).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda je droga loupaná nebo neloupaná.

## LUPULI FLOS

7.0:1222

### Chmelová šišťice

#### DEFINICE

Je to usušené, zpravidla celé samičí květenství druhu *Humulus lupulus* L.

#### VLASTNOSTI

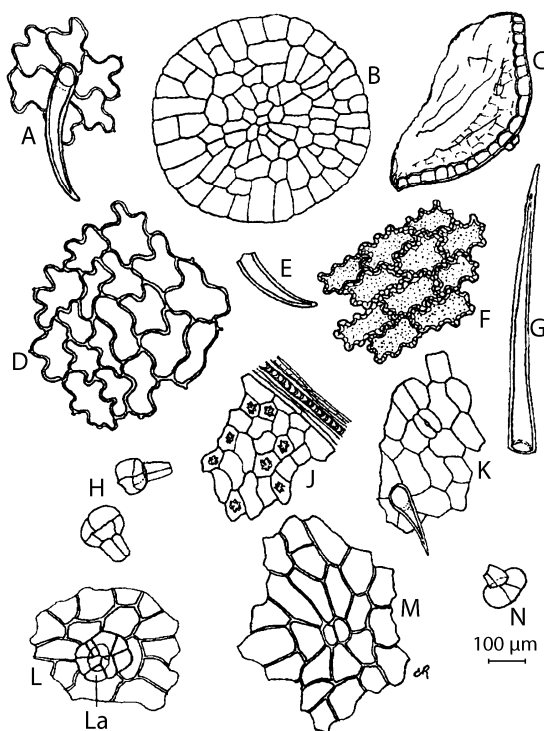
Droga charakteristického aromatického pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Chmelové šišťice jsou obvykle jednotlivé, 2 cm až 5 cm dlouhé, listenaté, vejčitého tvaru, složené z četných oválných zelenožlutých, přisedlých, suchomázdřivých, překrývajících se listenů. Zevní listeny jsou ploché, pravidelné, vnitřní listeny jsou delší, na bázi nepravidelné, úplně uzavírající plod (nažku). Semeníky nebo

řidčeji plody, báze listenů a zejména listence jsou pokryty malými oranžovožlutými žlázkami.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky listenů a listenců s mnohohrannými, nepravidelnými pokožkovými buňkami s vlnitě zprohýbanými stěnami [D, L, M]; jednobuněčné kuželovité přímé nebo zahnuté krycí chlupy s tenkými hladkými stěnami, jejich úlomky [E, G] nebo spolu s pokožkou [A]; zřídka anomocytické průduchy (2.8.3) [K]; žláznaté chlupy, s dvoubuněčnou dvouřadou nohou a s hlavičkou složenou z osmi malých buněk, obvykle volné [H, N], zřídka s pokožkou [La]; úlomky mezofylu s malými drůzami kalcium-oxalátu [J]; četné charakteristické oranžovožluté žláznaté chlupy s krátkou dvoubuněčnou dvouřadou nohou, nahoře pohárkovitě rozšířené, pohárkovitá část o průměru 150  $\mu\text{m}$  až 250  $\mu\text{m}$  je tvořena polokulovitou vrstvou sekrečních buněk, jejichž kutikula je vychlípena pryskyřičným sekretem, v plošném pohledu [B] nebo v bočním pohledu [C]; úlomky protáhlých sklerenchymatických buněk osemení se silnými na povrchu zvrásněnými stěnami a s četnými tečkami [F].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové chmelové šišťice

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 1,0 g čerstvě upráškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (3 + 7), 15 min se protřepává a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *sudanu I R*, 2,0 mg *kurkuminu R* a 2,0 mg *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *ethyl-acetátu R* a *cyklohexanu R* (2 + 38 + 60).

*Nanášení.* 20  $\mu\text{l}$ , do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou tři zhášející skvrny: v dolní čtvrtině slabá skvrna (kurkumin), poněkud níže od středu je skvrna dimethylaminobenzaldehydu a nad ní skvrna sudanu I. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou zhášející skvrny v polohách odpovídajících polohám skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku; v poloze přibližně odpovídající poloze skvrny kurkuminu na chromatogramu porovnávacího roztoku je slabě zbarvená skvrna (xanthohumol), v poloze přibližně odpovídající poloze skvrny dimethylaminobenzaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou skvrny humulonů a v poloze přibližně odpovídající poloze skvrny sudanu I na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou skvrny lupulonů.

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Skvrny lupulonů na chromatogramu zkoušeného roztoku vykazují modrou fluorescenci, skvrny humulonů hnědou fluorescenci a skvrna xanthohumolu tmavě hnědou fluorescenci.

*Detekce C.* Vrstva se postříká *zkoumadlem fosfomolybdenan-wolframovým zředěným RS* a vloží se do komory nasycené parami amoniaku; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení C.* Skvrny humulonů a lupulonů na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou zbarveny modrošedě, skvrna xanthohumolu zelenošedě; na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou modrošedé nebo hnědošedé skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Látky extrahovatelné ethanolem 70% (V/V).** Nejméně 25,0 %; 10,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 300 ml *ethanolu 70% (V/V) R* a zahřívá se 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zfiltruje se a prvních 10 ml filtrátu se odstraní. 30,0 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 0,250 g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.



## LYTHRI HERBA

6.0:1537

## Kyprejová nať

## DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Lythrum salicaria* L.

**Obsah.** Nejméně 5,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je tuhá, čtyřhranná, v horní části větvená, hnědozelená, podélně rýhovaná, pýřitá. Listy jsou vstřícné, křížmostojné, zřídka v přeslenu po třech, květenství (svazečky) v úžlabí vstřícných listenů tvoří koncový klas. Listy jsou přisedlé, kopinaté, na bázi srdčité, 5 cm až 15 cm dlouhé a 1 cm až 2,5 cm široké, naspodu pýřité; sousední žilky anastomozují u okraje čepele. Kalich je trubkovitý, vytrvalý, chlupatý, 4 mm až 8 mm dlouhý, šest široce trojúhelníkovitých lístků kališních se střídá se šesti šídlovitými přívěsky, které jsou dvakrát delší než kališní lístky. Koruna je šestičetná, korunní lístky jsou fialovorůžové, úzce kopistovitě. Tyčinek je dvanáct uspořádaných ve dvou kruzích po šesti (tyčinky jsou nestejně dlouhé, jeden kruh tyčinek je ukryt v květu, druhý je delší a z koruny vyniká). Plody, jsou-li v droze přítomné, jsou malé tobolky uzavřené ve vytrvalém kalichu.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: jednobuněčné nebo dvoubuněčné jednořadé krycí chlupy dolní části lodyhy a spodní strany listů, z buněk se stěnami ztlustlými, jemně tečkovanými; četné jednobuněčné nebo dvoubuněčné jednořadé krycí chlupy kalichu z tenkostěnných, jemně tečkovaných buněk; průhledné růžovofialové úlomky korunních lístků; četné drůzy šřavelanu vápenatého; pylová zrna se třemi klíčovými póry a tenkou jemně zrnitou exinou; úlomky pokožky svrchní strany listů s velkými mnohohrannými buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými; úlomky pokožky spodní strany listů s menšími mnohohrannými buňkami a anomocytickými průduchy (2.8.3).
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje. Filtrát se zředí *methanolem R* na 10 ml.  
*Porovnávací roztok.* 0,5 mg *kyseliny chlorogenové R*, 1 mg *hyperosidu R*, 1 mg *rutinu R* a 1 mg *vitexinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (7,5 + 7,5 + 18 + 67).  
*Nanášení.* 10 µl, do proužků.  
*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.  
*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin), ve střední třetině světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a nad ní žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid) a zeleně fluoreskující skvrna (vitexin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je světle zeleně fluoreskující skvrna, v poloze vyšší, než je poloha skvrny rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku, žlutě fluoreskující skvrna v poloze odpovídající polohou skvrně kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku, žlutě fluoreskující skvrna v poloze odpovídající polohou skvrně hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku a světle zeleně fluoreskující skvrna v poloze odpovídající polohou skvrně vitexinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14) s 0,750 g práškové drogy (180) (2.9.12).

## MALVAE FOLIUM

7.2:2391

## Slézový list

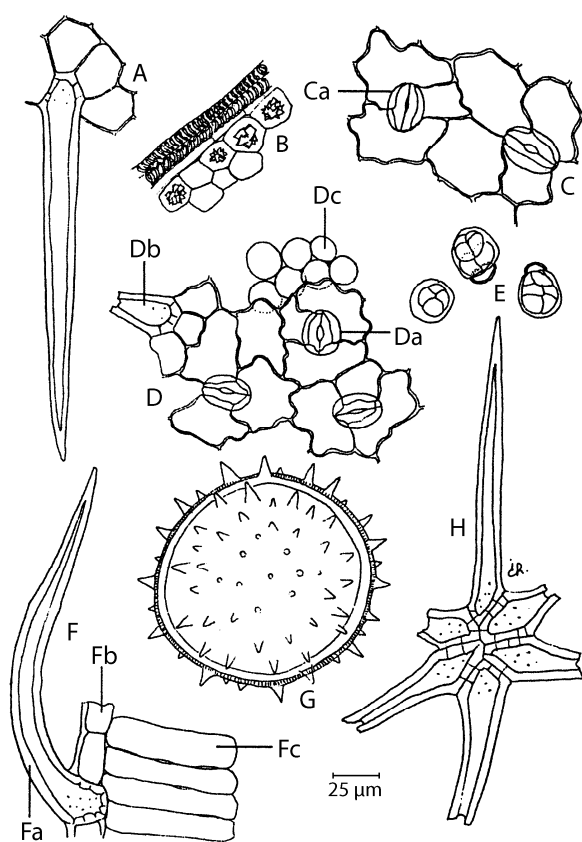
## DEFINICE

Je to usušený celý nebo rozlámaný list druhu *Malva sylvestris* L., *Malva neglecta* WALLR. nebo směsi obou druhů.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy druhu *Malva sylvestris* jsou až 12 cm dlouhé a až 15 cm široké, třílaločné, pětílaločné nebo sedmilaločné, na bázi sbíhavé. Listy druhu *Malva neglecta* jsou až 9 cm dlouhé a široké, okrouhlé nebo ledvinovité, mělce pětílaločné nebo sedmilaločné. Listy obou druhů mají čepel nepravidelně zubatou a jsou zelené nebo hnědozelené. Na spodní straně listu jsou četnější chlupy a více vyniklá žilnatina než na straně svrchní. Hlavní žilka na svrchní straně listů a řapíky mohou být fialové. Řapíky jsou stejně dlouhé jako listy, až 2 mm silné, okrouhlé a mírně zploštělé, podélně slabě rýhované, zelené, hnědozelené nebo fialové. Úlomky drogy někdy tvoří zmačkané kousky s vyniklou žilnatinou.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelený nebo žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky čepele listu v bočním pohledu [F] se spodní pokožkou v plošném pohle-

du [C] a se svrchní pokožkou v plošném pohledu [D] nebo v příčném řezu [Fb], s buňkami s přímými nebo více či méně zprohýbanými antiklinálními stěnami; průduchy většinou anisocytického typu (2.8.3) na obou stranách listu [Ca, Da]; úlomky dlouhých krycích chlupů [Db] se ztlustlými stěnami a špičatou koncovou buňkou, chlupy jsou obvykle jednobuněčné [A, Fa], ale u druhu *Malva sylvestris* mohou být dvoubuněčné až osmibuněčné [H], hvězdovité, každá z buněk je na bázi výrazně tečkovaná; žláznaté chlupy paličkovitého tvaru jsou dvoubuněčné až šestibuněčné u obou rostlinných druhů [E]; úlomky mezofylu tvořeného palisádovým parenchymem v plošném pohledu [Dc] nebo v příčném řezu [Fc], houbovým mezofylem obsahujícím sliz a buňkami s drúzami kalcium-oxalátu často spojenými s cévami [B]; někdy okrouhlá pylová zrna o průměru 110 µm až 170 µm s ostnitou exinou [G].



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného slézového listu

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškované drogy (710) (2.9.12) se smíchají s 20 ml roztoku *tetrahydrofuranu R 80% (V/V)*, extrahuje se 10 min v ultrazvukové lázni a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 3 mg *rutinu R* a 3 mg *hyperosidu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové bezvodé R*, *vody R*, *ethylformiátu R* a *pentan-3-onu R* (4 + 11 + 14 + 20 + 50).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 4 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 až 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Suší se 10 min při 100 °C. Ještě horká vrstva se postříká nebo navlhčí roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*, rozpouštědlo se odstraní proudem studeného vzduchu. Vrstva se postříká nebo navlhčí roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Usuší se na vzduchu a po 15 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutě fluoreskující skvrna	žlutě fluoreskující skvrna
rutin: žlutě fluoreskující skvrna	žlutě fluoreskující skvrna světle modře fluoreskující skvrna oranžově fluoreskující skvrna oranžově fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % jiných částí matečné rostliny, nejvýše 5 % listů napadených rzi *Puccinia malvacearum* (rez slézová) a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

Jiné části matečné rostliny mohou být květy, plody a části lodyhy. Červené nebo hnědé kupky spor rzi na listech mohou mít průměr nejvýše 1 mm. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Spory *Puccinia malvacearum* jsou podlouhlé nebo oválné s nahnědlými stěnami, ukončené drobným hrotem.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 17,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 7; stanoví se s 1,0 g práškované drogy (710) (2.9.12).

## MALVAE SYLVESTRIS FLOS

7.0:1541

## Květ slézu lesního

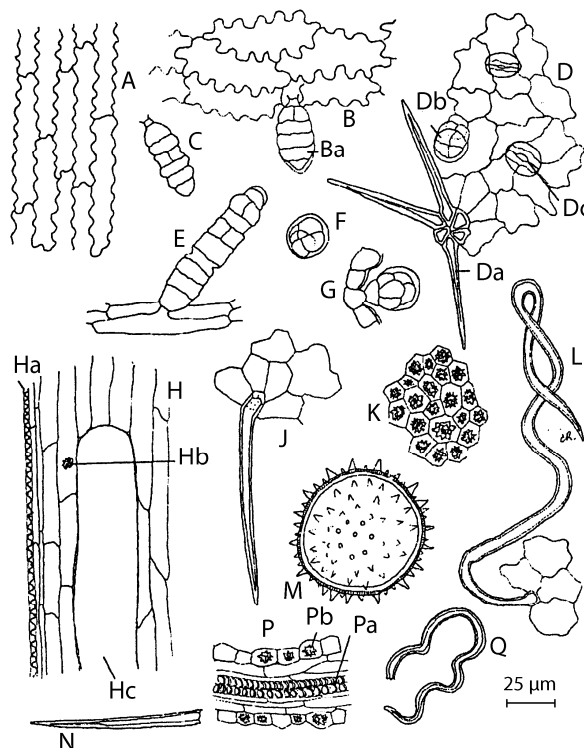
## DEFINICE

Je to usušený květ druhu *Malva sylvestris* L. nebo jeho pěstovaných odrůd, celý nebo jeho úlomky.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Kalíšek je trojlístý, listeny kalíšku jsou podlouhlé nebo oválně kopinaté, kratší než lístky kalicha, k nimž se přimykají. Kalich je pětičetný, trojúhelníkovité kališní ušty jsou v dolní části srostlé, na vnější straně hvězdovitě chlupaté. Pětičetná koruna je třikrát až čtyřikrát delší než kalich. Lístky korunní jsou hluboce vykrojené, na bázi klínovité, srostlé s tyčinkami. Četné tyčinky jsou jednobratré, srostlé nitkami v trubku, nitky jsou hvězdovitě chlupaté, příležitostně jsou jednotlivé chlupy viditelné pod lupou; četné plodolisty uzavřené v kruhu tyčinek jsou lysé nebo často pýřité, sraštlé, vyběhají v jednoduchou čnělku zakončenou četnými nitkovitými bliznami. U pěstovaných odrůd je kalíšek trojčetný až sedmičetný, kalich pětičetný až osmičetný a koruna pětičetná až desetičetná.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je modrošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): jednobuněčné ztlustlé tuhé krycí chlupy z kalichu a kalíšku až 2 mm dlouhé, celé [L] nebo častěji jejich úlomky [Q]; úlomky pokožky kališních lístků v plošném pohledu [D, J] s anomocytickými průduchy (2.8.3) [Dc]; žláznaté chlupy paličkovitého tvaru s mnohobuněčnou hlavičkou [Db] a krátké jednobuněčné mírně zakřivené krycí chlupy, buď jednotlivé [J], nebo v malých paprscitě uspořádaných chomáčcích po dvou až šesti [Da]; úlomky krycích chlupů [N]; jednotlivé žláznaté chlupy v plošném pohledu [F] nebo v příčném řezu [G]; úlomky mezofylu z kalichu a kalíšku s cévami obsahujícími malé drůzy kalcium-oxalátu [K]; žilky kališních lístků [P] s cévami [Pa] doprovázenými buňkami, které obsahují drůzy kalcium-oxalátu [Pb]; úlomky pokožky korunních lístků s protáhlými buňkami s vlnitými okraji, které jsou úzké u planých rostlin [A], kratší a širší u pěstovaných rostlin [B], s přisedlými žláznatými chlupy s mnohobuněčnou hlavičkou paličkovitého tvaru [Ba, C, E]; úlomky mezofylu korunních lístků [H], složené z velkých slizových buněk [Hc], někdy z buněk obsahujících malé drůzy kalcium-oxalátu [Hb] a šroubovitých cév [Ha]; kulovitá pylová zrna o průměru asi 150 μm s hrubě ostnitou exinou [M].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškování květu slézu lesního

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g práškové drogy (355) (2.9.12) se míchá 15 min s 10 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a zfiltruje se. *Porovnávací roztok.* Roztok *červeně chinaldinové R* (0,5 g/l) v *ethanolu 96% R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *butan-1-olu R* (15 + 30 + 60).

*Nanášení.* 10 μl zkoušeného roztoku a 5 μl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části střední třetiny oranžovočervená skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, v poloze odpovídající poloze pod skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou ve střední třetině dvě fialové skvrny; hlavní skvrna (6"-malonylmalvin) je těsně pod fialovou skvrnou (malvin).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 14,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 2,0 %.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 15; stanoví se s 0,2 g práškové drogy (710) (2.9.12) navlhčené 0,5 ml *ethanolu bezvodého R*.

## MARRUBII HERBA

6.0:1835

## Jablečnicková nať

## DEFINICE

Je to usušená celá kvetoucí nať druhu *Marrubium vulgare* L. nebo její úlomky.

*Obsah.* Nejméně 0,7 % marrubiinu ( $C_{20}H_{28}O_4$ ;  $M_r$  332,4), počítáno na vysušenou drogu.

## VLASTNOSTI

Droga má hořkou chuť.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je až 50 cm dlouhá, tupě čtyřhranná, až 7 mm široká, mladé lodyhy jsou bíle vlnatě chlupaté, starší zelenavě šedé, olysávající. Dolní listy jsou široce vejčité až téměř okrouhlé, horní listy široce klínovité, listy jsou řapíkaté; čepel listu je 1,5 cm až 4 cm dlouhá, 1 cm až 3,5 cm široká, na vrcholu okrouhlá, na bázi uťatá nebo mírně srdčitá, čepel vroubkovaná až vroubkovaně zubatá, řapík je až 3 cm dlouhý; žilnatina je síťnatá, na spodní straně listu vyniklá, na svrchní straně výrazně vpadlá. List je na obou stranách bíle vlnatě chlupatý, starší listy jsou na svrchní straně olysálé, tmavě šedozelené. Květy jsou malé, přisedlé tvořící hustá úžlabní květenství. Kalich je 5 mm dlouhý, vytrvalý, se střídavými pěti dlouhými a pěti krátkými, nazpět ohnutými zašpičatělými ušty, z vnitřní strany kalicha vyčnívá prstenec přímých, dlouhých, hedvábitých chlupů; koruna je 7 mm dlouhá, špičatě bílá, čtyřpyská, horní pysk je dvoucípý, dolní třícípý, čtyři krátké tyčinky, čnělka s dvojklanou bliznou.
- B.** Droga se upráškuje (710) (2.9.12). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky listů s čepelí, v plošném pohledu s mnohohrannými buňkami pokožky se stěnami zprohýbanými, diacytické průduchy (2.8.3) četnější na spodní straně listu; buňky mezofylu s malými jehlicemi nebo drúzami šťavelanu vápenatého; velmi četné krycí chlupy, zkroucené nebo spirálovité, 100  $\mu$ m až 200  $\mu$ m dlouhé, jednobuněčné nebo mnohobuněčné a jednořadé, tvořené dvěma až šesti buňkami, na konci rozšířené; dva typy hvězdivitých chlupů: první s patnácti až dvaceti paprsky vyrůstajícími z krátké jednobuněčné nohy, druhý s menším počtem paprsků, na bázi srostlých; osmibuněčné žláznaté chlupy typu *Lamiaceae*; žláznaté chlupy s jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou nohou a jednobuněčnou až čtyřbuněčnou hlavičkou; dvou- až třibuněčné ztlustlé krycí chlupy z vnitřní strany kalicha, jsou až 1000  $\mu$ m dlouhé, na naběhlém kloubu silně ztlustlé s protáhlou koncovou buňkou; pylová zrna okrouhlá o průměru asi 25  $\mu$ m s hladkou exinou; úlomky svazků cévních z lodyh a žilnatiny.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok (a).* 1,0 g práškované drogy (710) (2.9.12) se smíchá se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 8 ml *methanolu R*, zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje.  
*Zkoušený roztok (b).* 1,0 g práškované drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R*, zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *cholesterolu R* a 10 mg *guajazulenu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l] zkoušených roztoků (a) a (b) a 10  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l] porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *vanilinu R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *ethanolu 96% R* a *kyseliny sírové R* (20 + 80); zahřívá se 5 min až 10 min při 130 °C a ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b). Na chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b) mohou být přítomny další skvrny. Skvrna marrubiinu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) je zbarvena intenzivněji než na chromatogramu zkoušeného roztoku (b). V průběhu extrakce kyselinou chlorovodíkovou a methanolem dochází k přeměně pre-marrubiinu na marrubiin, čímž dochází ke zvýšení intenzity zbarvení.

Horní okraj desky		
guajazulen: červenofialová skvrna	modrofialová skvrna	modrofialová skvrna
	modrofialová skvrna	modrofialová skvrna
cholesterol: modrofialová skvrna	intenzivní mod- rofialová skvrna (marrubiin) modrofialová skvrna modrofialová skvrna	modrofialová skvrna (marrubiin) modrofialová skvrna modrofialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok (a)</b>	<b>Zkoušený roztok (b)</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

*Celkový popel* (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

*Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové* (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 50 g drogy se upráškuje (250) (2.9.12) a zhomogenizuje se. 1,00 g práškované drogy se v 50ml baňce s kulatým dnem smíchá s 15 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *methanolu R*

(2 + 8) a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 80 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. *Methanolem R*, kterým byla nejprve promyta baňka s kulatým dnem a filtr, se zředí na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok*. 2,0 mg *marrubiinu R* se rozpustí v 10,0 ml *methanolu R*.

*Kolona*:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze*: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 µm).

*Mobilní fáze*:

- *mobilní fáze A*: acetonitril R;
- *mobilní fáze B*: 0,5 ml *kyseliny fosforečné R* se zředí vodou R na 1000 ml.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 → 15	40 → 90	60 → 10
15 → 20	90 → 40	10 → 60
20 → 25	40	60

*Průtoková rychlost*. 1,5 ml/min.

*Detekce*. Spektrofotometrický detektor, 217 nm.

*Nástřik*. 20 µl.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se určí pík *marrubiinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Obsah *marrubiinu* v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 2,5}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku *marrubiinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku *marrubiinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v miligramech;
- $m_2$  – hmotnost *marrubiinu R* v miligramech;
- $p$  – obsah *marrubiinu* v *marrubiinu R* v procentech.

## MASTIX

6.0:1876

### Mastix

#### DEFINICE

Je to usušená pryskyřice získaná z kmenů a větví druhu *Pistacia lentiscus* L. var. *latifolius* COSS.

*Obsah*. Nejméně 10,0 ml silice v kilogramu drogy, počítáno na bezvodou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Malé světle žluté až nazelenale žluté, nepravidelné, okrouhlé nebo kapkovité, čiré nebo matné, tvrdé sklovité úlomky.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 1 g se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R* a po 1 min až 2 min se zfiltruje.

*Porovnávací roztok*. 25 mg *eugenolu R* a 25 mg *borneolu R* se rozpustí ve 3 ml *dichlormethanu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *petroletheru R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení*. 1 µl, do proužků.

*Vývíjení*. Po dráze 10 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, různě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
	fialová skvrna
	světle fialová skvrna slabě nafialovělá skvrna
eugenol: hnědá skvrna borneol: zelenomodrá skvrna	modrá skvrna modrofialová skvrna tmavofialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Číslo kyselosti** (2.5.1). 50 až 70; stanoví se s 1,0 g.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 10 ml/kg; stanoví se se 25,0 g práškové drogy (1400) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 0,5 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). Droga se upráškuje (1400) (2.9.12) těsně před použitím. 20,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 200 ml *vody R*. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

#### SKLADOVÁNÍ

Droga se skladuje nerozdrobněná.

## MATRICARIAE ETHEROLEUM

6.0:1836

### Heřmánková silice

*Synonymum*. *Matricariae aetheroleum*

#### DEFINICE

Je to modrá silice získaná z čerstvých nebo usušených úborů nebo kvetoucích vrcholků druhu *Matricaria recutita* L. [*Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT] destilací s vodní parou. Rozlišují se dva typy, a to silice bohatá na bisabololoxidy a silice bohatá na levomenol [(-)-α-bisabolol].

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá výrazně modrá viskózní kapalina, intenzivního charakteristického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

## A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 20 µl se rozpustí v 1,0 ml *toluenu R*.

*Porovnávací roztok.* 2 mg *guajazulenu R*, 5 µl *levomenolu R* a 10 mg *bornyl-acetátu R* se rozpustí v 5,0 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
guajazulen: modrá skvrna	modrá skvrna (chamazulen)
_____	_____
_____	_____
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roz-

toku. V dolní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny žlutohnědé až zelenožluté skvrny, fialové skvrny a další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
guajazulen: červená až červenofialová skvrna	1 nebo 2 modré až modrofialové skvrny
_____	_____
bornyl-acetát: žlutohnědá až šedo zelená skvrna	hnědá skvrna (en-yn-dicykloether)
_____	_____
levomenol: červenofialová až modrofialová skvrna	červenofialová až modrofialová skvrna (levomenol)
	nahnědlá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

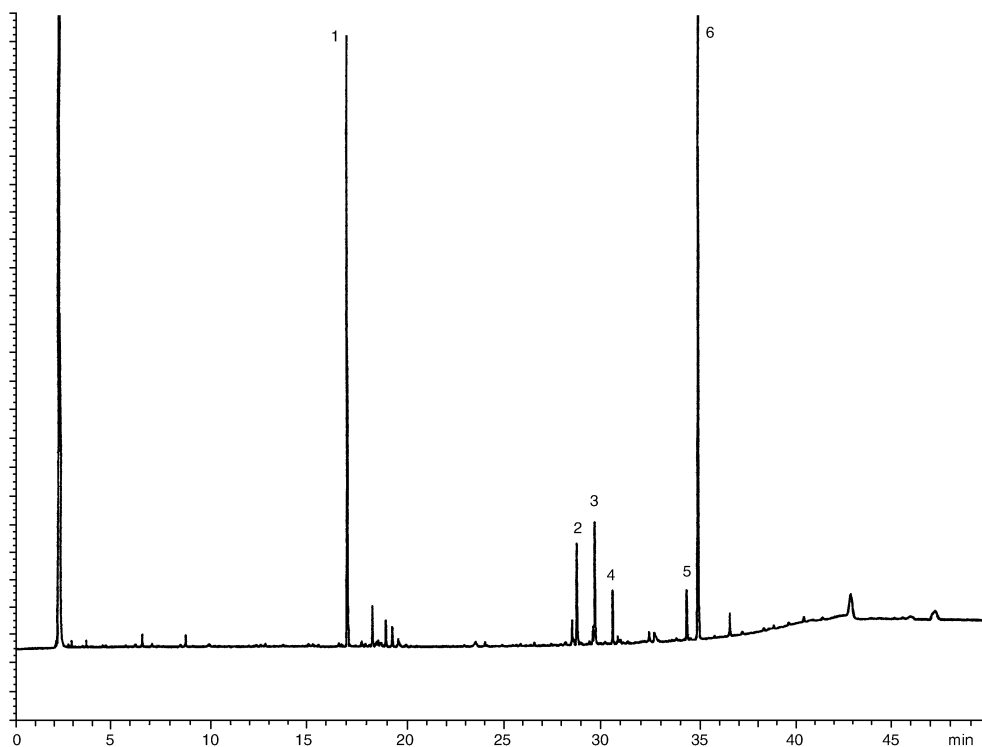
*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků levomenolu a chamazulenu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

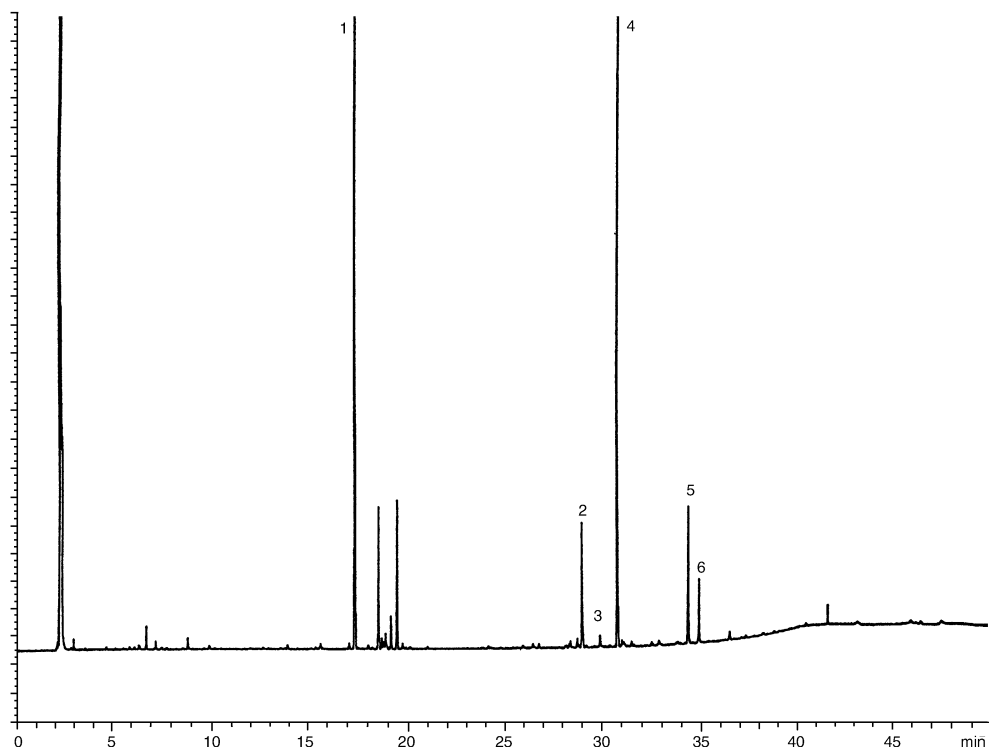
*Zkoušený roztok.* 20 µl se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *levomenolu R*, 5 mg *chamazulenu R* a 6 mg *guajazulenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 5,0 ml.



- 1 = β-farnesen
- 2 = bisabololoxid B
- 3 = bisabolon
- 4 = levomenol
- 5 = chamazulen
- 6 = bisabololoxid A

**Obr. 1** Chromatogram heřmánkové silice bohaté na bisabololoxidy



1 =  $\beta$ -farnesen  
 2 = bisabololoxid B  
 3 = bisabolon  
 4 = levomenol  
 5 = chamazulen  
 6 = bisabololoxid A

**Obr. 2** Chromatogram heřmánkové silice bohaté na levomenol

#### Kolona:

- *materiál*: tavený křemen;
- *rozměry*: délka 30 m (tloušťka filmu 1  $\mu\text{m}$ ) až 60 m (tloušťka filmu 0,2  $\mu\text{m}$ ), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm; použije-li se kolona delší než 30 m, upraví se teplotní program, je-li třeba;
- *stacionární fáze*: makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn*. Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost*. 1 ml až 2 ml/min.

*Dělicí poměr*. 1 : 100.

#### Teplota:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–40 40–50	70 → 230 230
nástříkový prostor		250
detektor		250

*Detekce*. Plamenoionizační detektor.

*Nástřík*. 1,0  $\mu\text{l}$ .

*Eluční pořadí*. Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Relativní retence* vztažená k chamazulenu (retenční čas asi 34,4 min).  $\beta$ -Farnesen asi 0,5; bisabololoxid B asi 0,8; bisabolon asi 0,87; levomenol asi 0,9; bisabololoxid A asi 1,02.

#### Test způsobilosti:

- *rozlišení*: nejméně 1,5 mezi píkem chamazulenu a píkem guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují levomenol a chamazulen na chromatogramu zkoušeného roztoku; bisabololoxi-

dy (bisabololoxid B, bisabolon a bisabololoxid A) se identifikují za použití obrázků 1 a 2 (k píku cyklohexanu se nepřihlíží). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není přítomen pík s retenčním časem guajazulenu.

Vypočítá se obsah těchto látek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

	Heřmánková silice bohatá na bisabololoxidy (%)	Heřmánková silice bohatá na levomenol (%)
bisabololoxidy	29–81	
levomenol		10–65
chamazulen	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$
celkový obsah bisabololoxidů a levomenolu		$\geq 20$

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotách nepřevyšujících 25 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede druh heřmánkové silice (bohatá na bisabololoxidy nebo bohatá na levomenol).

## MATRICARIAE EXTRACTUM FLUIDUM

6.2:1544

### Heřmánkový extrakt tekutý

#### DEFINICE

Vyrábí se z drogy *Matricariae flos* (0404).

*Obsah*. Nejméně 0,30 % modré zbytkové silice.

## VÝROBA

Vyrábí se z rostlinné drogy a směsi objemových dílů 10% roztoku *amoniaku* ( $NH_3$ ), *vody a ethanolu* 96% (2,5 + 47,5 + 50) postupem vhodným pro tekuté extrakty.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Nahnědlá čirá tekutina intenzivního charakteristického pachy a charakteristické hořké chuti.

*Rozpustnost.* Mísitelný s vodou a s ethanolem 96% za vzniku zákalu, dobře se rozpouští v *ethanolu* 50% (V/V).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

## A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 10 ml se protřepe v dělicí nálevce dvakrát 10 ml *pentanu* R. Spojené pentanové vrstvy se vysuší 2 g *síranu sodného bezvodého* R a zfiltrují se. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu* R.

*Porovnávací roztok.* 4 mg *guajazulenu* R, 20 mg *levomenolu* R a 20 mg *bornyl-acetátu* R se rozpustí v 10 ml *toluenu* R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu* F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu* R a *toluenu* R (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn zhasávajících fluorescenci, z nichž dvě hlavní skvrny jsou ve střední třetině (en-yn-dicykloether).

*Detekce B.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části intenzivně modře fluoreskující skvrna (herniarin).

*Detekce C.* Vrstva se postříká *anisaldehydem* RS a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení C.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině červenofialová nebo modrofialová skvrna (*levomenol*), ve střední třetině žlutohnědá nebo šedozelená skvrna (*bornyl-acetát*) a v horní třetině červená nebo červenofialová skvrna (*guajazulen*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině žlutohnědé nebo zelenožluté a fialové skvrny a červenofialová nebo modrofialová skvrna odpovídající polohou skvrně *levomenolu* na chromatogramu porovnávacího roztoku; nahnědlá skvrna (en-yn-dicykloether) odpovídající polohou skvrně *bornyl-acetátu* na chromatogramu porovnávacího roztoku; červená nebo červenofialová skvrna (*chamazulen*) odpovídající polohou skvrně *guajazulenu* na chromatogramu porovnávacího roztoku

a těsně nad ní je jedna nebo dvě modré nebo modrofialové skvrny. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

## B. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušený extrakt.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *kyseliny chlorogenové* R, 2,5 mg *hyperosidu* R a 2,5 mg *rutinu* R se rozpustí v 10 ml *methanolu* R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé* R, *kyseliny octové ledové* R, *vody* R a *ethyl-acetátu* R (7,5 + 7,5 + 18 + 67).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Teplá vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu* R (10 g/l) v *methanolu* R a potom roztokem *makrogolu 400* R (50 g/l) v *methanolu* R, suší se asi 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části světle modře fluoreskující skvrna (*kyselina chlorogenová*), pod ní žlutohnědě fluoreskující skvrna (*rutin*) a nad ní žlutohnědě fluoreskující skvrna (*hyperosid*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou žlutohnědě fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *rutinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku, světle modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *kyseliny chlorogenové* na chromatogramu porovnávacího roztoku, žlutohnědě fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny *hyperosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku; nad žlutohnědě fluoreskující skvrnou je zeleně fluoreskující skvrna, několik namodrale nebo nazelenale fluoreskujících skvrn a v blízkosti čela mobilní fáze nažloutle fluoreskující skvrna.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 38 % (V/V) až 53 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 12,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

20,0 g se smíchá v 1000ml baňce s kulatým dnem s 300 ml *vody* R a destiluje se do konečného objemu 200 ml destilátu. Destilát se převede do dělicí nálevky, přidá se 65 g *chloridu sodného* R a po rozpuštění se roztok protřepe třikrát 30 ml *pentanu* R, který byl použit k promytí zpětného chladiče a baňky. Spojené pentanové vrstvy se vysuší 2 g *síranu sodného bezvodého* R a zfiltrují se do vysušené (3 h v exsikatoru) a předem zvážené 100ml baňky s kulatým dnem. Vrstva *síranu sodného bezvodého* a filtr se promyjí dvakrát 20 ml *pentanu* R. Pentan se odpaří na vodní lázni při 45 °C. Zbytek pentanu se odstraní proudem vzduchu během 3 min. Baňka se suší 3 h v exsikatoru a zváží se. Zbytková sílice je modrá (*chamazulen*).



## MATRICARIAE FLOS

6.0:0404

## Heřmánkový květ

## DEFINICE

Je to usušený úbor druhu *Matricaria recutita* L. [*Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT].

*Obsah*, počítáno na vysušenou drogu:

- *modře zbarvená silice*: nejméně 4 ml/kg;
- *celkový apigenin-7-glukosid* (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>): nejméně 0,25 %.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Rozkvetlý úbor se skládá ze zákrovu s četnými listeny sestavenými v jedné až třech řadách; protáhle kuželovitého lůžka, někdy i polokulovitého (mladé úbory), dvánácti až dvaceti obvodových jazykovitých květů s bílou ligulou a velkého množství žlutých trubkovitých květů. Listeny zákrovu jsou vejčité až kopinaté s hnědošedým blanitým okrajem. Květní lůžko je duté, bez plevin. Koruna jazykovitých květů má na bázi hnědožluté trubky protažené v protáhle oválný bílý jazyk. Spodní semeník je tmavě hnědý vejčitý až kulovitý a má dlouhou čnělku a rozeklanou bliznu. Trubkovité květy jsou žluté a mají pěticipou korunní trubku, pět epipetálních tyčinek a soubor plodolistů jako u jazykovitých květů.

**B.** Úbor se rozdělí na jednotlivé části. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: listeny zákrovu mají okraj složený z tenkostěnných buněk a centrální část listenu je tvořena podlouhlými sklereidami s občasnými průduchy (2.8.3). Vnitřní pokožka koruny jazykovitých květů se v plošném pohledu skládá z tenkostěnných polygonálních buněk mírně papilózních, buňky vnější pokožky jsou výrazně zvlněné a silně proužkované; koruna tubulárních květů s podélně protáhlými pokožkovými buňkami a s malými skupinami papil v blízkosti vrcholu laloků. Žláznaté trichomy složené z krátké nohy a hlavičky se dvěma až třemi dvoubuněčnými patry se vyskytují na vnějších plochách zákrovních listenů a na korunách obou typů květů. Semeníky mají na bázi věnec kamenných buněk a stěna je tvořena svislými svazky tenkostěnných, podélně protáhlých buněk s četnými žláznatými trichomy, které se střídají s vřetenovitými skupinami malých, radiálně protáhlých buněk obsahujících sliz. Buňky na vrcholu blizen jsou rozšířené a tvoří okrouhlé papily. Četné malé drúzy krystalů šťavelanu vápenatého se nacházejí ve vnitřních tkáních semeníků a lalocích prašníků. Pylová zrna jsou kulovitá až trojúhelníkovitá, asi 30 μm v průměru se třemi póry a ostnitou exinou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 50 μl silice získané ze Stanovení obsahu se zředí *xylemem R* na 1 ml.

*Porovnávací roztok*. 2 μl *chamazulenu R*, 5 μl *levomenolu R* a 10 mg *bornyl-acetátu R* se rozpustí v 5 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení*. 10 μl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 10 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
chamazulen: červená nebo červenofialová skvrna	1 nebo 2 modré nebo modrofialové skvrny červená nebo červenofialová skvrna (chamazulen)
bornyl-acetát: žlutohnědá skvrna	hnědá skvrna (en-yn-dicykloether)
levomenol: červenofialová nebo modrofialová skvrna	červenofialová nebo modrofialová skvrna (levomenol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Rozdrcená droga**. Nejvýše 25 % projde sítím (710) (2.9.12); stanoví se s 20,0 g drogy.

**Zráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 13,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Silice** (2.8.12). Použije se 30 g nerozdrobněné drogy, 1000ml baňka, 300 ml *vody R* jako destilační kapaliny a 0,50 ml *xylenu R* v dělené trubici. Destiluje se 4 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min. Ke konci této doby se uzavře přívod vody k chladiči, ale pokračuje se v destilaci, dokud se spodní konec chladiče nenaplní modrým dýmem těkavých sloučenin. Ihned se obnoví průtok vody chladičem, aby se zabránilo přehřátí separačního prostoru. Destilace se ukončí po dalších 10 min.

**Celkový apigenin-7-glukosid**. Kapalínová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok*. 40 g drogy se upráškuje (500) (2.9.12). Ke 2,00 g práškové drogy se v 500ml baňce s kulatým dnem přidá 200 ml *ethanolu 96% R*, zahřívá se 15 min pod zpětným chladičem na vodní lázni. Ochladí se a zfiltruje se. Filtr a zbytek se propláchnou několika mililitry *ethanolu 96% R*. K filtrátu se přidá 10 ml čerstvého připraveného *hydroxidu sodného zředěného RS* a směs se zahřívá asi 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni. Ochladí se a zředí

se *ethanolem* 96% R na 250,0 ml. K 50,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 g *kyseliny citronové monohydrátu* R, 5 min se protřepává a zfiltruje se. 5,0 ml se zředí mobilní fází na 10,0 ml (počáteční směs).

*Porovnávací roztok (a)*. 10,0 mg *apigenin-7-glukosidu* R se rozpustí ve 100,0 ml *methanolu* R. 25,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml (počáteční směs).

*Porovnávací roztok (b)*. 10,0 mg *5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu* R se rozpustí ve 100,0 ml *methanolu* R. 25,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml (počáteční směs). Ke 4,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 10,0 ml (počáteční směs).

*Předkolona*:

- *rozměry*: délka 8 mm, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný* R (5 µm).

*Kolona*:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný* R (5 µm).

*Mobilní fáze*:

- *mobilní fáze A*: směs objemových dílů *kyseliny fosforečné* R a *vody* R (0,5 + 99,5);
- *mobilní fáze B*: směs objemových dílů *kyseliny fosforečné* R a *acetonitrilu* R (0,5 + 99,5).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–9	75	25
9–19	75 → 25	25 → 75
19–24	25	75

*Průtoková rychlost*. 1 ml/min.

*Detekce*. Spektrofotometrický detektor, 340 nm.

*Nástřík*. 20 µl.

*Test způsobilosti, porovnávací roztok (b)*:

- *rozlíšení*: nejméně 1,8 mezi píkem *apigenin-7-glukosidu* a píkem *5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu*.

Vypočítá se obsah celkového *apigenin-7-glukosidu* v procentech podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2}{A_2 \cdot m_1} \cdot P \cdot 0,625,$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku *apigenin-7-glukosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku *apigenin-7-glukosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost drogy v gramech ve zkoušeném roztoku;
- $m_2$  – hmotnost *apigenin-7-glukosidu* R v gramech v porovnávacím roztoku (a);
- $P$  – obsah *apigenin-7-glukosidu* v procentech ve zkoumadle.

## MELALEUCAE ETHEROLEUM

7.0:1837

Silice kajeputu střídavolistého

*Synonymum*. *Melaleuca aetheroleum*

### DEFINICE

Je to silice získaná z listnatých koncových větví druhů *Melaleuca alternifolia* (MAIDEN a BETCH) CHEEL, *M. linariifolia* SMITH, *M. dissitiflora* F. MUELLER a/nebo jiných druhů rodu *Melaleuca* destilací s vodní parou.

### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Čirá pohyblivá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina, charakteristického pachu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,1 ml se rozpustí v 5 ml *heptanu* R.

*Porovnávací roztok*. 30 µl *cineolu* R, 60 µl *terpinen-4-olu* a 10 mg  $\alpha$ -*terpineolu* R se rozpustí v 10 ml *heptanu* R.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC* R.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *ethyl-acetátu* R a *heptanu* R (20 + 80).

*Nanášení*. 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 10 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Postříká se *anisaldehydem* RS, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a současně se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny ještě další skvrny.

Horní okraj desky	
cineol: fialovohnědá skvrna	fialovohnědá skvrna, méně intenzivní (cineol)
terpinen-4-ol: hnědo-fialová skvrna	hnědofialová skvrna (terpinen-4-ol)
$\alpha$ -terpineol: fialová nebo hnědofialová skvrna	fialová nebo hnědofialová skvrna ( $\alpha$ -terpineol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,885 až 0,906.

**Index lomu** (2.2.6). 1,475 až 1,482.

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $+5^\circ$  až  $+15^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 0,15 ml se rozpustí v 10 ml hexanu R.

**Porovnávací roztok.** 5  $\mu$ l  $\alpha$ -pinenu R, 5  $\mu$ l sabinenu R, 15  $\mu$ l  $\alpha$ -terpinenu R, 5  $\mu$ l limonenu R, 5  $\mu$ l cineolu R, 30  $\mu$ l  $\gamma$ -terpinenu R, 5  $\mu$ l *p*-cymenu R, 5  $\mu$ l terpinolenu R, 60  $\mu$ l terpinen-4-olu R, 5  $\mu$ l aromadendrenu R a 5 mg  $\alpha$ -terpineolu R se rozpustí v 10 ml hexanu R.

**Kolona:**

- **materiál:** tavený křemen;
- **rozměry:** délka 30 m (může se použít tloušťka filmu 1  $\mu$ m) až 60 m (může se použít tloušťka filmu 0,2  $\mu$ m), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;
- **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R.

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,3 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–1	50
	1–37	50 → 230
	37–45	230
nástřikový prostor		240
detektor		240

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřik.** 1  $\mu$ l.

**Eluční pořadí.** Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **rozlíšení:** nejméně 2,7 mezi píkem terpinen-4-olu a píkem aromadendrenu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Nepřihlíží se k píku hexanu.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezích:

- $\alpha$ -pinen: 1,0 % až 6,0 %;
- sabinen: nejvýše 3,5 %;
- $\alpha$ -terpinen: 5,0 % až 13,0 %;
- limonen: 0,5 % až 4,0 %;
- cineol: nejvýše 15,0 %;
- $\gamma$ -terpinen: 10,0 % až 28,0 %;
- *p*-cymen: 0,5 % až 12,0 %;
- terpinolen: 1,5 % až 5,0 %;
- terpinen-4-ol: nejméně 30,0 %;
- aromadendren: nejvýše 7,0 %;
- $\alpha$ -terpineol: 1,5 % až 8,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## MELILOTI HERBA

7.5:2120

### Komoniová nať

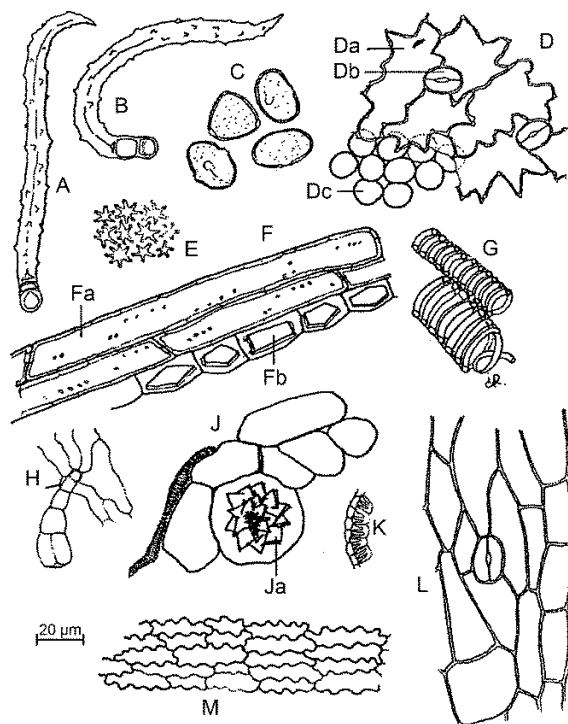
**DEFINICE**

Je to celá nebo řezaná usušená nať druhu *Melilotus officinalis* (L.) LAM.

**Obsah.** Nejméně 0,3 % kumarinu ( $C_9H_6O_2$ ;  $M_r$  146,1), počítáno na vysušenou drogu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Lodyha je zelená, válcovitá, lysá a jemně rýhovaná. Listy jsou střídavě řapíkaté a trojčetné, se dvěma kopinatými palisty; lístky jsou až asi 3 cm dlouhé a 20 mm široké, podlouhlé až vejčité, pilovité, na obou koncích zapičatělé; svrchní strana listu je tmavě zelená lysá, spodní strana světlejší s krátkými jemnými chlupy, zejména na bázi. Květenství je hroznovité, s četnými světle žlutými květy, květ je asi 7 mm dlouhý, s chlupatým pětičetným kalichem, cípy kalicha jsou hluboce dělené, nepravidelné, koruna je motýlokvětá. Plod je nepukavá tobolka, často s vytrvalým kalichem, se žlutohnědým krátkým kuželovitým hrotem; povrch plodu je lysý, síťnatě žilkovaný.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškované komoniové nati

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky čepele listů v plošném pohledu [D] s nepravidelně ztlustlými, vlnitě zprohýbanými buňkami pokožky; četné průduchy [Db] většinou anomocytické (2.8.3) se třemi až šesti vedlejšími buňkami [Da] a často se spodní vrstvou palisádového parenchymu [Dc]; jednořadé krycí chlupy se dvěma krátkými bazálními buň-

kami s hladkými stěnami a s dlouhou koncovou buňkou ohnutou do pravého úhlu, se ztlustlou stěnou a bradavčitou kutikulou [A, B]; zřídka žláznaté chlupy s krátkou dvou- až tříbuněčnou nohou a vejčitou dvouřadou hlavíčkou se čtyřmi nezřetelnými buňkami [H]; úlomky papilózní koruny složené z buněk s vlnitě zprohýbanými stěnami [M]; úlomky cévních svazků lodyh [F, G] se širokými cévami [G], někdy provázené nezdrěvnatělými komůrkovými vlákny [Fa] a pouzdry z parenchymatických buněk obsahujícími hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Fb]; úlomky mezofylu [J] s buňkami, které mohou zřídka obsahovat drúzy kalcium-oxalátu [Ja]; úlomky pokožky stonku s podlouhlými rovnostěnnými buňkami a anomocytickými (2.8.3) průduchy [L]; úlomky vláknité vrstvy prašníků v plošném pohledu [E] a v příčném řezu [K]; okrouhlá nebo vejčitá pylová zrna asi 25 µm dlouhá se třemi klíčními póry a hladkou exinou [C].

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,3 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 3 ml *methanolu R*, zahřívá se 1 min na vodní lázni při 100 °C a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 50 mg *kumarinu CRL* a 20 mg *kyseliny o-kumarové R* se rozpustí v 50 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Horní vrstva směsi objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS*, *etheru R* a *toluenu R* (10 + 50 + 50).

**Nanášení.** 25 µl [nebo 3 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vývíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *hydroxidem draselným 2 mol/l* v *ethanolu RS* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě různě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kumarin: zelenožlutě fluoreskující skvrna	zelenožlutě fluoreskující skvrna (kumarin)
	modře fluoreskující skvrna
kyselina o-kumarová: zelenožlutě fluoreskující skvrna	může být přítomna zelenožlutě fluoreskující skvrna (kyselina o-kumarová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2 % stonků o průměru větším než 3 mm a nejvýše 2 % jiných cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Asi 50 g rostlinné drogy se upráškuje (500) (2.9.12). 5,00 g práškované drogy se smíchá s 90 ml *methanolu R*, vaří se 30 min pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a zfiltruje se za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken. Zbytek drogy a rozlámaný filtr se extrahují 90 ml *methanolu R* stejným způsobem. Spojené filtráty se zředí *methanolem R* na 250,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 25,0 mg *kumarinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 250,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R* (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) (22 + 78).

**Průtoková rychlost.** 1,7 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 275 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Test způsobilosti:**

– **retenční čas:** kumarin asi 7,8 min.

Obsah kumarinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku kumarinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku kumarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost *kumarinu CRL* v porovnávacím roztoku v gramech;

$p$  – obsah kumarinu v *kumarinu CRL* v procentech.

## MELISSAE FOLII EXTRACTUM SICCCUM

6.6:2524

Extrakt z meduňkového listu suchý

### DEFINICE

Připravuje se z drogy *Melissae folium* (1447).

**Obsah.** Nejméně 2,0 % kyseliny rozmarýnové ( $C_{18}H_{16}O_8$ ;  $M_r$  360,33), počítáno na vysušený extrakt.

### VÝROBA

Extrakt se vyrábí z rostlinné drogy vhodným postupem za použití se buď horké vody (ne méně než 70 °C), nebo vod-

ně-ethanolickeho rozpouštědla o koncentraci odpovídající nejméně ethanolu 70% (V/V).

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědý nebo zelenohnědý amorfni prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,2 g se přidá 5 ml *methanolu R*, 5 min se působí ultrazvukem a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *hyperosidu R*, 1,0 mg *rutinu R* a 5,0 mg *kyseliny rozmarýnové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (6 + 6 + 90).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 8 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Zahřívá se 5 min při 100 °C, ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (5 g/l) v *ethyl-acetátu R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina rozmarýnová: světle modře fluoreskující skvrna	intenzivní světle modře fluoreskující skvrna (kyse- lina rozmarýnová) modře fluoreskující skvrna
_____	_____
_____	_____
hyperosid: oranžově nebo zelenožlutě fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna
_____	_____
_____	_____
rutin: oranžově nebo zelenožlutě fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.8.17). Nejméně 6,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Použijí se hnědé skleněné baňky. 0,200 g extraktu se smíchá s 50 ml *ethanolu 50% (V/V) R*, působí se 10 min ultrazvukem a zředí se *ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml. Zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

*Porovnávací roztok (a).* 20,0 mg *kyseliny rozmarýnové CRL* se rozpustí v *ethanolu 50% (V/V) R* a zředí se jím na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5 mg *kyseliny ferulové R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 50 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 19 + 80);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *methanolu R* a *acetonitrilu R* (1 + 40 + 59).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	100 → 55	0 → 45
20–25	55 → 0	45 → 100

*Průtoková rychlost.* 1,2 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

*Nástřik.* 20 µl.

*Relativní retence* vztažená ke *kyselině rozmarýnové* (retenční čas asi 11 min). *Kyselina ferulová* asi 0,8.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozlíšení:* nejméně 4,0 mezi píkem *kyseliny ferulové* a píkem *kyseliny rozmarýnové*.

Obsah *kyseliny rozmarýnové* (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,2}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku *kyseliny rozmarýnové* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>2</sub> – plochu píku *kyseliny rozmarýnové* na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

*m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

*m*<sub>2</sub> – hmotnost *kyseliny rozmarýnové CRL* použité k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

*p* – obsah *kyseliny rozmarýnové* v *kyselině rozmarýnové CRL* v procentech.

## MELISSAE FOLIUM

7.0:1447

### Meduňkový list

#### DEFINICE

Je to usušený list druhu *Melissa officinalis* L.

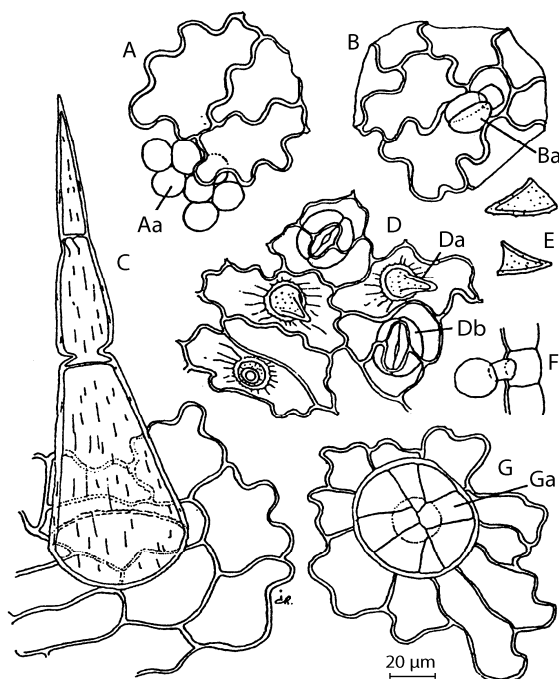
*Obsah.* Nejméně 1,0 % *kyseliny rozmarýnové* (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; *M*<sub>r</sub> 360,33), počítáno na vysušenou drogu.

## VLASTNOSTI

Droga má charakteristický pach po citronu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy s řapíkem proměnlivé délky; čepel je široce vejčitá až asi 8 cm dlouhá a 5 cm široká, na horním konci zašpičatělá, na bázi okrouhlá až srdčitá; okraj čepele je vroubkovaný až zubatý. Svrchní strana listu je sytě zelená, spodní strana světleji zelená s vyniklou střední žilkou a vystouplou síťovitou žilnatinou; roztroušené chlupy jsou na svrchní straně a podél žilek na spodní straně, spodní strana listu je jemně tečkovaná.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je nazelenalý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky svrchní strany listu v plošném pohledu, s buňkami se zprohýbanými stěnami [A, B, G], někdy doprovázené palisádovým parenchymem [Aa]; úlomky pokožky spodní strany listu [D] s diacytickými průduchy (2.8.3) [Db]; krátké přímé jednobuněčné kuželovité krycí chlupy s jemně rýhovanou kutikulou, volné [E] nebo přirostlé k pokožce [Da]; mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy s kulovitou koncovou buňkou a silnou bradavčitou kutikulou [C]; osmibuněčné žláznaté chlupy typu *Lamiaceae* v plošném pohledu [Ga]; žláznaté chlupy s jednobuněčnou až třibuněčnou nohou a jednobuněčnou nebo zřídka dvoubuněčnou hlavičkou v plošném pohledu [Ba] nebo v příčném řezu [F].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného meduňkového listu

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se v 250ml baňce s kulatým dnem smíchají se 100 ml vody R a destilují se 1 h za použití destilačního přístroje pro Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12), do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu R. Po ukončení destilace se organická fáze převede pomocí malého

množství xylenu R, jímž se promyje dělená trubice, do 1 ml odměrné baňky a zředí se xylemem R na 1,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 1,0 µl citronellalu R a 10,0 µl citralu R (složeného z neralu a geranialu) se rozpustí ve 25 ml xylenu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a hexanu R (10 + 90).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 4 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** V nenasyčené komoře po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 10 min až 15 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
citronellal: šedá nebo šedofialová skvrna na hranici horní a střední části chromatogramu	šedá nebo šedofialová skvrna (citronellal) na hranici horní a střední části chromatogramu  červenofialová skvrna
citral: dvě šedofialové nebo modrofialové skvrny na hranici střední a dolní části chromatogramu	dvě šedofialové nebo modrofialové skvrny (citral) na hranici střední a dolní části chromatogramu
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné drogy a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 10 % stonků o průměru větším než 1 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí; stanoví se s 20 g drogy.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Použije se hnědé laboratorní sklo. 0,100 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 90 ml ethanolu 50% (V/V) R a zahřívá se 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do 100ml odměrné baňky. Baňka i filtr se promyjí 10 ml ethanolu 50% (V/V) R a zředí se jím na 100,0 ml. Zfiltruje se přes filtr o velikosti porů 0,45 µm.

*Porovnávací roztok (a).* 20,0 mg kyseliny rozmarýnové CRL se rozpustí v ethanolu 50% (V/V) R a zředí se jím na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se zředí ethanolu 50% (V/V) R na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5,0 mg kyseliny ferulové R se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 50,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a acetonitrilu R (1 + 19 + 80);
- *mobilní fáze B:* směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a acetonitrilu R (1 + 40 + 59).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	100 → 55	0 → 45
20–25	55 → 0	45 → 100
25–30	0 → 100	100 → 0

*Průtoková rychlost.* 1,2 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

*Nástrík.* 20 µl.

*Relativní retence* vztažená ke kyselině rozmarýnové (retenční čas asi 11 min). Kyselina ferulová asi 0,8.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

- *rozlišení:* nejméně 4,0 mezi pikem kyseliny ferulové a pikem kyseliny rozmarýnové.

Obsah kyseliny rozmarýnové (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,2}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- A<sub>1</sub> – plochu píku kyseliny rozmarýnové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A<sub>2</sub> – plochu píku kyseliny rozmarýnové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);
- m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- m<sub>2</sub> – hmotnost kyseliny rozmarýnové CRL použité k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;
- p – obsah kyseliny rozmarýnové v kyselině rozmarýnové CRL v procentech.

## MENTHAE ARVENSIS ETHEROLEUM PARTIM MENTHOLI DEPLETUM

6.0:1838

Silice máty rolní částečně zbavená mentholu

*Synonymum.* Menthae arvensis aetheroleum partim mentholum depletum

**DEFINICE**

Je to silice získaná z čerstvé kvetoucí natě druhů *Mentha canadensis* L. (syn. *M. arvensis* L. var. *glabrata* (BENTH) FERN. a *M. arvensis* var. *piperascens* MALINV. ex HOLMES) destilací s vodní parou a následným částečným oddělením mentholu krystalizací.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Bezbarvá nebo světle žlutá až zelenožlutá tekutina charakteristického pachu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 ml se rozpustí v 1,0 ml toluenu R.

*Porovnávací roztok.* 4 µl karvonu R, 4 µl pulegonu R, 10 µl menthyl-acetátu R, 20 µl cineolu R a 50 mg mentholu R se rozpustí v 5 ml toluenu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. V horní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku může být skvrna zhášeující fluorescenci.

Horní okraj desky	
karvon a pulegon: zhášeující skvrna	zhášeující skvrna
	zhášeující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku chybí skvrna v poloze odpovídající poloze skvrny cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není pod intenzivní červenofialovou skvrnou žlutohnědá skvrna.

Horní okraj desky	
menthyl-acetát: modrofialová skvrna	intenzivní červenofialová skvrna (v blízkosti čela mobilní fáze)
karvon a pulegon: načervenalá skvrna	modrofialová skvrna (menthyl-acetát)
cineol: fialová skvrna	silně nazelenalá skvrna nazelenalá skvrna načervenalá skvrna
menthol: intenzivní modrá skvrna	jasná fialová skvrna velmi intenzivní modrá skvrna (menthol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Karvon může na chromatogramu zkoušeného roztoku chybět.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,888 až 0,910.

**Index lomu** (2.2.6). 1,456 až 1,470.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-16,0^\circ$  až  $-34,0^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0; 5,00 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,20 g se rozpustí v hexanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg limonenu R, 20 mg cineolu R, 40 mg menthonu R, 10 mg isomenthonu R, 40 mg menthyl-acetátu R, 20 mg isopulegolu R, 60 mg mentholu R, 20 mg pulegonu R a 10 mg karvonu R se rozpustí v hexanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 30 m (tloušťka filmu 1  $\mu\text{m}$ ) až 60 m (tloušťka filmu 0,2  $\mu\text{m}$ ), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–70	60 → 180
	70–75	180
nástříkový prostor		200
detektor		220

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřík.* 1,0  $\mu\text{l}$ .

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

- *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem cineolu.

Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Z chromatogramu zkoušeného roztoku se vypočítá obsah těchto složek v procentech. Obsah složek v procentech se pohybuje v mezích:

- *limonen:* 1,5 % až 7,0 %;
- *cineol:* nejvýše 1,5 %;
- *menthon:* 17,0 % až 35,0 %;
- *isomenthon:* 5,0 % až 13,0 %;
- *menthyl-acetát:* 1,5 % až 7,0 %;
- *isopulegol:* 1,0 % až 3,0 %;
- *menthol:* 30,0 % až 50,0 %;
- *pulegon:* nejvýše 2,5 %;
- *karvon:* nejvýše 2,0 %.

Poměr obsahu cineolu k obsahu limonenu je menší než 1.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## MENTHAE PIPERITAE ETHEROLEUM

7.5:0405

### Silice máty peprné

*Synonymum.* Menthae piperitae aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvé kvetoucí natě druhu *Mentha × piperita* L. destilací s vodní parou.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá, světle žlutá nebo světle zelenožlutá tekutina, charakteristického pachu a chladivé chuti.

*Rozpustnost.* Mísitelná s ethanolem 96% a dichlormethanem.



ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- 1.: B.  
2.: A.

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce A Mátová silice (viz Zkoušky na čistotu).  
*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
thymol: zhášející skvrna	mohou být přítomny zhášející skvrny (karvon, pulegon)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
	intenzivní fialovočervená skvrna (v blízkosti čela rozpouštědla) (uhlovodíky) hnědožlutá skvrna (menthofuran)
menthyl-acetát: fialovomodrá skvrna	fialovomodrá skvrna (menthyl-acetát) zelenomodrá skvrna (menthon)
thymol: růžová skvrna	může být přítomna světle růžová nebo šedomodrá nebo šedo zelená skvrna (karvon, pulegon a isomenthon)
1,8-cineol: fialovomodrá nebo hnědá skvrna	slabá fialovomodrá nebo hnědá skvrna (1,8-cineol)
menthol: intenzivní modrá nebo fialová skvrna	intenzivní modrá nebo fialová skvrna (menthol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).  
*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických pík limonenu, 1,8-cineolu, menthonu, menthofuranu, isomenthonu, menthyl-acetátu a mentholu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být přítomen karvon, isopulegol a pulegon.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,900 až 0,916.  
**Index lomu** (2.2.6). 1,457 až 1,467.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-10^{\circ}$  až  $-30^{\circ}$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,4; 5,0 g se zředí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice** (2.8.7). Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

**Mátová silice**

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se smíchá s toluenem R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 50 mg mentholu R, 20  $\mu$ l cineolu R, 10 mg thymolu R a 10  $\mu$ l menthyl-acetátu R se rozpustí v toluenu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 1  $\mu$ l] porovnávacího roztoku a 20  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l] zkoušeného roztoku, do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vývíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Detekce B.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není modrá skvrna v poloze mezi skvrnami odpovídajícími 1,8-cineolu a mentholu.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není pík s retenčním časem odpovídajícím isopulegolu, který má plochu větší než 0,2 % celkové plochy.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,20 g se smíchá s heptanem R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10  $\mu$ l limonenu R, 20  $\mu$ l cineolu R, 40  $\mu$ l menthonu R, 10  $\mu$ l menthofuranu R, 10  $\mu$ l isomenthonu R, 40  $\mu$ l menthyl-acetátu R, 20  $\mu$ l isopulegolu R, 60 mg mentholu R, 20  $\mu$ l pulegonu R, 10  $\mu$ l piperitonu R a 10  $\mu$ l karvonu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5  $\mu$ l isopulegonu R se rozpustí v heptanu R a zředí se stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. 0,1 ml se zředí heptanem R na 5,0 ml.

*Kolona:*

– materiál: tavený křemen;

- *rozměry*: délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze*: makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn*. Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost*. 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr*. 1 : 50.

*Teplota*:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–70	60 → 180
	70–75	180
nástříkový prostor		200
detektor		220

*Detekce*. Plamenoionizační detektor.

*Nástřík*. 1 µl.

*Eluční pořadí*. Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a); zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Identifikace píků*. Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

*Test způsobilosti*, porovnávací roztok (a):

- *rozlišení*: nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem 1,8-cineolu a nejméně 1,5 mezi píkem piperitonu a píkem karvonu.

Vypočítá se obsah těchto složek v procentech. Obsah složek v procentech se pohybuje v mezích:

- *limonen*: 1,0 % až 3,5 %;
- *1,8-cineol*: 3,5 % až 8,0 %;
- *menthon*: 14,0 % až 32,0 %;
- *menthofuran*: 1,0 % až 8,0 %;
- *isomenthon*: 1,5 % až 10,0 %;
- *menthyl-acetát*: 2,8 % až 10,0 %;
- *isopulegol*: nejvýše 0,2 %;
- *menthol*: 30,0 % až 55,0 %;
- *pulegon*: nejvýše 3,0 %;
- *karvon*: nejvýše 1,0 %;
- *limit zanedbatelnosti*: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

Poměr obsahu 1,8-cineolu k obsahu limonenu je nejméně 2.

#### SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## MENTHAE PIPERITAE FOLII EXTRACTUM SICCCUM

6.4:2382

Extrakt z listu máty peprné suchý

#### DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Menthae piperitae folium* (0406).

*Obsah*. Nejméně 0,5 % kyseliny rozmarýnové (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; M<sub>r</sub> 360,33), počítáno na vysušený extrakt.

#### VÝROBA

Extrakt se připravuje vhodným postupem z rostlinné drogy za použití ethanolu 30% (V/V) až 50% (V/V) nebo vody při nejméně 60 °C.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Hnědý amorfni prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. K 0,2 g se přidá 5 ml methanolu R, 5 min se míchá ultrazvukem a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok*. 5 mg kyseliny rozmarýnové R, 1 mg hyperosidu R a 1 mg rutinu R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R a ethyl-acetátu R (6 + 6 + 90).

*Nanášení*. 10 µl [nebo 4 µl] do proužků 15 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení*. Po dráze 8 cm [nebo 6 cm].

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. 5 min se zahřívá při 100 °C a horká vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu R (5 g/l) v ethyl-acetátu R; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina rozmarýnová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina rozmarý- nová)
hyperosid: oranžově fluo- reskující skvrna	žlutě fluoreskující skvrna
rutin: oranžově fluoreskující skvrna	hnědě fluoreskující skvrna žlutě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok*. Použijí se baňky z hnědého skla. K 0,400 g zkoušeného extraktu se přidá 15 ml ethanolu 50% (V/V) R, 10 min se míchá ultrazvukem a zfiltruje se do 20ml odměrné baňky. Baňka a filtr se promyjí ethanolem 50% (V/V) R a zředí se jím na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10,0 mg kyseliny rozmarýnové CRL se rozpustí v ethanolu 50% (V/V) R a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 5 mg kyseliny ferulové R se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 50 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, acetonitrilu R a vody R (1 + 19 + 80);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a acetonitrilu R (1 + 40 + 59).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	100 → 55	0 → 45
20–25	55 → 0	45 → 100
25–30	0 → 100	100 → 0

*Průtoková rychlost.* 1,2 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

*Nástrik.* 20 µl.

*Relativní retence* vztažená ke kyselině rozmarýnové (retenční čas asi 11 min). Kyselina ferulová asi 0,8.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozišení:* nejméně 4,0 mezi píkem kyseliny ferulové a píkem kyseliny rozmarýnové.

Vypočítá se obsah kyseliny rozmarýnové (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>) v procentech podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,2}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

A<sub>1</sub> – plochu píku kyseliny rozmarýnové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>2</sub> – plochu píku kyseliny rozmarýnové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

m<sub>2</sub> – hmotnost kyseliny rozmarýnové CRL použité k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

p – obsah kyseliny rozmarýnové v kyselině rozmarýnové CRL v procentech.

## MENTHAE PIPERITAE FOLIUM

7.0:0406

### List máty peprné

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Mentha × piperita* L.

*Obsah silice:*

– nejméně 12 ml/kg neřezané drogy;

– nejméně 9 ml/kg řezané drogy.

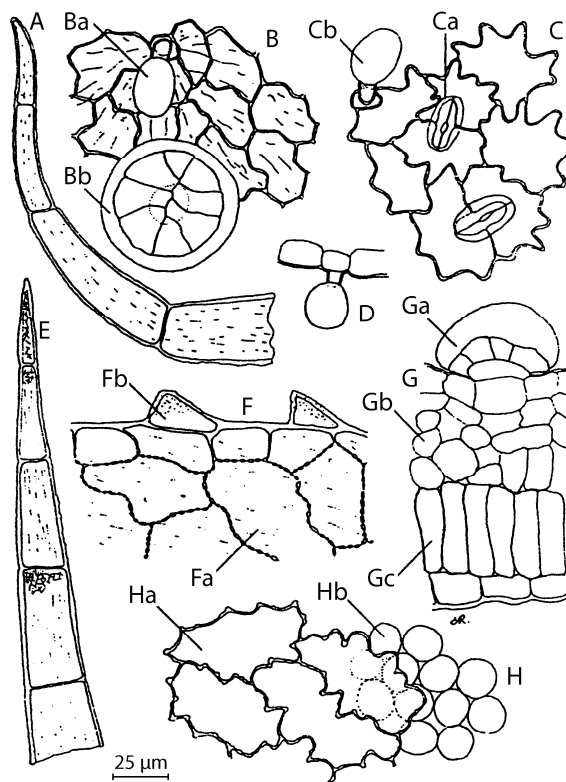
#### VLASTNOSTI

Droga má charakteristický a pronikavý pach a charakteristickou aromatickou chuť.

List je zelený nebo hnědozelený, u některých odrůd s hnědofialovou žilnatinou. Řapíky jsou zelené nebo hnědofialové.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** List je celý, rozlámáný nebo řezaný, tenký, křehký a často svrstělý. Celý list je 3 cm až 9 cm dlouhý a 1 cm až 3 cm široký. Čepel je oválná nebo kopinatá, v horní části zašpičatělá, na bázi nesouměrná, s okrajem ostře pilovitým. Žilnatina je zpeřená, na spodní straně vyniklá, postranní žilky svírají s hlavní žilkou úhel 45°. Spodní strana čepele je slabě pýřitá, žláznaté chlupy jsou pod lupou (šestkrát) patrné jako jasně žluté body. Rýhovaný řapík obvykle o průměru až 1 mm je 0,5 cm až 1 cm dlouhý.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškování listu máty peprné

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky s krycími a žláznatými chlupy; svrchní pokožka v plošném pohledu [B, H] s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými [Ha], s kutikulou nad žilnatinou zvrásněnou [B] doprovázenou plicinovým parenchymem [Hb]; spodní pokožka [C] s dia-cytickými průduchy (2.8.3) [Ca]; protáhlé jednořadé krycí chlupy, složené ze tří až osmi buněk se zvrásněnou kutikulou, většinou polámané, [A, E]; dva typy žláznatých chlupů: a) jednobuněčná noha s malou kulovitou jednobuněčnou hlavičkou o průměru 15 µm až 25 µm v plošném pohledu [Ba, Cb] nebo v příčném řezu [D], b) jednobuněčná noha s protáhlou oválnou hla-

vičkou o průměru 55 µm až 70 µm složenou z osmi paprskovitě uspořádaných buněk v plošném pohledu [Bb] nebo v příčném řezu [Ga]; úlomky pokožky okraje listu [F] s izodiametrickými buňkami s antiklinálními víceméně přínými růžencovitě ztlustlými stěnami [Fa] a s krátkými kuželovitými jednobuněčnými nebo dvou-buněčnými krycími chlupy [Fb]; úlomky dorziventrálního mezofylu v příčném řezu [G] s jednořadým palisádovým parenchymem [Gc] a čtyřřadým až šestiřadým houbovým parenchymem [Gb]. Pod kutikulou sekrečních buněk mohou být přítomny nažloutlé krystaly mentolu.

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,2 g drogy se upráškuje těsně před použitím, protřepává se několik minut s 2 ml *dichlor-methanu R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha při teplotě nepřesahující 40 °C, zbytek se rozpustí v 0,1 ml *toluenu R*.

**Porovnávací roztok.** 50 mg *mentholu R*, 20 µl *cineolu R*, 10 mg *thymolu R* a 10 µl *menthyl-acetátu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu GF<sub>254</sub> pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

**Nanášení.** 10 µl porovnávacího roztoku a 20 µl zkoušeného roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu, do odpaření rozpouštědla.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zžářející skvrny.

Horní okraj desky	
thymol: zžářející skvrna	zžářející skvrny (karvon, pulegon) mohou být patrné
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Postříká se *anisaldehydem RS* a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	intenzivní fialovočervená skvrna (uhlovodíky) (v blízkosti čela mobilní fáze)
menthyl-acetát: fialovomodrá skvrna	fialovomodrá skvrna (menthyl-acetát) zelenomodrá skvrna (menthon)
thymol: růžová skvrna	světle růžové nebo šedomodré nebo šedozelené skvrny (karvon, pulegon, isomenthon) mohou být přítomny
cineol: fialovomodrá nebo hnědá skvrna	slabě fialovomodrá nebo hnědá skvrna (cineol)
menthol: intenzivní modrá nebo fialová skvrna	intenzivní modrá nebo fialová skvrna (menthol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5 % stonků o průměru nejvýše 1,5 mm; nejvýše 2 % cizích organických příměsí a nejvýše 8 % listů vykazujících stopy po napadení rzí *Puccinia menthae*. Stanoví se s 10 g drogy.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 110 ml/kg; stanoví se s 20,0 g drogy.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 15,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 1,5 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 500ml baňce s kulatým dnem za použití 20,0 g rozdrčené drogy a 200 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R* a destiluje se nejméně 2 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

## MILLEFOLII HERBA

7.3:1382

### Řebříčková nat'

#### DEFINICE

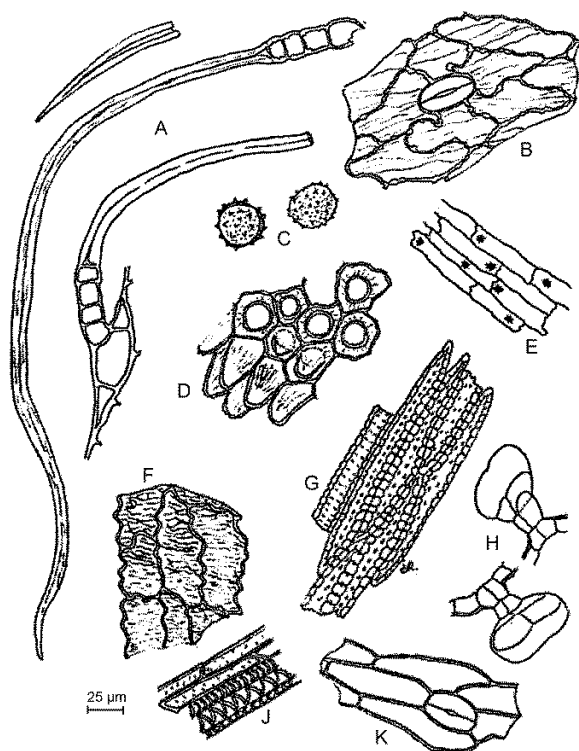
Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Achillea millefolium L.*

**Obsah** (počítáno na vysušenou drogu):

- *silice*: nejméně 2 ml/kg;
- *proazuleny, vyjádřeno jako chamazulen* (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 184,3): nejméně 0,02 %.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Listy jsou zelené nebo šedozelené, na svrchní straně slabě pýřité, na spodní straně lehce pýřité, dvakrát až třikrát peřenosečné, úkrojky listů jsou čárkovité ukončené bělavým hrotem, květenství je chocholičnaté, koncové, úbory o průměru 3 mm až 5 mm, květní lůžko na obvodu obvykle se čtyřmi nebo pěti jazykovitými květy a ve střední části se třemi až dvaceti trubkovitými květy. Zákrv je třířadý, zelené listeny jsou střechovité, uspořádané, kopinaté, pýřité, na okrajích s nahnědlým nebo bělavým blanitým lemem. Lůžko je slabě vypouklé, plevkaté, jazykovité květy mají korunu bělavou nebo načervenalou, trojzubou, terčové květy korunu pěticípou, nažloutlou nebo slabě nahnědlou. Stonky jsou pýřité, zelené, hnědě nebo fialově naběhlé, podélně rýhované, až 3 mm silné, uvnitř vyplněné světle zbarvenou dřevinou.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti *B* práškové rebríčkové natě

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelený nebo šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky stonku v plošném pohledu [K] s buňkami s hladkou kutikulou a anomocytickými průduchy (2.8.3); úlomky pokožky listu a listenu v plošném pohledu [B] s buňkami se zprohýbanými a nepravidelně ztlustlými stěnami, jemně rýhovanou kutikulou a anomocytickými průduchy (2.8.3); velmi zřídka žláznaté chlupy s krátkou nohou a dvouřadovou tříbuněčnou až pětibuněčnou hlavičkou, krytou měchýřovitou membránou [H]; úlomky nebo celé jednoradé krycí chlupy [A] na bázi se čtyřmi až šesti malými více nebo méně stejnostěnnými buňkami, koncová buňka ztlustlá, často zkroucená, asi 400 μm až 1000 μm dlouhá; úlomky jazykovité koruny s buňkami pokožky

papilózně vychlípenými [D]; úlomky koruny trubkovitých květů v plošném pohledu se zprohýbanými buňkami pokožky pokrytými tenkou rýhovanou kutikulou [F]; parenchym koruny trubkovitých květů složený z malých buněk obsahujících drůzy kalcium-oxalátu [E]; skupiny zdřevnatělých a tečkovaných buněk listenů [G]; kulovitá pylová zrna o průměru asi 30 μm, se třemi klíčovými póry a ostnitou exinou [C]; skupiny sklerenchymatických vláken a malé šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlé cévy stonku [J].

**C.** 2,0 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se protřepávají 5 min s 25 ml *ethyl-acetátu R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R* (roztok A). 2,5 ml *dime-thylaminobenzaldehydu RS8* se přidá k 0,1 ml roztoku A a zahřívá se 2 min na vodní lázni. Nechá se ochladit a přidá se 5 ml *petroletheru R* a směs se silně protřepe. Vodná vrstva se zbarví modře nebo zelenomodře.

**D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Použije se roztok A připravený ve Zkoušce totožnosti C.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *cineolu R* a 10 mg *guajazulenu R* se rozpustí ve 20 ml *toluenu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 μl, do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části červená skvrna (guajazulen) a ve střední části modrá nebo šedomodrá skvrna (cineol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je fialová skvrna v poloze odpovídající poloze mírně nad skvrnou guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku; pod ní je červenofialová skvrna a pod touto skvrnou jedna nebo dvě nepříliš zřetelně rozdělené šedofialové nebo našedlé skvrny (jejich zbarvení se mění po několika hodinách na zelenošedé) a červenofialová skvrna v poloze odpovídající poloze mírně nad skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny další málo výrazné skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % stonků o průměru větším než 3 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 0,500 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,5 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Silice.** Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) se provede v 1000ml baňce s kulatým dnem se 20,0 g řezané drogy a 500 ml směsi objemových dílů vody R a ethylenglykolu R (1 + 9) jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,2 ml xylenu R. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

Po ukončení destilace se přeruší chlazení a v destilaci se pokračuje, dokud modře zbarvená silice nedosáhne dolního konce chladiče, pak se ihned opět zapne chlazení tak, aby nedošlo k přehřátí separačního prostoru. Destiluje se 5 min, pak se 1000ml baňka s kulatým dnem nahradí 250ml baňkou s kulatým dnem se směsí 0,4 ml xylenu R a 50 ml vody R a destiluje se 15 min. 10 min po ukončení destilace se odečte celkový objem destilátu. Provede se slepá zkouška se směsí 0,4 ml xylenu R a 50 ml vody R, do dělené trubice se přidá 0,2 ml xylenu R, destiluje se 15 min.

**Proazulený.** Modře zbarvená směs silice a xylenu ze zkoušky Silice se převede za použití malých objemů xylenu R do 50ml odměrné baňky tak, aby byla znečištěna co nejmenším množstvím vody. Dělená trubice se promyje xylenem R a roztok v baňce se jím zředí na 50,0 ml. Změří se absorbance (2.2.25) roztoku při 608 nm za použití xylenu R jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah proazulenů v procentech, vyjádřeno jako chamazulen (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>) podle následujícího vzorce:

$$\frac{A \cdot 2,1}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 608 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance chamazulenu má hodnotu 23,8.

## MYRISTICAE ETHEROLEUM

7.0:1552

## Muškátovníková silice

*Synonymum.* Myristicae fragrantis aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z usušeného a rozdrobněného semene druhu *Myristica fragrans* HOUTT. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá nebo světle žlutá tekutina, aromatického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v toluenu R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 20 µl myristicinu R se rozpustí v 10 ml toluenu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se zkoumadlem vanilinovým R, suší se 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní třetině růžová nebo červenohnědá skvrna (myristicin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je řada skvrn, z nichž jedna odpovídá poloze a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku, nad ní je nahnědlá skvrna (safrol) a fialová skvrna (uhlovdíky). Pod skvrnou odpovídající poloze myristicinu je pět modrých skvrn různé intenzity.

**B.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,885 až 0,905.

**Index lomu** (2.2.6). 1,475 až 1,485.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +8° až +18°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 15 µl α-pinenu R, 15 µl β-pinenu R, 15 µl sabinenu R, 5 µl kar-3-enu R, 5 µl limonenu R, 5 µl γ-terpinenu R, 5 µl terpinen-4-olu R, 5 µl safrolu R a 10 µl myristicinu R se rozpustí v 1 ml hexanu R.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 25 m až 60 m, vnitřní průměr asi 0,3 mm;

– *stacionární fáze:* vázaný makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	50
	10–75	50 → 180
	75–130	180
nástřikový prostor		200–220
detektor		240–250

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

**Eluční pořadí.** Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku; zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem  $\beta$ -pinenu a píkem sabinenu.

**Identifikace složek.** Za použití retenčních časů píků určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky porovnávacího roztoku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících mezích:

- $\alpha$ -pinen: 15 % až 28 %;
- $\beta$ -pinen: 13 % až 18 %;
- sabinen: 14 % až 29 %;
- kar-3-en: 0,5 % až 2,0 %;
- limonen: 2,0 % až 7,0 %;
- $\gamma$ -terpinen: 2,0 % až 6,0 %;
- terpinen-4-ol: 2,0 % až 6,0 %;
- safrol: nejvýše 2,5 %;
- myristicin: 5,0 % až 12,0 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněna před teplem.

## MYRRHAE TINCTURA

6.0:1877

### Myrhová tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Gummiresina myrrha* (1349).

#### VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z jednoho dílu drogy a pěti dílů roztoku ethanolu 90% (V/V).

#### VLASTNOSTI

Čirá žlutohnědá nebo oranžovohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 5 ml se zředí 10 ml ethanolu 96% R.

*Porovnávací roztok.* 10 mg thymolu R a 40  $\mu$ l anetholu R se rozpustí v 10 ml etheru R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (2 + 98).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS, zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a současně se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou i další, většinou fialové skvrny.

#### Horní okraj desky

Porovnávací roztok	Zkoušený roztok
anethol: fialová skvrna thymol: oranžovočervená skvrna	intenzivní fialová skvrna převyšující ostatní velikostí a intenzitou (furanoeudesma-1,3-dien) fialová skvrna dvě intenzivní fialové skvrny (kurzerenon a níže 2-methoxyfuranodien)

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 82 % (V/V) až 88 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 4,0 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Nedoporučují se obaly z plastů.

## MYRTILLI FRUCTUS RECENS

6.1:1602

### Borůvkový plod čerstvý

#### DEFINICE

Je to čerstvý nebo zmrazený zralý plod druhu *Vaccinium myrtillus* L.

*Obsah.* Nejméně 0,30 % anthokyaninů, vyjádřeno jako kyanidin-3-O-glukosid-chlorid (chrysanthemín, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>11</sub>; M<sub>r</sub> 484,8), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má sladkou, mírně svíravou chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Čerstvý plod je černomodrá kulovitá bobule o průměru asi 5 mm; na spodu s jizvou nebo řidčeji se zbytkem stopky, na zploštělém temeni s úzkým okrajem vytrvalého kalicha, s malým prohloubeným terčem uprostřed a se zbytkem čnělky; ve fialové masité dužnině čtyřpřihrádečné až pětipřihrádečné bobule jsou četná malá hnědá vejčitá semena.

**B.** Rozdrcený čerstvý plod je fialovočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Droga je charakteristická těmito znaky: většinou shloučené fialovo-růžové sklereidy se ztlustlými žlábkovitými stěnami z endokarpu a mezokarpu; červenohnědé úlomky epikarpu z mnohohranných buněk s mírně ztlustlými stěnami; hnědožluté úlomky osemení z protáhlých buněk se stěnami podkovovitě ztlustlými; drúzy šťavelanu vápenatého.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 5 g čerstvě rozdrcených plodů se smíchá s 20 ml methanolu R; míchá se 15 min a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg chrysanthemínu R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, butan-1-olu R (16 + 19 + 65).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
chrysanthemín: fialovočervená skvrna	fialovočervená skvrna hlavní fialovočervená skvrna kompaktní skupina jiných hlavních skvrn: – fialovočervená skvrna – několik fialovomodrých skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 0,6 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). 80,0 % až 90,0 %; 5,000 g čerstvě rozdrcené drogy se suší v sušárně při 105 °C.

#### STANOVENÍ OBSAHU

V čas potřeby se rozdrtí 50 g drogy. Asi 5,00 g přesně zvážené rozdrcené drogy se smíchá s 95 ml methanolu R. Mechanicky se 30 min míchá a zfiltruje se do 100ml odměrné baňky. Filtr se promyje methanolem R a roztok se zředí methanolem R na 100,0 ml. Připraví se 50násobné zředění ve směsi objemových dílů kyseliny chlorovodíkové R a methanolu R (1 + 999).

Měří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku při 528 nm za použití směsi objemových dílů kyseliny chlorovodíkové R a methanolu R (1 + 999) jako kontrolní tekutiny.

Obsah anthokyaninů, vyjádřeno jako kyanidin-3-O-glukosid-chlorid, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 5000}{718 \cdot m}$$

v němž značí:

718 – specifickou absorbanci kyanidin-3-O-glukosid-chloridu při 528 nm;

A – absorbanci při 528 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

#### SKLADOVÁNÍ

Zmrazená droga se skladuje při teplotě –18 °C nebo nižší.

## MYRTILLI FRUCTUS RECENTIS EXTRACTUM SICCCUM RAFFINATUM ET NORMATUM

6.4:2394

Extrakt z čerstvého borůvkového plodu suchý  
čištěný a standardizovaný

#### DEFINICE

Je to čištěný a standardizovaný suchý extrakt vyrobený z drogy *Myrtilli fructus recens* (1602).

*Obsah.* 32,4 % až 39,6 % anthokyaninů, vyjádřeno jako kyanidin-3-O-glukosid-chlorid (chrysanthemín, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>11</sub>; M<sub>r</sub> 484,8), počítáno na vysušený extrakt.

#### VÝROBA

Extrakt se připravuje vhodným postupem z rostlinné drogy za použití ethanolu 96% (V/V) nebo methanolu [nejméně 60% (V/V)]. Přechištění se může provést iontoměničovou chromatografií.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tmavě červenofialový amorfni hygroskopický prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,10 g se rozpustí ve 25 ml methanolu R. Míchá se 15 min a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 2 mg chrysanthemínu R a 2 mg myrtillinu R se rozpustí v 5 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska pro TLC pokrytá celulosou pro chromatografii R (5 µm až 40 µm) [nebo deska pro TLC pokrytá celulosou pro chromatografii R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů kyseliny chlorovodíkové R, kyseliny octové RS a vody R (3 + 15 + 82);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů vody R a kyseliny octové RS (40 + 60).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

*Vyvíjení A.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm] mobilní fázi A.

*Sušení A.* V teplém vzduchu.

*Vyvíjení B.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm] mobilní fázi B.

*Sušení B.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně intenzivní skvrny.



Horní okraj desky	
chrysanthemín: fialovočervená skvrna	fialovočervená skvrna
myrtillin: fialovočervená skvrna	fialovočervená skvrna (chrysanthemín)
	fialovočervená skvrna (myrtillin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

- B.** Kapalinná chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Celkové anthokyanidiny (viz Zkoušky na čistotu). Charakteristické píky anthokyaninů (píky 1 až 8, 10 až 15 a 17) na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají píčkům na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 4,5 %.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 2,0 %.

**Celkové anthokyanidiny.** Kapalinná chromatografie (2.2.29). *Roztoky se udržují při teplotě 4 °C.*

*Rozpouštěcí směs.* Směs objemových dílů kyseliny chlorovodíkové R a methanolu R (2 + 98).

*Zkoušený roztok.* 0,1250 g se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí kyselinou fosforečnou zředěnou RS na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10,0 mg kyanidin-chloridu CRL se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí kyselinou fosforečnou zředěnou RS na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 0,1250 g borůvkového extraktu suchého CRL se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí kyselinou fosforečnou zředěnou RS na 20,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,250 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm);
- *teplota:* 30 °C.

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R a vody R (8,5 + 91,5);
- *mobilní fáze B:* směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, acetonitrilu R, methanolu R a vody R (8,5 + 22,5 + 22,5 + 41,5).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–35	93 → 75	7 → 25
35–45	75 → 35	25 → 65
45–46	35 → 0	65 → 100
46–50	0	100

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 535 nm.

*Nástřik.* 10 μl.

*Identifikace píků.* K identifikaci píků anthokyaninů a anthokyanidinů se použije chromatogram dodávaný s borůvkovým extraktem suchým CRL a chromatogramy porovnávacích roztoků (a) a (b).

*Retenční časy.* Retenční časy a eluční pořadí píků odpovídají retenčním časům a elučnímu pořadí píků na chromatogramu, viz obrázek 1.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *poměr výšky píku k sedlu:* nejméně 2,0, kde  $H_p$  je výška píku kyanidin-3-O-galaktosidu (pík 3) nad základní linií a  $H_v$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento píku od píku delfinidin-3-O-arabinosidu (pík 4) nad základní linií.

Obsah anthokyanidinů v procentech, vyjádřeno jako kyanidin-chlorid, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 100 \cdot p}{m_1 \cdot A_2 \cdot 1250},$$

v němž značí:

$A_1$  – součet ploch píků anthokyanidinů (píky 9, 16, 18–20) na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku kyanidin-chloridu (pík 16) na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost kyanidin-chloridu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

$p$  – obsah kyanidin-chloridu v kyanidin-chloridu CRL v procentech.

*Limity.* Nejvýše 1,0 % celkových anthokyanidinů, vyjádřeno jako kyanidin-chlorid.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinná chromatografie (2.2.29) popsaná ve zkoušce Celkové anthokyanidiny (viz Zkoušky na čistotu) s následující úpravou.

*Nástřik.* Zkoušený roztok a porovnávací roztok (b).

Celkový obsah anthokyaninů v procentech, vyjádřeno jako kyanidin-3-O-glukosid-chlorid ( $C_{21}H_{21}ClO_{11}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{m_1 \cdot A_2},$$

v němž značí:

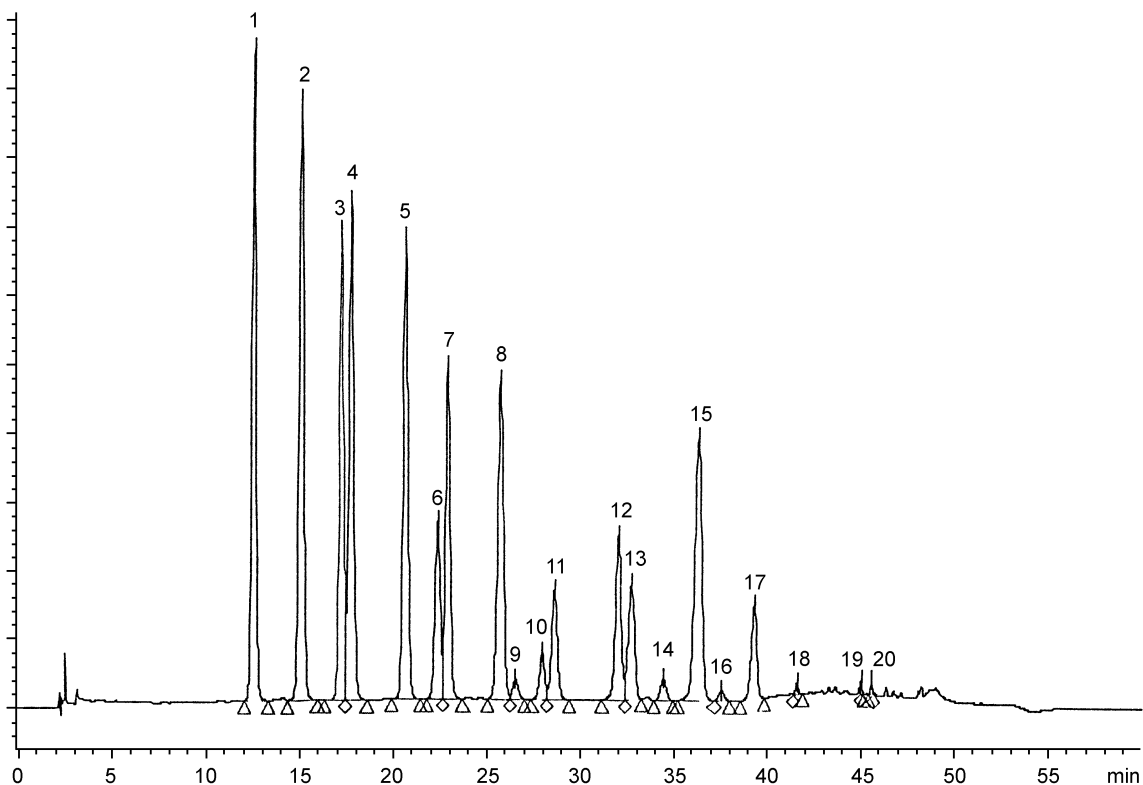
$A_1$  – součet ploch píků anthokyaninů (píky 1–8, 10–15 a 17) na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku kyanidin-3-O-glukosid-chloridu (pík 5) na chromatogramu porovnávacího roztoku (b);

$m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost borůvkového extraktu suchého CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku (b) v gramech;

$p$  – obsah kyanidin-3-O-glukosid-chloridu v borůvkovém extraktu suchém CRL v procentech.



- |                                                            |                                                |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1 = delfinidin-3- <i>O</i> -galaktosid-chlorid             | 11 = petunidin-3- <i>O</i> -arabinosid-chlorid |
| 2 = myrtillin (delfinidin-3- <i>O</i> -glukosid-chlorid)   | 12 = peonidin-3- <i>O</i> -glukosid-chlorid    |
| 3 = kyanidin-3- <i>O</i> -galaktosid-chlorid               | 13 = malvidin-3- <i>O</i> -galaktosid-chlorid  |
| 4 = delfinidin-3- <i>O</i> -arabinosid-chlorid             | 14 = peonidin-3- <i>O</i> -arabinosid-chlorid  |
| 5 = chrysanthemín (kyanidin-3- <i>O</i> -glukosid-chlorid) | 15 = malvidin-3- <i>O</i> -glukosid-chlorid    |
| 6 = petunidin-3- <i>O</i> -galaktosid-chlorid              | 16 = kyanidin-chlorid                          |
| 7 = kyanidin-3- <i>O</i> -arabinosid-chlorid               | 17 = malvidin-3- <i>O</i> -arabinosid-chlorid  |
| 8 = petunidin-3- <i>O</i> -glukosid-chlorid                | 18 = petunidin-chlorid                         |
| 9 = delfinidin-chlorid                                     | 19 = peonidin-chlorid                          |
| 10 = peonidin-3- <i>O</i> -galaktosid-chlorid              | 20 = malvidin-chlorid                          |

**Obř. 1** Chromatogram pro stanovení obsahu extraktu z čerstvého borůvkového plodu suchého čiřtěného a standardizovaného

## MYRTILLI FRUCTUS SICCUS

6.0:1588

### Borůvkový plod sušený

#### DEFINICE

Je to usušený zralý plod druhu *Vaccinium myrtillus* L.

*Obsah.* Nejméně 1,0 % tříslovin, vyjádřeno jako benzen-1,2,3-triol (pyrogallol, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 126,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má sladkou, mírně svíravou chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Plod je tmavomodrá, téměř kulovitá, scvrklá bobule o průměru asi 5 mm; s jizvou na spodní části, s úzkým okrajem vytrvalého kalicha na temeni, s malým prohloubeným terčem uprostřed a se zbytkem čnělky; v tmavofialové masité dužnině jsou četná malá hnědá vejčitá semena.

- B.** Droga se uprářkuje (355) (2.9.12). Prášek je fialovohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: většinou shloučené fialovorůžové sklereidy se ztlustlými žlábkovitými stěnami z endokarpu a mezokarpu; červenohnědé úlomky epikarpu z mnohohranných buněk s mírně ztlustlými stěnami; hnědožluté úlomky osemení z protáhlých buněk se stěnami podkovovitě ztlustlými; drúzy a krystaly šřavelanu vápenatého různé velikosti.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 2 g prářkované drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 20 ml *methanolu R*; směs se protřepává 15 min a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *chrysanthemínu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-1-olu R* (16 + 19 + 65).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
chrysanthemín: fialovočervená skvrna	fialovočervená nevýrazná skvrna hlavní fialovočervená skvrna kompaktní skupina jiných hlavních skvrn: – fialovočervená skvrna – několik fialovomodrých skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslavin (2.8.14) v rostlinných drogách; použije se 1,500 g práškové drogy (355) (2.9.12).

## NIAOULI TYPO CINEOLO ETHEROLEUM

7.5:2468

Niaouliová silice cineolového typu

*Synonymum.* Niaouli typy cineolo aetheroleum

#### DEFINICE

Je to silice získaná z mladých olistěných větvíček druhu *Melaleuca quinquenervia* (CAV.) S. T. BLAKE destilací s vodní parou.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá nebo světle žlutá kapalina, aromatického pachu po cineolu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 100 µl se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 25 µl *trans-nerolidolu R* a 50 µl *cineolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 3 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
1,8-cineol: fialovohnědá skvrna	slabá šedá skvrna purpurová skvrna intenzivní fialovohnědá skvrna (1,8-cineol)
<i>trans-nerolidol</i> : tmavě fialová skvrna	intenzivní fialovohnědá skvrna fialovohnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,904 až 0,925.

**Index lomu** (2.2.6). 1,463 až 1,472.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-4^{\circ}$  až  $+1^{\circ}$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Methyleugenol a isomethyleugenol.** Plynová chromatografie (2.2.28) popsána ve zkoušce Chromatografický profil s následujícími úpravami.

*Porovnávací roztok.* 5 µl *methyleugenolu R* a 5 µl *isomethyleugenolu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *heptanem R* na 5,0 ml.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy methyleugenolu a isomethyleugenolu.

*Identifikace píků.* Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

*Limity:*

– *methyleugenol*: nejvýše 0,05 %;

– *isomethyleugenol*: nejvýše 0,05 %.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 0,2 ml se rozpustí v 10,0 ml heptanu R.

**Porovnávací roztok (a).** 10 µl α-pinenu R, 5 µl β-pinenu R, 10 µl limonenu R, 50 µl cineolu R, 5 µl p-cymenu R, 5 µl benzaldehydu R, 5 mg α-terpineolu R a 5 µl trans-nerolidolu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 5 µl limonenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 50,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí heptanem R na 5,0 ml.

**Kolona:**

- **materiál:** tavený křemen;
- **rozměry:** délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,3 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–5	65
	5–65	65 → 185
	65–80	185 → 230
nástřikový prostor		230
detektor		250

**Detekce.** Plamenoionizační detektor.

**Nástřik.** 1 µl.

**Eluční pořadí.** Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Identifikace píků.** Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Pík viridiflorolu se eluuje s relativní retencí asi 1,02 vztáženou k trans-nerolidolu.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (a):

- **rozlíšení:** nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem 1,8-cineolu.

Vypočítá se obsah těchto složek v procentech. Obsah složek v procentech se pohybuje v následujících rozmezích:

- α-pinén: 5,0 % až 15,0 %;
- β-pinén: 1,0 % až 4,0 %;
- limonén: 5,0 % až 10,0 %;
- 1,8-cineol: 45,0 % až 65,0 %;
- p-cymén: 0,05 % až 4,0 %;
- benzaldehyd: 0,05 % až 0,5 %;
- α-terpineol: 3,0 % až 8,0 %;
- trans-nerolidol: 0,05 % až 1,5 %;
- viridiflorol: 2,5 % až 9,0 %;
- **limit zanedbatelnosti:** plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## NOTOGINSENG RADIX

6.0:2383

Kořen všehoje nepravého

### DEFINICE

Je to usušený celý nebo řezaný hlavní kořen, upravený parou, bez postranních kořenů druhu *Panax pseudoginseng* WALL. var. *notoginseng* (BURK.) HOO et TSENG [*Panax notoginseng* (BURK.) F. H. CHEN ex C. Y. WU et K. M. FENG].

**Obsah,** počítáno na vysušenou drogu. Nejméně 3,8 % ginsenosidu Rg1 (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>.2H<sub>2</sub>O; M<sub>r</sub> 837) a ginsenosidu Rb1 (C<sub>54</sub>H<sub>92</sub>O<sub>23</sub>.3H<sub>2</sub>O; M<sub>r</sub> 1163); součet obsahů.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Hlavní kořen je kuželovitý, větvenovitý nebo válcovitý, až 6 cm dlouhý, o průměru až 4 cm. Povrch je hnědošedý nebo žlutošedý, s mělkými příčnými rýhami a s jizvami po postranních kořenech. Jizva po nadzemní části rostliny je na kořenové hlavě obklopena bradavičnatými výrůstky, takže připomíná korunu. Textura kořene je kompaktní. Lom je hladký, lesklý, hnědošedý se žlutošedým kambialním kruhem a s četnými dřevnými paprsky.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky tenkostěnných parenchymatických buněk; úlomky sekrečních kanálků obsahujících žlutohnědou pryskyřici; zřídka dřevnatělé síťovité nebo tečkované ztlustlé cévy o průměru asi 30 µm; vzácně úlomky korku. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*; jsou patrná velmi četná často deformovaná jednoduchá, dvoučetná nebo trojčetná škrobová zrna o průměru 1 µm až 10 µm.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Panax ginseng* nebo *Panax quinquefolium* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
arbutin: hnědá skvrna	fialová skvrna (čelo chromatogramu) fialová skvrna
	fialová skvrna (ginsenosidy Rg1 a Rg2) 2 fialové skvrny 2 slabé fialové skvrny
escin: šedá skvrna	fialová skvrna několik fialových a nazelenalých skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Panax ginseng nebo Panax quinquefolium.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se vaří 15 min pod zpětným chladičem s 10 ml roztoku *methanolu* 70% (V/V) R. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí *methanolem* R na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *escinu* R a 5,0 mg *arbutinu* R se rozpustí v 1 ml *methanolu* R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu* R, *vody* R a *butan-1-olu* R (25 + 50 + 100), nechá se 10 min stát a použije se horní vrstva.

**Nanášení.** 20 µl; do proužků 15 mm [nebo 4 µl zkoušeného roztoku a 2 µl porovnávacího roztoku, do proužků 8 mm].

**Vyvíjení.** V nenasycené komoře po dráze 10 cm [nebo 5 cm].

**Sušení.** Na vzduchu, 30 min.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem* RS, zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °C až 110 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku svědčí nepřítomnost fialové skvrny těsně nad skvrnou *arbutinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku o přítomnosti druhu *Panax ginseng*; na chromatogramu zkoušeného roztoku svědčí přítomnost hnědé skvrny těsně pod fialovou skvrnou *ginsenosidů* Rg1 a Rg2 o přítomnosti druhu *Panax quinquefolium*.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se 2 h suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Upráškují se asi 50 g drogy (355) (2.9.12). 0,250 g práškové drogy se smíchá se 70 ml roztoku *methanolu* 50% (V/V) R ve 250 ml baňce s kulatým dnem, přidá se několik zrněk pemzy a vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se odstředí, supernatantní tekutina se jímá a zbytek se extrahuje ještě jednou za výše uvedených podmínek. Supernatantní tekutiny se spojí a odpaří se za sníženého tlaku do sucha při teplotě nepřevyšující 60 °C. Zbytek se promyje 10,0 ml tlumivého roztoku (s pH upraveným na hodnotu 4,5), který obsahuje 3,5 g *dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu* R a 7,2 g *dihydrogenfosforečnanu draselného* R v 1000 ml *vody* R (roztok A). Kolona obsahující asi 0,36 g *silikagelu* pro chromatografii *oktadecylsilylovaného* R se promyje 5 ml *methanolu* R a potom 20 ml *vody* pro chromatografii R. Na kolonu se převede 5,0 ml roztoku A. Eluuje se 20 ml *vody* pro chromatografii R, a potom 15 ml roztoku *methanolu* 30% (V/V) R. Po ověření nepřítomnosti *ginsenosidů*, se eluáty odstraní, v opačném případě se stanovení obsahu opakuje s jiným druhem kolony. Kolona se eluuje 20 ml *methanolu* R; tento eluát se odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5,0 ml *methanolu* R.

**Porovnávací roztok.** 3,0 mg *ginsenosidu* Rb1 R, 3,0 mg *ginsenosidu* Rg1 R, 3,0 mg *ginsenosidu* Rf R se rozpustí v *methanolu* R a zředí se jím na 5,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel* pro chromatografii *aminopropylsilylovaný* R (3 µm).

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** *acetonitril* R;
- **mobilní fáze B:** *voda* pro chromatografii R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–14	90	10
14–18	90 → 80	10 → 20
18–55	80	20

**Průtoková rychlost.** 2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 203 nm.

**Nástřík.** 20 µl.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **rozlíšení:** nejméně 3,0 mezi píkem *ginsenosidu* Rf a píkem *ginsenosidu* Rg1.

Vypočítá se celkový obsah *ginsenosidu* Rb1 a *ginsenosidu* Rg1 v procentech podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 2 \cdot p_1}{m_1 \cdot A_3} + \frac{A_2 \cdot m_3 \cdot 2 \cdot p_2}{m_1 \cdot A_4}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku *ginsenosidu* Rb1 na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku *ginsenosidu* Rg1 na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_3$  – plochu píku *ginsenosidu* Rb1 na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $A_4$  – plochu píku *ginsenosidu* Rg1 na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost vysušené zkoušené drogy v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *ginsenosidu* Rb1 R v porovnávacím roztoku v gramech;
- $m_3$  – hmotnost *ginsenosidu* Rg1 R v porovnávacím roztoku v gramech;
- $p_1$  – obsah *ginsenosidu* Rb1 v *ginsenosidu* Rb1 R v procentech;
- $p_2$  – obsah *ginsenosidu* Rg1 v *ginsenosidu* Rg1 R v procentech.

## OLEAE FOLII EXTRACTUM SICCUM

6.4:2313

Extrakt z olivovníkového listu suchý

## DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Oleae folium* (1878).

**Obsah.** Nejméně 16,0 % oleuropeinu (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>; M<sub>r</sub> 540,52), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Extrakt se vyrábí vhodným postupem z rostlinné drogy a ethanolu 65% (V/V) až 96% (V/V).

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Zelenohnědý nebo hnědý amorfni prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,25 g se přidá 10 ml *methanolu R*. 15 min se ponechá v ultrazvukové lázni a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *oleuropeinu R* a 1 mg *rutinu R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethyl-acetátu R* (7 + 13 + 80).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
	tmavá fialovomodrá skvrna
oleuropein: hnědozelená skvrna	hnědozelená skvrna (oleuropein)
rutin: žlutá skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.8.17). Nejvýše 8,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29). *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

*Zkoušený roztok.* K 0,250 g se přidá 50 ml *methanolu R*. 15 min se ponechá v ultrazvukové lázni a zfiltruje se do 100ml odměrné baňky. Baňka i filtr se promyjí 2 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 10,0 mg *oleuropeinu CRL* se rozpustí v 10,0 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 4 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml porovnávacího roztoku (a).

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 µm);

– *teplota:* 25 °C.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny trifluoroctové R*, *methanolu R* a *vody R* (1 + 400 + 600).

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 233 nm.

*Nástřik.* 20 µl.

*Doba záznamu.* Dvojnásobek retenčního času *oleuropeinu*.

*Relativní retence* vztažená k *oleuropeinu* (retenční čas asi 11 min). *Rutin* asi 0,7.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozlišení:* nejméně 3,0 mezi píkem *rutinu* a píkem *oleuropeinu*.

Obsah *oleuropeinu* (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 4}{A_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku *oleuropeinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>2</sub> – plochu píku *oleuropeinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

*m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

*m*<sub>2</sub> – hmotnost *oleuropeinu CRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

*p* – obsah *oleuropeinu* v *oleuropeinu CRL* v procentech.

## OLEAE FOLIUM

6.3:1878

## Olivovníkový list

## DEFINICE

Je to usušený list druhu *Olea europaea L.*

*Obsah.* Nejméně 5,0 % *oleuropeinu* (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>; *M<sub>r</sub>* 540,52), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** List je jednoduchý, tlustý, kožovitý, kopinatý až obvejčitý, 30 mm až 50 mm dlouhý a 10 mm až 15 mm široký, hrotitý, na bázi protažený v krátký řapík; čepel listu je celokrajná, podvinutá. List je na svrchní straně šedozelelý, hladký a lesklý, na spodní straně světlejší, převážně podél hlavní žilky a velkých postranních žilek chlupatý.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky listu v plošném pohledu z malých silnostěnných, mnohohranných buněk, jen na spodní straně listu jsou drobné anomocytické průduchy (2.8.3); úlomky čepele v příčném pohledu se ztlustlou kutikulou, třířadým palisádovým parenchymem a drobnými buňkami houbového parenchymu; četné sklereidy se silně ztlustlými stěnami jsou většinou vláknité, s tupými nebo někdy vidlicovitými konci, jsou jednotlivé nebo provázené parenchymem mezofylu; četné nápadně velké štítkovité

chlupy s centrální jednobuněčnou nohou a s deseti až třiceti tenkostěnnými paprčitě uspořádanými buňkami, buňky přecházejí volně od sousedních buněk směrem k okrajům štítu a dávají mu nepravidelný, roztřepený vzhled.

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml *methanolu R* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem. Ochladí se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 10 mg *oleuropeinu R* a 1 mg *rutinu R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1,5 + 15 + 85).

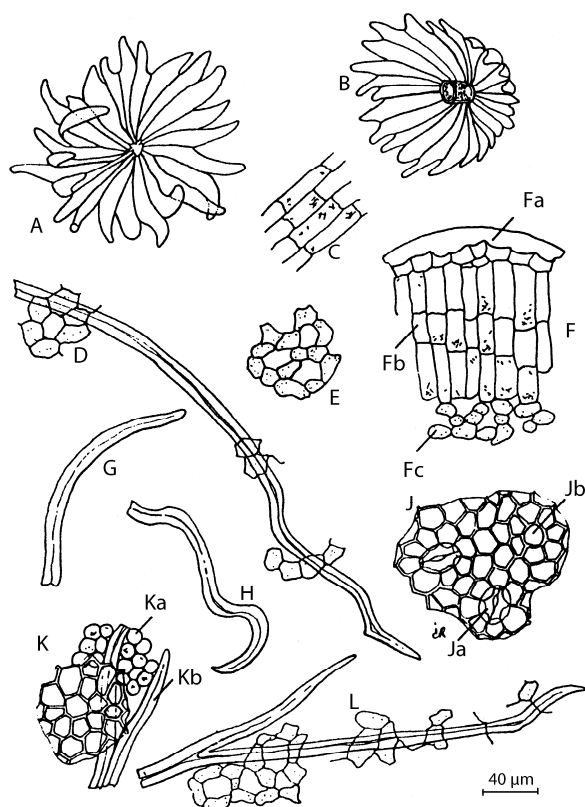
**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny.



- A = štítovitý chlup, pohled shora  
 B = štítovitý chlup, pohled zespodu  
 C = palisádový parenchym  
 D, G, H a L = vláknité sklereidy někdy provázené úločky parenchymatického houbového mezofylu  
 E = houbový parenchym

F = úločky čepele na příčném řezu se ztlustlou kutikulou (Fa), třířadým palisádovým parenchymem (Fb) a houbovým parenchymem (Fc)

J = úloček pokožky ze spodní strany listu s anomocytickým průduchem (Ja) a cicatrix štítového chlupu (Jb)

K = úloček pokožky ze svrchní strany listu s palisádovým parenchymem a sklereidami houbového mezofylu

**Obř. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškového olivovníkového listu (viz Zkoušku totožnosti B)

Horní okraj desky	
	tmavá fialovomodrá skvrna (čelo chromatogramu)
	tmavá fialovomodrá skvrna
oleuropein: hnědozelená skvrna	hnědozelená skvrna (oleuropein)
rutin: hnědožlutá skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se v baňce smíchá s 50 ml *methanolu R* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 60 °C za protřepávání. Nechá se ochladit a zfiltruje se do 100ml odměrné baňky. Baňka i filtr se promyjí *methanolem R* a filtrát a promývací tekutiny se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 2,5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *oleuropeinu R* se rozpustí v 5,0 ml *methanolu R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 25,0 ml.

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,15 m, vnitřní průměr 3,9 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 µm);
- teplota: 25 °C.

**Mobilní fáze:**

- mobilní fáze A: 1,0 ml *kyseliny octové ledové R* se zředí *vodou R* na 100 ml;
- mobilní fáze B: *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	85 → 40	15 → 60
5–12	40 → 20	60 → 80
12–15	20 → 85	80 → 15

Průtoková rychlost. 1 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

Nástrík. 20 µl.

Retenční čas. Oleuropein asi 9 min.

Obsah oleuropeinu ( $C_{25}H_{32}O_{13}$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 8}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku oleuropeinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku oleuropeinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost oleuropeinu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah oleuropeinu v oleuropeinu CRL v procentech.

## OLIBANUM INDICUM

6.0: 2310

### Pryskyřice indická

#### DEFINICE

Je to na vzduchu zaschlý klejoprskyřičný exsudát získaný nařezáváním kmene nebo větvi druhu *Boswellia serrata* ROXB. ex COLEBR.

Obsah, počítáno na vysušenou drogu:

– kyselina 11-keto-β-boswellová ( $C_{30}H_{46}O_4$ ;  $M_r$  470,7):  
nejméně 1,0 %;

– kyselina acetyl-11-keto-β-boswellová ( $C_{32}H_{48}O_5$ ;  $M_r$  512,7):  
nejméně 1,0 %.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Průsvitné okrouhlé nebo nepravidelné kousky různé velikosti, až 3 cm velké. Jsou nažloutlé nebo červeno-hnědé, na povrchu pokryté šedým prachem. Lom je matný nebo mírně lesklý.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 90 ml *methanolu R* a extrahuje se 10 min v ultrazvukové lázni. Během extrakce se směs třikrát nebo čtyřikrát silně protřepe. Pak se zředí *methanolem R* na 100 ml a odstředí se. Použije se čirá supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 2 mg *kyseliny 11-keto-β-boswellové R* a 2 mg *kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *heptanu R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (3 + 10 + 20 + 80).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 3 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 8 cm [nebo 5 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny kyseliny 11-keto-β-boswellové a acetyl-11-keto-β-boswellové přibližně stejně intenzivní. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě žhášející skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina acetyl-11-keto-β-boswellová: žhášející skvrna	žhášející skvrna (kyselina acetyl-11-keto-β-boswellová)
kyselina 11-keto-β-boswellová: žhášející skvrna	žhášející skvrna (kyselina 11-keto-β-boswellová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.2.32). Nejvýše 8,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 3 h v sušárně při 105 °C.

*Celkový popel* (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 90 ml *methanolu R* a extrahuje se 10 min v ultrazvukové lázni. Během extrakce se směs třikrát nebo čtyřikrát silně protřepe. Pak se zředí *methanolem R* na 100,0 ml a 5 min se odstředí. 1,0 ml čirého roztoku se zředí směsí objemových dílů mobilní fáze A a mobilní fáze B (16 + 84) na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *kyseliny 11-keto-β-boswellové R* a 1,0 mg *kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové R* se rozpustí v 20,0 ml *methanolu R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 10,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

*Mobilní fáze.*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (0,1 + 99,9);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *acetonitrilu R* (0,1 + 99,9).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–12,5	16 → 6	84 → 94
12,5–13,5	6 → 0	94 → 100
13,5–28	0	100

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 250 nm.

Nástrík. 20 µl.



*Retenční časy.* Kyselina 11-keto-β-boswellová asi 8 min; kyselina acetyl-11-keto-β-boswellová asi 12 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 6,0 mezi pikem kyseliny 11-keto-β-boswellové a pikem kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové.

Obsah kyseliny 11-keto-β-boswellové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot p_1}{A_2 \cdot m}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny 11-keto-β-boswellové na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_2$  – plochu píku kyseliny 11-keto-β-boswellové na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $m$  – hmotnost zkoušené látky v gramech;  
 $m_1$  – hmotnost kyseliny 11-keto-β-boswellové  $R$  v porovnávacím roztoku v gramech;  
 $p_1$  – obsah kyseliny 11-keto-β-boswellové v kyselině 11-keto-β-boswellové  $R$  v procentech.

Obsah kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_3 \cdot m_2 \cdot 5 \cdot p_2}{A_4 \cdot m}$$

v němž značí:

- $A_3$  – plochu píku kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_4$  – plochu píku kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $m$  – hmotnost zkoušené látky v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové  $R$  v porovnávacím roztoku v gramech;  
 $p_2$  – obsah kyseliny acetyl-11-keto-β-boswellové v kyselině acetyl-11-keto-β-boswellové  $R$  v procentech.

## ONONIDIS RADIX

6.0:1879

### Jehlicový kořen

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Ononis spinosa* L.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořen je více nebo méně zploštělý, zkroucený, rozvětvený, hluboce zvrásněný, na povrchu hnědý, podélně svraskalý. Na příčném řezu je patrná úzká kůra a výrazně vějířovité dřevo. Lom je krátký, vláknitý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý nebo hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: hnědé úlomky korku z tenkostěnných mnohohranných buněk; skupiny ztlustlých úzkých vláken často provázených komůrkovými vlákny s hranolovitými krystaly štávelanu vápenatého; úlomky cév

s četnými malými dvůrky; parenchymatické buňky s hranolovitými krystaly štávelanu vápenatého. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R* a *vody R*. V prášku jsou četná jednoduchá okrouhlá škrobová zrna o průměru 5 μm až 10 μm.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá s 15,0 ml *methanolu R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *resorcinolu R* a 50 mg *vanilinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC  $R$ .

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethanolu 96% R*, *dichlormethanu R* a *toluenu R* (10 + 45 + 45).

*Nanášení.* 20 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a při 365 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ve střední třetině další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
vanilin: skvrna viditelná při 254 nm	
resorcinol: skvrna viditelná při 254 nm	intenzivní modrá skvrna viditelná při 365 nm
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
vanilin: šedofialová skvrna	
resorcinol: červená skvrna	fialová skvrna (onokol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

**Extrahovatelné látky.** Nejméně 15,0 %; 2,00 g práškované drogy (250) (2.9.12) se smíchají se směsí 8 g *vody R* a 12 g *ethanolu 96% R* a nechá se 2 h stát za častého protřepávání, zfiltruje se a 5 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha.

Zbytek po odpaření se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek po vysušení váží nejméně 75 mg.

## OPII EXTRACTUM SICCCUM NORMATUM

6.0:1839

### Opiový extrakt suchý standardizovaný

#### DEFINICE

Je to standardizovaný suchý extrakt vyrobený ze surového opia [*Opium crudum* (0777)].

*Obsah*, počítáno na vysušený extrakt:

- *morfin* ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ;  $M_r$  285,34): 19,6 % až 20,4 %;
- *kodein* ( $C_{18}H_{21}NO_3$ ;  $M_r$  299,37): nejméně 2,0 %.

Je-li třeba, obsah se upraví přidáním vhodné pomocné látky (např. laktosy, dextrinu).

#### VÝROBA

Připravuje se z drogy a vody vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Hnědý amorfni prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,05 g se suspenduje v 5 ml *ethanolu* 70% (V/V) R a převede se do 25 ml kuželové baňky. Zbytek se vypláchne 3 ml *ethanolu* 70% (V/V) R, převede se do stejné baňky a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C za stálého míchání. Po ochlazení se zfiltruje, filtr se promyje *ethanolem* 70% (V/V) R a filtrát spojený s promývací tekutinou se zředí stejným rozpouštědlem na 10 ml.

*Porovnávací roztok*. 5 mg *morfin-hydrochloridu* R se rozpustí v roztoku připraveném takto: 2 mg *papaverin-hydrochloridu* R, 12 mg *kodein-fosfátu* R, 12 mg *noskapiin-hydrochloridu* R se rozpustí v *ethanolu* 70% (V/V) R a zředí se jím na 5 ml a dále se zředí *ethanolem* 70% (V/V) R na 25 ml.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *amoniaku* 26% R, *ethanolu* 96% R, *acetonu* R a *toluenu* R (2 + 6 + 40 + 40). Použije se čerstvě připravená směs.

*Nanášení*. 20 μl [nebo 6 μl], do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm [nebo 8 cm].

*Sušení*. 15 min při 100 °C až 105 °C.

*Detekce*. Nechá se ochladit, postříká se *jodobismutitanem draselným* RS2 a pak roztokem *kyseliny sírové* R (4 g/l). Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být mezi skvrnou kodeinu a skvrnou papaverinu další tmavě červená skvrna (thebain). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
noskapiin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (noskapiin)
papaverin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (papaverin)
kodein: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (kodein)
morfin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (morfin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

- B. 0,5 g se protřepává 5 min s 5 ml *vody* R a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,25 ml *chloridu železitého* RS2; vzniká červené zbarvení, které se po přidání 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné* RS nemění.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Thebain**. Kapalinná chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok*. 0,500 g se suspenduje v 50 ml *ethanolu* 50% (V/V) R a míchá se 1 h pomocí ultrazvukové lázně; nechá se ochladit, zředí se *ethanolem* 50% (V/V) R na 100,0 ml a nechá se stát. K 10,0 ml supernatantní tekutiny se přidá 5 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 9,5*, zředí se *vodou* R na 25,0 ml a promíchá se. 20,0 ml tohoto roztoku se převede na chromatografickou kolonu délky asi 0,15 m a vnitřního průměru asi 30 mm naplněnou 15 g *křemeliny pro chromatografii* R a nechá se stát 15 min. Eluuje se dvakrát 40 ml směsi objemových dílů *propan-2-olu* R a *dichlormethanu* R (15 + 85). Eluát se odpaří do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek po odpaření se převede pomocí mobilní fáze do odměrné baňky a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok (a)*. 5,0 mg *thebainu* CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok (b)*. 12,0 mg *morfin-hydrochloridu* CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 15,0 ml (roztok A). 10,0 mg *kodeinu* CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se přidá k 10,0 ml roztoku A a promíchá se.

*Předkolona*:

- *rozměry*: délka 4 mm, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný* R (5 μm).

*Kolona*:

- *rozměry*: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- *stacionární fáze*: *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný* R (5 μm).

*Mobilní fáze*. 1,0 g *natrium-heptansulfonátu monohydrátu* R se rozpustí ve 420 ml *vody* R, *pH* se upraví roztokem *kyseliny fosforečné* R (4,9 g/l) na hodnotu 3,2 a přidá se 180 ml *acetonitrilu* R.

*Průtoková rychlost*. 1,5 ml/min.

*Detekce*. Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

*Nástrik*. 20 μl.

**Test způsobilosti:**

- rozlišení: nejméně 2,5 mezi píkem morfinu a píkem kodeinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b);
- hmotnostní distribuční poměr: nejméně 3,0 pro pík thebainu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Obsah thebainu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot F \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu ve zkoušeném roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost odpovídajícího alkaloidu v porovnávacím roztoku v gramech;
- $p$  – obsah alkaloidu v odpovídajícím alkaloidu CRL v procentech;
- $F$  – 6,250 pro stanovení thebainu.

**Limit:**

- thebain: nejvýše 6,0 %, počítáno na vysušený extrakt.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 105 °C.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kapalinová chromatografie (2.2.29) postupem uvedeným ve zkoušce Thebain (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

**Nástřík.** Zkoušený roztok a porovnávací roztok (b).

**Test způsobilosti:**

- opakovatelnost: relativní směrodatná odchylka je nejvýše 1,0 % pro plochu píku morfinu po šesti nástřících porovnávacího roztoku (b).

Vypočítá se obsah morfinu a kodeinu v procentech podle vzorce uvedeného ve zkoušce Thebain s tím, že hodnota  $F$  pro morfin je 10,417 a pro kodein je 3,125.

**OPII PULVIS NORMATUS****6.0:1840****Opium práškované standardizované****DEFINICE**

Je to surové opium práškované (180) (2.9.12) a vysušené při teplotě nepřevyšující 70 °C.

**Obsah** (droga sušená 4 h při 100 °C až 105 °C):

- morfin ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ;  $M_r$  285,34): 9,8 % až 10,2 %;
- kodein ( $C_{18}H_{21}NO_3$ ;  $M_r$  299,37): nejméně 1,0 %.

Je-li třeba, upraví se obsah přidáním vhodné pomocné látky nebo práškovaného surového opia.

**VLASTNOSTI**

**Vzhled.** Žlutavohnědý nebo tmavohnědý prášek.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *hydroxidu draselného R* (20 g/l). Jsou patrna zrnka mléčné šťávy, nahromaděná v neuspořádanou hmotu a světle hnědá protáhlá vlákna. Mohou být patrné úlomky cév a řidčeji i protáhlé, světlo lámající krystaly; stejně tak malé množství okrouhlých pylových zrn a úlomky protáhlých vláken. Mohou být přítomny ostře zašpičatělé chlupy různé délky a úlomky epikarpu z mnohohranných buněk se ztlustlými stěnami a hvězdicovým lumenem. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu 85% R*; mohou být přítomny částice pomocné látky a malé množství škrobových zrn zanesených v průběhu zpracování mléčné šťávy.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,10 g drogy se rozetře s 5 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, směs se převede pomocí 3 ml *ethanolu 70% (V/V) R* do 25ml kuželové baňky a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C za stálého míchání. Po ochlazení se zfiltruje, filtr se promyje *ethanolem 70% (V/V) R* a filtrát se zředí stejným rozpouštědlem na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 2,0 mg *papaverin-hydrochloridu R*, 12,0 mg *kodein-fosfátu R*, 12,0 mg *noskapin-hydrochloridu R* a 25,0 mg *morfin-hydrochloridu R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R* a zředí se jím na 25,0 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu 96% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (2 + 6 + 40 + 40). Použije se čerstvě připravená směs.

**Nanášení.** 20 µl, do proužků 20 mm × 3 mm.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** 15 min při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Nechá se ochladit a postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* a pak roztokem *kyseliny sírové R* (4 g/l). Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být mezi skvrnou kodeinu a skvrnou papaverinu další tmavě červená skvrna (thebain).

Horní okraj desky	
noskapin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (noskapin)
papaverin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (papaverin)
kodein: oranžovočervená nebo červená skvrna morfin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (kodein) oranžovočervená nebo červená skvrna (morfin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**C.** 1,0 g se protřepává 5 min s 5 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,25 ml *chloridu železitého RS2*;

vzniká červené zbarvení, které se po přidání 0,5 ml *ky-seliny chlorovodíkové zředěné RS* nemění.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Thebain.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,00 g se suspenduje v 50 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a míchá se 1 h pomocí ultrazvuku, nechá se ochladit, zředí se *ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml a nechá se stát. K 10,0 ml supernatantní tekutiny se přidá 5 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 9,5*, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a promíchá se. 20,0 ml tohoto roztoku se převede na chromatografickou kolonu délky asi 0,15 m a vnitřního průměru asi 30 mm naplněnou 15 g *křemeliny pro chromatografii R* a nechá se stát 15 min. Promyje se dvakrát 40 ml směsi objemových dílů *propan-2-olu R* a *dichlormethanu R* (15 + 85). Eluát se odpaří do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek po odpaření se převede do odměrné baňky pomocí mobilní fáze a zředí se jí na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 25,0 mg *thebainu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

**Předkolona:**

- **rozměry:** délka 4 mm, vnitřní průměr 4,0 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R* (5 μm).

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R* (5 μm).

**Mobilní fáze:** 1,0 g *natrium-heptansulfonátu monohydrátu R* se rozpustí ve 420 ml *vody R*, *pH* se upraví roztokem *kyseliny fosforečné (4,9 g/l)* na hodnotu 3,2 (asi 5 ml) a přidá se 180 ml *acetonitrilu R*.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

**Nástřík.** Vhodný objem, injektorovou smyčkou.

**Test způsobilosti, porovnávací roztok:**

- **hmotnostní distribuční poměr:** nejméně 3,0 pro pík *thebainu*.

**Obsah alkaloidu v procentech se vypočítá podle vzorce:**

$$\frac{m_1 \cdot A_2 \cdot 125}{m_2 \cdot A_1} \cdot \frac{100}{100 - h}$$

v němž značí:

- $m_1$  – hmotnost alkaloidu v porovnávacím roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;
- $A_1$  – plochu píku alkaloidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $A_2$  – plochu píku alkaloidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $H$  – ztrátu sušením v procentech.

**Limit:**

- *thebain*: nejvýše 3,0 %, počítáno na vysušenou drogu.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 8,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 6,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) popsána ve zkoušce *Thebain* (viz Zkoušky na čistotu), s následujícími úpravami. **Porovnávací roztok.** 0,100 g *morfin-hydrochloridu R* a 25,0 mg *kodeinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

**Test způsobilosti, porovnávací roztok:**

- **rozlišení:** nejméně 2,5 mezi píkem *morfinu* a píkem *kodeinu*; je-li třeba, upraví se objem *acetonitrilu* v mobilní fázi;
- **opakovatelnost:** relativní směrodatná odchylka je nejvýše 1,0 % pro plochu píku *morfinu*; provede se šest nástříků.

Obsah *morfinu* a *kodeinu* v procentech se vypočítá podle vzorce uvedeného ve zkoušce *Thebain* s tím, že 1 mg *morfin-hydrochloridu R* odpovídá 0,759 mg *morfinu* a 1 mg *kodeinu R* odpovídá 0,943 mg *kodeinu*.

## OPII TINCTURA NORMATA

6.0:1841

### Opiová tinktura standardizovaná

#### DEFINICE

Je to standardizovaná tinktura vyrobená ze surového opia [*Opium crudum (0777)*].

**Obsah:**

- *morfin* ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ;  $M_r$  285,34): 0,95 % až 1,05 %;
- *kodein* ( $C_{18}H_{21}NO_3$ ;  $M_r$  299,37): nejméně 0,1 %.

#### VÝROBA

Připravuje se z drogy a stejných objemových dílů *ethanolu 70% (V/V)* a *vody* vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Červenohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 ml se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *morfin-hydrochloridu R* se rozpustí v roztoku připraveném takto: 2 mg *papaverin-hydrochloridu R*, 12 mg *kodein-fosfátu R*, 12 mg *noskapin-hydrochloridu R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R* a zředí se jím na 5 ml a dále se zředí *ethanolem 70% (V/V) R* na 25 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 μm až 10 μm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu 96% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (2 + 6 + 40 + 40). Použije se čerstvě připravená směs.

**Nanášení.** 20 μl [nebo 6 μl], do proužku.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 8 cm].

**Sušení.** 15 min při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Nechá se ochladit a postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* a pak roztokem *kyseliny sírové R* (4 g/l); pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být mezi skvrnou kodeinu a skvrnou papaverinu další tmavočervená skvrna (thebain). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
noskapin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (noskapin)
papaverin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (papaverin)
kodein: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (kodein)
morfin: oranžovočervená nebo červená skvrna	oranžovočervená nebo červená skvrna (morfin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 31 % (V/V) až 34 % (V/V).

**Thebain.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 2,000 g se v odměrné baňce zředí ethanolem 50% (V/V) R na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 5 ml tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 9,5, zředí se vodou R na 25,0 ml a promíchá se. 20,0 ml tohoto roztoku se převede na chromatografickou kolonu délky asi 0,15 m a vnitřního průměru asi 30 mm naplněnou 15 g křemelinou pro chromatografii R a nechá se stát 15 min. Eluuje se dvakrát 40 ml směsi objemových dílů propan-2-olu R a dichlormethanu R (15 + 85). Eluát se odpaří do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek po odpaření se převede pomocí mobilní fáze do odměrné baňky a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 5,0 mg thebainu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 12,0 mg morfin-hydrochloridu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 15,0 ml (roztok A). 10,0 mg kodeinu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 10,0 ml roztoku A.

**Předkolona:**

- rozměry: délka 4 mm, vnitřní průměr 4,0 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 µm).

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R (5 µm).

**Mobilní fáze.** 1,0 g natrium-heptansulfonátu monohydrátu R se rozpustí ve 420 ml vody R, pH se upraví roztokem kyseliny fosforečné R (4,9 g/l) na hodnotu 3,2 a přidá se 180 ml acetonitrilu R.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Test způsobilosti, porovnávací roztok (b):**

– rozlišení: nejméně 2,5 mezi píkem morfinu a píkem kodeinu.

**Obsah thebainu v procentech se vypočítá podle vzorce:**

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot F \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené tinktury ve zkoušeném roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost odpovídajícího alkaloidu v porovnávacím roztoku v gramech;

$p$  – obsah alkaloidu v odpovídajícím alkaloidu CRL v procentech;

$F$  – 1,563 pro stanovení thebainu.

**Limit:**

– thebain: nejvýše 0,3 %.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 3,00 g.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29) postupem uvedeným ve zkoušce Thebain (viz Zkoušky na čistotu) s následujícími úpravami.

**Nástřik.** Zkoušený roztok a porovnávací roztok (b).

**Test způsobilosti:**

– opakovatelnost: relativní směrodatná odchylka je nejvýše 1,0 % pro plochu píku odpovídajícího morfinu po šesti nástřicích porovnávacího roztoku (b).

Obsah morfinu a kodeinu v procentech se vypočítá podle vzorce uvedeného ve zkoušce Thebain, s tím, že hodnota  $F$  pro morfin je 2,604 a pro kodein je 0,781.

## OPIUM CRUDUM

6.0:0777

### Opium surové

#### DEFINICE

Surové opium je určeno výhradně jako výchozí surovina pro přípravu galenických přípravků. Samostatně se nesmí vydat.

Je to na vzduchu usušená mléčná šťáva získaná nařiznutím nezralých plodů druhu *Papaver somniferum* L.

**Obsah,** počítáno na vysušenou drogu:

- morfin ( $C_{17}H_{19}NO_3$ ;  $M_r$  285,34): nejméně 10,0 %;
- kodein ( $C_{18}H_{21}NO_3$ ;  $M_r$  299,37): nejméně 2,0 %.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Černoohnědé kusy, různé velikosti, které bývají měkké a lesklé, po usušení tvrdé a křehké.

Droga má charakteristický pach.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

*Odstraní se slupka, zkoušená látka se nakrájí na tenké plátky; je-li třeba, suší se 48 h při asi 60 °C a pak se upráškuje (500) (2.9.12).*

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem. V suspenzi surového opia v roztoku *hydroxidu draselného R* (20 g/l) jsou patrná zrnka mléčné šťávy nahromaděná v neuspořádanou hmotu a světle hnědá protáhlá vlákna. Mohou být patrné úlomky cév a řidčeji i protáhlé, světle lámající krystaly; stejně tak malý počet okrouhlých pylových zrn a úlomky protáhlých vláken. Mohou být přítomny ostře zašpičatělé chlupy různé délky a malé množství škrobových zrn zanesených v průběhu zpracování mléčné šťávy. Mohou být patrné úlomky epikarpu z mnohohranných buněk se ztlustlými stěnami a hvězdicovým lumenem.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,10 g práškované drogy se rozetře s 5 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, přidají se 3 ml *ethanolu 70% (V/V) R*; směs se převede do 25ml kuželové baňky a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C za stálého míchání. Po ochlazení se zfiltruje, filtr se promyje *ethanolem 70% (V/V) R* a filtrát se zředí stejným rozpouštědlem na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 2,0 mg *papaverin-hydrochloridu R*, 12,0 mg *kodein-fosfátu R*, 12,0 mg *noskapin-hydrochloridu R* a 25,0 mg *morfin-hydrochloridu R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R* a zředí se jím na 25,0 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu 96% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (2 + 6 + 40 + 40); použije se čerstvě připravená směs.

*Nanášení.* 20 µl, do proužků 20 mm × 3 mm.

*Vývíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* 15 min při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

*Detekce.* Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* a pak roztokem *kyseliny sírové R* (4 g/l).

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části oranžovočervená nebo červená skvrna (morfin), nad ní podobně zbarvená skvrna (kodein), v horní části oranžovočervená nebo červená skvrna (papaverin) a nad ní podobně zbarvená skvrna (noskapin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami kodeinu a papaverinu může být tmavočervená skvrna (thebain).

**C.** 1,0 g práškované drogy se protřepává 5 min s 5 ml *vody R* a pak se zfiltruje. K filtrátu se přidá 0,25 ml *chloridu železitého RS2*; vzniká červené zbarvení, které se po přidání 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* nemění.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Thebain.** Kapalínová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,00 g surového opia nakrájeného na tenké plátky se suspenduje v 50 ml *ethanolu 50% (V/V) R* a pomocí ultrazvuku se míchá 1 h; po ochlazení se zředí

*ethanolem 50% (V/V) R* na 100,0 ml a nechá se stát.

K 10,0 ml supernatantní tekutiny se přidá 5 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 9,5*, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a promíchá se. 20,0 ml tohoto roztoku se převede na chromatografickou kolonu asi 150 mm dlouhou s vnitřním průměrem asi 30 mm naplněnou 15 g *křemeliny pro chromatografii R* a nechá se stát 15 min. Promyje se dvakrát 40 ml směsi objemových dílů *propan-2-olu R* a *dichlormethanu R* (15 + 85). Eluát se odpaří do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek po odpaření se převede do odměrné baňky pomocí mobilní fáze a zředí se jí na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 25,0 mg *thebainu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 100,0 ml.

*Předkolona:*

– *rozměry:* délka 4 mm, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R* (5 µm).

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktylsilylovaný R* (5 µm).

*Mobilní fáze.* 1,0 g *natrium-heptansulfonátu monohydrátu R* se rozpustí ve 420 ml *vody R*, pH se upraví roztokem *kyseliny fosforečné (4,9 g/l)* na hodnotu 3,2 (asi 5 ml) a přidá se 180 ml *acetonitrilu R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

*Nástrík.* Vhodný objem injektorovou smyčkou.

*Test způsobilosti, porovnávací roztok:*

– *počet teoretických pater:* nejméně 3000;

– *hmotnostní distribuční poměr:* nejméně 3,0 pro pik *thebainu*.

*Obsah alkaloidu v procentech se vypočítá podle vzorce:*

$$\frac{m_1 \cdot A_2 \cdot 625}{m_2 \cdot A_1 \cdot 5} \cdot \frac{100}{100 - h}$$

v němž značí:

$m_1$  – hmotnost alkaloidu použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost zkoušené látky použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$A_1$  – plochu píku alkaloidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$A_2$  – plochu píku alkaloidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$h$  – ztrátu sušením v procentech.

*Limit:*

– *thebain:* nejvýše 3,0 %, počítáno na vysušenou drogu.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 15,0 %, 1,000 g opia narežaného na tenké plátky se suší 4 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 6,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalínová chromatografie (2.2.29) popsána ve zkoušce Thebain (viz Zkoušky na čistotu), s následujícími úpravami.

*Porovnávací roztok.* 0,100 g *morfin-hydrochloridu R* a 25,0 mg *kodeinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fázi na 100,0 ml.

*Test způsobilosti*, porovnávací roztok:

- *rozišení*: nejméně 2,5 mezi píkem morfinu a píkem kodeinu; je-li třeba, upraví se objem acetonitrilu v mobilní fázi;
- *opakovatelnost*: relativní směrodatná odchylka je nejvýše 1,0 % pro plochu píku morfinu po šesti nástřicích.

Vypočítá se obsah morfinu a kodeinu v procentech podle vzorce uvedeného ve zkoušce Thebain, s tím, že 1 mg *morfin-hydrochloridu R* odpovídá 0,759 mg morfinu a 1 mg *kodeinu R* odpovídá 0,943 mg kodeinu.

## ORIGANI HERBA

7.0:1880

### Dobromyslová nat'

#### DEFINICE

Jsou to od stonků oddělené usušené listy a květy druhu *Origanum onites* L. nebo *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (LINK) IETSW., nebo směsi obou druhů.

#### Obsah:

- *silice*: nejméně 25 ml/kg, počítáno na bezvodou drogu;
- *karvakrol a thymol* (oba  $C_{10}H_{14}O$ ;  $M_r$  150,2) (součet obsahů): nejméně 60 % v silici.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

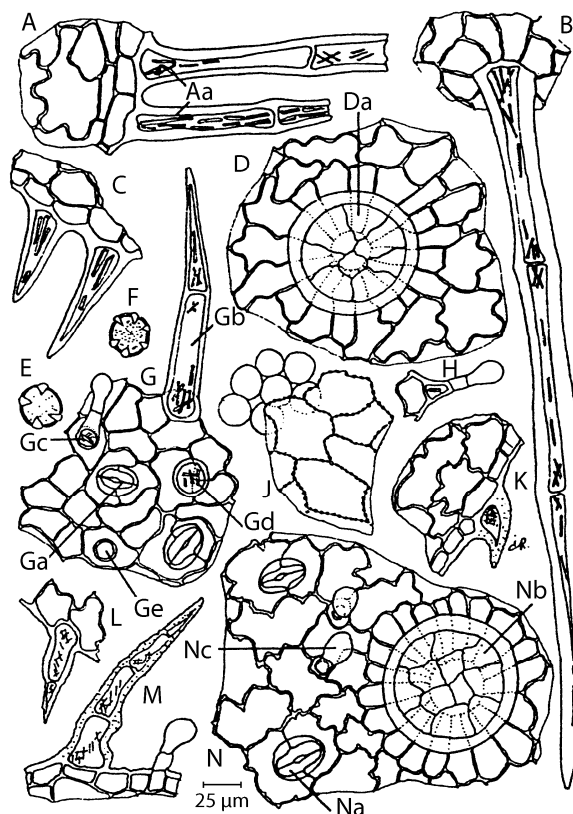
**A.** *Origanum onites*. List je žlutozelený, obvykle 4 mm až 22 mm dlouhý a 3 mm až 14 mm široký. Má dlouhý nebo krátký řapík nebo je přisedlý. Čepel je vejčitá, oválná nebo vejčitě kopinatá, celokrajná nebo na okraji pilovitá, na horním konci zašpičatělá nebo tupá. Žilky jsou nažloutlé, na svrchní straně vyčnílé. Květy jsou jednotlivé nebo jsou to úločky chocholičnatého květenství. Kalich je podobný listenu, nenápadný. Koruna je na vrcholku květenství nebo jednotlivých květů bílá nebo je nenápadná. Listeny jsou střežovitě uspořádány a jsou zelené stejně jako listy. Droga obsahuje nažloutlé nebo žlutohnědé části stonků.

*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. List je zelený, obvykle 3 mm až 28 mm dlouhý a 2,5 mm až 19 mm široký, je řapíkatý nebo přisedlý. Čepel je vejčitá nebo vejčitě oválná, celokrajná nebo na okraji pilovitá, na horním konci zašpičatělá nebo tupá. Květy jsou přítomné jen velmi zřídka v podobě úloček chocholičnatého květenství. Listeny jsou zelenožluté, střežovitě uspořádané. Kalich je podobný koruně, nenápadný. Koruna na vrcholku květenství bílá, mírně nápadná nebo nenápadná.

**B.** Droga se upráškuje (710) (2.9.12). Prášek je zelený (*O. vulgare*) nebo žlutozelený (*O. onites*). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): *O. onites*: úločky pokožky listu [A, D, G] z buněk se zprohýbanými stěnami, diacytické průduchy (2.8.3) [Ga], krycí a žláznaté chlupy; jsou zde dva typy žláznatých

chlupů: osmibuněčné až šestnáctibuněčné chlupy typu *Lamiaceae* v plošném pohledu [Da] a velmi běžný typ s jednobuněčnou hlavičkou a jednobuněčnou [Gc], dvoubuněčnou [H] nebo třibuněčnou nohou; krycí chlupy se ztlustlými hladkými stěnami jsou buď mnohobuněčné [B, Gb], často rozlámané [Aa], obsahující hranolovité krystaly kalcium-oxalátu, nebo zřídka jednobuněčné a kuželovité krycí chlupy [C]; na pokožce jsou znatelné jizvy po krycích a žláznatých chlupcích [Gd, Ge]; četná pylová zrna s hladkou exinou [E, F].

*O. vulgare* subsp. *hirtum*: úločky pokožky svrchní strany listu s buňkami se zprohýbanými a ztlustlými stěnami, doprovázené palisádovým parenchymem [J]; úločky pokožky spodní strany listu [N] z buněk s jemnými a nepravidelně ztlustlými stěnami, diacytické průduchy (2.8.3) [Na], krycí a žláznaté chlupy; jsou zde dva typy žláznatých chlupů: dvanáctibuněčné chlupy typu *Lamiaceae* v plošném pohledu [Nb] a zřídka chlupy s jednobuněčnou hlavičkou [Nc] a dvoubuněčnou nebo třibuněčnou nohou; krycí chlupy mají ztlustlé bradavčité stěny obsahující drobné jehličky kalcium-oxalátu, většinou jsou kuželovité mnohobuněčné pilovité [L, M], zřídka jednobuněčné [K]; málo četná pylová zrna s hladkou exinou [E, F].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové dobromyslové nati

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *dichlormethanu R*, protřepává se 3 min a pak se zfiltruje přes asi 2 g *síranu sodného bezvodého R*.

*Porovnávací roztok.* 1 mg thymolu R a 10 µl karvakrolu R se rozpustí v 10 ml dichlormethanu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Dichlormethan R.

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS (použije se 10 ml na desku o délce strany 200 mm) a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině a horní části další skvrny.

Horní okraj desky	
	modropurpurová skvrna
thymol: růžová skvrna	světle zelená skvrna
karvakrol: světle fialová skvrna	růžová skvrna (thymol)
	světle fialová skvrna (karvakrol)
	světle purpurová skvrna
	šedá skvrna
	světle zelená skvrna
	modropurpurová skvrna
	intenzivní hnědá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Voda** (2.2.13). Nejvýše 120 ml/kg; stanoví se se 20,0 g práškované drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice** (2.8.12). 30,0 g drogy se destiluje 2 h v 1000 ml baňce s kulatým dnem se 400 ml vody R jako destilační kapaliny, rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min, bez přídavku xylenu R do dělené trubice.

**Karvakrol a thymol.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Silice ze zkoušky silice se zfiltruje přes malé množství síranu sodného bezvodého R a zředí se heptanem R, kterým byl promyt přístroj na stanovení silic a síran sodný bezvodý, na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,20 g thymolu R a 50 mg karvakrolu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 5,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Dusík pro chromatografii R nebo helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–45	40 → 250
nástřikový prostor		190
detektor		210

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Odpovídá složení porovnávacího roztoku; zaznamenávají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozišení:* nejméně 1,5 mezi píkem thymolu a píkem karvakrolu.

Za použití retenčních časů z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky porovnávacího roztoku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se celkový obsah karvakrolu a thymolu v procentech.

## ORTHOSIPHONIS FOLIUM

6.4:1229

### Trubkovcový list

#### DEFINICE

Jsou to úlomky usušených listů a vrcholků lodyh druhu *Orthosiphon stamineus* BENTH. (*Orthosiphon aristatus* MIQ.; *Orthosiphon spicatus* BAK.).

*Obsah.* Nejméně 0,05 % sinensetinu (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>; M<sub>r</sub> 372,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou křehké, až 7,5 cm dlouhé a až 2,5 cm široké. Řapík je krátký, čepel oválná nebo kopinatá, na konci zašpičatělá, na bázi klínovitá. List je na spodní straně světle šedozelený, na svrchní straně tmavozelený nebo hnědozelený. Žilnatina je zpeřená, s malým množstvím postranních žilek. Pozoruje se pod lupou (10× zvětšující), postranní žilky probíhají rovnoběžně s hlavní žilkou a pak se odklánějí v ostrém úhlu. Okraj listu je nepravidelně hrubě zubatý, někdy vroubkovaný, čepel mírně podvinutá. Řapík je tenký, čtyřhranný, 4 mm až 8 mm dlouhý a stejně jako primární žilnatina většinou fialově zbarvený. Občas jsou patrné shluky modrobílých až fialových dosud nerozvinutých květů.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je tmavozelelný. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými; jednobuněčné nebo dvoubuněčné kuželovité krycí chlupy a spojené jednořadé, tříbuněčné až osmbuněčné chlupy až 450 µm dlouhé se silnými tečkovanými stěnami; chlupy s jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou hlavičkou;

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...



žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a obvykle čtyřbuněčnou hlavičkou; diacytické průduchy (2.8.3) jsou čtenější na spodní straně listu.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** 1 g práškové drogy (710) (2.9.12) se 5 min protřepává s 10 ml *methanolu R* ve vodní lázni při 60 °C a po ochlazení se zfiltruje.

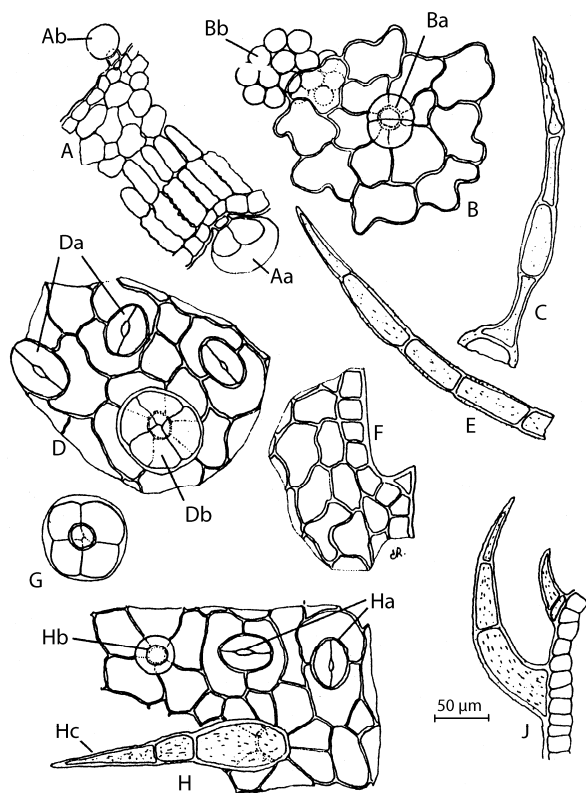
**Porovnávací roztok.** 1 mg *sinensetinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 40 + 55).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.



- A = čepel na příčném řezu se žláznatým chlupem se čtyřbuněčnou hlavičkou (Aa) a hlavičkovým chlupem s jednobuněčnou hlavičkou (Ab)
- B = pokožka spodní strany listu v plošném pohledu s hlavičkovitým chlupem s dvoubuněčnou hlavičkou (Ba) a palisádovým parenchymem (Bb)
- C a E = mnohobuněčné krycí chlupy (obvykle jen ve formě úlomků)
- D = pokožka spodní strany listu, v plošném pohledu, s diacytickým průduchem (Da) a žláznatým chlupem se čtyřbuněčnou hlavičkou (Db)
- F = okraj čepele listu
- G = žláznatý chlup
- H = pokožka spodní strany listu, v plošném pohledu s diacytickým průduchem (Ha), hlavičkovým chlupem (Hb, Hc)

pem s jednobuněčnou hlavičkou (Hb) a mnohobuněčným krycím chlupem (Hc)

J = krycí chlupy na okraji čepele listu

**Obr. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškového trubkovcového listu (viz Zkoušku totožnosti B)

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině chromatogramu a v blízkosti čela mobilní fáze další červeně fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	jedna nebo dvě více či méně intenzivní modře až fialovomodře fluoreskující skvrny
sinensetin: intenzivní světle modře fluoreskující skvrna	hlavní modře fluoreskující skvrna (sinensetin)
	dvě namodrale fluoreskující skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5 % lodyh o průměru více než 1 mm; nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 12,5 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

**Kapalinová chromatografie (2.2.29).**

**Zkoušený roztok.** 2,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se za míchání zahřívá 30 min na vodní lázni se 100 ml *dichlormethanu R* a pak se zfiltruje. Filtrát se odebere a postup se stejným způsobem dvakrát opakuje. Filtráty se spojí a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25,0 ml mobilní fáze, je-li třeba za použití ultrazvuku. Roztok se zfiltruje přes nitrocelulózový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

**Porovnávací roztok.** 5 mg (*m*<sub>2</sub>) *sinensetinu R* se rozpustí v 80 ml mobilní fáze, je-li třeba, za použití ultrazvuku a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *tetrahydrofuranu R*, *kyseliny octové RS*, *vody R* a *methanolu R* (5 + 8 + 42 + 45).

**Průtoková rychlost.** 0,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 258 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

Obsah sinensetinu ( $C_{20}H_{20}O_7$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_2 \cdot F_1 \cdot 25}{m_1 \cdot F_2}$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku odpovídajícího sinensetinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku odpovídajícího sinensetinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost sinensetinu v porovnávacím roztoku v gramech.

## PAPAVERIS RHOEADOS FLOS

7.0:1881

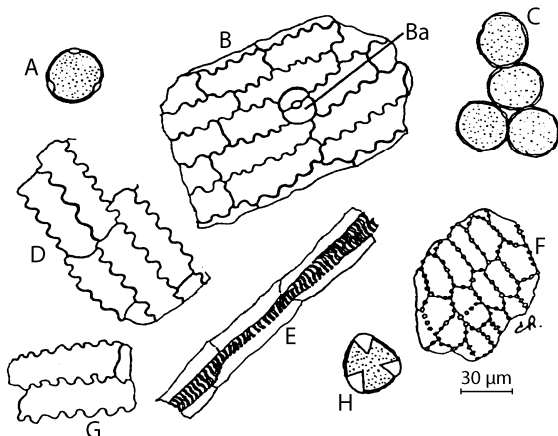
### Květ máku vlcího

#### DEFINICE

Jsou to celé usušené korunní lístky druhu *Papaver rhoeas* L. nebo jejich úlomky.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Korunní lístky jsou tmavě červené nebo tmavě fialovohnědé, velmi tenké, poddajné, na omak sametové, svařstělé, často zmačkané do chomáčku. Jsou široce vejčité, celokrajné, asi 6 cm dlouhé a 4 cm až 6 cm široké, na bázi zúžené; každý korunní lístek má na bázi černou skvrnu. Žilnatina je paprsovitá, žilky anastomozují v uzavřeném oblouku, všechny ve stejné vzdálenosti těsně u okraje lístku.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je intenzivně červenorůžový. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky pokožky z protáhlých buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými [B, D, G], s malými okrouhlými anomocytickými průduchy [Ba]; četné svazky cévní se šroubovitě ztlustlými cévami [E] doprovázenými parenchymem; někdy úlomky vláknité vrstvy prašníků [F]; okrouhlá pylová zrna o průměru asi 30  $\mu$ m, se třemi klíčovými póry a jemně bradavčitou exinou [A, C, H].



Obr. 1 Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného květu máku vlcího

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a míchá se 15 min. Zfiltruje se přes papírový filtr.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *červeně chinaldinové R* a 1 mg *modři sulfanové R* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *butan-1-olu R* (10 + 12 + 40).

**Nanášení.** 10  $\mu$ l, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
červeň chinaldinová: oranžovočervená skvrna	dvě žluté skvrny
modř sulfanová: modrá skvrna	fialová hlavní skvrna fialová skvrna žlutá skvrna
	souvislá skupina fialových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2,0 % tobolek a nejvýše 1,0 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 11,0 %.

**Barevnost.** 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se v 250ml baňce smíchá se 100 ml *ethanolu 30% (V/V) R* a nechá se macerovat 4 h za častého míchání. Pak se zfiltruje a prvních 10 ml filtrátu se odstraní. 10,0 ml filtrátu se ve 100ml odměrné baňce smíchá se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *ethanolem 30% (V/V) R* na 100,0 ml. Nechá se 10 min stát. Absorbance (2.2.25) měřená při 523 nm za použití *ethanolu 30% (V/V) R* jako kontrolní kapaliny je nejméně 0,6.

## PASSIFLORAE EXTRACTUM SICCCUM

6.0:1882

## Mučenkový extrakt suchý

*Synonymum.* Passiflorae herbae extractum sicccum

## DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Passiflorae herba* (1459).

*Obsah.* Nejméně 2 % flavonoidů, vyjádřeno jako vitexin ( $C_{21}H_{20}O_{10}$ ;  $M_r$  432,4), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Extrakt se vyrábí z naťové drogy vhodným postupem; použije se ethanol 40% (V/V) až 90% (V/V), methanol 60% (V/V) nebo aceton 40% (V/V).

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Zelenohnědý amorfni prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,25 g zkoušeného extraktu se smíchá s *methanolem R*, směs se protřepe, zfiltruje a filtrát se zředí *methanolem R* na 5 ml.

*Porovnávací roztok.* 2,0 mg *hyperosidu R* a 2,0 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 5 cm].

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem obsahujícím *difenyloboryloxyethylamin R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se asi 30 min sušit na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
hyperosid: žlutooranžově fluoreskující skvrna	zeleně fluoreskující skvrna žlutě fluoreskující skvrna
rutin: žlutooranžově fluoreskující skvrna	zeleně fluoreskující skvrna
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Ztráta sušením* (2.8.17). Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

## STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok.* 50 mg zkoušeného extraktu se smíchá s *ethanolem 60% (V/V) R*, směs se protřepe, zfiltruje a filtrát se zředí *ethanolem 60% (V/V) R* na 100,0 ml.

*Zkoušený roztok.* 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se převede pomocí 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsí objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml roztoku, který obsahuje 25,0 g/l *kyseliny borité R* a 20,0 g/l *kyseliny šťavelové R* v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

*Kontrolní kapalina.* 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se převede pomocí 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsí objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 401 nm proti kontrolní kapalině.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako vitexin ( $C_{21}H_{20}O_{10}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 0,8}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci roztoku při 401 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech.

Specifická absorbance vitexinu má hodnotu 628.

## PASSIFLORAE HERBA

6.0:1459

## Mučenková nať

## DEFINICE

Je to rozlámaná nebo řezaná usušená nadzemní část druhu *Passiflora incarnata* L., může obsahovat také květy a/nebo plody.

*Obsah.* Nejméně 1,5 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako vitexin ( $C_{21}H_{20}O_{10}$ ;  $M_r$  432,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Zelená nebo zelenošedá nebo nahnědlá lodyha je dřevnatá, dutá, podélně rýhovaná, lysá nebo roztroušeně chlupatá, obvykle o průměru méně než 8 mm. Listy jsou zelené nebo zelenohnědé, střídavé, jemně zubaté a chlupaté, hluboce dělené do tří špičatých laloků, střední la-

lok je největší. Hlavní žilka je na spodní straně listu silně vyniklá. Řapík je chlupatý, se dvěma tmavě zbarvenými nektarii v blízkosti čepele. Četné úponky vyrůstají v paždí listů, jsou jemné, hladké, na průřezu okrouhlé, na konci spirálovitě stočené. Květy (jsou-li v droze přítomné) jsou paprscité, se třemi malými listenci a pěti bílými, protáhlými lístky korunními a s několika řadami nitkovitých petaloidních přívěsků (korunka). Plody (jsou-li v droze přítomné) jsou nazelenalé až nahnědlé, zploštělé, oválné, uvnitř s několika zploštělými hnědožlutými, tečkovanými semeny.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky listu s buňkami se stěnami zprohýbanými a s anomocytickými průduchy (2.8.3); četné drúzy šřavelanu vápenatého jednotlivé nebo uspořádané podél žilnatin; četná vlákna lodyhy jednotlivá nebo ve skupinách provázená tečkovanými cévami a cévicemi; jednobuněčné až třibuněčné, jednořadé, tenkostěnné, přímé nebo lehce zakřivené chlupy, na konci zašpičatělé nebo někdy hákovitě zahnuté. Jsou-li v droze přítomné květy, je patrná papilózní pokožka koruny a korunky a pylová zrna se síťovitou exinou; jsou-li v droze přítomny zralé plody, jsou patrné roztroušené hnědě zbarvené tříslovinné buňky a hnědožluté tečkované úlomky osemení.
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Jiné druhy rodu *Passiflora* (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v poloze odpovídající poloze pod skvrnou rutinou na chromatogramu porovnávacího roztoku intenzivně žlutě fluoreskující skvrna a nad ní zeleně fluoreskující skvrna (diglykosylflavon), pod skvrnou v poloze odpovídající poloze hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku je žlutě fluoreskující skvrna (isoorientin) a nad ní zeleně fluoreskující skvrna (isovitexin). Nad skvrnou v poloze odpovídající poloze hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku je hnědožlutě fluoreskující skvrna (orientin) a nad ní zeleně fluoreskující skvrna (vitexin). Dvě posledně jmenované skvrny mohou chybět. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Jiné druhy rodu *Passiflora*.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min k varu pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 2,0 mg *rutinu R* a 2,0 mg *hyperosidu R* se zahřátím rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin), ve střední třetině žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou intenzivní zelenožlutě nebo oranžovožlutě fluoreskující skvrny mezi skvrnou diglykosylflavonů a skvrnou isoorientinu (*P. coerulea* a *P. edulis*).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 13,0 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Základní roztok.* 0,200 g práškové drogy (250) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá se 40 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a za častého protřepávání se zahřívá 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a směs se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml baňky. Chomáček vaty se zbytkem drogy se převede zpět do baňky s kulatým dnem. Přidá se 40 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a opět se zahřívá 10 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a směs a první filtrát ze 100ml baňky se zfiltrují přes papírový filtr do 100ml odměrné baňky a zředí se na 100 ml stejným rozpouštědlem použitým k promytí baňky s kulatým dnem, odměrné baňky a filtru.

*Zkoušený roztok.* 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100). Přidá se 10 ml roztoku obsahujícího *kyselinu boritou R* (25 g/l) a *kyselinu šřavelovou R* (20 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 5,0 ml základního roztoku se odpaří v druhé baňce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100). Přidá se 10 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 401 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní kapaliny.

Obsah celkových flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako vitexin (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 0,8}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 401 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance vitexinu má hodnotu 628.

## PELARGONII RADIX

6.0:2264

## Pelargoniový kořen

## DEFINICE

Jsou to obvykle úlomky usušených podzemních orgánů druhu *Pelargonium sidoides* DC. a/nebo *Pelargonium reniforme* CURT.

*Obsah.* Nejméně 2,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořen je kryt tmavou, částečně červenohnědou podélně popraskanou kůrou. Na příčném řezu je pod vrstvou korku patrné žluté nebo bílé dřevo se zřetelnými částečně nahnědlými dřevnými paprsky.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: vícevrstvý korek z téměř jednotných, obdélníkovitých buněk; pod nimi je parenchym se sklereidami s velkým lumenem a s četnými drúzami šřavelanu vápenatého. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná jednoduchá škrobová zrna bez vrstvení nebo prasklin.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R*, protřepává se 15 min a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *skopoletinu R* a 2 mg *eskulinu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 14 + 76).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká *hydroxidem draselným v ethanolu RS*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další modře fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
skopoletin: velmi jasně modře fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna slabě modře fluoreskující skvrna (skopoletin)
eskulin: velmi jasně modře fluoreskující skvrna	jedna nebo dvě jasně modře fluoreskující skvrny  modře fluoreskující skvrna slabě modře fluoreskující skvrna
	modře fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,750 g práškované drogy (180) (2.9.12).

## PINI PUMILIONIS ETHEROLEUM

6.0:2377

## Kosodřevinová silice

*Synonymum.* Pini pumilionis aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvého jehličí a větví druhu *Pinus mugo* TURRA destilací s vodní parou. Může být přidána vhodná antioxidační látka.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

- A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *borneolu R* a 10  $\mu$ l *bornyl-acetátu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 2 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další skvrny.

Horní okraj desky	
	růžová skvrna
bornyl-acetát: hnědá nebo šedohnědá skvrna	hnědá nebo šedohnědá skvrna (bornyl-acetát) růžová skvrna
borneol: hnědá nebo šedohnědá skvrna	skupina fialových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Retenční časy piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům piků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,857 až 0,868.

**Index lomu** (2.2.6). 1,474 až 1,480.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-7^\circ$  až  $-15^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0.

**Číslo peroxidové** (2.5.5). Nejvýše 20.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 200 µl se zředí heptanem R na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 30 µl  $\alpha$ -pinenu R, 5 mg kamfenu R, 10 µl  $\beta$ -pinenu R, 20 µl kar-3-enu R, 5 µl  $\beta$ -myrcenu R, 10 µl limonenu R, 5 µl p-cymenu R, 10 µl terpinolenu R,

5 µl bornyl-acetátu R a 5 µl  $\beta$ -karyofylenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 5 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 5 mg kamfenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí heptanem R na 10,0 ml.

**Kolona:**

– **materiál:** tavený křemen;

– **rozměry:** délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;

– **stacionární fáze:** makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

**Nosný plyn.** Helium pro chromatografii R.

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Dělicí poměr.** 1 : 50.

**Teplota:**

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	65
	10–41	65 → 220
	41–50	220
nástříkový prostor		220
detektor		250

**Detekce.** Plamenionizační detektor.

**Nástřík.** 1 µl.

**Eluční pořadí.** Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a); zaznamenají se retenční časy těchto látek.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (a):

– **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi pikem kar-3-enu a pikem  $\beta$ -myrcenu.

**Identifikace složek.** Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Pík  $\beta$ -fellandrenu se eluuje po pikem limonenu s relativní retencí asi 1,03, vztaženo k limonenu.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity se pohybují v následujících rozmezech:

–  $\alpha$ -pinen: 10,0 % až 30,0 %;

– kamfen: nejvýše 2,0 %;

–  $\beta$ -pinen: 3,0 % až 14,0 %;

– kar-3-en: 10,0 % až 20,0 %;

–  $\beta$ -myrcen: 3,0 % až 12,0 %;

– limonen: 8,0 % až 14,0 %;

–  $\beta$ -fellandren: 10,0 až 19,0 %;

– p-cymen: nejvýše 2,5 %;

– terpinolen: nejvýše 8,0 %;

– bornyl-acetát: 0,5 až 5,0 %;

–  $\beta$ -karyofylen: 0,5 % až 5,0 %;

– **limit zanedbatelnosti:** plocha hlavního pikem na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných inertních obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## PINI SYLVESTRIS ETHEROLEUM

6.0:1842

## Borovicová silice

*Synonymum.* Pini sylvestris aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvého jehličí a větévek druhu *Pinus sylvestris* L. destilací s vodní parou. Může být přidána vhodná antioxidační látka.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina charakteristického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se zředí *toluenem R* na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *borneolu R* a 10 µl *bornyl-acetátu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl [nebo 2 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	růžová skvrna (uhlovdíky)
bornyl-acetát: hnědá nebo šedohnědá skvrna	hnědá nebo šedohnědá skvrna (bornyl-acetát) růžová skvrna
borneol: hnědá nebo šedohnědá skvrna	skupina fialových skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům charakteristických píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,855 až 0,875.

**Index lomu** (2.2.6). 1,465 až 1,480.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-9^{\circ}$  až  $-30^{\circ}$ ; měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0.

**Číslo peroxidové** (2.5.5). Nejvýše 20.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok (a).* 30 µl  $\alpha$ -pinenu R, 10 mg *kamfenu R*, 20 µl  $\beta$ -pinenu R, 10 µl *kar-3-enu R*, 10 µl  $\beta$ -myrcenu R, 20 µl *limonenu R*, 10 µl *p-cymenu R*, 10 µl *terpinolenenu R*, 10 µl *bornyl-acetátu R* a 10 µl  $\beta$ -karyofylenu R se rozpustí v 1 ml *heptanu R*.

*Porovnávací roztok (b).* 10 mg *kamfenu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 2 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *heptanem R* na 1 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,22 mm;

– *stacionární fáze:* *makrogol 20 000 R* (tloušťka filmu 0,2 µm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	65
	10–41	65 → 220
	41–50	220
nástříkový prostor		220
detektor		250

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřík.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a); zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem *kar-3-enu* a píkem  $\beta$ -myrcenu.

*Identifikace složek.* Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Pík  $\beta$ -felandrenu se eluuje po píku *limonenu* s relativní retencí asi 1,03 vztaženo k *limonenu*.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity se pohybují v následujících rozmezích:

- $\alpha$ -pinen: 32,0 % až 60,0 %;
- kamfen: 0,5 % až 2,0 %;
- $\beta$ -pinen: 5,0 % až 22,0 %;
- kar-3-en: 6,0 % až 18,0 %;
- $\beta$ -myrcen: 1,5 % až 10,0 %;
- limonen: 7,0 % až 12,0 %;
- $\beta$ -felandren: nejvýše 2,5 %;
- p-cymen: nejvýše 2,0 %;
- terpinolen: nejvýše 4,0 %;
- bornyl-acetát: 1,0 % až 4,0 %;
- $\beta$ -karyofylen: 1,0 % až 6,0 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## PLANTAGINIS FOLIUM

7.3:1884

### Jitrocelový list

*Synonymum.* *Plantaginis lanceolatae folium*

#### DEFINICE

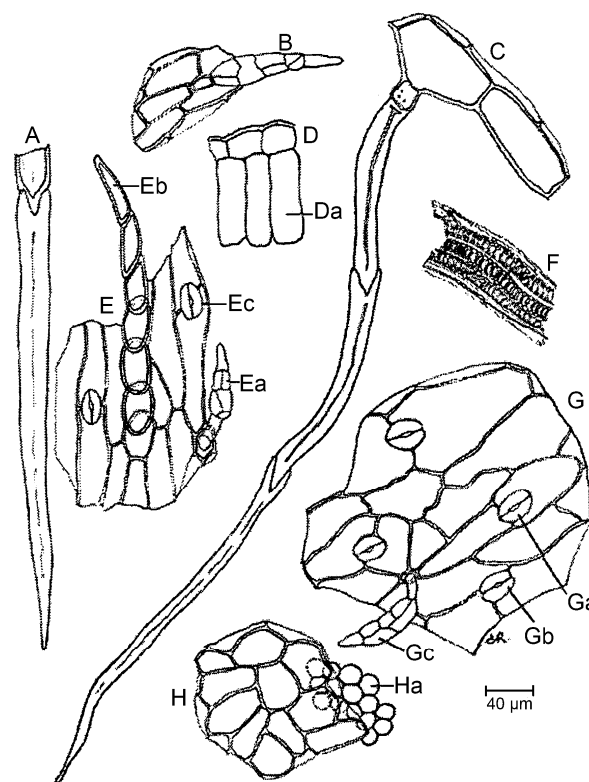
Je to celý usušený list a stvol druhu *Plantago lanceolata* L. *sensu lato*, nebo jejich úločky.

*Obsah.* Nejméně 1,5 % celkových derivátů kyseliny *ortho*-dihydroxyskořicové, vyjádřených jako akteosid ( $C_{29}H_{36}O_{15}$ ;  $M_r$  624,6), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je až 30 cm dlouhý a 4 cm široký, žlutozelený až hnědozelený, na spodní straně s vyniklou, bělavě zelenou téměř souběžnou žilnatinou. Čepel je kopinatá, na bázi zúžená ve žlábkovitý řapík. Okraj listu je nezřetelně zubatý a často zvlněný. Čepel má tři, pět nebo sedm primárních žilek přibližně stejné délky, které probíhají téměř souběžně. Chlupy mohou úplně chybět, řidčeji jsou roztroušené, nebo někdy hojně, zvláště na spodní straně listu a na žilnatině. Stvol je hnědozelený, delší než listy, o průměru 3 mm až 4 mm a je hluboce podélně rýhovaný s 5 až 7 nápadnými žebry. Povrch je obvykle pokryt jemnými chlupy.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úločky pokožky z buněk s nepravidelně zprohýbanými bočními stěnami, úločky svrchní pokožky čepele listu v plošném pohledu [H] a v příčném řezu [D] s palisádovým parenchymem [Da, Ha], úločky spodní pokožky čepele listu v plošném pohledu [G] s průduchy (2.8.3) většinou diacytického typu [Ga], občas anomocytického typu [Gb]; mnohobuněčné jednořadé kuželovité krycí chlupy, celé [C] nebo většinou úločky [A], jsou velmi charakteristické, bazální buňka je zřetelně větší než ostatní buňky pokožky, na ni nase-

dá jedna krátká buňka a dvě nebo více protáhlých buněk s úzkým lumenem, které jsou v nepravidelných intervalech zduřelé tak, že mají kloubovitý vzhled, koncová buňka je dlouhá zašpičatělá s nitkovitým lumenem; žláznaté chlupy mají jednobuněčnou válcovitou nohu a mnohobuněčnou protáhlou kuželovitou hlavičku, tvořenou několika řadami malých buněk a jednou koncovou buňkou [B, Gc]; kompaktní skupiny zdřevnatělých vláknitých cévnatých buněk s úzkými spirálovitě a kruhovitě ztlustlými cévami a s tenkými mírně ztlustlými vlákny [F]; úločky stvolu [E] s buňkami se ztlustlými stěnami a hrubě rýhovanou kutikulou, průduchy [Ec], mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy [Eb] a žláznaté chlupy [Ea] popsané výše.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného jitrocelového listu

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky na čistotu *Digitalis lanatae folium*.  
*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
akteosid: žlutá skvrna	žlutá skvrna (akteosid)
aukubin: modrá skvrna	modrá skvrna (aukubin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné drogy a přípravky...



## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

***Digitalis lanatae folium.*** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Rozpuštěcí směs.** Směs objemových dílů vody R a methanolu R (30 + 70).

**Zkoušený roztok.** Použije se čerstvě připravený roztok. 1 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se v 25ml baňce smíchá s 10 ml rozpuštěcí směsí a protřepává se 30 min, pak se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí dvakrát 5 ml rozpuštěcí směsí. Spojené roztoky (filtrát a promývací tekutiny) se zředí rozpuštěcí směsí na 25 ml.

**Porovnávací roztok.** 1 mg akteosidu R a 1 mg aukubinu R se rozpustí v 1 ml rozpuštěcí směsí.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové RS, vody R a ethylacetátu R (11 + 11 + 27 + 100).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 8 cm; ihned po vyvíjení se zahřívá 5 min až 10 min při asi 120 °C.

**Detekce A.** Pozoruje se v denním světle.

**Detekce B.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není jasně modře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze těsně pod červenohnědě fluoreskující skvrnou odpovídající aukubinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5 % jinak zbarvené drogy a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 14,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 90 ml ethanolu 50% (V/V) R a zahřívá se 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zfiltruje se do 100ml odměrné baňky a baňka i filtr se promyjí 10 ml ethanolu 50% (V/V) R. Filtrát a promývací tekutiny se spojí a zředí se ethanolom 50% (V/V) R na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** Do 10ml odměrné baňky se přidá za míchání po každém přidání 1,0 ml základního roztoku, 2 ml kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS, 2 ml roztoku připraveného rozpuštěním dusitanu sodného R (100 g/l) a molybdenanu sodného R (100 g/l) ve vodě R, a 2 ml hydroxidu sodného zředěného RS a zředí se vodou R na 10,0 ml.

Ihned se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 525 nm za použití kontrolní kapaliny připravené takto: v 10ml odměrné baňce se 1,0 ml základního roztoku smíchá se 2 ml kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS, 2 ml hydroxidu sodného zředěného RS a zředí se vodou R na 10,0 ml.

Obsah celkových derivátů kyseliny *ortho*-dihydroxyskořicové, vyjádřeno jako akteosid (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1000}{185 \cdot m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci zkoušeného roztoku při 525 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance pro akteosid má při 525 nm hodnotu 185.

## PLANTAGINIS OVATAE SEMEN

6.0:1333

## Semeno jitrocele vejčitého

## DEFINICE

Je to usušené zralé semeno druhu *Plantago ovata* FORSSK. (*P. ispaghula* ROXB.).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Semeno člunkovitého tvaru je narůžověle béžové a hladké. Je 1,5 mm až 3,5 mm dlouhé, 1,5 mm až 2 mm široké a 1 mm až 1,5 mm tlusté. Uprostřed vyduté strany je patrná světle zbarvená skvrna odpovídající semeně jizvě (hilum). Světle hnědá skvrna na vypouklé straně odpovídá umístění zárodka a zaujímá asi jednu čtvrtinu délky semene.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem ve zkoumadle s kyselinou mléčnou R. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: zejména úlomky pokožky osemení s mnohohrannými slizovými buňkami; úlomky vnitřních vrstev osemení s nahnědlými tenkostěnnými buňkami často spojenými s vnějšími vrstvami endospermu; úlomky endospermu z buněk se ztlustlými celulosními stěnami, obsahující aleuronová zrna a kapénky oleje; zřídka úlomky zárodka z tenkostěnných buněk. Pozoruje se pod mikroskopem v glycerolu R 50% (V/V). Jsou patrná škrobová zrna, jednoduchá nebo dvoučetná až čtyřčetná o průměru 3 µm až 25 µm.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
**Zkoušený roztok.** K 50 mg práškované drogy (355) (2.9.12) v silnostěnné odstředivkové zkumavce se přidají 2 ml roztoku kyseliny trifluorocetové R (230 g/l) a silně se protřepe. Zkumavka se uzavře a zahřívá se 1 h při 120 °C. Hydrolyzát se odstředí a čirá supernatantní tekutina se převede do 50ml baňky, přidá se 10 ml vody R a roztok se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v 10 ml vody R a opět se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí ve 2 ml methanolu R.  
**Porovnávací roztok (a).** 10 mg arabinosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 10 mg xylosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Porovnávací roztok (c).** 10 mg galaktosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R. **Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (15 + 85).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Detekce.** Vrstva se postříká zkoumadlem aminohippurovým R, zahřívá se 5 min při 120 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
xylosa: oranžovorůžová skvrna	oranžovorůžová skvrna (xylosa)
arabinsosa: oranžovorůžová skvrna	oranžovorůžová skvrna (arabinsosa)
galaktosa: žlutá skvrna	žlutá skvrna (galaktosa)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Stanoví se s 10,0 g drogy.

**Číslo bobtnavosti (2.8.4).** Nejméně 9.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 4,0 %.

## PLANTAGINIS OVATAE TESTA

6.0:1334

### Osemení jitrocele vejčitého

*Synonymum.* Plantaginis ovatae seminis tegumentum

#### DEFINICE

Je to osemení druhu *Plantago ovata* FORSSK. (*P. ispaghula* ROXB.).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Osemení tvoří narůžověle béžové úlomky nebo slupky až asi 2 mm dlouhé a 1 mm široké. Světle hnědá skvrna odpovídá umístění zárodku v semeni před jeho odstraněním.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem ve zkoumadle s kyselinou mléčnou R. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: zejména úlomky vnější vrstvy osemení s mnohohrannými slizovými buňkami; úlomky vnitřních vrstev osemení s nahnědlými tenkostěnnými buňkami často spojenými s vnějšími vrstvami endospermu. Pozoruje se pod mikroskopem v glycerolu R

50% (V/V). Občas jsou patrná škrobová zrna, jednoduchá nebo dvoučetná až čtyřčetná, o průměru 3 µm až 25 µm.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 10 mg práškované drogy (355) (2.9.12) v silnostěnné odstředivkové zkumavce se přidají 2 ml roztoku kyseliny trifluoroctové R (230 g/l) a silně se protřepe. Zkumavka se uzavře a zahřívá se 1 h při 120 °C. Hydrolyzát se odstředí a čirá supernatantní tekutina se převede do 50ml baňky, přidá se 10 ml vody R a roztok se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v 10 ml vody R a opět se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí ve 2 ml methanolu R.

**Porovnávací roztok (a).** 10 mg arabinosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 10 mg xylosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Porovnávací roztok (c).** 10 mg galaktosy R se rozpustí v malém množství vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R. **Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R a acetonitrilu R (15 + 85).

**Nanášení.** 10 µl; do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Detekce.** Vrstva se postříká zkoumadlem aminohippurovým R, zahřívá se 5 min při 120 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě oranžovorůžové skvrny (arabinsosa a xylosa) a žlutá skvrna (galaktosa) odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 2 %; stanoví se s 5,0 g drogy.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 4,0 %.

**Číslo bobtnavosti (2.8.4).** Nejméně 40; stanoví se s 0,1 g práškované drogy (355) (2.9.12).

## POLYGALAE RADIX

6.0:0202

### Vítodový kořen

#### DEFINICE

Jsou to zpravidla úlomky usušeného kořene a kořenových hlav druhu *Polygala senega* L. nebo jiných příbuzných druhů nebo směsi druhů rodu *Polygala*.

## VLASTNOSTI

Droga nasládlého, lehce zažluklého pachu nebo pachu po methyl-salicylátu.

Prášková droga dráždí a nutí k dávení. Po protřepání s vodou silně pění.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořenová hlava je šedohnědá, širší než kořen, nepravidelného tvaru, s četnými zbytky stonků a s přítiskými červenohnědými pupeny. Kořen je hnědý nebo žlutý, zřídka rozvětvený, někdy zahnutý, zpravidla zkroutený, bez postranních kořenů, výjimku tvoří japonské odrůdy a druhy, které mají četné vláknité kořinky. Průměr u kořenové hlavy je obvykle 1 mm až 8 mm, ke konci se postupně zužuje. Povrch je podélně a příčně rýhovaný, často s více nebo méně zřetelně vyvinutým, protáhle šroubovitým kýlem. Lom je krátký; na lomu je patrná nažloutlá kůra různé tloušťky, obklopující v závislosti na druhu matečné rostliny okrouhlé nebo nepravidelné světleji zbarvené dřevo.
- B.** Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Na příčném řezu jsou tyto charakteristické znaky: několikvrstevný korek tvořený tenkostěnnými buňkami; buňky felodermu slabě kolenchymaticky ztlustlé obsahující olejové kapky; lýko a dřevo má zejména v blízkosti kořenové hlavy obvyklé uspořádání; tam, kde je vytvořen kýl, je patrné silně vyvinuté lýko, kromě toho se mohou vyskytnout i další anomálie v důsledku vzniku jednoho nebo dvou kýlovitých paprsků v lýku a dřevu, parenchymatické buňky paprsku obsahují kapky oleje; dřevo, většinou centrální, tvořené cévami o průměru až 60 μm provázenými četnými tenkostěnnými cévicemi a několika malými zdřevnatělými parenchymatickými buňkami.
- C.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: podlouhlé úlomky zdřevnatělého pletiva tvořené tečkovanými cévicemi a poněkud širšími cévami s četnými dvůrky nebo cévami síťovitě ztlustlými; nažloutlý parenchym a kolenchymatické buňky obsahující kapky oleje; někdy úlomky korku a úlomky pokožky s průduchy a jednobuněčnými chlupy pocházejícími ze šupin pupenů. Krystaly šťavelanu vápenatého a sklereidy chybějí.
- D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se vaří 15 min pod zpětným chladičem s 10 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, zfiltruje se a nechá se ochladit.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *escinu R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Horní vrstva směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *butan-1-olu R* (10 + 40 + 50).

*Nanášení.* 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl a 40 μl porovnávacího roztoku, do proužků 20 mm × 3 mm.

*Vývíjení.* Po dráze 12 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce A.* Postříká se *anisaldehydem RS* (na desku o straně 200 mm se použije asi 10 ml) a znovu se zahřívá při 100 °C až 105 °C, dokud se na chromatogramu zkoušeného roztoku neobjeví červené skvrny (saponiny).

*Hodnocení A.* V dolní a střední části chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři až pět červeně zbarvených skvrn odpovídajících polohou šedofialovým skvrnám *escinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Vrstva se postříká asi 10 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu bezvodém R* a zahřívá se při 100 °C až 105 °C, dokud se skvrny saponinů nezbarví modře.

*Hodnocení B.* Intenzita a velikost skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku se pohybuje mezi intenzitou a velikostí dvou proužků *escinu* na chromatogramech při nanesení 10 μl a 40 μl porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 3,0 %.

## SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## POLYGONI AVICULARIS HERBA

6.0:1885

## Nať rdesna ptačího

## DEFINICE

Je to celá nebo řezaná, usušená kvetoucí nať druhu *Polygonum aviculare L. sensu lato*.

*Obsah.* Nejméně 0,30 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha 0,5 mm až 2 mm silná, rozvětvená, článkovitá, válcovitá nebo mírně hranatá, podélně rýhovaná. Listy přisedlé nebo kratičce řapíkaté, lysé, proměnlivého tvaru a velikosti. Člunkovité palisty (ochrea) jsou roztrpěné a stříbřité. Malé úžlabní květy mají pět zelenobílých segmentů okvětí, každý segment je na konci většinou červeně zbarven. Plody jsou 2 mm až 4 mm, hnědé až černé trojhranné nažky, obvykle tečkované nebo proužkované.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky listu z buněk se stěnami mnohohranými nebo zprohýbanými s četnými anisocytickými průduchy (2.8.3) a proužkovanou kutikulou; úlomky listů a lodyh obsahují četné drůzy šťavelanu vápenatého, některé z nich velmi velké; skupiny tlustostěnných vláken pokožky lodyh; kulovitá pylová zrna s hladkou exinou a třemi klíčovými póry; někdy hnědé úlomky exokarpu z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými a ztlustlými. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *hydroxi-*

du draselného R (675 g/l), opatrně se zahřeje; pokožka listů a některé buňky mezofylu se zbarví červeně až červenofialově. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku chloridu železitého R (0,1 g/l); úlomky listů se zbarví téměř černě.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml methanolu R a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni; po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1 mg kyseliny kávové R, 2,5 mg hyperosidu R a 1 mg kyseliny chlorogenové R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové R, vody R a ethyl-acetátu R (7 + 7 + 14 + 72).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Postříká se roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R. Vrstva se suší na vzduchu asi 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí fluoreskujících skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: světle modře fluoreskující skvrna	jedna nebo dvě modře fluoreskující skvrny (kyselina kávová)
hyperosid: žlutohnědě fluoreskující skvrna	jedna nebo dvě žlutozeleně fluoreskující skvrny žlutě fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	žlutohnědě fluoreskující skvrna světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
	žlutohnědě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 2 % kořenů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 10,0 %.

**STANOVENÍ OBSAHU**

**Zásobní roztok.** 0,800 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Kapalína se zfiltruje přes chomáček vaty do baňky. Chomáček vaty se přidá ke zbytku v baňce s kulatým dnem a vaří se dvakrát 10 min pod zpětným chladičem, vždy s 20 ml acetonu R. Po ochlazení se každý extrakt zfiltruje přes chomáček vaty do baňky. Spojené acetonové vrstvy se zfiltrují přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se acetonem R použitým k promytí baňky a filtračního papíru na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody R a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu R. Spojené ethyl-acetátové výtřepky se protřepávají dvakrát 50 ml vody R a zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem R na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se smíchá s 1 ml chloridu hlinitého RS1 a zředí se roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní kapaliny.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku při 425 nm;

m – navážku zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

**PORIA**

**7.5:2475**

**Pórnatka**

**DEFINICE**

Je to usušené sklerocium druhu *Wolfiporia extensa* (PECK) GINNS (synonymum: *Poria cocos* (SCHW.) WOLF, *Wolfiporia cocos* (F. A. WOLF) RYVARDEN et GILB.) zbavené vrchní kůry.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

- A.** Čtvercové, obdélníkové nebo mnohohranné kousky nebo plátky proměnlivé délky a tloušťky; bělavé se světle hnědým odstínem, ploché a hladké, čtvercové, obdélníkové nebo mnohohranné kousky zbavené hnědé kůry, obtížně se lámající (plátky se lámou snadněji), lom je drsný se zrnitou nebo moučnatou texturou.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je bělavý se světle hnědým odstínem. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: bezbarvé částice nepravidelného

Rostlinné drogy a přípravky...

tvaru, někdy větvené, postupně se rozpouštějící v *chloralhydrátu R*. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l). V práškové droze jsou úlomky bezbarvých, úzkých, mírně zakřivených rozvětvených hyf, někdy se septy, o průměru 3 µm až 16 µm.

**C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

**Zkoušený roztok.** K 1 g práškové rostlinné drogy (250) (2.9.12) se přidá 5 ml směsi objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *methanolu R* (2 + 3). Vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně, odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

**Porovnávací roztok.** 10 mg *kyseliny 4-aminobenzoové R*, 10 mg *kumarinu R* a 10 mg *thymolu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2 µm až 10 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *propan-2-olu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 5 µl, do proužků 8 mm.

**Vyvíjení.** Po dráze 6 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zřáhající skvrny v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami *kyseliny 4-aminobenzoové* a *kumarinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Horní okraj desky	
thymol: zhášející skvrna	dvě zhášející skvrny
kumarin: zhášející skvrna	
kyselina 4-aminobenzoová: zhášející skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** Rostlinná droga navlhčená *vodou R* se při tření ve třecí misce lepí na těrku.

**E.** K malému nařezanému kousku drogy se přidá jedna kapka *jodidu draselného s jodem RSI*; vznikne tmavě červené zbarvení.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 0,1 % hnědé kůry a kořenu z jehličnanů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 13,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 1,0 %.

**Látky rozpustné ve vodě.** Nejvýše 1,5 %; k 5,00 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 100 ml vroucí *vody R* a nechá se 10 min stát za občasného protřepání. Nechá se ochladit, zředí se *vodou R* na 100,0 ml a zfiltruje se. 25,0 ml filtrátu se odpaří do sucha na vodní lázni a suší se v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 18,75 mg.

**PRIMULAE RADIX**

**6.0:1364**

**Prvosenný kořen**

**DEFINICE**

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek a kořeny druhu *Primula veris* L. nebo *Primula elatior* (L.) HILL.

**VLASTNOSTI**

Droga hořké chuti.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Hrubě bradavčitý šedohnědý oddenek, přímý nebo slabě zakřivený, asi 1 cm až 5 cm dlouhý a asi 2 mm až 4 mm silný. Hlava oddenku je často pokryta zbytky stonků a listů. Oddenek je porostlý četnými křehkými kořeny, asi 1 mm silnými a obvykle 6 cm až 8 cm dlouhými. Kořeny druhu *Primula elatior* jsou světle hnědé nebo červenohnědé, kořeny druhu *Primula veris* jsou světle žluté nebo nažloutlé. Lom je hladký.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu z kůry kořene; dřev a kůra oddenku z okrouhlých buněk, se ztlustlými, tečkovanými stěnami; nahnědlé úlomky pokožky oddenku s vlasovými kořínky; síťovitě ztlustlé cévy; skupiny žlutozelených výrazně tečkovaných kamenných buněk jsou charakteristické pro druh *Primula elatior*. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R 50% (V/V)*. Jsou patrná jednoduchá nebo složená škrobová zrna různé velikosti a tvaru.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) popsaná ve zkoušce Kořen druhu *Vincetoxicum hirundinaria* s následujícími úpravami.

**Detekce.** Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v blízkosti rozhraní dolní a střední třetiny modrofialová hlavní skvrna (escin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou jedna až dvě intenzivně tmavofialové skvrny v poloze o málo níže než hlavní skvrna escinu na chromatogramu porovnávacího roztoku; na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být viditelné další slabě fialové, nažloutlé nebo hnědozelené skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Kořen druhu *Vincetoxicum hirundinaria*.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g práškové drogy (500) (2.9.12) se přidá 10 ml *ethanolu 70% (V/V) R* a zahřívá se 15 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 10 mg *escinu R* se rozpustí v 1,0 ml *ethanolu 70% (V/V) R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Horní fáze směsi objemových dílů *kyseliny octové R, vody R a butan-1-olu R* (10 + 40 + 50).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 12 cm.

**Sušení.** V sušárně při 100 °C až 105 °C.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku je na rozhraní dolní a střední třetiny skvrna zhášející fluorescenci (*escin*), tato skvrna se označí.

**Detekce B.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení B.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou světle modře nebo nazelenale fluoreskující skvrny níže než hlavní skvrna *escinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

## PRUNI AFRICANAE CORTEX

6.0:1886

## Kůra slivoně africké

## DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kůra kmenů a větví druhu *Prunus africana* (HOOK f.) KALKM. (*Pygeum africanum* HOOK f.).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Nepravidelné zkroucené tvrdé kousky tmavě hnědé až červenohnědé kůry. Svrchní strana kůry je kryta rozpraskaným tmavě červenohnědým korkem s ulpívajícími lišejníky. Vnitřní strana kůry je červenohnědá až tmavě hnědá, podélně rýhovaná. Mohou být přítomny zkroucené úlomky na lomu vláknité.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: sklereidy se ztlustlými stěnami jednotlivě nebo ve skupinách; drůzy šřavelanu vápenatého různé velikosti; četná zdřevnatělá vlákna se ztlustlými stěnami a úzkým lumenem, na konci vidlicovitě rozvětvená, některá jednotlivě, většinou však ve skupinách; úlomky červenohnědě zbarvených mnohohranných buněk; úlomky kůry. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R*

50% (V/V); jsou patrná jednotlivá malá škrobová zrna, která se *jodem RS1* barví modročerně.

## C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 15,0 g práškové drogy (250) (2.9.12) se 30 min extrahuje *dichlormethanem R* v kontinuálním extrakčním přístroji (Soxhletův). Zfiltruje se, filtrát se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml *dichlormethanu R*.

**Porovnávací roztok.** 20 mg *β-sitosterolu R* a 20 mg *kyseliny ursolové R* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90).

**Nanášení.** 10 µl, do 1cm proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R*, zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a nechá se ochladit; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
	fialová skvrna několik málo intenzivních fialových, modrých nebo šedých skvrn
β-sitosterol: fialová skvrna kyselina ursolová: modrá skvrna	fialová skvrna (β-sitosterol) modrá skvrna (kyselina ursolová) několik málo intenzivních fialových, modrých nebo šedých skvrn
	fialová skvrna (β-sitosterolglukosid)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné drogy a přípravky...

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3,0 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Extrahovatelné látky.** Nejméně 0,5 %; 20,0 g práškové drogy (250) (2.9.12) se 4 h extrahuje *dichlormethanem R* v kontinuálním extrakčním přístroji (Soxhletův). Roztok se odpaří za použití vakua na vodní lázni do sucha. Zbytek se suší 2 h v sušárně při 80 °C. Zbytek po vysušení váží nejméně 0,10 g.

## PUERARIAE LOBATAE RADIX

7.3:2434

## Kořen puerarie laločnaté

## DEFINICE

Jsou to úlomky usušeného kořene druhu *Pueraria lobata* (WILLD.) OHWI.

*Obsah.* Nejméně 6,5 % celkových isoflavonoidů, vyjádřeno jako puerarin ( $C_{21}H_{20}O_9$ ;  $M_r$  416,4), počítáno na vysušenou drogu; z toho obsah puerarinu je nejméně 45 %.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Malé čtvercové kousky nebo silné obdélníkové plátky 5 cm až 35 cm dlouhé a 0,5 cm až 1 cm silné. Svrchní kůra je světle hnědá, hrubá, s podélnými rýhami. Řez je žlutobílý nevýrazně paprskovitý. Textura je silně vláknitá.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: skupiny zdřevnatělých vláken se ztlustlými stěnami, obklopené hranolovitými krystaly kalcium-oxalátu; buňky s obsahem krystalů kalcium-oxalátu se ztlustlými stěnami; zřídka zaoblené nebo oválné sklereidy o průměru asi 50  $\mu$ m; poměrně široké dvůrkovitě ztlustlé cévy, hustě poseté šestihrannými nebo oválnými tečkami. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). V práškové droze jsou četná kulovitá, polokulovitá nebo mnohohranná, jednotlivá nebo složená (dvojčetná až dvacetičetná) škrobová zrna o průměru asi 15  $\mu$ m, se špičatým, rýhovitým nebo hvězdicovitým hilem.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R*, vloží se do ultrazvukové lázně a pak se odstředí; použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 5 mg puerarinu *R* a 5 mg daidzinu *R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu *F<sub>254</sub>* pro TLC *R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *dichloromethanu R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 20 + 22 + 40); použije se dolní vrstva.

*Nanášení.* 7  $\mu$ l, do proužků 8 mm.

*Vývíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	slabá zhášeující skvrna
	zhášeující skvrna
daidzin: zhášeující skvrna	zhášeující skvrna
puerarin: zhášeující skvrna	zhášeující skvrna
	nejméně pět zhášeujících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* K 0,100 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) ve 250ml kuželové baňce se přidá 50,0 ml *ethanolu 30% (V/V) R* a zváží se. 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a znovu se zváží. Hmotnost se upraví *ethanolem 30% (V/V) R* na počáteční hodnotu, dobře se promíchá a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* K množství extraktu z kořene puerarie suchého HRL odpovídajícímu 3,0 mg puerarinu ve 250ml kuželové baňce se přidá 50,0 ml *ethanolu 30% (V/V) R* a zváží se. 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a znovu se zváží. Hmotnost se upraví *ethanolem 30% (V/V) R* na počáteční hodnotu, dobře se promíchá a zfiltruje se.

*Kolona (dvě kolony zapojené do série):*

– *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný monolitický *R*.

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (0,1 + 99,9);

– *mobilní fáze B:* *acetonitril R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–16,5	90 → 71	10 → 29

*Průtoková rychlost.* 3,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 260 nm.

*Nástřik.* 10  $\mu$ l.

*Identifikace piků.* K identifikaci piků isoflavonoidů (3-hydroxyruerarin, ruerarin, 3-methoxyruerarin, 6-O''-D-xylosylruerarin a daidzin) se použije chromatogram dodávaný s extraktem z kořene puerarie suchým HRL a chromatogram porovnávacího roztoku.

*Relativní retence* vztažená k puerarinu (retenční čas asi 3,4 min). 3-hydroxypuerarin asi 0,7; 3-methoxypuerarin asi 1,09; 6-*O''*-D-xylosylpuerarin asi 1,15; daidzin asi 1,4.

*Test způsobilosti*, porovnávací roztok:

– *poměr výšky píku k sedlu*: nejméně 10, kde  $H_p$  je výška píku 3-methoxypuerarinu nad základní linií a  $H_v$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku puerarinu nad základní linií.

Obsah puerarinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *extraktu z kořene puerarie suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah puerarinu v *extraktu z kořene puerarie suchém HRL* v procentech.

Obsah celkových isoflavonoidů (3-hydroxypuerarin, puerarin, 3-methoxypuerarin, 6-*O''*-D-xylosylpuerarin a daidzin) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – součet ploch píků isoflavonoidů (3-hydroxypuerarin, puerarin, 3-methoxypuerarin, 6-*O''*-D-xylosylpuerarin, daidzin) na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *extraktu z kořene puerarie suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah puerarinu v *extraktu z kořene puerarie suchém HRL* v procentech.

## PUERARIAE THOMSONII RADIX

7.3:2483

Kořen puerarie thomsonovy

### DEFINICE

Je to celý usušený kořen druhu *Pueraria thomsonii* BENTH., zbavený vnější kůry, nebo jeho úlomky.

*Obsah*. Nejméně 0,4 % celkových isoflavonoidů, vyjádřeno jako puerarin ( $C_{21}H_{20}O_9$ ;  $M_r$  416,4), počítáno na vysušenou drogu; z toho obsah puerarinu je nejméně 55 %.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kořen je válcovitý, téměř vřetenovitý nebo téměř válcovitý, 12 cm až 15 cm dlouhý, o průměru 4 cm až 8 cm, někdy v podobě podélně nebo šikmo řezaných silných plátků různých rozměrů. Povrch je žlutobílý nebo světle hnědý. Kořen je těžký, textura tvrdá a škrabnatá. V příčném řezu jsou patrné světle hnědé soustředné kruhy tvořené vlákny, v podélném řezu je několik podélných rýh tvořených vlákny.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: skupiny zdřevnatělých vláken se ztlustlými stěnami, obklopené hranolovitými krystaly kalcium-oxalátu; buňky s obsahem krystalů kalcium-oxalátu se ztlustlými stěnami; zřídka zaoblené nebo elipsovité sklereidy o průměru asi 50  $\mu$ m; poměrně široké dvůrkovitě ztlustlé cévy, hustě poseté šestihrannými nebo oválnými tečkami. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R 50% (V/V)*. V práškové droze jsou četná kulovitá, polokulovitá nebo mnohohranná, jednotlivá nebo složená (dvojčetná až dvacetičetná) škrobová zrna o průměru asi 15  $\mu$ m, se špičatým štěrbínovitým nebo hvězdicovitým hilem.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. K 0,5 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R*, vloží se do ultrazvukové lázně a pak se odstředí; použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok*. 5 mg *daidzinu R* a 5 mg *puerarinu R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m).

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *vody R*, *dichloromethanu R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 20 + 22 + 40); použije se dolní vrstva.

*Nanášení*. 7  $\mu$ l, do proužků 8 mm.

*Vývíjení*. Po dráze 6 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	slabá zhášeující skvrna
daidzin: zhášeující skvrna	slabá zhášeující skvrna
puerarin: zhášeující skvrna	slabá zhášeující skvrna
	několik zhášeujících skvrn
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.



**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** K 1,00 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) ve 250ml kuželové baňce se přidá 50,0 ml *ethanolu* 30% (V/V) R a zváží se. 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a znovu se zváží. Hmotnost se upraví *ethanolem* 30% (V/V) R na počáteční hodnotu, dobře se promíchá a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** K množství extraktu z kořene *puerarie suchého HRL* odpovídajícímu 3,0 mg puerarinu se ve 250ml kuželové baňce přidá 50,0 ml *ethanolu* 30% (V/V) R a zváží se. 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a znovu se zváží. Hmotnost se upraví *ethanolem* 30% (V/V) R na počáteční hodnotu, dobře se promíchá a zfiltruje se.

**Kolona** (dvě kolony zapojené do série):

- rozměry: délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný monolitický R.

**Mobilní fáze:**

- mobilní fáze A: směs objemových dílů *kyseliny octové ledové* R a *vody* R (0,1 + 99,9);
- mobilní fáze B: *acetonitril* R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–16,5	90 → 71	10 → 29

**Průtoková rychlost.** 3,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 260 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Identifikace píků.** K identifikaci píků isoflavonoidů (puerarin, 3-methoxypuerarin, 6-O''-D-xylosylpuerarin a daidzin) se použije chromatogram dodávaný s *extraktem z kořene puerarie suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

**Relativní retence** vztahená k puerarinu (retenční čas asi 3,4 min). 6-O''-D-xylosylpuerarin asi 1,15; daidzin asi 1,4.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- poměr výšky píku *k* sedlu: nejméně 10, kde  $H_p$  je výška píku 3-methoxypuerarinu nad základní linií a  $H_v$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku puerarinu nad základní linií.

Obsah puerarinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost extraktu z kořene *puerarie suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah puerarinu v extraktu z kořene *puerarie suchém HRL* v procentech.

Obsah celkových isoflavonoidů (puerarin, 6-O''-D-xylosylpuerarin, daidzin) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – součet ploch píků isoflavonoidů (puerarin, 6-O''-D-xylosylpuerarin, daidzin) na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku puerarinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost extraktu z kořene *puerarie suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah puerarinu v extraktu z kořene *puerarie suchém HRL* v procentech.

## PSYLLII SEMEN

6.0:0858

### Chmelíkové semeno

#### DEFINICE

Je to zralé celé usušené semeno druhu *Psyllium afra* (L.) MIRBEL (*Plantago afra* L., *P. psyllium* L.) nebo druhu *Psyllium arenaria* (W. et K.) MIRBEL (*Plantago indica* L., *P. arenaria* (W. et K.) MIRBEL).

#### VLASTNOSTI

Droga sladké chuti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Semena druhu *P. afra* jsou světle hnědá až tmavě hnědá, ne však černá, hladká, lesklá, podlouhle oválná, 2 mm až 3 mm dlouhá a 0,8 mm až 1,0 mm široká, na jednom konci širší. Uprostřed dorzální strany je patrná světleji zbarvená skvrna. Na ventrální straně je podélná, světleji zbarvená jizva, lemovaná vystouplými okraji, uprostřed se zřetelně patrným hilem.

Semena druhu *Plantago indica* jsou téměř totožná se semeny druhu *Plantago afra*, jsou však méně lesklá, 2 mm až 3 mm dlouhá a nejvýše 1,5 mm široká.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 10.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1,0 %, stanoví se s 10,0 g drogy včetně nazelenalých nezralých semen. Droga neobsahuje semena, která mají ve střední části jizvy tmavou

skvrnu (*Plantago lanceolata* L. a *Plantago major* L.) nebo semena s hnědavě šedým nebo narůžovělým osemením (*Plantago ovata* FORSSK. a *Plantago sempervirens* CRANTZ).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 14,0 %; 1,000 g drogy se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 4,0 %.

SKLADOVÁNÍ

Chráněno před vlhkostí.

## QUERCUS CORTEX

6.0:1887

### Dubová kůra

DEFINICE

Je to řezaná usušená kůra čerstvých mladých větví druhů *Quercus robur* L., *Q. petraea* (MATT.) LIEBL. a *Q. pubescens* WILLD.

**Obsah.** Nejméně 3,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol (benzen-1,2,3-triol; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 126,11), počítáno na vysušenou drogu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Žlábkovitě až rourkovitě svinuté kousky, nejvýše 3 mm silné. Kůra je na svrchní straně světle šedá nebo nazele nale šedá, hladká, někdy s lenticelami; na vnitřní straně světle hnědá nebo červenohnědá, mírně podélně ryhovaná, s rýhami 0,5 mm až 1 mm širokými. Lom je tříštinový, hrubě vláknitý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle hnědý až červenohnědý, vláknitý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: svazky ztlustlých vláken provázených mírně ztlustlými komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky korku z buněk plochých, tenkostěnných buněk s nahnědlým nebo načervenalým obsahem; četné sklereidy jednotlivé nebo ve skupinách, některé velké se ztlustlými vrstevnatými stěnami a dvojtečkami, jiné menší s tenčími stěnami s jednoduchými tečkami, často vyplněné neprůhlednou hnědou hmotou; úlomky parenchymu s drúzami šťavelanu vápenatého; občas úlomky tenkostěnných sítkovic, některé s patrnými sítky na šikmém konci buněk.
- C.** 1 g práškované drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *ethanolu 30% (V/V) R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. 1 ml tohoto roztoku se smíchá se 2 ml roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R*; vzniká červené zbarvení.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,700 g práškované drogy (710) (2.9.12).

## RATANHIAE RADIX

6.0:0289

### Ratanhový kořen

DEFINICE

Jsou to usušené, většinou rozlámání kořeny druhu *Krameria triandra* RUIZ et PAVON. Droga je známá jako Peru-ratanhia.

**Obsah.** Nejméně 5,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol (benzen-1,2,3-triol; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 126,1), počítáno na vysušenou drogu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Hlavní kořen je tmavě červenohnědý, má silnou uzlovitou hlavu. Sekundární kořeny mají stejnou barvu a jsou téměř rovné nebo jen mírně zkroucené. Kůra starších kořenů je šupinovitě rozpukaná, u mladších kořenů je hladká s ostrými příčnými prasklinami, snadno se odděluje od dřeva. Lom v kůře je vláknitý, ve dřevu tříštinový. Na hladkém příčném řezu je patrná tmavě hnědočervená kůra, která sahá asi do jedné třetiny průměru kořene, a husté světle červenohnědé jemně pórovité dřevo s četnými, jemnými dřeňovými paprsky. Centrální jádrové dřevo je často tmavší.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: korkové buňky obsahují tmavě hnědé flobafeny; úlomky nezdřevnatělých lýkových vláken o průměru obvykle 12 μm až 30 μm s mírně ztlustlými stěnami; parenchymatické buňky lýka uspořádané v řadách obsahují hranolky a mikrokrystaly šťavelanu vápenatého; úlomky cév obvykle o průměru 20 μm až 60 μm s dvůrkovitými ztenčeními; úlomky cévic o průměru až 20 μm, se štěrbinovitými ztenčeními. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*; jsou patrná okrouhlá, jednotlivá nebo dvoučetná až čtyřčetná škrobová zrna; jednotlivá škrobová zrna mají až 30 μm v průměru, některá škrobová zrna se nacházejí v buňkách dřeňových paprsků a v parenchymu.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml směsí objemových dílů *vody R* a *ethanolu 96% R* (3 + 7), třepě se 10 min a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 10 ml *petroletheru R* a protřepe se. Petroletherová vrstva se oddělí, přidají se 2 g *síranu sodného bezvodého R*, protřepe se a zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.  
*Porovnávací roztok.* 5,0 mg *červeně sudanové G R* se rozpustí v 10 ml v *methanolu R*.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (2 + 98).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *modři pravé B R* (5 g/l). Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *hydroxidu sodného 0,1 mol/l v ethanolu RS* a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině červená skvrna červeně sudanové G. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je fialová skvrna ratanhia fenolu I v poloze odpovídající poloze skvrně červeně sudanové G na chromatogramu porovnávacího roztoku, pod ní je nahnědlá skvrna ratanhia fenolu II a pod ní modrošedá skvrna ratanhia fenolu III. Mohou být přítomné další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2 % cizích příměsí a nejvýše 5 % úlomků kořenových hlav nebo kořenů, jejichž průměr je větší než 25 mm. Kořeny zbavené kůry mohou být přítomné ve velmi malém množství.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,5 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); stanoví se s 0,750 g práškované drogy (180) (2.9.12).

## RATANHIAE TINCTURA

6.0:1888

### Ratanhová tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Ratanhiae radix* (0289). Obsahuje nejméně 1,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol (benzen-1,2,3-triol; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 126,1).

#### VÝROBA

Připravuje se vhodným postupem z 1 dílu drogy a 5 dílů ethanolu 70% (V/V).

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Červenohnědá kapalina.

Zkouška totožnosti

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 5 ml se přidá 10 ml *petroletheru R* a protřepe se. Petroletherová vrstva se oddělí, přidají se 2 g *síranu sodného bezvodého R*, protřepe se a zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *dichlormethanu R*.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *thymolu R* a 10 mg *natrium-dichlorfenolindofenolátu R* se rozpustí v 10 ml *ethanolu 60% (V/V)*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* *Dichlormethan R*.

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Deska se postříká roztokem *modři pravé B R* (5 g/l), nechá se vysušit na vzduchu a postříká se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l v ethanolu RS*. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
thymol: oranžově hnědo- žlutá skvrna	fialová skvrna
dichlorfenolindofenol: šedomodrá skvrna	zelenošedá skvrna modrošedá skvrna žlutohnědá skvrna fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 63 % (V/V) až 67 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); stanoví se s 2,500 g zkoušené tinktury.

## RHAMNI PURSHIANAE CORTEX

7.1:0105

### Kůra řešetláku Purshova

#### DEFINICE

Je to usušená kůra druhu *Rhamnus purshiana* DC. (*Frangula purshiana* (DC.) A. GRAY) nebo její úlomky.

*Obsah.* Nejméně 8,0 % hydroxyanthracenových glykosidů, z toho nejméně 60 % kaskarosidů, obojí vyjádřeno jako kaskarosid A (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>; M<sub>r</sub> 580,5), počítáno na vysušenou drogu.

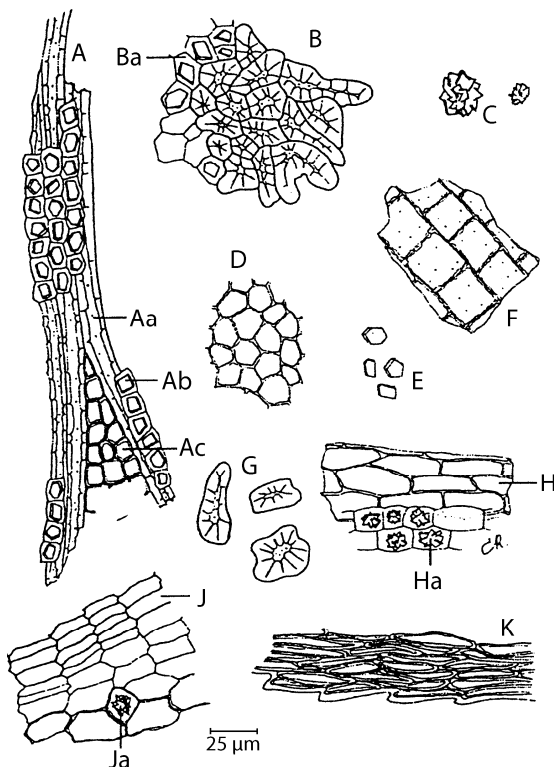
#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Jsou to mírně žlábkovité nebo téměř ploché úlomky, obvykle 1 mm až 5 mm silné, velmi proměnlivé délky a šířky. Zevní strana je šedá nebo tmavě šedohnědá, někdy s roztroušenými, příčně orientovanými lenticelami. Obvykle je pokryta více nebo méně souvislou bělavou vrstvou lišejníků, epifytických mechů a lupenitých játrůvek. Vnitřní strana je žlutá nebo červenohnědá nebo téměř černá s jemným podélným rýhováním. Alkalickými roztoky se barví červeně. Lom krátký, žlutý, v zevní části zrnitý, ve vnitřní části mírně vláknitý.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz

obrázek 1): svazky [A] částečně zdřevnatělých lýkových vláken [Aa] provázených komůrkovými vlákny s krystaly kalcium-oxalátu [Ab], občas i dřevové paprsky [Ac]; izolované sklereidy [G] nebo skupiny sklereid [B] provázených vrstvami krystalů [Ba]; izolované drúzy [C] nebo hranolovité krystaly [E] kalcium-oxalátu; parenchymatické buňky [F, H] vyplněné žlutou hmotou barvící se alkalickými roztoky tmavočerveně, občas s buňkami obsahujícími drúzy kalcium-oxalátu [Ha]; buňky korku, z plošného pohledu [D] nebo v příčném řezu [J]; s parenchymem, některé buňky obsahují drúzy kalcium-oxalátu [Ja]; často epifysy [K], mohou to být celé játrovky nebo jejich úlomky, s čepelí tvořenou jednou vrstvou izodiametrických buněk, bez střední žilky nebo listy mechů s čepelí tvořenou jednou vrstvou protáhlých buněk a se střední vícebuněčnou žilkou.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky A, Jiné druhy rodu *Rhamnus*; anthrony (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik červenohnědých skvrn s rozdílnou intenzitou zbarvení. Čtyři skvrny jsou slabě zbarvené, tři z nich jsou ve střední části chromatogramu a jedna v dolní třetině, v horní třetině chromatogramu je intenzivně zbarvená skvrna. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn (kaskarosidy) se stejnou fluorescencí v poloze odpovídající poloze nad a zejména pod skvrnou aloinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové kůry řešetláku Purshova

D. 0,2 g práškové drogy (180) (2.9.12) se 15 min zahřívá s 50 ml vody R na vodní lázni. Nechá se ochladit a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 20 ml kyseliny chlorovodíkové RS a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Nechá

se ochladit, převede se do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 20 ml etheru R. Vodná vrstva se uchová (roztok A). Tři etherové vrstvy se spojí a protřepávají se 10 ml amoniaku zředěného RS2; vodná vrstva se zbarví červenofialově. Roztok A se v malé baňce smíchá s 5 g chloridu železitého R a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Nechá se ochladit, převede se do dělicí nálevky a protřepe se 15 ml etheru R. Etherová vrstva se promyje 10 ml vody R, vodná vrstva se odstraní a etherová vrstva se protřepe 5 ml amoniaku zředěného RS2; vodná vrstva se zbarví červeně.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Jiné druhy rodu *Rhamnus*; anthrony.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 0,5 g práškové drogy (180) (2.9.12) se přidá 5 ml ethanolu 70% (V/V) R a zahřeje se k varu. Po ochlazení se odstředí. Supernatantní tekutina se ihned slijí a použije se do 30 min.

**Porovnávací roztok.** 20 mg aloinu R se rozpustí v ethanolu 70% (V/V) R a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (dvě desky).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů vody R, methanolu R a ethyl-acetátu R (13 + 17 + 100).

A. **Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu 5 min.

**Detekce.** Postříká se asi 10 ml roztoku hydroxidu draselného R (50 g/l) v ethanolu 50% (V/V) R a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se ihned po zahřívání.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části červenohnědá skvrna aloinu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna aloinu fluoreskuje intenzivně žlutohnědě. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná oranžovohnědě fluoreskující skvrna mezi skvrnou aloinu a skvrnami kaskarosidů.

B. **Nanášení.** 10 µl zkoušeného roztoku, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu nejvýše 5 min.

**Detekce.** Ihned se postříká roztokem modři nitrotetrazaoliové R (5 g/l) v methanolu R a chromatogram se ihned hodnotí.

**Hodnocení.** Na chromatogramu nejsou žádné fialové nebo šedomodré skvrny.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (180) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

STANOVENÍ OBSAHU

**Zkouška se provede do 24 h, za chránění před přímým světlem.**

1,00 g práškové drogy (180) (2.9.12) se převede do 100 ml vroucí vody R a za stálého míchání se 5 min vaří.

Nechá se ochladit, zředí se *vodou R* na 100,0 ml, protřepe se, zfiltruje a prvních 20 ml filtrátu se odstraní. 10,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a protřepává se dvakrát 20 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3). Spojené organické vrstvy se promyjí 5 ml *vody R*, organická vrstva se odstraní a promývací tekutina se přidá k vodné vrstvě. Spojené vodné vrstvy se protřepou čtyřikrát 30 ml *ethyl-acetátu R* čerstvě nasyceného *vodou R* (ke 150 ml *ethyl-acetátu R* se přidá 15 ml *vody R*, 3 min se třepe a nechá se stát). Pokaždé se oddělí čiré organické vrstvy. Ethyl-acetátové vrstvy se spojí. Vodná vrstva se použije pro stanovení obsahu kaskarosidů, organická vrstva se použije pro stanovení obsahu hydroxyanthracenových glykosidů jiných než kaskarosidy.

#### Hydroxyanthracenové glykosidy jiné než kaskarosidy.

Organická vrstva se převede do vhodné varné baňky a rozpouštědlo se oddestiluje téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,3 ml až 0,5 ml *methanolu R* a převede se do odměrné baňky. Varná baňka se promyje horkou *vodou R* a promývací tekutina se spojí s methanolickým roztokem. Nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se ve 100ml baňce s kulatým dnem a se zabroušenou zátkou smíchá se 2 g *chloridu železitého R* a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Zahřívá se 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Nechá se ochladit, roztok se převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 3 ml až 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 3 ml až 4 ml *vody R*; promývací tekutiny se spojí s roztokem v dělicí nálevce. Obsah dělicí nálevky se protřepe třikrát 30 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3). Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 10 ml *vody R*, vodná vrstva se odstraní. Organická vrstva se zředí směsí objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3) na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se odpaří opatrně na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R* a změří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku při 440 nm a při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Zkoušku nelze hodnotit, jestliže poměr absorbance při 515 nm k absorbanci při 440 nm je menší než 2,4.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů jiných než kaskarosidy v procentech, vyjádřeno jako kaskarosid A, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 6,95}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 180.

**Kaskarosidy.** Vodná vrstva uchovaná pro tuto zkoušku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se zpracuje postupem výše uvedeným v odstavci Hydroxyanthracenové glykosidy jiné než kaskarosidy. Změří se absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 440 nm a při 515 nm. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže poměr absorbance při 515 nm k absorbanci při 440 nm je menší než 2,7.

Vypočítá se obsah kaskarosidů v procentech, vyjádřeno jako kaskarosid A, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 6,95}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 180.

## RHAMNI PURSHIANAE EXTRACTUM SICCCUM NORMATUM

6.0:1844

### Extrakt z řešetláku Purshova suchý standardizovaný

#### DEFINICE

Je to suchý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Rhamni purshianae cortex (0105)*.

**Obsah.** 90 % až 110 % jmenovitého obsahu hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako kaskarosid A ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ ;  $M_r$  580,5), uvedeného v označení na obalu; nejméně 60 % hydroxyanthracenových glykosidů jsou kaskarosidy, vyjádřeno jako kaskarosid A. Jmenovitý obsah hydroxyanthracenových glykosidů je v rozmezí 8,0 % až 25,0 %, počítáno na vysušený extrakt.

#### VÝROBA

Připravuje se z rostlinné drogy vhodným postupem za použití buď vroucí vody, nebo roztoku s minimálním obsahem ethanolu 60 % (V/V).

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědý sypký prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,2 g extraktu se smíchá s 5 ml *ethanolu 70% (V/V) R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se odstředí. Supernatantní tekutina se ihned slijí a použije se do 30 min.

*Porovnávací roztok.* 20 mg *aloinu R* a 2 mg *emodinu R* se rozpustí v *ethanolu 70% (V/V) R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (13 + 17 + 100).

*Nanášení.* 10 μl [nebo 2 μl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu 5 min.

*Detekce.* Postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *ethanolu 50% (V/V) R* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
emodin: červeně fluoreskující skvrna	slabě červeně fluoreskující skvrna
aloin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	žlutohnědě fluoreskující skvrna modře fluoreskující skvrna
	intenzivně žlutohnědě fluoreskující skvrna tři žlutohnědě fluoreskující skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením.** Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provede do 24 h za chránění před přímým světlem.*

0,500 g extraktu se smíchá s 80 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, protřepe se a nechá se stát nejméně 8 h ve tmě. Zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml, protřepe se a zfiltruje. Prvních 20 ml filtrátu se odstraní. 10,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a protřepe se dvakrát 20 ml směsi objemových dílů *etheru R a hexanu R (1 + 3)*. Spojené organické vrstvy se promyjí 5 ml *vody R* a organická vrstva se odstraní. Vodně – ethanolová vrstva se protřepe čtyřikrát 30 ml *ethyl-acetátu R* čerstvě nasyceného *vodou R* (připraví se takto: 150 ml *ethyl-acetátu R* se protřepává 3 min s 15 ml *vody R* a nechá se stát), po každém protřepání se směs nechá stát do úplného oddělení vrstev. Ethyl-acetátové vrstvy se spojí. Vodná vrstva se použije pro stanovení obsahu kaskarosidů a organická vrstva pro stanovení obsahu hydroxyanthracenových glykosidů jiných než kaskarosidy.

#### Hydroxyanthracenové glykosidy jiné než kaskarosidy.

Organická vrstva se převede do baňky s kulatým dnem a rozpouštědlo se odstraní destilací téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*, přidá se 10 ml *vody R* při 40 °C a převede se do 50ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje *vodou R* při 40 °C a promývací tekutina se přidá k roztoku v baňce. Nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem, která obsahuje 2 g *chloridu železitého R* a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Připojí se zpětný chladič a baňka se vloží do vodní lázně tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce a zahřívá se 4 h. Nechá se ochladit, roztok se převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 4 ml *vody R* a promývací tekutiny se přidají do dělicí nálevky. Obsah dělicí nálevky se protřepe třikrát 30 ml směsi objemových dílů

*etheru R a hexanu R (1 + 3)*. Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 10 ml *vody R* a promývací tekutina se odstraní. Organická vrstva se zředí směsí objemových dílů *etheru R a hexanu R (1 + 3)* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R (5 g/l) v methanolu R*. Změří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku při 440 nm a při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny. Zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr hodnoty absorbance při 515 nm k hodnotě absorbance při 440 nm je nejméně 2,4.

Obsah hydroxyanthracenových glykosidů jiných než kaskarosidy v procentech, vyjádřeno jako kaskarosid A, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 6,95}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného přípravku v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 180.

**Kaskarosidy.** Vodná vrstva se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se zpracuje postupem výše uvedeným ve zkoušce Stanovení obsahu Hydroxyanthracenové glykosidy jiné než kaskarosidy. Změří se absorbance (2.2.25) při 440 nm a při 515 nm. Zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr hodnoty absorbance při 515 nm k hodnotě absorbance při 440 nm je nejméně 2,7.

Obsah kaskarosidů v procentech, vyjádřeno jako kaskarosid A, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 6,95}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného přípravku v gramech.

Specifická absorbance má hodnotu 180.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede jmenovitý obsah hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako kaskarosid A.

## RHEI RADIX

6.0:0291

### Reveňový kořen

#### DEFINICE

Jsou to usušené celé nebo řezané kořeny a oddenky druhu *Rheum palmatum L.*, *Rheum officinale* BAILL., kříženců obou druhů nebo jejich směs. Kořeny a oddenky jsou většinou rozřezané, zbavené stonku a zevní vrstvy kůry s postranními kořínky.

*Obsah.* Nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako rhein (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>; M<sub>r</sub> 284,2), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga charakteristického, aromatického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Droga má různý vzhled; okrouhlé plátky v průměru až 10 cm, 1 cm až 5 cm silné; válcovité, oválné nebo ploskovypouklé kousky. Svrchní strana má bledě růžový nádech, je obvykle pokryta vrstvou hnědožlutého prášku. Tmavší, síťovitě se křížící linie jsou patrné zejména po navlhčení; vytvářejí charakteristický, mramorovaný vzhled drogy. Lom je zrnitý. Na příčném řezu oddenkem je patrná úzká zevní vrstva s paprscitými, hnědočervenými pruhy. Dřeňové paprsky kolmo protínají tmavý pruh kambia. Uprostřed je pruh drobných, hvězdicovitě uspořádaných anomálních svazků cévních. Kořen má výrazně paprscitou strukturu.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je oranžový až hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášek vykazuje tyto charakteristické znaky: velké drúzy šřavelanu vápenatého někdy o průměru více než 100 µm a jejich úlomky; síťovitě ztlustlé, nezdřevnatělé cévy o průměru až 175 µm. Četné skupiny okrouhlých nebo mnohohranných, tenkostěnných parenchymatických buněk. Sklereidy a průvodní vlákna chybí. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná okrouhlá škrobová zrna s hvězdicovitým hilem, jednotlivá nebo složená po dvou až čtyřech.
- C.** Proveďte se tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) za použití vrstvy vhodného silikagelu.  
*Zkoušený roztok.* 50 mg práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 30 ml *vody R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Nechá se ochladit a protřepe se 25 ml *etheru R*. Etherová vrstva se vysuší nad *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *etheru R*.  
*Porovnávací roztok.* 5 mg *emodinu R* se rozpustí v 5 ml *etheru R*.  
 Na vrstvu se nanese odděleně do proužků po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *ethyl-acetátu R* a *petrol-etheru R* (1 + 25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části oranžově fluoreskující skvrna (emodin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající skvrně emodinu; nad skvrnou emodinu jsou dvě stejně fluoreskující skvrny (fyscion a chrysofanol v pořadí vzestupné hodnoty  $R_F$ ); pod skvrnou emodinu jsou také dvě stejně fluoreskující skvrny (rhein a aloe-emodin v pořadí sestupné hodnoty  $R_F$ ). Vrstva se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R*. Všechny skvrny se zbarví červeně až fialově.
- D.** Asi 50 mg práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá s 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Nechá se ochladit, protřepe se 20 ml *etheru R* a vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 10 ml *amoniaku zředěného RS1*. Vodná vrstva se zbarví červeně až fialově.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

***Rheum rhoponticum.*** Proveďte se tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

*Zkoušený roztok.* 0,2 g práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá se 2 ml *methanolu R* a vaří se 5 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *rhoponticinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do proužků (nejvýše 20 mm × 3 mm) po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (20 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *kyselinou fosfomolybdenovou RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v blízkosti startu modrá skvrna (rhoponticin) v poloze odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,100 g práškované drogy (180) (2.9.12) se ve 100ml baňce smíchá se 30,0 ml *vody R*, baňka se zváží a směs se zahřívá 15 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 50 mg *hydrogenuhlčitanu sodného R*, zváží se, doplní se *vodou R* na původní hmotnost a roztok se odstředí. 10,0 ml tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zabroušenou zátkou, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a směs se zahřívá 20 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Pak se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 20 min za častého protřepávání. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepává se třikrát 25 ml *etheru R*, kterým byla předem promyta baňka. Etherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml *vody R*. Etherové vrstvy se zfiltrují přes chomáček vaty do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha, zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Změří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny.

Vypočítá se obsah rheimu v procentech podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 0,64}{m},$$

v němž značí:

$A$  – absorbanci při 515 nm;

$m$  – hmotnost drogy v gramech.

Specifická absorbance rheimu, počítaná na základě specifické absorbance aloinu, má hodnotu 468.

## ROSMARINI ETHEROLEUM

6.0:1846

## Rozmarýnová silice

*Synonymum.* Rosmarini aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z kvetoucích nadzemních částí druhu *Rosmarinus officinalis* L. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá pohyblivá bezbarvá až světle žlutá kapalina, charakteristického pachu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

## A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 ml se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 50 mg *borneolu R*, 50 mg *bornyl-acetátu R* a 100 µl *cinéolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká *zkoumadlem vanilino-vým RS* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Ihned se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. V dolní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku může být přítomno několik fialovomodrých až fialovošedých skvrn střední intenzity (terpenické alkoholy).

Horní okraj desky	
	intenzivní fialová skvrna fialovošedá skvrna
bornyl-acetát: málo intenzivní modrošedá skvrna	málo intenzivní modrošedá skvrna (bornyl-acetát) fialovorůžová skvrna
cinéol: intenzivní modrá skvrna	intenzivní modrá skvrna (cinéol)
borneol: fialovomodrá skvrna střední intenzity	fialovomodrá skvrna střední intenzity (borneol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční časy hlavních piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům piků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,895 až 0,920.

**Index lomu** (2.2.6). 1,464 až 1,473.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-5^{\circ}$  až  $+8^{\circ}$ ; měří se úhel optické otáčivosti.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 0,20 ml se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *α-pinenu R*, 10 mg *kamfenu R*, 20 µl *β-pinenu R*, 10 µl *β-myrcenu R*, 20 µl *limonenu R*, 50 µl *cinéolu R*, 10 µl *p-cymenu R*, 50 mg *kafru R*, 30 mg *bornyl-acetátu R*, 10 mg *α-terpineolu R*, 10 mg *borneolu R* a 10 µl *verbenonu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

*Kolona:*

– *materiál:* tavený křemen;

– *rozměry:* délka 30 m (tloušťka filmu 1 µm) až 60 m (tloušťka filmu 0,2 µm), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;

– *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	50
	10–85	50 → 200
	85–110	200
nástříkový prostor		200
detektor		250

*Detekce.* Plamenionizační detektor.

*Nástřík.* 1 µl.

*Eluční pořadí.* Pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem cinéolu a nejméně 1,5 mezi píkem *α-terpineolu* a píkem borneolu.

Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Z chromatogramu zkoušeného roztoku se vypočítá obsah těchto látek v procentech.

Pro rozmarýnovou silici španělského typu se obsah látek v procentech pohybuje v rozmezích:

– *α-pinen:* 18 % až 26 %;  
 – *kamfen:* 8,0 % až 12,0 %;  
 – *β-pinen:* 2,0 % až 6,0 %;  
 – *β-myrcen:* 1,5 % až 5,0 %;  
 – *limonen:* 2,5 % až 5,0 %;  
 – *cinéol:* 16,0 % až 25,0 %;  
 – *p-cymen:* 1,0 % až 2,2 %;



- *kafr*: 13,0 % až 21,0 %;
- *bornyl-acetát*: 0,5 % až 2,5 %;
- *α-terpineol*: 1,0 % až 3,5 %;
- *borneol*: 2,0 % až 4,5 %;
- *verbenon*: 0,7 % až 2,5 %.

Pro rozmarýnovou silici marockého a tuniského typu se obsah látek v procentech pohybuje v rozmezích:

- *α-pinen*: 9,0 % až 14,0 %;
- *kamfen*: 2,5 % až 6,0 %;
- *β-pinen*: 4,0 % až 9,0 %;
- *β-myrcen*: 1,0 % až 2,0 %;
- *limonen*: 1,5 % až 4,0 %;
- *cineol*: 38,0 % až 55,0 %;
- *p-cymen*: 0,8 % až 2,5 %;
- *kafr*: 5,0 % až 15,0 %;
- *bornyl-acetát*: 0,1 % až 1,5 %;
- *α-terpineol*: 1,0 % až 2,6 %;
- *borneol*: 1,5 % až 5,0 %;
- *verbenon*: nejvýše 0,4 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotách nepřesahujících 25 °C.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda obsahuje španělský nebo marocký a tuniský typ.

## ROSMARINI FOLIUM

6.0:1560

### Rozmarýnový list

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Rosmarinus officinalis* L.

*Obsah* (počítáno na bezvodou drogu):

- nejméně 12 ml silice v 1 kilogramu drogy;
- nejméně 3 % celkových hydroxyskořicových derivátů, vyjádřeno jako kyselina rozmarýnová (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; M<sub>r</sub> 360,32).

#### VLASTNOSTI

Droga má výrazný aromatický pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je čárkovitý až čárkovitě kopinatý, 1 cm až 4 cm dlouhý a 2 mm až 4 mm široký, přisedlý, tuhý, s podvinutými okraji. Na svrchní straně je tmavozelený a lysý, zrnitý, na spodní straně šedozelený a plstnatý s výraznou střední žilkou.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedozelený až nažloutle zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: pokožka spodní strany listu z buněk se stěnami přímými nebo vlnitě zprohýbanými, růžencovitě ztlustlými, s četnými diacytickými průduchy (2.8.3); úlomky pokožky horní strany listu z buněk se stěnami přímými, mírně ztlustlými a tečkovanými, pod ní ležící hypodermis z velkých nepravidelných buněk s růžencovitě ztlustlými antiklinálními stěnami; na přič-

ných úlomcích listu je pod hypodermis jednořadý až dvouřadý palisádový parenchym uspořádaný do tvaru velkého srpku; na spodní pokožce četné mnohobuněčné, silně rozvětvené krycí chlupy; zřídka kuželovité krycí chlupy; na svrchní pokožce převažují žláznaté chlupy s krátkou jednobuněčnou nohou a hlavičkou z osmi paprscitě uspořádaných buněk, další méně četné chlupy mají jednobuněčnou nohu a kulovitou jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou hlavičku.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 20 µl silice ze Stanovení obsahu se rozpustí v 1 ml *hexanu R*.

*Porovnávací roztok*. 5 mg *borneolu R*, 5 mg *bornyl-acetátu R* a 10 µl *cineolu R* se rozpustí v 1 ml *hexanu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení*. 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 15 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
bornyl-acetát: nažloutle hnědá skvrna	červená skvrna nažloutle hnědá skvrna nízké intenzity zbarvená skvrna nízké intenzity
cineol: fialová skvrna	fialová skvrna zbarvené skvrny nízké intenzity
borneol: fialovohnědá skvrna	fialovohnědá skvrna zbarvená skvrna nízké intenzity
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### D. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 1,0 g drogy se rozeře v 10 ml *methanolu R* a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok*. 5,0 mg *kyseliny rozmarýnové R*, 1,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *acetonu R* a *dichlormethanu R* (8,55 + 25 + 85).

*Nanášení*. 10 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení*. Po dráze 8 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení*. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: světle modře fluoreskující skvrna	růžově fluoreskující skvrna
kyselina rozmarýnová: světle modře fluoreskující skvrna	modrá fluoreskující skvrna nízké intenzity
	intenzivně světle modře fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; použije se 20,0 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

#### Celkové hydroxyskořicové deriváty.

**Základní roztok.** K 0,200 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 80 ml *ethanolu* 50% (V/V) R, vaří se 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 10 ml *ethanolu* 50% (V/V) R. Filtrát a promývací tekutina se spojí v odměrné baňce a zředí se *ethanolem* 50% (V/V) R na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** K 1,0 ml základního roztoku se ve zkumavce přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové* 0,5 mol/l RS, 2 ml roztoku připraveného rozpuštěním 10 g *dusitanu sodného* R a 10 g *molybdenanu sodného* R ve 100 ml *vody* R, pak se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného* RS, zředí se *vodou* R na 10,0 ml a promíchá se.

**Kontrolní roztok.** 1,0 ml základního roztoku se zředí *vodou* R na 10,0 ml.

Absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku se měří ihned při 505 nm.

Obsah celkových hydroxyskořicových derivátů v procentech, vyjádřeno jako kyselina rozmarýnová (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 2,5}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci zkoušeného roztoku při 505 nm;

M – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorpance kyseliny rozmarýnové má hodnotu 400.

**Stanovení silic v rostlinných drogách** (2.8.12). 25,0 g rozdrčené drogy se destiluje 3 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 1000ml baňce se 300 ml *vody* R jako *destilační tekutiny*.

## RUSCI RADIX

7.0:1847

### Listnatcový kořen

*Synonymum.* Rusci rhizoma

### DEFINICE

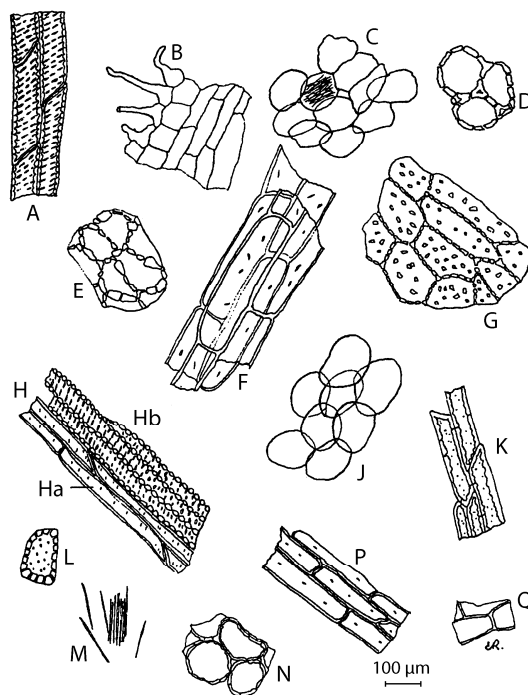
Je to celý usušený oddenek a kořeny druhu *Ruscus aculeatus* L. nebo jejich úlomky.

**Obsah.** Nejméně 1,0 % celkových sapogeninů, vyjádřeno jako ruskogeniny [směs neoruskogeninu (C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>; M<sub>r</sub> 428,6) a ruskogeninu (C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 430,6)], počítáno na vysušenou drogu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oddenek tvoří nažloutlé, rozvětvené, článkovité, mírně uzlovité, válcovité nebo téměř kuželovité kousky, asi 5 cm až 10 cm dlouhé a asi 5 mm silné; na povrchu s tenkými prstencovitými, vzájemně oddělenými rýhami, asi 1 mm až 3 mm silnými; na svrchní straně oddenku jsou patrné okrouhlé jizvy po lodyhách; na spodní straně četné kořeny nebo kořenové jizvy; kořeny o průměru asi 2 mm mají podobnou barvu jako oddenek. Zevní vrstvu lze snadno odloupnout, pod ní ležící střední část je velmi tvrdá, žlutobílá.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je nažloutlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu* RS. Droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): skupiny sklereid z oddenku s buňkami různých tvarů, okrouhlých, protáhlých nebo pravouhlých; stěny buněk jsou mírně růžencovitě ztlustlé se zřetelnými, velkými okrouhlými nebo oválnými dvůrky [F, G, L, P, Q]; úlomky jednořadé endodermis z buněk nepravidelně ztlustlých [K]; skupiny okrouhlých parenchymatických buněk, v rozích ztlustlých, s malými trojúhelníkovitými mezibuněčnými dutinami [D, E, N]; tenkostěnný parenchym [J] s některými buňkami obsahujícími rafidy kalcium-oxalátu [C]; skupiny [H] ztlustlých vláken [Ha] a malých cév o průměru až 50 μm se stěnami s četnými malými šterbinovitými tečkami [A, Hb]; ojedinělé úlomky pokožky kořene [B]; izolované rafidy kalcium-oxalátu [M].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového listnatcového kořenu

## C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100 ml baňce se zabroušeným hrdlem smíchá s 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se 40 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, nezfiltrovaná směs se protřepává třikrát 25 ml *dichlormethanu R*. Spojené organické vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltruje se a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *ruskogeninů CRL* a 1 mg *stigmasterolu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (7 + 93).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 4 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a zahřívá se v sušárně 1 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
stigmasterol: fialová skvrna	několik skvrn různých barev fialová skvrna
ruskogeny: žlutá skvrna	fialová skvrna žlutá skvrna (ruskogeny) několik skvrn různých barev
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 5,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Ke 2,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 60 ml *ethanolu bezvodého R*, 15 ml *vody R* a 0,2 g *hydroxidu draselného R* a extrahuje se 4 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se do 100 ml odměrné baňky. Extrakční baňka i zbytek na filtru se promyjí třikrát 10 ml *ethanolu bezvodého R*, pro-

mývácí tekutiny se přidají do odměrné baňky a zředí se *ethanolem bezvodým R* na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do baňky s kulatým dnem vhodné pro rotační odpařku a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí v 10 ml *butan-1-olu R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 8 ml *vody R* a zahřívá se 1 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, tekutina se převede do 100 ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje třikrát 20 ml *methanolu R*. Promývací tekutiny se přidají do odměrné baňky a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml.

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *ruskogeninů CRL* se rozpustí ve 100 ml *methanolu R*.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** *voda R*;

– **mobilní fáze B:** *acetonitril RI*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–25	40	60
25–27	40 → 0	60 → 100
27–37	0	100

**Průtoková rychlost.** 1,2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 203 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Identifikace piků.** K identifikaci piků *neoruskogenu* a *ruskogenu* se použije chromatogram dodávaný s *ruskogeninů CRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

**Relativní retence** vztažená k *neoruskogenu* (retenční čas asi 16 min). *Ruskogenin* asi 1,2.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– **rozlíšení:** nejméně 1,5 mezi píkem *neoruskogenu* a píkem *ruskogenu*.

Obsah *sapogeninů* v procentech, vyjádřeno jako *ruskogeny* (*neorusogenin* a *ruskogenin*) se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 4 \cdot p_1}{A_2 \cdot m_1} + \frac{A_3 \cdot m_2 \cdot 4 \cdot p_2}{A_4 \cdot m_1},$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu piku *ruskogenu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu piku *ruskogenu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$A_3$  – plochu piku *neoruskogenu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_4$  – plochu piku *neoruskogenu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *ruskogeninů CRL* použitých k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p_1$  – obsah *ruskogenu* v *ruskogeninech CRL* v procentech;

$p_2$  – obsah *neoruskogenu* v *ruskogeninech CRL* v procentech.

## SALICIS CORTEX

6.8:1583

## Vrbová kůra

## DEFINICE

Je to celá usušená kůra mladých větví nebo její úlomky, nebo celé usušené kousky letorostů různých druhů rodu *Salix*, včetně druhů *S. purpurea* L., *S. daphnoides* VILL. a *S. fragilis* L.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % celkových salicylových derivátů, vyjádřeno jako salicin ( $C_{13}H_{18}O_7$ ;  $M_r$  286,3), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Kůra je 1 mm až 2 mm silná, tvoří ohebné, podlouhlé, žlábkovité nebo ohnuté kousky. Zevní strana je hladká nebo jemně podélně vrásčitá, zelenožlutá nebo hnědošedá. Vnitřní strana je hladká nebo jemně podélně rýhovaná a v závislosti na druhu bílá, světle žlutá nebo červenohnědá. Lom je v zevní části krátký, ve vnitřní části hrubě vláknitý. Průměr letorostů nepřesahuje 10 mm. Dřevo je bílé nebo světle žluté.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutý, zelenožlutý nebo světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: svazky úzkých vláken lýka až asi 600  $\mu$ m dlouhých se silně ztlustlými stěnami jsou provázené průvodními vlákny obsahujícími hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého; parenchym kůry se ztlustlými, tečkovanými, uzlinovitými stěnami obsahující velké drúzy krystalů šťavelanu vápenatého; jednořadé dřevné paprsky; ztlustlé buňky korku. Mohou být přítomné i části nahnědlého kolenchymu pupenů, kromě toho i úlomky zdřevnatělého lýka a cév z větviček.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok (a).* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při asi 50 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.  
*Zkoušený roztok (b).* K 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 1,0 ml roztoku *uhličitanu sodného bezvodého R* (50 g/l) a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při asi 60 °C. Je-li třeba, po ochlazení se zfiltruje.  
*Porovnávací roztok.* 2 mg *salicinu R* a 2 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethyl-acetátu R* (8 + 15 + 77).  
*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l], do proužků.  
*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].  
*Sušení.* V proudu teplého vzduchu.  
*Detekce.* Postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové R* a *methanolu R* (5 + 95), zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b). Na chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b) mohou být další skvrny.

Horní okraj desky		
	může být přítomno několik červenofialových skvrn	
salicin: červenofialová skvrna	slabá červenofialová skvrna (salicin)	červenofialová skvrna (salicin)
kyselina chlorogenová: hnědá skvrna		
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok (a)</b>	<b>Zkoušený roztok (b)</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % větviček o průměru větším než 10 mm a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Kadmium** (2.4.27). Nejvýše 2,0  $\mu$ g/g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 11 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* K 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 40 ml *methanolu R* a 40,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4,2 g/l) a zahřívá se asi 1 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni při asi 60 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se přidají 4,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103,0 g/l). Suspenze se zfiltruje do 100ml odměrné baňky, promyje se a roztok se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (50 + 50). Zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45  $\mu$ m).

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg *piceinu R* se rozpustí ve 25,0 ml směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80) (roztok A). 15,0 mg *salicinu R* se rozpustí ve 25 ml směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80); přidá se 5,0 ml roztoku A a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

## Kolona:

- *rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (3  $\mu$ m).

## Mobilní fáze:

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a roztoku *kyseliny fosforečné R* 0,5% (V/V) (1,8 + 98,2);
- *mobilní fáze B:* *tetrahydrofuran R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–15	100	0
15–17	100 → 90	0 → 10
17–23	90	10
23–25	90 → 100	10 → 0
25–40	100	0

Průtoková rychlost. 1,0 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 270 nm.

Nástřík. 10 µl.

Retenční časy. Salicin asi 6,4 min; picein asi 7,7 min.

Test způsobilosti, porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem salicinu a píkem piceinu.

Celkový obsah salicylových derivátů v procentech, vyjádřeno jako salicin (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 2}{A_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

A<sub>1</sub> – plochu píku salicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>2</sub> – plochu píku salicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené drogy použitá k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

m<sub>2</sub> – hmotnost salicinu CRL použitá k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

p – obsah salicinu v salicinu CRL v procentech.

## SALICIS CORTICIS EXTRACTUM SICCUM

### 6.1:2312

#### Extrakt z vrbové kůry suchý

##### DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Salicis cortex* (1583).

Obsah. Nejméně 5,0 % celkových salicylových derivátů, vyjádřeno jako salicin (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>; M<sub>r</sub> 286,3), počítáno na vysušený extrakt.

##### VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z rostlinné drogy za použití vody nebo vodně-ethanolového rozpouštědla o koncentraci odpovídající nejvýše 80% (V/V) ethanolu.

##### VLASTNOSTI

Vzhled. Žlutohnědý amorfni prášek.

##### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok (a). 0,200 g se smíchá s 5 ml methanolu R a vloží se na 5 min do ultrazvukové lázně, zfiltruje se a zředí se methanolem R na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). K 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 1,0 ml roztoku uhličitanu sodného bezvodého R

(50 g/l) a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při asi 60 °C. Je-li třeba, po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 2,0 mg salicinu R a 2,0 mg kyseliny chlorogenové R se rozpustí v 1,0 ml methanolu R.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

Mobilní fáze. Směs objemových dílů vody R, methanolu R a ethyl-acetátu R (8 + 15 + 77).

Nanášení. 10 µl [nebo 2 µl]; do proužků.

Vyvíjení. Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

Sušení. V proudu teplého vzduchu.

Detekce. Postříká se směsí objemových dílů kyseliny sírové R a methanolu R (5 + 95), zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku a chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b). Na chromatogramech zkoušených roztoků (a) a (b) mohou být další skvrny.

Horní okraj desky		
salicin: červeno-fialová skvrna	mohou být přítomné četné červeno-fialové skvrny slabě červeno-fialová skvrna (salicin)	červeno-fialová skvrna (salicin)
kyselina chlorogenová: hnědá skvrna		
Porovnávací roztok	Zkoušený roztok (a)	Zkoušený roztok (b)

##### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

Zkoušený roztok. K 0,300 g se přidá 40 ml methanolu R a 40,0 ml roztoku hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS a zahřívá se asi 1 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem při asi 60 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se přidají 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS. Suspenze se zfiltruje do 100ml odměrné baňky, promyje se a roztok se zředí směsí stejných objemových dílů vody R a methanolu R. Zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost porů 0,45 µm).

Porovnávací roztok. 5,0 mg piceinu R se rozpustí ve 25,0 ml směsi objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80) (roztok A). 15,0 mg salicinu CRL se rozpustí ve 25 ml směsi objemových dílů vody R a methanolu R (20 + 80); přidá se 5,0 ml roztoku A a zředí se vodou R na 50,0 ml.

##### Kolona:

– rozměry: délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (3 µm);

**Mobilní fáze:**

– mobilní fáze A: směs objemových dílů tetrahydrofuranu R a roztoku kyseliny fosforečné R 0,5% (V/V)

(1,8 + 98,2);

– mobilní fáze B: tetrahydrofuran R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–15	100	0
15–17	100 → 90	0 → 10
17–23	90	10
23–25	90 → 100	10 → 0
25–40	100	0

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 270 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Retenční časy.** Salicin asi 6,4 min; picein asi 7,7 min.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem salicinu a píkem piceinu.

Celkový obsah salicylových derivátů v procentech, vyjádřeno jako salicin (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 2}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

A<sub>1</sub> – plochu píku salicinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>2</sub> – plochu píku salicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušeného extraktu použitá k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

m<sub>2</sub> – hmotnost salicinu CRL použitá k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

p – obsah salicinu v procentech v salicinu CRL.

## SALVIAE LAVANDULIFOLIAE ETHEROLEUM

Silice šalvěje levandulové

7.0:1849

*Synonymum.* Salviae lavandulifoliae aetheroleum

### DEFINICE

Je to silice získaná z kvetoucích nadzemních částí druhu *Salvia lavandulifolia* VAHL destilací s vodní parou.

### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Čirá, bezbarvá nebo světle žlutá pohyblivá kapalina kافrovitého pachu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,1 ml se rozpustí v 10 ml toluenu R.

**Porovnávací roztok.** 20 µl thujonu R a 30 µl cineolu R se rozpustí v 10 ml toluenu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 3 µl], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se čerstvě připraveným roztokem kyseliny fosfomolybdenové R (200 g/l) v ethanolu 96% R a zahřívá se 10 min při 105 °C; pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny ještě další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	modrá skvrna
thujon: dvě růžovofialové skvrny	
cineol: modrá skvrna	modrá skvrna (cineol)
	tři modré skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Retenční časy charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,907 až 0,932.

**Index lomu** (2.2.6). 1,465 až 1,473.

**Optická otáčivost** (2.2.7). +7° až +17°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

**Rozpustnost v ethanolu** (2.8.10). 1 objemový díl zkoušené látky je dobře rozpustný ve 2 nebo více objemových dílech ethanolu 80% (V/V) R.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

**Zkoušený roztok.** 0,200 g se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 0,200 g silice šalvěje levandulové pro identifikaci píků CRL se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 µl limonenu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 50,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí heptanem R na 5,0 ml.

Kolona:

- materiál: tavený křemen;
- rozměry: délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- stacionární fáze: makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

Nosný plyn. Helium pro chromatografii R.

Průtoková rychlost. 1,5 ml/min.

Dělicí poměr. 1 : 50.

Teplota:

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–43	60 → 232
nástřikový prostor		250
detektor		250

Detekce. Plamenoionizační detektor.

Nástřik. 1 µl.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (a):

- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému se silicí šalvěže levandulové pro identifikaci píků CRL;
- rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem limonenu a píkem 1,8-cineolu a nejméně 1,5 mezi píkem α-terpinyl-acetátu a píkem borneolu.

K identifikaci píků α-pinenu, sabinenu, limonenu, 1,8-cineolu, thujonu, kafru, linalolu, linalyl-acetátu, terpinen-4-olu, sabinyl-acetátu, α-terpinyl-acetátu a borneolu se použije chromatogram dodávaný se silicí šalvěže levandulové pro identifikaci píků CRL a chromatogram porovnávacího roztoku (a).

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

- α-pinén: 4,0 % až 11,0 %;
- sabinén: 0,1 % až 3,5 %;
- limonén: 2,0 % až 6,5 %;
- 1,8-cineol: 10,0 % až 30,5 %;
- thujon: nejvýše 0,5 %;
- kafr: 11,0 % až 36,0 %;
- linalol: 0,3 % až 4,0 %;
- linalyl-acetát: nejvýše 5,0 %
- terpinen-4-ol: nejvýše 2,0 %;
- sabinyl-acetát: 0,5 % až 9,0 %;
- α-terpinyl-acetát: 0,5 % až 9,0 %;
- borneol: 1,0 % až 7,0 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## SALVIAE OFFICINALIS FOLIUM

6.0:1370

List šalvěže lékařské

DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Salvia officinalis* L.

Obsah silice (počítáno na bezvodou drogu):

- nejméně 15 ml/kg neřezané drogy;
- nejméně 10 ml/kg řezané drogy.

VLASTNOSTI

Silice druhu *Salvia officinalis* L. obsahuje velké množství thujonu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Čepel listu je asi 2 cm až 10 cm dlouhá a 1 cm až 2 cm široká, obvejčitá až oválná, s okrajem jemně vroubkovaným až celokrajným na horním konci je zaokrouhlená nebo zašpičatělá, na bázi sbíhavá, zaokrouhlená nebo téměř srdčitá. List je na svrchní straně zelenošedý, jemně zrnitý, na spodní straně bílý, pýřitý, s hustou sítí vyniklých žilek.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle šedý až hnědozelený. Pozoruje se v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: velmi četné svazčité krycí chlupy nebo jejich úlomky s výrazně ztlustlou bazální buňkou a ostatními buňkami tenkostěnnými, protáhlými, s úzkým lumenem; úlomky svrchní pokožky s tečkovanými nevýrazně mnohohranými buňkami; úlomky spodní pokožky s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými a s četnými diacytickými průduchy (2.8.3); zřídka jednotlivé žláznaté chlupy s jednobuněčnou až čtyřbuněčnou nohou a jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou hlavičkou; četné žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a hlavičkou složenou z osmi paprčité uspořádaných buněk překrytých společnou kutikulou.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
Zkoušený roztok. 0,5 g čerstvě upráškové drogy (355) (2.9.12) se 5 min protřepává s 5 ml ethanolu bezvodého R.  
Porovnávací roztok. 20 µl thujonu R a 25 µl cineolu R se rozpustí ve 20 ml ethanolu bezvodého R.  
Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.  
Mobilní fáze. Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 +95).  
Nanášení. 20 µl, do proužků.  
Vývíjení. Po dráze 15 cm.  
Sušení. Na vzduchu.  
Detekce. Vrstva se postříká roztokem kyseliny fosfomolybdenové R (200 g/l) v ethanolu bezvodém R a 10 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.  
Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
	modrá skvrna (v blízkosti čela mobilní fáze)
$\alpha$ -thujon a $\beta$ -thujon: 2 růžovofialové skvrny cineol: modrá skvrna	2 růžovofialové skvrny ( $\alpha$ -thujon a $\beta$ -thujon) modrá skvrna (cineol)
	modré skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se se 20,0 g drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 20,0 g čerstvě řezané drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 250 ml vody R jako destilační kapaliny; do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu R.

## SALVIAE SCLAREAE ETHEROLEUM

7.0:1850

## Silice šalvěje muškátové

*Synonymum.* Salviae sclareae aetheroleum

## DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvých nebo usušených kvetoucích stonků druhu *Salvia sclarea* L. destilací s vodní parou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bezbarvá nebo hnědožlutá, obvykle světle žlutá kapalina.

Má charakteristický pach.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

**A.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 ml se rozpustí v toluenu R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 60  $\mu$ l linalolu R, 200  $\mu$ l linalyl-acetátu R a 60  $\mu$ l  $\alpha$ -terpineolu R se rozpustí v toluenu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů ethyl-acetátu R a toluenu R (5 + 95).

*Nanášení.* 5  $\mu$ l zkoušeného roztoku a 10  $\mu$ l porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se zkoumadlem vanilinovým R a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle během 5 min.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny ještě další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
$\alpha$ -terpineol: tmavofialová skvrna	tmavofialová skvrna
linalyl-acetát: tmavofialová skvrna	tmavofialová skvrna
linalol: tmavofialová skvrna	tmavofialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Retenční čas pěti piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času pěti piků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Dva piky odpovídající  $\alpha$ - a  $\beta$ -thujonu mohou chybět.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,890 až 0,908.

**Index lomu** (2.2.6). 1,456 až 1,466.

**Optická otáčivost** (2.2.7).  $-26^\circ$  až  $-10^\circ$ ; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok.* 5  $\mu$ l thujonu R, 5  $\mu$ l linalolu R, 100  $\mu$ l linalyl-acetátu R, 10  $\mu$ l  $\alpha$ -terpineolu R a 25 mg ( $\pm 20\%$ ) sklareolu R se přidá k 1 g hexanu R a důkladně se promíchá.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 30 m (může se použít tloušťka filmu 1  $\mu$ m) až 60 m (může se použít tloušťka filmu 0,2  $\mu$ m), vnitřní průměr 0,25 mm až 0,53 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R.

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–75	60 → 190
	75–120	190
nástříkový prostor		220
detektor		240



*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástržik.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem linalolu a píkem linalyl-acetátu.

Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují složky porovnávacího roztoku na chromatogramu zkoušeného roztoku (nepřihlíží se k píku hexanu). *Thujon R* je směs α- a β-thujonu. α-Thujon se za předepsaných podmínek eluuje před β-thujonem. Stanoví se také obsah germakrenu D v procentech. Jeho pík se může identifikovat na chromatogramu zkoušeného roztoku jeho relativní retencí vztaženou k linalolu, která je za daných podmínek 1,23.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezích:

- α- a β-thujon: nejvýše 0,2 %;
- linalol: 6,5 % až 24 %;
- linalyl-acetát: 56 % až 78 %;
- α-terpineol: nejvýše 5,0 %;
- germakren D: 1,0 % až 12 %;
- sklareol: 0,4 % až 2,6 %.

#### SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## SALVIAE TINCTURA

6.0:1889

### Šalvějová tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Salviae officinalis folium* (1370).

*Obsah.* Nejméně 0,1 % silice.

#### VÝROBA

Připravuje se z 1 dílu práškové drogy a 10 dílů ethanolu 70% (V/V) vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Nahnědlá tekutina, charakteristického pachu.

#### ZKOUŠKA TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.7).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená tinktura.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *thujonu R* a 25 µl *cineolu R* se rozpustí ve 20 ml *ethanolu bezvodého R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu bezvodém R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ještě další skvrny.

Horní okraj desky	
	modrá skvrna (v blízkosti čela mobilní fáze)
α-thujon a β-thujon: 2 narůžověle fialové skvrny cineol: modrá skvrna	2 narůžověle fialové skvrny (α-thujon a β-thujon) modrá skvrna (cineol)
	modré skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 64 % (V/V) až 69 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propanol-2-olu.

**Zbytek po vysušení u extraktů** (2.8.16). Nejméně 2,0 %; stanoví se se 3,00 g tinktury.

#### STANOVENÍ OBSAHU

30,0 g tinktury se v 500ml baňce s kulatým dnem smíchá se 100 ml *vody R*. Destiluje se za použití sestupného chladiče do dělicí nálevky, která byla označena těsně pod 50 ml, destilace se při dosažení této značky zastaví. Chladič se promyje 10 ml *pentanu R*. V destilátu se rozpustí takové množství *chloridu sodného R*, aby vznikl nasycený roztok, protřepe se třikrát 20 ml *pentanu R*. Spojené pentanové vrstvy spolu s pentanem použitým k promytí chladiče se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se přes chomáček vaty do předem zvážené 100ml baňky s kulatým dnem. Síran sodný se propláchně několikrát malým množstvím *pentanu R*. Pentan se opatrně odpaří při teplotě nepřesahující 40 °C. Zbytek se suší 2 h v exsíkátoru nad *oxidem fosforečným R* a tvrdým parafinem za normálního tlaku a při teplotě místnosti. Zbytek po vysušení se zváží (silice).

## SALVIAE TRILOBAE FOLIUM

6.0:1561

### List šalvěje trojlaločné

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Salvia fruticosa* MILL. (*S. triloba* L. fil.).

*Obsah.* Nejméně 18 ml silice v kilogramu neřezané drogy a nejméně 12 ml silice v kilogramu řezané drogy, obojí počítáno na bezvodou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má po rozetření kořeněný pach po eukalyptové silici.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Čepel listu je asi 8 mm až 50 mm dlouhá a asi 4 mm až 20 mm široká, oválně vejčitá až kopinatá, na obou stranách hustě chlupatá, na okraji jemně vroubkovaná, zvládněná, ale díky hustému ochlupení na obou stranách čepel je okraj nevýrazný. List je na bázi tupý, někdy nese jeden nebo dva více nebo méně vyvinuté přílistky. List je na svrchní straně šedoplstnatý, na spodní straně je běloplstnatý, žilnatina je nezřetelná. Běloplstnatý řapík má průměr asi 1 mm.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedozeleň a plstnatý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četné krycí a žláznaté chlupy a jejich úlomky, spolu s úlomky pokožky; krycí chlupy článkované, jednořadé, se ztlustlými stěnami, tupě zašpicatělé, na svrchní straně pokožky jsou chlupy přímé, na spodní straně pokožky jsou delší, četnější, zkroucené; žláznaté chlupy, z nichž některé jsou s jednobuněčnou až čtyřbuněčnou nohou a jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou hlavičkou, většina však má krátkou, jednobuněčnou nohu a hlavičku z osmi paprscitě uspořádaných buněk, pokrytých měchýřkovitou kutikulou; pokožka svrchní strany listu z buněk poněkud mnohohranných s tečkovanými, růžencovitými stěnami, s roztroušenými diacytickými průduchy (2.8.3); pokožka spodní strany listu z buněk se stěnami zprohýbanými nebo vlnitě zprohýbanými a četnými diacytickými průduchy.

**C.** Hodnotí se chromatogram ze zkoušky Thujon (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna odpovídající velikostí a intenzitou zbarvení skvrně cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku, nebo tuto skvrnu velikostí a intenzitou zbarvení převyšuje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Thujon.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,3 g čerstvě práškové drogy (355) (2.9.12) se protřepává 5 min s 5,0 ml *ethanolu bezvodého R*.

*Porovnávací roztok.* 20 µl *thujonu R* a 25 µl *cineolu R* se rozpustí ve 20 ml *ethanolu bezvodého R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *ethylacetátu R* a *tolueny R* (5 + 95).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu bezvodém R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části modrá skvrna (cineol) a v horní části růžovomodrá skvrna (thujon). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není skvrna odpovídající thujonu patrná, nebo je jen velmi slabě růžovomodře zbarvená.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 8 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 10,0 %; stanoví se se 20,0 g drogy.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). 20,0 g drogy, je-li třeba rozdrobněně těsně před stanovením, se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 250 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené zkumavky se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

## SAMBUCI NIGRAE FLOS

6.0:1217

Květ bezu černého

*Synonymum.* Sambuci flos

## DEFINICE

Je to usušený květ druhu *Sambucus nigra L.*

*Obsah.* Nejméně 0,80 % flavonoidů, vyjádřeno jako isokvercitrin (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; M<sub>r</sub> 464,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Květ o průměru asi 5 mm má tři malé čočkovité listeny, které mohou mít stopku. Kalich je malý, s pěti ušty; koruna je světle žlutá s pěti široce oválnými korunními lístky na bázi srostlými. Nitky pěti světle žlutých tyčinek se střídají s korunními lístky. Koruna se vyskytuje často samostatně nebo spolu s tyčinkami, které jsou k bázi koruny přirostlé. Semeník je spodní, trojpodzdrý, s přisedlou trojlaločnou bliznou.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: četná pylová zrna kulovitá, někdy oválná o průměru asi 30 µm, se třemi klíčovými póry a velmi jemně tečkovanou exinou; pokožka kalicha s buňkami s rýhovanou kutikulou, a občasnými jednobuněčnými, okrajovými zoubky bazální oblasti; úlomky koruny s četnými malými kapkami silice, buňky pokožky se stěnami zprohýbanými, na svrchní straně slabě ztlustlé, s růžencovitými stěnami a rýhovanou kutikulou; v mezofylu koruny a kalicha jsou idioblasty obsahující četné pískovité krystaly šřavelanu vápenatého.

**C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce *Sambucus ebulus L.* (viz Zkoušky na čistotu).

*Detekce.* V ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní světle modře fluoreskující skvrna odpovídající kyselině chlorogenové, oranžově fluoreskující skvrna odpovídající rutině a v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku je oranžově fluoreskující skvrna odpovídající isokvercitrinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je zelenomodře fluoreskující skvrna v poloze odpoví

vídající poloze těsně pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další slabě fluoreskující skvrny. V denním světle jsou zřetelné pouze oranžově fluoreskující skvrny odpovídající rutině a isokvercitrinid.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 8 % úlomků květních stopek a jiných cizích příměsí, nejvýše 15 % zhnědlých květů; stanoví se s 10 g drogy.

***Sambucus ebulus* L.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí *methanolem R* na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *kyseliny kávové R*, 1 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*, pak se postříká roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině (v pořadí stoupajících hodnot  $R_F$ ): oranžově fluoreskující skvrna rutin, světle modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové a oranžovožlutě nebo oranžovohnědě fluoreskující skvrna hyperosidu, v horní třetině je zelenomodře fluoreskující skvrna kyseliny kávové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není růžová skvrna v poloze odpovídající poloze pod skvrnou rutin na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,600 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do odměrné baňky. Ke zbytku v baňce s kulatým dnem se přidá chomáček vaty a extrahuje se ještě dvakrát 10 min varem se 20 ml *acetonu R* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se každý extrakt zfiltruje přes chomáček vaty do odměrné baňky. Spojené acetonové extrakty se zfiltrují přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se *acetonem R* předem použitým k promytí baňky a papírového filtru na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se jednou 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-ace-*

*tátu R*. Spojené ethyl-acetátové vrstvy se protřepou dvakrát 50 ml *vody R*, zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem R* na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml *chloridu hlinitého RS1* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako isokvercitrinid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

$A$  – absorbanci při 425 nm;

$m$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance isokvercitrinidu má hodnotu 500.

## SANGUISORBAE RADIX

6.1:2385

### Krvavcový kořen

#### DEFINICE

Jsou to usušené podzemní části druhu *Sanguisorba officinalis* L. zbavené kořínků, celé nebo jejich úlomky.

**Obsah.** Nejméně 5,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Adventivní kořeny jsou asi 5 cm až 25 cm dlouhé, o průměru až 2 cm.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Celá droga se skládá z oddenku často rozvětveného, tlustého, krátkého, větvenitého nebo válcovitého a adventivních kořenů, jejichž povrch je červenohnědý nebo černohnědý, podélně rýhovaný, někdy s příčnými trhlinami a s jizvami po kořínkách.

Droga může být tvořena i více nebo méně válcovitými úlomky až 2 cm dlouhými nebo oválnými nebo nepravidelnými kotoučky. Lom je světlý, silně vláknitý.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: četná vlákna lýka nebo jejich úlomky, obvykle jednotlivá, úzká, někdy více než 500 µm dlouhá, často se ztlustlými stěnami; drúzy šřavelanu vápenatého buď samostatně, nebo uvnitř parenchymatických buněk; nepřilíší četné síťovité ztlustlé cévy; vzácně úlomky korku. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná jednoduchá okrouhlá nebo vejčítá škrobová zrna o průměru až 30 µm jednotlivá nebo dvoučetná až čtyřčetná. Některá škrobová zrna jsou uložena v buňkách parenchymu nebo v buňkách dřevných paprsků.

## C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** Ke 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 50 ml vody R a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se roztok odstředí 10 min. Supernatantní tekutina se protřepává dvakrát 15 ml diisopropyletheru R nasyceného kyselinou chlorovodíkovou R. Spojené etherové vrstvy se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 1,0 ml methanolu R. Zfiltruje se polypropylenovou stříkačkou s filtrem (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok.** 5 mg kyseliny gallové R a 20 mg resorcinolu R se rozpustí ve 20 ml methanolu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R (5 µm až 40 µm) nebo deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R (2 µm až 10 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, ethyl-acetátu R a toluenu R (10 + 30 + 60).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 4 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zhášející skvrny.

Horní okraj desky	
	zhášející skvrna
resorcinol: zhášející skvrna	zhášející skvrna
kyselina gallová: zhášející skvrna	zhášející skvrna (kyselina gallová) zhášející skvrna zhášející skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**Detekce B.** Vrstva se postříká roztokem oxidu železitého R (10 g/l) v ethanolu bezvodém R a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení B.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
resorcinol: hnědá skvrna	černomodrá skvrna
kyselina gallová: černomodrá skvrna	černomodrá skvrna (kyselina gallová) černomodrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tríslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,500 g práškové drogy (180) (2.9.12).

## SCHISANDRAE CHINENSIS FRUCTUS

6.3:2428

## Plod magnolky čínské

## DEFINICE

Je to celý usušený nebo spařený a usušený zralý plod druhu *Schisandra chinensis* (TURCZ.) BAILL.

**Obsah.** Nejméně 0,40 % schisandrinu (C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>; M<sub>r</sub> 432,5), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Bobule jsou více nebo méně okrouhlé o průměru až 8 mm; na svrchní straně červené, červenohnědé nebo načernalé, někdy bíle ojměné; perikarp je silně scvrklý s jedním až dvěma ledvinovitými žlutohnědými lesklými semeny s tenkým osemením.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu R<sub>S</sub>. Droga je charakteristická těmito znaky: červenohnědé úlomky perikarpu, tvořené jednou vrstvou tenkostěnných buněk epikarpu provázených roztroušenými olejovými buňkami a několika vrstvami vejčitých, více nebo méně zploštělých buněk mezokarpu; úlomky zevní vrstvy osemení obsahující ztlustlé, jemně žlábkované sklereidy z plošného pohledu mnohohranné o průměru 15 µm až 50 µm, v příčném pohledu jsou palisádovitě upořádané; úlomky vnitřní vrstvy osemení se sklereidami jednotlivými nebo v malých skupinách o průměru asi 80 µm, s lehce ztlustlými, zřetelně žlábkovitými stěnami; úlomky endospermu z mnohohranných buněk, obsahujících kapky oleje a aleuronová zrna. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku glycerolu R 50% (V/V). Jsou patrné parenchymatické buňky mezokarpu obsahující četná malá kulovitá škrobová zrna.

- C.** Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu *Schisandra sphenanthera*.

**Hodnocení A.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny slabě zhášející fluorescenci.

Horní okraj desky	
$\gamma$ -schisandrin: skvrna zhášeující fluorescenci	skvrna zhášeující fluorescenci ( $\gamma$ -schisandrin)
_____	_____
_____	skvrna slabě zhášeující fluorescenci
_____	_____
schisandrin: skvrna zhášeující fluorescenci	skvrna zhášeující fluorescenci (schisandrin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
$\gamma$ -schisandrin: hnědá skvrna	hnědá skvrna ( $\gamma$ -schisandrin)
_____	_____
_____	_____
schisandrin: intenzivní hnědozelená skvrna	intenzivní hnědozelená skvrna (schisandrin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Schisandra sphenanthera.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 2,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá 10 ml *methanolu R*. Extrahuje se 5 min v ultrazvukové lázni při 25 °C a odstředí se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *schisandrinu R* a 5 mg  $\gamma$ -*schisandrinu R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254} R$  pro TLC (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC  $R$  (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (2 + 22 + 46).

*Nanášení.* 5  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l], do proužků 10 mm [nebo 6 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 7 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se ultrafialovém světle při 254 nm.

*Detekce B.* Vrstva se postříká roztokem *kyseliny sírové R* (100 g/l) v *methanolu R* a suší se 7 min v sušárně při 120 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná skvrna *schisandrinu* a  $\gamma$ -*schisandrinu*; na chromatogramu zkoušeného roztoku není ve střední třetině intenzivní fialovorůžová skvrna.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,250 g práškové drogy (355) (2.9.12) se 250 ml kuželové baňce smíchá s 90 ml *methanolu R* a působí se ultrazvukem 30 min při 25 °C. Zfiltruje se do odměrné baňky, filtr se promyje 10 ml *methanolu R* a spojené tekutiny se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 5,0 mg *schisandrinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami  $R$  (5  $\mu$ m);

– *teplota* 25 °C.

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (35 + 65).

– *mobilní fáze B:* *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–10	100	0
10–16	100 → 58	0 → 42
16–26	58	42

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 250 nm.

*Nástřik.* 10  $\mu$ l.

*Retenční čas.* *Schisandrin* asi 8 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *počet teoretických pater:* nejméně 5 000 počítáno pro pík *schisandrinu*.

Obsah *schisandrinu* ( $C_{24}H_{32}O_7$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku *schisandrinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku *schisandrinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použitá pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *schisandrinu R* použitá pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah *schisandrinu* ve *schisandrinu R* v procentech.

## SCUTELLARIAE RADIX

7.1:2438

## Šišákový kořen

*Synonymum.* Scutellariae baicalensis radix

## DEFINICE

Je to usušený loupáný, obvykle rozlámaný kořen druhu *Scutellaria baicalensis* GEORGI, bez postranních kořínků. Sbírá se na jaře nebo na podzim.

*Obsah.* Nejméně 9,0 % bajkalinu ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ;  $M_r$  446,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Kořen je kuželovitý, pokroucený, a pokud není zkrácen, je 8 cm až 25 cm dlouhý, o průměru 1 cm až 3 cm. Svrchní strana je hnědavě žlutá nebo tmavě žlutá, s roztroušenými bradavčitými jizvami po kořincích, horní část kořene je hrubá, se zkroucenými podélnými rýhami nebo nepravidelně síťovitá, spodní část podlouhle zvrášená, jemně rýhovaná. Kořen je tvrdý a křehký, snadno se láme, lom žlutý, uprostřed červenohnědý; střední část starých kořenů je tmavě hnědá nebo hnědo černá, sešlá nebo dutá.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutý nebo světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: lýková vlákna jednotlivá nebo ve svazcích, větvenitá, 60  $\mu$ m až 250  $\mu$ m dlouhá, o průměru 9  $\mu$ m až 33  $\mu$ m se silnými žlábkovitými stěnami; kamenné buňky téměř okrouhlé, téměř čtvercové nebo obdélníkovité, s mírně nebo silně ztlustlými stěnami; buňky korku hnědožluté, mnohohranné; četné síťovitě ztlustlé cévy o průměru 24  $\mu$ m až 72  $\mu$ m; zdřevnatělá vlákna často rozlámaná, o průměru asi 12  $\mu$ m, s roztroušenými šikmými dvůrky. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná četná škrobová zrna, jednoduchá, kulovitá o průměru 2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m, hilum zřetelné; složená zrna jsou dvoučetná až tříčetná.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 1 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml *methanolu R* a vloží se do ultrazvukové lázně na 10 min. Odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *bajkalinu R* a 1 mg *verbaskosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové RS*, *kyseliny mravenčí R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (1 + 1 + 2 + 15).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l, do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 6 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Deska se 3 min zahřívá při 100 °C až 105 °C, postříká se roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*, potom se postříká roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, nechá se 30 min sušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé modře fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	tři až čtyři fluoreskující skvrny
	dvě fluoreskující skvrny
verbaskosid: modře fluoreskující skvrna	intenzivní modře fluoreskující skvrna modře fluoreskující skvrna
bajkalin: černá skvrna	černá skvrna
	slabá žlutě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %. 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* K 0,300 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 40 ml *ethanolu 70% (V/V) R*, zahřívá se 3 h na vodní lázni pod zpětným chladičem, ochladí se a zfiltruje se. Filtrát se převede do 100ml odměrné baňky. Extrakční baňka i zbytek na filtru se promyjí několikrát malým objemem *ethanolu 70% (V/V) R*, promývací tekutiny se zfiltrují do stejné odměrné baňky, zředí se *ethanolem 70% (V/V) R* na 100,0 ml a směs se dobře promíchá. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml a dobře se promíchá.

*Porovnávací roztok (a).* 5,0 mg *bajkalinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* 2 mg *methylparabenu CRL* se rozpustí v *methanolu R*, přidá se 20 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *methanolem R* na 100 ml.

## Kolona:

– *rozměry:* délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m).

## Mobilní fáze:

– *mobilní fáze A:* roztok *kyseliny fosforečné R* 0,1% (V/V);

– *mobilní fáze B:* *acetonitril R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–30	90 → 60	10 → 40

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

*Nástřik.* 10 µl.

*Retenční časy.* Methylparaben asi 15 min; bajkalin asi 16 min.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

– *rozišení:* nejméně 3 mezi píkem methylparabenu a píkem bajkalinu.

Obsah bajkalinu v procentech se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\frac{m_2 \cdot S_1 \cdot 10 \cdot p}{S_2 \cdot m_1},$$

v němž značí:

$m_1$  – hmotnost rostlinné drogy v gramech;

$m_2$  – hmotnost bajkalinu použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

$S_1$  – plochu píku bajkalinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$S_2$  – plochu píku bajkalinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$p$  – obsah bajkalinu v *bajkalinu CRL* v procentech.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## SENNAE ACUTIFOLIAE FRUCTUS

6.0:0207

### Plod kassie ostrolisté

*Synonymum.* Sennae fructus acutifoliae

#### DEFINICE

Je to usušený plod druhu *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* DELILE) známého jako Alexandrijská senna.

*Obsah.* Nejméně 3,4 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B ( $C_{42}H_{38}O_{20}$ ;  $M_r$  863), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má slabý pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Ploché ledvinovité lusky, zelené nebo zelenohnědé s hnědými skvrnami odpovídajícími poloze semen, zpravidla 40 mm až 50 mm dlouhé a nejméně 20 mm široké. Jsou výrazně zašpičatělé, krátce stopkaté. Lusky obsahují šest až sedm plochých opakvejitých semen, zelených nebo světle hnědých na osemení s uzavřenými síťovitými vyniklými žebry.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: oplodí s mnohohrannými buňkami a malým množstvím kuželovitých, na povrchu bradavčitých chlupů, občas s anomocytickými nebo paracytickými průduchy (2.8.3); dvě vrstvy zkřížených vláken obklopených komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého;

charakteristické palisádové buňky semene a vrstevnaté buňky endospermu; drúzy a krystaly šťavelanu vápenatého.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (180) (2.9.12) se zahřeje k varu s 5 ml směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R*. Směs se odstředí a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *sennového extraktu CRL* se rozpustí v 1 ml směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment).

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové R*, *vody R*, *ethyl-acetátu R* a *propan-1-olu R* (1 + 30 + 40 + 40).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků (20 mm × 2 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% (V/V) a zahřívá se 10 min při 120 °C, po vychlazení se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *ethanolu 50% (V/V) R* do objevení skvrn.

*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (sennosidy B, A, D a C v pořadí stoupajících hodnot  $R_f$ ), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidů D a C může být patrná červená skvrna odpovídající rheim-8-glukosidu. Skvrny odpovídající sennosidům D a C jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku zbarveny slabě.

**D.** Asi 25 mg práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml *etheru R*. Etherová vrstva se oddělí a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R*. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychlazení smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1*; vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.* 0,150 g práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá ve 100 ml baňce se 30,0 ml *vody R*. Baňka se zváží a zahřívá se 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zváží se a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost *vodou R*. Odstředí se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepe se třikrát

15 ml *chloroformu R*. Chloroformová vrstva se vždy odstraní. Přidá se 0,10 g *hydrogenuhlčitanu sodného R*, 3 min se protřepává, pak se odstředí. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a znovu se zahřívá 20 min za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, předem použitého k promytí baňky. Tři etherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml *vody R*. Etherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Měří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B má hodnotu 240.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## SENNAE ANGUSTIFOLIAE FRUCTUS

6.0:0208

### Plod kassie úzkolisté

*Synonymum*. *Sennae fructus angustifoliae*

#### DEFINICE

Je to usušený plod druhu *Cassia angustifolia* VAHL známého jako Tinnevelly senna.

*Obsah*. Nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B (C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>; M<sub>r</sub> 863), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga slabého pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Ploché nevýrazně ledvinovité lusky, žlutohnědé nebo hnědé, s tmavohnědými skvrnami odpovídajícími poloze semen, zpravidla 35 mm až 60 mm dlouhé a 14 mm až 18 mm široké. Jsou výrazně zašpičatělé, krátce stopkaté. Lusky obsahují pět až osm plochých, opak vejčitých semen, zelených nebo světle hnědých, na osemení s nespojitými vlnitými příčnými žebry.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práš-

kovaná droga je charakteristická těmito znaky: oplodí s mnohohrannými buňkami a malým počtem kuželovitých, na povrchu bradavčitých chlupů a občas i anomocytickými nebo paracytickými průduchy (2.8.3); dvě vrstvy zkřížených vláken obklopené vrstvou komůrkových vláken s krystaly šřavelanu vápenatého; charakteristické palisádové buňky semene a vrstevnaté buňky endospermu; drůzy a krystaly šřavelanu vápenatého.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 0,5 g práškované drogy (180) (2.9.12) se zahřeje k varu s 5 ml směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R*. Směs se odstředí a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok*. 10 mg *sennového extraktu CRL* se rozpustí v 1 ml směsí stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment).

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *ethyl-acetátu R* a *propan-1-olu R* (1 + 30 + 40 + 40).

*Nanášení*. 10 µl, do proužků (20 mm × 2 mm).

*Vyjvíjení*. Po dráze 10 cm.

*Sušení*. Na vzduchu.

*Detekce*. Postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% (V/V) a zahřívá se 10 min při 120 °C, nechá se ochladit a postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *ethanolu 50% (V/V) R* do objevení skvrn.

*Hodnocení*. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (sennosidy B, A, D a C v pořadí stoupajících hodnot R<sub>F</sub>), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidů D a C může být patrná červená skvrna odpovídající rhein-8-glukosidu. Skvrny odpovídající sennosidům D a C jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku zbarveny slabě.

**D.** Asi 25 mg práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml *etheru R*. Etherová vrstva se oddělí a vysuší nad *síranem sodným bezvodým R*. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1*; vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vznikne červenofialové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 1 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem*. 0,150 g práškované drogy (180) (2.9.12) se smíchá ve 100ml baňce se 30,0 ml *vody R*. Baňka se zváží a zahřívá se



15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zváží se a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost vodou R. Odstředí se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a protřepe se třikrát 15 ml chloroformu R. Chloroformová vrstva se vždy odstraní. Přidá se 0,10 g hydrogenuhličitanu sodného R, 3 min se protřepává, pak se odstředí. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem se zabroušeným hrdlem, přidá se 20 ml chloridu železitého RS1 a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml kyseliny chlorovodíkové R a znovu se zahřívá 20 min za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml etheru R, předem použitého k promytí baňky. Tři etherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml vody R. Etherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se etherem R na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku octanu hořečnatého R (5 g/l) v methanolu R.

Měří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití methanolu R jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 515 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B má hodnotu 240.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## SENNAE FOLII EXTRACTUM SICCCUM NORMATUM

6.3:1261

Sennový extrakt suchý standardizovaný

CAS 8055-96-7

#### DEFINICE

Je to suchý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Sennae folium* (0206).

Obsah. 5,5 % až 8,0 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B (C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>; M<sub>r</sub> 863), počítáno na vysušený extrakt. Zjištěný obsah se neliší od obsahu uvedeného v označení na obalu o více než ±10 %.

#### VÝROBA

Vyrábí se z drogy a ethanolu 50% (V/V) až 80% (V/V) vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

Vzhled. Nahnědlý nebo hnědý prášek.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

##### A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Rozpouštěcí směs.* Směs stejných objemových dílů ethanolu 96% R a vody R.

*Zkoušený roztok.* 0,1 g se smíchá s 5 ml rozpouštěcí směsi a zahřeje se k varu. Ochladí a odstředí se a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 10 mg sennového extraktu CRL se rozpustí v 1 ml rozpouštěcí směsi (roztok obsahuje malý sediment).

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, vody R, ethyl-acetátu R a propan-1-olu R (1 + 30 + 40 + 40).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem kyseliny dusičné R 20% (V/V) a zahřívá se 10 min při 120 °C, nechá se ochladit a postříká se roztokem hydroxidu draselného R (50 g/l) v ethanolu 50% (V/V) R do objevení skvrn.

*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. V dolní třetině chromatogramů je nápadná hnědá skvrna odpovídající sennosidu B, nad ní žlutá skvrna následovaná další nápadnou hnědou skvrnou odpovídající sennosidu A. V horní polovině chromatogramů jsou v pořadí vzestupné hodnoty R<sub>F</sub>: nápadná červenohnědá skvrna a oranžovohnědá skvrna následovaná světle růžovou skvrnou a dvěma žlutými skvrnami. Na čele mobilní fáze je tmavě růžová skvrna, která může být následována několika nevýraznými skvrnami.

**B.** Asi 25 mg se v kuželové baňce smíchá s 50 ml vody R a s 2 ml kyseliny chlorovodíkové R a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml etheru R, etherová vrstva se oddělí a vysuší se nad síranem sodným bezvodým R, 5 ml roztoku se odpaří do sucha a vychladlý odparek se smíchá s 5 ml amoniaku zředěného RS1; vznikne žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 5,0 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>4</sup> CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>2</sup> CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,150 g zkoušeného extraktu se ve 100ml baňce rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 100,0 ml. Roztok se zfiltruje a prvních 10 ml filtrátu se odstraní. 20,0 ml filtrátu se převede do 150ml dělicí nálevky, smíchá se s 0,1 ml kyseliny chlorovo-

*dikové zředěné RS* a protřepává se třikrát 15 ml *etheru R*. Etherová vrstva se odstraní, přidá se 0,10 g *hydrogenuhlčitanu sodného R* a 3 min se protřepává. Odstředí se a 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a směs se promíchá. Zahřívá se 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 30 min za častého protřepávání do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepává se třikrát 25 ml *etheru R* předem použitého k promytí baňky. Etherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml *vody R*. Etherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5,0 g/l) v *methanolu R*. Měří se absorbance v maximu (2.2.25) při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 4,167}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 515 nm;

*m* – hmotnost zkoušeného přípravku v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B má hodnotu 240.

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede obsah hydroxyanthracenových glykosidů.

# SENNAE FOLIUM

6.0:0206

## Sennový list

### DEFINICE

Jsou to usušené lístky druhu *Cassia senna* L. (*Cassia acutifolia* DELILE) známého jako Alexandrijská nebo Chartúm senna nebo druhu *Cassia angustifolia* VAHL známého jako Tinnevely senna, nebo směs obou druhů.

*Obsah.* Nejméně 2,5 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B (C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>; *M<sub>r</sub>* 863), počítáno na vysušenou drogu.

### VLASTNOSTI

Droga slabého charakteristického pachu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** *C. senna* se vyskytuje jako šedozeleň nebo hnědozeleň, tenké, křehké lístky, kopinaté, ostnitě zašpičatělé, na bázi nesouměrné, obvykle 15 mm až 40 mm dlouhé a 5 mm až 15 mm široké. List je nejširší pod střední částí. Čepel listku je slabě vlnitá, na obou stranách s jemnými, krátkými chlupy. Zpeřená žilnatina je patrná zejména na spodní straně. Postranní žilky svírají s hlavní žilkou úhel asi 60°, na okraji čepel anastomozují.

*Stomatální index* (2.8.3). 10-12,5-15.

*C. angustifolia* se vyskytuje jako žlutozeleň nebo hnědozeleň lístky, protáhle kopinaté, na bázi poněkud nesouměrné, zpravidla 20 mm až 50 mm dlouhé a ve střední části 7 mm až 20 mm široké s roztroušenými krátkými chlupy na obou stranách, často s výraznými příčnými nebo šikmými pruhy.

*Stomatální index* (2.8.3). 14-17,5-20.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle zelený nebo zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: mnohohranné buňky pokožky s paracytickými průduchy (2.8.3); jednobuněčné kuželovité na povrchu bradavčité chlupy jednotlivě nebo spolu s úlomky pokožky; úlomky svazků cévních provázaných komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; drúzy šťavelanu vápenatého jednotlivě nebo v úlomcích parenchymu.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškováná droga (180) (2.9.12) se zahřeje k varu s 5 ml směsi stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R*. Směs se odstředí a použije se supernatantní tekutina.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *sennového extraktu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *ethanolu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment). *Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *ethyl-acetátu R* a *propan-1-olu R* (1 + 30 + 40 + 40).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků (20 mm × 2 mm).

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% (V/V) a zahřívá se 10 min při 120 °C, nechá se ochladit a postříká se roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *ethanolu 50% (V/V) R* do objevení skvrn.

*Hodnocení.* Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (sennosidy B, A, D a C v pořadí stoupajících hodnot *R<sub>F</sub>*), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidů D a C může být patrná červená skvrna odpovídající rein-8-glukosidu.

**D.** Asi 25 mg práškováná droga (180) (2.9.12) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml *etheru R*. Etherová vrstva se oddělí a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R*. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1*; vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 % cizích orgánů a nejvýše 1 % cizích částí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškováná droga (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).  
Nejvýše 2,5 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem.*

0,150 g práškové drogy (180) (2.9.12) se smíchá v 100 ml baňce se 30,0 ml vody R. Baňka se zváží a zahřívá se 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zváží se a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost vodou R. Odstředí se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS a protřepe se třikrát 15 ml chloroformu R. Chloroformová vrstva se po oddělení vždy odstraní. Přidá se 0,10 g hydrogenuhličitanu sodného R, 3 min se protřepává, pak se odstředí. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100 ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem, přidá se 20 ml chloridu železitého RS1 a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml kyseliny chlorovodíkové R a znovu se zahřívá 20 min ve vodní lázni za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml etheru R, předem použitého k promytí baňky. Tři etherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml vody R. Etherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se etherem R na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku octanu hořečnatého R (5 g/l) v methanolu R. Měří se absorbance (2.2.25) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití methanolu R jako kontrolní tekutiny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B, podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m},$$

v němž značí:

A – absorbanci při 515 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B má hodnotu 240.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## SERENOAE FRUCTUS

### Serenový plod

7.5:1848

*Synonymum.* Sabalis serrulatae fructus

Je to usušený zralý plod druhu *Serenoa repens* (W. BAR-TRAM) SMALL [synonymum: *Sabal serrulata* (MICHOUX) T. NUTTAL ex SCHULTES et SCHULTES].

*Obsah.* Nejméně 11,0 % celkových mastných kyselin, počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

*Pach.* Intenzivní, ne však žluklý.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: A, B a D.

2.: A, B a C.

**A.** Plod je vejčitá až téměř kulovitá peckovice, délky až 2,5 cm a průměru 1,5 cm, na povrchu tmavohnědá až načernalá, silně svraskalá, více nebo méně měděně lesklá. Na horním konci plodu jsou někdy zbytky čnělky a trubkovitého třícípého kalicha, na bázi plodu je často malá prohloubenina s jizvou po stopce. Oplodí (epikarp) a pod ním ležící mezokarp jsou tvořeny tenkou křehkou vrstvou, která se částečně odlupuje a odkrývá tak tenký, tvrdý, světle hnědý, vláknitý a snadno oddělitelný endokarp. Semeno je nepravidelně kulovité až vejčité, až 12 mm dlouhé, o průměru 8 mm, na povrchu tvrdé, hladké nebo jemně tečkované, červenohnědé, v oblasti švu a otvoru klového je světlejší, blanité a mírně vyvýšené; na příčném řezu semenem je patrné tenké osemení, úzký perisperm a velká plocha kompaktního, rohovitěho, šedobílého endospermu s excentricky umístěným zárodkem.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Droga se upráškuje (710) (2.9.12). Prášek je načervenalý nebo černohnědý a olejovitý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky epikarpu složené z několika vrstev tenkostěnných, červenohnědých, mnohohranných buněk (10 μm až 40 μm), které obsahují pigment a jsou silně kutinizované; buňky zevní vrstvy jsou výrazně menší než buňky vnitřních vrstev. Parenchymatické buňky mezokarpu mohou být velké a naplněné kapkami oleje, nebo menší obsahující hrudky oxidu křemičitého. Skupiny dřeva mezokarpu s malými, dřevnatělými, kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlými cévami. Kamenné buňky mezokarpu (20 μm až 200 μm) mohou být rozptýlené, většinou jednotlivě, někdy v malých skupinkách, stěny buněk jsou mírně ztlustlé, zřetelně proužkované a jemně tečkované; úlomky endokarpu obsahují skupiny protáhlých sklereid asi 300 μm dlouhých, se silně ztlustlými stěnami a četnými tečkami. Osemení složené z malých tenkostěnných buněk s nahnědlým obsahem a pod nimi ležících sklereid; silnostěnný bílek buněk, s velkými nápadnými tečkami, obsahuje aleuronová zrna a zásobní olej.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* K 1,5 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se přidá 20 ml ethanolu 96% R, míchá se 15 min a pak se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 4 mg β-amyrinu R a 10 mg β-sitosterolu R se rozpustí v 10 ml ethanolu 96% R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny octové RS, ethyl-acetátu R a toluenu R (1 + 30 + 70).

*Nanášení.* 10 μl [nebo 2 μl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být, zejména v dolní třetině, další méně výrazné skvrny.

Horní okraj desky	
	intenzivní modrá skvrna
	dvě slabé modré skvrny
β-amyryn: modrá skvrna	intenzivní modrofialová skvrna
β-sitosterol: modrá skvrna	slabá modrá skvrna
	slabá modrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Celkové mastné kyseliny (viz Stanovení obsahu).

*Hodnocení.* Retenční časy píků kyseliny hexanové, oktanové, dekanové, laurové, myristové, palmitolejové, palmitové, linolové, linolenové, olejové a stearové na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b); hlavní píky odpovídají kyselině laurové a olejové.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované rostlinné drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Celkové mastné kyseliny.** Plynová chromatografie (2.2.28). *Roztok vnitřního standardu.* 0,47 g *methyl-margarátu R* se rozpustí ve 20,0 ml *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

*Zkoušený roztok.* 50 g rostlinné drogy se upráškuje (200) (2.9.12). 4,00 g práškované rostlinné drogy se dispergují v 60 ml *dimethylformamidu R*, vloží se na 15 min do ultrazvukové lázně a pak se 30 min třepe. Zředí se *dimethylformamidem R* na 100,0 ml, nechá se několik minut stát a zfiltruje se. Ke 20,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dimethylformamidem R* na 25,0 ml. 0,4 ml tohoto roztoku se smíchají s 0,6 ml roztoku *trimethylsulfonium-hydroxidu R* (18,84 g/l) v *methanolu R*.

*Porovnávací roztok (a).* 0,699 g *kyseliny laurové CRL* a 0,870 g *kyseliny olejové CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dimethylformamidem R* na 25,0 ml. 0,4 ml tohoto

roztoku se smíchají s 0,6 ml roztoku *trimethylsulfonium-hydroxidu R* (18,84 g/l) v *methanolu R*.

*Porovnávací roztok (b).* 0,25 g extraktu ze *serenového plodu HRL* se disperguje v 10 ml *dimethylformamidu R*, přidají se 4,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dimethylformamidem R* na 25,0 ml. 0,4 ml tohoto roztoku se smíchají s 0,6 ml roztoku *trimethylsulfonium-hydroxidu R* (18,84 g/l) v *methanolu R*.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 25 m, vnitřní průměr 0,20 mm;
- *stacionární fáze:* *polydimethylsiloxan R* (tloušťka filmu 0,33 μm).

*Nosný plyn.* *Helium pro chromatografii R*.

*Průtoková rychlost.* 0,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 40.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–2	150
	2–7	150 → 190
	7–12	190
	12–22	190 → 220
	22–32	220
nástříkový prostor		300
detektor		300

*Detekce.* Plamenionizační detektor.

*Nástřík.* 1 μl.

*Identifikace píků.* K identifikaci píků kyseliny hexanové, oktanové, dekanové, laurové, myristové, palmitolejové, palmitové, linolové, linolenové, olejové, stearové a methylmargarátu se použije chromatogram dodávaný s *extraktem ze serenového plodu HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku (b).

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (b):

- *poměr výšky píku k sedlu:* nejméně 1,2, kde  $H_p$  je výška píku kyseliny linolenové nad základní linií a  $H_v$  je výška nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku kyseliny linolové nad základní linií.

Obsah celkových mastných kyselin v procentech, kde kyseliny hexanová, oktanová, dekanová, laurová, myristová, palmitolejová, palmitová a stearová jsou vyjádřeny jako kyselina laurová ( $C_{12}H_{24}O_2$ ;  $M_r$  200,3) a kyseliny linolová, linolenová a olejová jsou vyjádřeny jako kyselina olejová ( $C_{18}H_{34}O_2$ ;  $M_r$  282,5) se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot A_4 \cdot m_2 \cdot p_1 \cdot 0,5}{A_2 \cdot A_3 \cdot m_1} + \frac{A_5 \cdot A_4 \cdot m_3 \cdot p_2 \cdot 0,5}{A_6 \cdot A_3 \cdot m_1},$$

v němž značí:

- $A_1$  – součet ploch píků kyseliny hexanové, oktanové, dekanové, laurové, myristové, palmitolejové, palmitové a stearové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny laurové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

- $A_3$  – plochu píku methyl-margarátu na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_4$  – plochu píku methyl-margarátu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);  
 $A_5$  – součet ploch piků kyseliny linolové, linolenové a olejové na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_6$  – plochu píku kyseliny olejové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);  
 $m_1$  – hmotnost rostlinné drogy použité pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost *kyseliny laurové CRL* použité pro přípravu porovnávacího roztoku (a) v gramech;  
 $m_3$  – hmotnost *kyseliny olejové CRL* použité pro přípravu porovnávacího roztoku (a) v gramech;  
 $p_1$  – obsah kyseliny laurové v *kyselině laurové CRL* v procentech;  
 $p_2$  – obsah kyseliny olejové v *kyselině olejové CRL* v procentech.

## SERPYPYLLI HERBA

6.0:1891

### Mateřídoušková nať

*Synonymum.* Nať mateřídoušky

#### DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Thymus serpyllum* L. *sensu lato*.

*Obsah.* Nejméně 3,0 ml silice v 1 kilogramu drogy, počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha bohatě větvená, o průměru až asi 1,5 mm, válcovitá nebo nezřetelně čtyřhranná, zelená, červeně nebo červenofialově naběhlá, starší lodyhy jsou hnědé, dřevnaté, mladší lodyhy jsou ochmýřené. Listy vstřícné 3 mm až 12 mm dlouhé a až 4 mm široké, oválné až vejčité kopinaté, na konci tupé, na bázi zašpičatělé, krátce řapíkaté; čepel listu celokrajná, zřetelně brvitá, zejména na bázi; list na obou stranách téměř lysý, zřetelně tečkovaný. Květenství je složeno z asi šesti až dvanácti květů v okrouhlé až vejčité koncové hlávce. Kalich je kuželovitý, dvoupyský, horní pysk třízubý, dolní dvouzubý, ukončený dlouhými chlupy. Vnitřní strana kalicha je hustě chlupatá, chlupy tvoří po odkvětu uzavřenou trubku. Koruna je červenofialová až červená, dvoupyská, spodní pysk se třemi cípy, horní pysk vrubkovitý, na vnitřní straně silně chlupatý; čtyři zákorunní tyčinky vyčnívají z koruny.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedo-zelený až hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky listu z buněk se stěnami zprohýbanými, mírně ztlustlými a průduchy diacytického typu (2.8.3). Četné krycí chlupy na obou stranách listu a na okraji čepele listu; převládají krátké, kuželo-

vité, jednobuněčné krycí chlupy se ztlustlými, bradavčitými stěnami, méně četné jsou dlouhé, jednořadé až osmibuněčné krycí chlupy, na konci lehce zduřelé, se stěnami mírně ztlustlými; četné žláznaté chlupy, většinou mnohobuněčné s malou, okrouhlou jednobuněčnou nohou a velkou kulovitou hlavičkou složenou z četných, nezřetelně paprscitých buněk, obsahujících hnědý sekret, nebo menších hlavičkovitých chlupů s jednobuněčnou nohou a jednobuněčnou kulovitou nebo vejčitou hlavičkou; červenofialové úlomky koruny s pokožkou na svrchní straně s četnými krycími a žláznatými chlupy, vnitřní pokožka je papilózní; pylová zrna okrouhlá až oválná, o průměru 30 μm až 40 μm, s jemně zrnitou exinou a šesti klíčovými póry.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *dichlormethanu R* a protřepává se 3 min. Zfiltruje se přes asi 2 g *síranu sodného bezvodého R*.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *thymolu R* a 10 μl *karvakrolu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* *Dichlormethan R*.

*Nanášení.* 20 μl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Viz níže uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
thymol: skvrna žhášející fluorescenci	výrazná skvrna žhášející fluorescenci skvrna žhášející fluorescenci (thymol)
	skvrny žhášející fluorescenci
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se *anisaldehydem RS* (10 ml na desku o délce strany 200 mm) a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině další skvrny. Intenzita skvrn thymolu a karvakrolu na chromatogramu zkoušeného vzorku závisí na zkoušeném vzorku drogy (chemotypu).

Horní okraj desky	
thymol: hnědorůžová skvrna karvakrol: světle fialová skvrna	hnědorůžová skvrna (thymol) světle fialová skvrna (karvakrol)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %; použije se 30 g drogy. Cizí příměsi mohou obsahovat jehlicovité až čárkovitě kopinaté listy se silně ohnutým okrajem, svrchní strana s krycími chlupy tvaru zubu s bradavčitými stěnami, spodní strana s četnými typy bradavčitých krycích chlupů; jednobuněčné, rovné nebo lehce ohnuté, dvoubuněčné nebo tříbuněčné, často kolenovitě ohnuté a dvoubuněčné nebo tříbuněčné, více nebo méně rovné (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškováné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12). Použije se 50,0 g řezané drogy, 1000ml baňka s kulatým dnem, 500 ml vody R jako destilační tekutiny. Destiluje se rychlostí 2 ml až 3 ml/min po dobu 2 h bez přídavku xylenu R v dělené trubici.

## SILYBI MARIANI EXTRACTUM SICCCUM RAFFINATUM ET NORMATUM

6.0:2071

Ostropestřecový extrakt suchý čištěný a standardizovaný

## DEFINICE

Je to suchý čištěný a standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Silybi mariani fructus* (1860).

**Obsah.** 90 % až 110 % jmenovitého obsahu silymarinu, vyjádřeno jako silibinin ( $C_{25}H_{22}O_{10}$ ;  $M_r$  482,4), uvedeného v označení na obalu. Počítáno na vysušený extrakt, je jmenovitý obsah silymarinu 30 % až 65 %.

Obsah silymarinu zahrnuje:

- součet obsahů silikristinu a silidianinu (oba  $C_{25}H_{22}O_{10}$ ;  $M_r$  482,4): 20 % až 45 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu;
- součet obsahů silibininu A a silibininu B (oba  $C_{25}H_{22}O_{10}$ ;  $M_r$  482,4): 40 % až 65 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu;
- součet obsahů isosilibininu A a isosilibininu B (oba  $C_{25}H_{22}O_{10}$ ;  $M_r$  482,4): 10 % až 20 %, vztaženo k celkovému obsahu silymarinu.

## VÝROBA

Vyrábí se z rostlinné drogy vhodným postupem za použití jednoho nebo více dále uvedených rozpouštědel:

- ethyl-acetát;
- aceton nebo směs acetonu s vodou;
- ethanol nebo směs ethanolu s vodou;
- methanol nebo směs methanolu s vodou.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutohnědý amorfni prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,250 g se rozpustí v 5 ml methanolu R.

*Porovnávací roztok.* 2 mg silibininu R a 5 mg taxifolinu R se rozpustí v 10 ml methanolu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, acetonu R a dichlormethanu R (8,5 + 16,5 + 75).

*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 8  $\mu$ l] zkoušeného roztoku a 10  $\mu$ l [nebo 2  $\mu$ l] porovnávacího roztoku; do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Deska se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R, nechá se asi 30 min sušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další žlutozeleně fluoreskující skvrny v poloze vymezené skvrnami silibininu a taxifolinu.

Horní okraj desky	
silibinin: žlutozeleně fluoreskující skvrna	žlutozeleně fluoreskující skvrna (silibinin)
taxifolin: oranžově fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna (taxifolin) žlutozeleně fluoreskující skvrna
	fluoreskující skvrna (start)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením u extraktů** (2.8.17). Nejvýše 5,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 60,0 mg se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok.* Množství ostropestřecového extraktu suchého standardizovaného CRL odpovídající 10,0 mg silibininu ( $m_1$  g) se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 100,0 ml.

**Kolona:**

- *rozměry*: délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze*: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

**Mobilní fáze:**

- *mobilní fáze A*: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a vody R (0,5 + 35 + 65);
- *mobilní fáze B*: směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, methanolu R a vody R (0,5 + 50 + 50).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–28	100 → 0	0 → 100
28–35	0	100
35–36	0 → 100	100 → 0
36–51	100	0

*Průtoková rychlost*. 0,8 ml/min.

*Detekce*. Spektrofotometrický detektor, 288 nm.

*Nástrik*. 10 µl.

*Retenční čas*. Silibinin B asi 30 min; je-li třeba, upraví se časový průběh gradientu.

*Test způsobilosti*, porovnávací roztok:

- *rozlíšení*: nejméně 1,8 mezi píkem silibininu A a píkem silibininu B.
- chromatogram porovnávacího roztoku odpovídá chromatogramu dodávanému s *ostropěstřecovým extraktem suchým standardizovaným CRL*.

K identifikaci píků silikristinu, silidianinu, silibininu A, silibininu B, isosilibininu A a isosilibininu B se použije chromatogram dodávaný s *ostropěstřecovým extraktem suchým standardizovaným CRL*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se pík silidianinu může lišit velikostí, nebo může chybět.

Celkový obsah silymarinu v procentech, počítáno jako silibinin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6) \cdot m_1}{(F_7 + F_8) \cdot m_2}$$

Součet obsahů silikristinu a silidianinu v procentech, vztaženo k celkovému silymarinu, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_1 + F_2) \cdot 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

Součet obsahů silibininu A a silibininu B v procentech, vztaženo k celkovému silymarinu, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_3 + F_4) \cdot 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

Součet obsahů isosilibininu A a isosilibininu B v procentech, vztaženo k celkovému silymarinu, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(F_5 + F_6) \cdot 100}{F_1 + F_2 + F_3 + F_4 + F_5 + F_6}$$

v nichž značí:

$F_1$  – plochu píku silikristinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku silidianinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_3$  – plochu píku silibininu A na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_4$  – plochu píku silibininu B na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_5$  – plochu píku isosilibininu A na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_6$  – plochu píku isosilibininu B na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_7$  – plochu píku silibininu A na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$F_8$  – plochu píku silibininu B na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost silibininu v porovnávacím roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost zkoušeného extraktu v gramech.

## SILYBI MARIANI FRUCTUS

6.0:1860

## Plod ostropěstřece mariánského

## DEFINICE

Je to chmýru zbařený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) GAERTN.

*Obsah*. Nejméně 1,5 % silymarinu, vyjádřeno jako silibinin ( $C_{25}H_{22}O_{10}$ ;  $M_r$  482,4), počítáno na vysušenou drogu.

## VLASTNOSTI

Droga nemá žluklý pach.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Podlouhle vejčité, silně zmáčklé nažky asi 6 mm až 8 mm dlouhé a 3 mm široké a 1,5 mm silné; svrchní strana je hladká, lesklá, základní barva je šedá nebo světle hnědá s podélným tmavohnědým žiháním, celková barva je světle našedlá nebo hnědá; nažka je naspodu zúžená, nahoře má lesklý světle žlutý asi 1 mm vysoký vyčnívající kruhový okraj, který uzavírá zbytek čnělky. Na příčném řezu je patrné úzké hnědé oplodí a dvě velké bílé silné olejnaté dělohy.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je hnědožlutý s tmavšími skvrnami. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky oplodí z bezbarvých, v plošném pohledu mnohohranných buněk, lumen tvoří v závislosti na poloze buď dosti velké, nebo malé štěrby; skupiny parenchymatických buněk pigmentové vrstvy, některé z nich obsahují jasně červeně zbarvenou hmotu; velmi početné skupiny velkých sklereid z osemení, s jasně žlutými tečkovanými stěnami a s úzkým lumenem; občas úlomky parenchymu z drobných buněk s tečkovanými a růžencovitými stěnami; četné tenkostěnné parenchymatické buňky děloh obsahující kapky oleje a roztroušené drúzy šťavelanu vápenatého; málo větších, hranolovitých krystalů šťavelanu vápenatého.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 1,0 g práškové drogy (500) (2.9.12) se přidá 10 ml *methanolu R* a zahřívá se pod zpětným chladičem 5 min ve vodní lázni při 70 °C. Ochladí se a zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *silibininu R* a 5 mg *taxifolinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *acetonu R* a *dichlormethanu R* (8,5 + 16,5 + 75).

**Nanášení.** 30 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku; do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Ještě horká deska se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*, suší se 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny další oranžově a žlutozeleně fluoreskující skvrny mezi skvrnami *silibininu* a *taxifolinu*.

Horní okraj desky	
silibinin: žlutozeleně fluoreskující skvrna	žlutozeleně fluoreskující skvrna ( <i>silibinin</i> )
taxifolin: oranžově fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna ( <i>taxifolin</i> ) žlutozeleně fluoreskující skvrna ( <i>silikristin</i> )
	světle modře fluoreskující skvrna (start)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 8,0 %; 1,000 g práškové drogy (500) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 5,00 g práškové drogy (500) (2.9.12) se v přístroji pro kontinuální extrakci (Soxhletův) extrahuje 8 h se 100 ml *petroletheru R* ve vodní lázni. Po odtučnění se droga usuší při teplotě místnosti a v přístroji pro kontinuální extrakci se 5 h extrahuje 100 ml *methanolu R* ve vodní lázni. Methanolickej extrakt se odpaří ve vakuu na objem asi 30 ml. Zfiltruje se do 50ml odměrné baňky, extrakční baňka a filtr se promyjí *methanolem R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok.** Množství *ostropěstřecového extraktu suchého standardizovaného CRL* odpovídající 5,0 mg *silibi-*

*ninu* ( $m_1$  g) se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *methanolu R* a *vody R* (0,5 + 35 + 65);

– **mobilní fáze B:** směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *methanolu R* a *vody R* (0,5 + 50 + 50).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–28	100 → 0	0 → 100
28–35	0	100
35–36	0 → 100	100 → 0
36–51	100	0

**Průtoková rychlost.** 0,8 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 288 nm.

**Nástřik.** 10 µl.

**Retenční čas.** *Silibinin B* asi 30 min; je-li třeba, upraví se časový průběh gradientu.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

– **rozišení:** nejméně 1,8 mezi píkem *silibininu A* a píkem *silibininu B*;

– získaný chromatogram odpovídá chromatogramu dodávanému s *ostropěstřecovým extraktem suchým standardizovaným CRL*.

K určení píků *silikristinu*, *silidianinu*, *silibininu A*, *silibininu B*, *isosilibininu A* a *isosilibininu B* se použije chromatogram dodávaný s *ostropěstřecovým extraktem suchým standardizovaným CRL*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se pík *silidianinu* může lišit velikostí, může chybět nebo může být přítomen jako hlavní pík. Určí se plocha píků *silikristinu*, *silidianinu*, *silibininu A*, *silibininu B*, *isosilibininu A* a *isosilibininu B*.

Obsah *silymarinu* v procentech, počítáno jako *silibinin*, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \cdot m_1 \cdot p \cdot 1000}{(A_7 + A_8) \cdot m_2 \cdot (100 - d)}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku *silikristinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku *silidianinu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_3$  – plochu píku *silibininu A* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_4$  – plochu píku *silibininu B* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_5$  – plochu píku *isosilibininu A* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_6$  – plochu píku *isosilibininu B* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_7$  – plochu píku *silibininu A* na chromatogramu porovnávacího roztoku;



- $A_8$  – plochu píku silibininu B na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost *ostropetřecového extraktu suchého standardizovaného CRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- $p$  – součet obsahů silibininu A a silibininu B v *ostropetřecovém extraktu suchém standardizovaném CRL* v procentech;
- $d$  – ztrátu sušením u zkoušené drogy v procentech.

## SOLIDAGINIS HERBA

6.0:1892

### Zlatobýlová nat'

#### DEFINICE

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Solidago gigantea* AIT nebo *Solidago canadensis* L., jejich odrůd nebo kříženců a/nebo jejich směsi.

**Obsah.** Nejméně 2,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Stonek je oblý, zelenožlutý nebo zelenohnědý, někdy načervenalý, více nebo méně rýhovaný, v dolní části lysý a hladký nebo jen roztroušeně chlupatý, v horní části jemně nebo hustě chlupatý. Stonek je vyplněn pevnou bílou dřevinou.
- Listy jsou zelené, přisedlé, kopinaté na okraji zubaté, 8 cm až 12 cm dlouhé a asi 1 cm až 3 cm široké, na svrchní straně zelené, lysé nebo roztroušeně chlupaté, na spodní straně šedozeleň a zejména na žilnatině chlupaté. Úbory jsou uspořádány v četných jednostranných ohnutých hroznech, které tvoří koncovou široce kuželovitou latu.
- Zákrovní lístky úboru jsou žlutozelené, čárkovitě kopinaté, střechovitě uspořádané, uzavírají jednu řadu žlutých jazykovitých květů, které jsou přibližně stejně dlouhé jako zákrov; žluté paprskovitě uspořádané trubkovité terčové květy jsou tak dlouhé jako jazykovité květy nebo delší; semeník je spodní, nahnědlý s bílým hedvábným chmýrem.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedozeleň. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: pentlicovitý chmýr a jeho úlomky tvořené mnohořadými chlupy složenými z protáhlých buněk, které svými konci odstávají; úlomky mezofylu listu se svazky cévními prováděnými sekrečními buňkami; úlomky pokožky listu se stěnami zprohýbanými až vlnitě zprohýbanými a průduchy anomocytického typu (2.8.3); jednořadé pětibuněčné nebo šestibuněčné krycí chlupy, některé bičovitě s mírně ztlustlou koncovou buňkou; úlomky blizny s dlouhými štíhlými papilami; úlomky stonku se síťovitě a šroubovitě ztlustlými cévami; pylová zrna, se třemi klíčovými póry a ostnitou exinou; četné metlovité chlupy; zřídka jednotlivé vidlákovité chlupy ze semeníku.

Nejsou přítomny mnohobuněčné chlupy s koncovou buňkou ohnutou do pravého úhlu.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 0,75 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R* a vaří se 10 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Ochladí se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *kvercitrinu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethylacetátu R* (6 + 6 + 18 + 30).

**Nanášení.** 20  $\mu$ l zkoušeného roztoku a 10  $\mu$ l porovnávacího roztoku; do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se stát 30 min. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
kvercitrin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	modrozeleně fluoreskující skvrna slabá až intenzivní žlutohnědě fluoreskující skvrna (kvercitrin) více či méně intenzivní žlutohnědá skvrna
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře a/nebo žlutě fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
rutin: oranžově fluoreskující skvrna	slabá až intenzivní žlutohnědě fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % zhnědlých částí drogy a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10 %; 0,500 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,200 g práškované drogy (250) (2.9.12) se ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, směs se vaří 30 min pod zpětným chla-

dičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy v baňce s kulatým dnem. Extrahuje se dvakrát 20 ml *acetonu R* 10min varem pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, spojené acetonové extrakty se zfiltrují přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se *acetonem R*, předem použitým k promytí baňky a filtru, na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do vhodné dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejdříve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-acetátu R*. Ethyl-acetátové vrstvy se spojí v dělicí nálevce, promyjí se dvakrát 50 ml *vody R*, zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem R* použitým k promytí dělicí nálevky a síranu sodného na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1,0 ml *chloridu hlinitého RS* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R 5% (V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci naměřenou při 425 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

## SOLIDAGINIS VIRGAUREAE HERBA

6.0:1893

### Nať zlatobýlu obecného

#### DEFINICE

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Solidago virgaurea* L.

**Obsah.** 0,5 % až 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ;  $M_r$  464,4), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Lodyha je válcovitá, podélně rýhovaná, v dolní části často červenofialová, občas lysá nebo pýřitá s krátkými chlupy ohnutými špičkou nahoru. Přizemní listy jsou obvejčité až obkopinaté, s pilovitým okrajem a čepel je v dolní části protažena v dlouhý křídlatý řapík; listy stonku jsou střídavé, menší než bazální, v obrysu více oválné, celokrajné nebo drobně zubaté; jsou přisedlé nebo jen krátce řapíkaté. Listy jsou na obou stranách lysé nebo roztroušeně chlupaté, s vyniklou síťovitou žilnatinou na spodní straně. Úbory jsou uspořádány v úzké latě. Na spodu květních stopek jsou dva malé čárkovité palisty s blanitým okrajem. Zákrov je dvouřadý až čtyřřadý, zákrovní lístky jsou volně uspořádané, střechovitě se kryjící. Lístky jsou zelenožluté, na vnitřní straně hladké, lesklé, na svrchní straně chlupaté nebo

lysé, s blanitým okrajem. Jednotlivé úbory tvoří šest až dvanáct zřetelně oddělených samičích jazykovitých květů, které jsou dvakrát delší než lístky zákrovu, a asi deset až třicet oboupohlavných trubkovitých květů.

Všechny květy jsou žluté. Semeník je spodní, hnědý, na konci zašpičatělý, rýhovaný, roztroušeně chlupatý; s přečnívajícím bělavým chmýrem tvořeným hladkými nebo drsnými pentlicovitými chlupy.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky listu v plošném pohledu s pokožkou na svrchní straně složené z mnohohranných buněk s přímými růžencovitými stěnami a zřetelně rýhovanou kutikulou, na spodní straně z buněk se stěnami více zprohýbanými, slabě rýhovanou kutikulou a četnými anomocytickými průduchy (2.8.3); úlomky listu někdy obsahují malé, izolované drúzy šťavelanu vápenatého; jednořadé kuželovité krycí chlupy listů a zákrovních lístků jsou až asi desetibuněčné, některé kratší chlupy mají koncovou buňku prodlouženou, dlouze pentlicovitou; občas žláznaté chlupy s jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou nohou a jednobuněčnou protáhlou hlavičkou; vzácně dvojité vidličnaté krycí chlupy semeníku se zřetelně tečkovanou vnitřní stěnou; četné chlupy chmýru a jejich úlomky jsou mnohořadé, s okrajovými, vně přesahujícími buňkami; skupiny vláken a cévních svazků stonku; úlomky pokožky korunních lístků s rýhovanou kutikulou, někdy s dlouhými dvouřadými žláznatými chlupy; pylová zrna jsou okrouhlá se třemi póry a s ostnitou exinou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) postupem uvedeným ve zkoušce *Solidago gigantea* a *Solidago canadensis* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
kvercitrin: oranžově fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: světle modře fluoreskující skvrna	světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová)
rutin: oranžově fluoreskující skvrna	oranžově fluoreskující skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % hnědě zbarvené drogy a nejvýše 5 % ostatních cizích příměsí.

***Solidago gigantea* a *Solidago canadensis*.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** K 0,75 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *kvercitrinu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (6 + 6 + 18 + 30).

**Nanášení.** 20 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Deska se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Po 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivní oranžová skvrna odpovídající polohou skvrně *kvercitrinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,200 g práškované drogy (355) (2.9.12) se ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, směs se vaří 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Tekutina se zfiltruje přes chomáček vaty do 100 ml baňky. Chomáček vaty se vloží zpět ke zbytku do baňky s kulatým dnem a extrahuje se ještě dvakrát 20 ml *acetonu R* 10 min varem pod zpětným chladičem.

Nechá se ochladit, spojené acetonové extrakty se zfiltrují přes filtrační papír a zředí se *acetonem R*, předem použitým k promytí baňky a filtru, na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do vhodné dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethyl-acetátu R*. Horní vrstvy se spojí v dělicí nálevce a promyjí se dvakrát 50 ml *vody R*, zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředí se *ethyl-acetátem R*, předem použitým k promytí dělicí nálevky a síranu sodného, na 50,0 ml.

**Zkoušený roztok.** K 10,0 ml základního roztoku se přidá 1,0 ml *chloridu hlinitého RSI* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% (V/V) v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbancí naměřenou při 425 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Použije se specifická absorbance hyperosidu, která má hodnotu 500.

## SOPHORAE JAPONICAE FLOS IMMATURUS

7.2:2427

### Poupě jerlínu japonského

#### DEFINICE

Je to celé usušené poupě druhu *Styphnolobium japonicum* (L.) SCHOTT (synonymum: *Sophora japonica* L.).

#### Obsah:

- nejméně 20,0 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako rutin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 610,5), počítáno na vysušenou drogu;
- nejméně 15,0 % rutinu (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; M<sub>r</sub> 610,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Ploché poupě vejčitého nebo oválného tvaru s velmi tenkou a krátkou stopkou je asi 7 mm až 10 mm dlouhé a 3 mm až 4 mm silné. Tmavě zelený nebo hnědý kalich tvořící spodní část poupěte je asi 3 mm až 4 mm dlouhý, složený z pěti srostlých kališních lístků na bázi podélně rýhovaných. Koruna je světle žlutá nebo hnědožlutá, nerozvitá, velmi tenká, přečnávající kalich; uzavírá deset volných tyčinek obklopujících centrální čnělku.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: okrouhlá nebo trojhranná pylová zrna se třemi klíčními póry a hladkou exinou o průměru asi 18 µm; úlomky kalicha nebo koruny tvořené laločnatými buňkami, anomocytickými průduchy (2.8.3) se čtyřmi až osmi sousedními buňkami a lehce zahnutými krycími chlupy různých délek (80 µm až 660 µm) s hladkými nebo mírně bradavčitými stěnami, obvykle s jednou nebo dvěma bazálními buňkami a dlouhou zašpičatělou koncovou buňkou; úlomky parenchymu obvykle obsahující hrano-ly kalcium-oxalátu; volné hrano-ly kalcium-oxalátu. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS* bez zahřívání preparátu; hnědožluté krystaly rutinu jsou patrné jako krystalická hmota nebo vějířovitě shluky velmi jemných jehliček.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
**Zkoušený roztok.** Ke 0,2 g práškované drogy (355) (2.9.12) se přidá 5,0 ml *methanolu R* a 10 min se zahřívá pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C, pak se ochladí a zfiltruje.  
**Porovnávací roztok.** 10 mg *hyperosidu R* a 10 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.  
**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků 10 mm [nebo 5 µl, do proužků 6 mm až 7 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a potom roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Nechá se sušit asi 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí fluoreskujících skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
	nažloutlá skvrna
hyperosid: žlutooranžová skvrna	hnědá skvrna
rutin: nažloutlá skvrna	dvě zelené skvrny velmi intenzivní nažloutlá skvrna (rutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % rozvitých květů a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 11,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 9,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

### Celkové flavonoidy

**Zásobní roztok.** 1,00 g práškované drogy (355) (2.9.12) se převede do extrakční patrony extraktoru typu Soxhlet. Přidá se 100 ml *heptanu R*, zahřívá se pod zpětným chladičem do odbarvení extrakční tekutiny, nechá se ochladit a odstraní se heptanová vrstva. Přidá se 90 ml *methanolu R*, pokračuje se v extrakci zahříváním pod zpětným chladičem do odbarvení extrakční tekutiny a nechá se ochladit. Methanolický roztok se převede do 100ml odměrné baňky, extrakční baňka se promyje několika mililitry *methanolu R*. Methanolické roztoky se spojí a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml a intenzivně se protřepe.

**Zkoušený roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se zředí roztokem *chloridu hlinitého R* (20 g/l) v *methanolu R* na 100,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 10,0 ml zásobního roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Po 15 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah celkových flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako rutin ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1000}{m \cdot 37}$$

v němž značí:

*A* – absorbanci zkoušeného roztoku při 425 nm;  
*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance rutinu má hodnotu 370.

**Rutin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,200 g práškované drogy (355) (2.9.12) se převede do kuželové baňky, přidá se 50,0 ml *methanolu R* a zváží se. Vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně a nechá se ochladit. Zváží se a ztráta rozpouštědla se doplní *methanolem R*, intenzivně se protřepe a zfiltruje se. 2,0 ml filtrátu se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** 10,0 mg *rutosidu trihydrátu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R* a zředí se roztokem *methanolu R* 50% (V/V) na 10,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *methanolu R* 50% (V/V) na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 10,0 mg *apigenin-7-glukosidu R* a 10,0 mg *rutinu R* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R* a zředí se roztokem *methanolu R* 50% (V/V) na 10,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *methanolu R* 50% (V/V) na 10,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** roztok *kyseliny octové ledové R* 1% (V/V);
- **mobilní fáze B:** *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	68	32
5–20	68 → 50	32 → 50
20–30	50 → 0	50 → 100
30–35	0	100

**Průtoková rychlost.** 1,3 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 350 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Relativní retence** vztažená k rutinu (retenční čas asi 17 min). *Apigenin-7-glukosid* asi 1,1.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok (b):

- **rozlíšení:** nejméně 1,5 mezi píkem rutinu a píkem *apigenin-7-glukosidu*.

Obsah rutinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 25}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku rutinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

- $A_2$  – plochu píku rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost *rutosidu trihydrátu CRL* použitého pro přípravu porovnávacího roztoku (a) v gramech;  
 $p$  – obsah rutinu v *rutosidu trihydrátu CRL* v procentech.

## STEPHANIAE TETRANDRAE RADIX

7.0:2478

## Kořen stefanie čtyřmužné

## DEFINICE

Je to oškrábaný řezaný a usušený kořen druhu *Stephania tetrandra* S.MOORE.

**Obsah.** Nejméně 1,6 % součtu tetrandrinu a fangchinolinu, vyjádřeno jako tetrandrin ( $C_{38}H_{42}N_2O_6$ ;  $M_r$  623), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Drogu tvoří plátky nebo nepravidelné válcovité nebo téměř válcovité kousky, často zkroucené, asi 0,5 cm až 1 cm silné, o průměru 1 cm až 5 cm. Svrchní strana kořene je šedožlutá, obvykle s hlubokými a zprohýbanými příčnými rýhami; ohnuté části jsou uzlovité a hrboilaté. Textura je hustá a kompaktní. Na příčném řezu je šedobílý s paprskovitými rýhami.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je šedobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky parenchymu s tenkostěnnými buňkami s uzlíkovitě ztlustlými stěnami; síťovité nebo tečkované dřevo cév provázené vlákny; úlomky felodermu obsahující sklereidy; ojediněle úlomky korku; ojedinělé jemné tyčinkovité krystaly kalcium-oxalátu. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R 50% (V/V)*. Prášek vykazuje velké množství kulatých nebo zkosených, jednoduchých nebo dvou nebo trojčetných škrobových zrn, o průměru 10  $\mu$ m až 20  $\mu$ m s tečkovaným hilem.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* K 0,4 g práškové drogy (355) (2.9.12) se přidá 10 ml směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *methanolu R* (1 + 9 + 40). Vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně při 25 °C a zfiltruje se.  
*Porovnávací roztok.* 10 mg *protopin-hydrochloridu R* a 10 mg *tetrandrinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.  
*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (0,3 + 5 + 10 + 10).  
*Nanášení.* 10  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].  
*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* 5 min v proudě teplého vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem *jodu R* (5 g/l) v *ethanolu 96% R*, dokud pozadí nezežlutne; po vymizení žlutého zbarvení se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
protopin: oranžová skvrna	
tetrandrin: oranžová skvrna	oranžová skvrna (tetrandrin)
	oranžová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Stanovení obsahu kyseliny aristolochové v rostlinných drogách** (2.8.21). Zkoušená droga vyhovuje metodě A.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 4,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 1,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

**Tetrandrin a fangchinolin.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 0,500 g práškové drogy (355) (2.9.12) se naváží do 50ml baňky s kulatým dnem, přidá se 25 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R 2% (V/V)* v *methanolu R*. Zváží se a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem na vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zváží. Hmotnost se doplní roztokem *kyseliny chlorovodíkové R 2% (V/V)* v *methanolu R* na původní hodnotu. Zfiltruje se. 5,0 ml filtrátu se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 10,0 mg *tetrandrinu CRL* se rozpustí v 5 ml *methanolu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5  $\mu$ m).

*Mobilní fáze.* Roztok *natrium-dodecyl-sulfátu R* (4,1 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *methanolu R*, *vody R* a *acetonitrilu R* (1 + 30 + 30 + 40).

*Průtoková rychlost.* 2,0 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

*Nástřik.* 20  $\mu$ l.

*Doba záznamu.* 30 min.

*Relativní retence* vztažená k tetrandrinu (retenční čas asi 18 min). Fangchinolin asi 0,7.

*Test způsobilosti*, zkoušený roztok:

– *rozlišení*: nejméně 3,0 mezi píkem fangchinolinu a píkem tetrandrinu.

Obsah tetrandrinu a fangchinolinu, vyjádřeno jako tetrandrin ( $C_{38}H_{42}N_2O_6$ ) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_3) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku tetrandrinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku tetrandrinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$A_3$  – plochu píku fangchinolinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost *tetrandrinu CRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah tetrandrinu v *tetrandrinu CRL* v procentech.

## STRAMONII FOLII PULVIS NORMATUS

6.2:0247

Durmanový list práškováný standardizovaný

*Synonymum*. Stramonii pulvis normatus

### DEFINICE

Je to práškováný list durmanu (180) (2.9.12), jehož obsah alkaloidů je upraven, je-li třeba, přidáním práškové laktosy nebo práškováného durmanového listu s nižším obsahem celkových alkaloidů.

*Obsah*. 0,23 % až 0,27 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ;  $M_r$  289,4), počítáno na vysušenou drogu.

### VLASTNOSTI

*Vzhled*. Šedozelený prášek nepříjemného pachu.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*.

Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky čepele listu s buňkami se stěnami slabě vlnitě zprohýbanými a s hladkou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy (2.8.3) četnější na spodní straně listu; krycí chlupy kuželovité, jednořadé, tříbuněčné až pětibuněčné, s bradavčitými stěnami; žláznaté chlupy krátké, paličkovité, s dvoubuněčnou až sedmibuněčnou hlavičkou; dorziventrální mezofyl s jednou řadou palisádových buněk, houbový parenchym s drúzami šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. Mohou být patrná vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna zpravidla asi 60  $\mu$ m až 80  $\mu$ m v průměru, se třemi klíčovými póry a téměř hladkou exinou; úlomky koruny s papilózní pokožkou; úlomky semene obsahující žlutohnědé zprohýbané silnostěnné sklereidy o semení; občas krystaly a mikrosférické krystaly šťavelanu vápenatého. Při hodnocení v *glycerolu 85% R* mohou být patrné krystaly laktosy.

**B.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie (viz Zkoušky na čistotu).

*Hodnocení*. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů.

**C.** 1 g se protřepává 2 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Opatrně se protřepává s 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R* tak, aby se netvořila emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*. Zfiltruje se a ether se odpaří v porcelánové misce. Přidá se 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného (30 g/l)* v *ethanolu 96% R*; vzniká tmavofialové zbarvení.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Chromatografie**. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok*. 1,0 g se protřepává 15 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Zfiltruje se a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* do konečného objemu 25 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a pak se protřepává dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředováním. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok*. 50 mg *hyoscyamin-sulfátu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolamin-hydrobromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. 3,8 ml roztoku *hyoscyamin-sulfátu* a 4,2 ml roztoku *skopolamin-hydrobromidu* se smíchá a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

*Stacionární fáze*. Deska s vrstvou *silikagelu G pro TLC R*.

*Mobilní fáze*. Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90).

*Nanášení*. 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l každého roztoku, do proužků (20 mm  $\times$  3 mm), vzdálenost mezi proužky je 1 cm.

*Vyvíjení*. Po dráze 10 cm.

*Sušení*. 15 min při 100 °C až 105 °C a nechá se ochladit.

*Detekce A*. Postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* (použije se asi 10 ml na desku o straně 200 mm) do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí.

*Hodnocení A*. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další skvrny ve střední části chromatogramu při nanášení 20  $\mu$ l zkoušeného roztoku nebo v blízkosti startu při nanášení 10  $\mu$ l zkoušeného roztoku.

*Detekce B*. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná; pozoruje se po 15 min.

*Hodnocení B*. Zbarvení skvrn odpovídajících hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku

Rostlinné  
drogy  
a přípravky...

se změni z hnědé na červenohnědé, ne však na šedomodré (atropin) a neobjeví se žádné další skvrny.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 20,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

- a) Proveďte se zkouška Ztráta sušením (2.2.32). 2,000 g se suší v sušárně při 105 °C.
- b) 10,0 g se navlhčí směsí 5 ml *amoniaku* 17,5% RS, 10 ml *ethanolu* 96% R a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek* R a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, nechá se 4 h macerovat a perkoluje se směsí objemových dílů *chloroformu* R a *etheru prostého peroxidických látek* R (1 + 3) do úplné extrakce alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v *kyselině sírové* 0,25 mol/l RS a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetraodortutnatanem draselným* RS. Perkolát se zahustí na vodní lázni na asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek* R. Přidá se množství *etheru prostého peroxidických látek* R odpovídající nejméně 2,1násobku objemu perkolátu, aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Roztok se protřepe nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové* 0,25 mol/l RS, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním a vrstvy kyseliny se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem* 17,5% RS a vytřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu* R. Chloroformové výtřepky se spojí a přidají se 4 g *síranu sodného bezvodého* R a nechá se stát 30 min za občasných protřepání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu* R. Promývací tekutina se přidá k chloroformovým extraktům, odpaří se na vodní lázni do sucha a odparek se zahřívá 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu* R, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové* 0,01 mol/l VS a chloroform se odstraní odpařením na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor* RS a nadbytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným* 0,02 mol/l VS.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako hyoscyamin (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{(100 - d) \cdot m}$$

v němž značí:

*d* – ztrátu sušením v procentech;

*n* – spotřebu *hydroxidu sodného* 0,02 mol/l VS v mililitrech;

*m* – hmotnost drogy v gramech.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## STRAMONII FOLIUM

7.3:0246

### Durmanový list

#### DEFINICE

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Datura stramonium* L. a jeho odrůd.

**Obsah.** Nejméně 0,25 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>; M<sub>r</sub> 289,4), počítáno na vysušenou drogu. Alkaloidy jsou zastoupeny zejména hyoscyaminem provázeným proměnlivým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

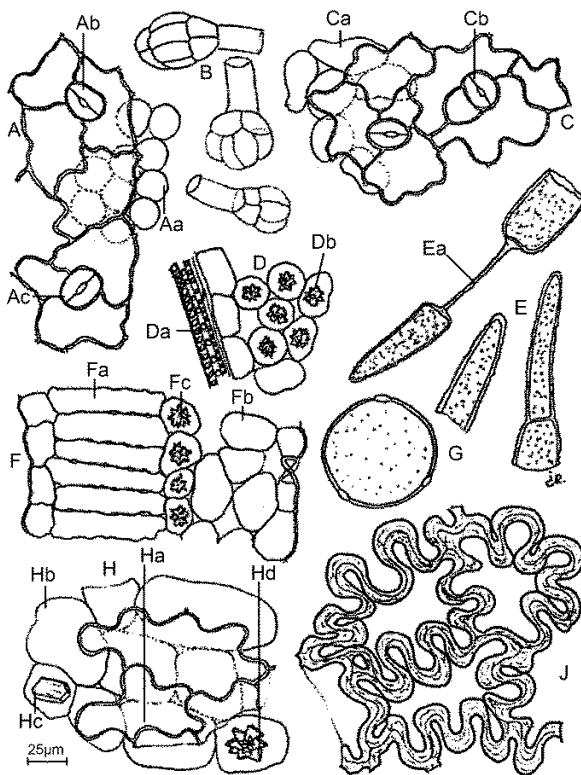
#### VLASTNOSTI

Droga má nepříjemný pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou tmavě hnědozelené nebo tmavě šedozelené, krátce řapíkaté, sušením často svraskalé a shloučené do hromady, tenké a křehké, vejčité nebo trojhranně vejčité, hluboce vykrajované, s protáhlou koncovou špičkou, na bázi často nesouměrné. Mladé listy jsou na žilnatině chlupaté, starší listy téměř lysé. Stonky jsou zelené nebo fialovozelené, tenké, ohnuté a zkroucené, podélně svaštělé, někdy příčně rýhované, dichasiálně větvené, v paždí s jedním květem nebo nezralým plodem. Květy s krátkou stopkou mají srostloplátečný kalich s pěti ušty a nálevkovitou hnědobílou nebo nafialovělou korunou. Plod je tobolka, zpravidla pokrytá četnými krátkými vzpřímenými ostny, semena jsou hnědá nebo černá s jemně jamkovitým osemením.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je šedozelelý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu* RS. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky svrchní [A] a spodní [C] pokožky čepele listu v plošném pohledu, s buňkami se stěnami slabě vlnitě zprohýbanými a s hladkou kutikulou, doprovázené palisádovým [Aa] a houbovým [Ca] parenchymem; anizocytické [Ac, Cb] a anomocytické [Ab] průduchy (2.8.3) četnější na spodní straně listu; úlomky kuželovitých [E], jednořadých, třibuněčných až pětibuněčných krycích chlupů s bradavčitými stěnami, některé poškozené [Ea]; krátké paličkovité žláznaté chlupy v bočním pohledu [B] s dvoubuněčnou až sedmibuněčnou hlavičkou; dorziventrální mezofyl v příčném řezu [F] s jednou řadou palisádových buněk [Fa] a houbovým parenchymem [Fb] s drúzami kalcium-oxalátu [Fc]; úlomky houbového parenchymu [D] s některými buňkami obsahujícími malé drúzy kalcium-oxalátu [Db], doprovázené kruhovitě a šroubovitě ztlustlými cévami [Da] v plošném pohledu. V práškové droze mohou být také: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna o průměru asi 60 μm až 80 μm se třemi klíčovými póry a téměř hladkou exinou [G]; úlomky koruny [H] s vlnitě zprohýbanými stěnami buněk [Ha] a s pod pokožkou ležícím mezofylem [Hb] s některými buňkami obsahujícími hranolovité krystaly [Hc] nebo drúzy [Hd] kalcium-oxalátu; úlomky semene obsahující žlutohnědě zprohýbané sklereidy osemení [J] a občas

hranolovité krystaly a mikrosférické krystaly kalcium-oxalátu.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškovaného durmanového listu

**C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku, při nanášení shodných objemů.

**D.** 1 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se protře-pává 2 min 10 ml kyseliny sírové 0,05 mol/l RS a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml amoniaku 26% R a 5 ml vody R. Opatrně se protře-pává 15 ml etheru prostého peroxidických látek R tak, aby se vytvořila emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší síranem sodným bezvodým R. Zfiltruje se a ether se odpaří v porcelánové misce. Přidá se 0,5 ml kyseliny dusičné R a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml acetonu R a po kapkách roztok hydroxidů draselného (30 g/l) v ethanolu 96% R; vzniká tmavofialové zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Chromatografie.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se protře-pává 15 min 10 ml kyseliny sírové 0,05 mol/l RS, zfiltruje se a filtr se promývá kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS do konečného objemu 25 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml amoniaku 26% R a pak se dvakrát protře-pe 10 ml etheru prostého peroxidických látek R. Je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené etherové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým R, zfiltrují se

a odpaří se na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí v 0,5 ml methanolu R.

**Porovnávací roztok.** 50 mg hyoscyamin-sulfátu R se rozpustí v 9 ml methanolu R. 15 mg skopolamin-hydrobromidu R se rozpustí v 10 ml methanolu R. Smíchá se 3,8 ml roztoku hyoscyamin-sulfátu a 4,2 ml roztoku skopolamin-hydrobromidu a zředí se methanolem R na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů amoniaku 26% R, vody R a acetonu R (3 + 7 + 90).

**Nanášení.** 10 μl a 20 μl každého roztoku, do proužků (20 mm × 3 mm), vzdálenost mezi proužky je 1 cm.

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm.

**Sušení.** 15 min při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit.

**Detekce A.** Postříká se jodobismutitanem draselným RS2 (použije se asi 10 ml na desku o straně 200 mm) do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí.

**Hodnocení A.** Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny ve střední části chromatogramu při nanášení 20 μl, nebo v blízkosti startu při nanášení 10 μl.

**Detekce B.** Vrstva se postříká dusitanem sodným RS tak, aby byla průsvitná; pozoruje se po 15 min.

**Hodnocení B.** Hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se změni na červenohnědé, ne však na šedomodré (atropin), neobjeví se žádné další skvrny.

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 3 % stonků o průměru větším než 5 mm.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 20,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 4,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

- Provede se zkouška Ztráta sušením (2.2.32). 2,000 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se suší v sušárně při 105 °C.
- 10,0 g práškované rostlinné drogy (180) (2.9.12) se navlhčí směsí 5 ml amoniaku 17,5% RS, 10 ml ethanolu 96% R a 30 ml etheru prostého peroxidických látek R a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, nechá se 4 h macerovat a perkuluje se směsí složenou z objemových dílů chloroformu R a etheru prostého peroxidických látek R (1 + 3) do úplné extrakce alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v kyselině sírové 0,25 mol/l RS a nepřítomnost alkaloidů se ověří tetraiodortuńnatanem draselným RS. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí etheru prostého peroxidických látek R. Přidá se množství etheru prostého peroxidických látek R odpovídající nejméně 2,1ná-



sobku objemu perkolátu, aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Roztok se protřepe nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním a vrstvy kyseliny se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a vytřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Chloroformové výtřepky se spojí a přidají se 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepání. Chloroform se dekantuje a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Promývací tekutiny se přidají k chloroformovým extraktům, odpaří se na vodní lázni do sucha a odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l VS* a chloroform se odstraní odpařením na vodní lázni. Přidá se *červen methylová směsný indikátor RS* a nadbytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \cdot (20 - n)}{(100 - d) \cdot m},$$

v němž značí:

*d* – ztrátu sušením v procentech;

*n* – spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech;

*m* – hmotnost práškové rostlinné drogy v gramech.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před vlhkostí.

## TANACETI PARTHENII HERBA

6.0:1516

### Nať kopretiny řimbaby

#### DEFINICE

Je to celá usušená nať druhu *Tanacetum parthenium* (L.) SCHULTZ BIP. nebo její úlomky.

*Obsah.* Nejméně 0,20 % parthenolidu ( $C_{15}H_{20}O_3$ ;  $M_r$  248,3), počítáno na vysušenou drogu.

#### VLASTNOSTI

Droga má charakteristický pach po kafru.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Listnatá, více nebo méně větvená lodyha o průměru až 5 mm je téměř čtyřhranná, podélně rýhovaná, slabě ochmýřená. Listy jsou v obrysu vejčité 2 cm až 5 cm, někdy až 10 cm dlouhé, žlutozelené, řapíkaté a střídavé. Jsou zpeřené nebo dvakrát zpeřené, peřenoklanně s pěti až devíti úkrojky, které mají hrubě zubatý okraj a tupu špicí. List je na obou stranách mírně pýřitý, na spodní straně vyniká střední žilka. V droze mohou být přítomné dlouze stopkaté úbory o průměru 12 mm až 22 mm, které jsou uspořádány v pěti až třicetikvětém chocholíku. Polokulovitý zákrov o průměru 6 mm až 8 mm je složen z četných překrývajících se listenů, které jsou poměrně úzké, tupé, suchomázdřitě lemované. Terčové květy jsou žluté, oboupohlavné, pětičetné, trubkovité a mají

pět tyčinek vrostlých do koruny. Nitky tyčinek jsou volné, prašníky srůstají v trubku, kterou proniká čnělka s dvojklannou bliznou. Obvodové květy jsou bílé, samičí, s třícípým 2 mm až 7 mm dlouhým jazykem. Plod je žláznatá nažka 1,2 mm až 1,5 mm dlouhá, v době zralosti hnědá s pěti až deseti bílými podlouhlými žebry a s krátkou vrubkovanou blanitou korunkou.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: četné velké mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy tvořené kosočtverečnou bazální buňkou, třemi až pěti menšími ztlustlými buňkami s pravouhlými stěnami a velmi dlouhou plochou štíhlou koncovou buňkou, často ohnutou do pravého úhlu k ose bazální buňky; žláznaté chlupy s krátkou dvouřadou dvoubuněčnou až čtyřbuněčnou nohou a dvouřadou čtyřbuněčnou hlavičkou, překrytou měchyřovitou kutikulou; pokožka z buněk se stěnami silně vlnitě zprohýbanými, sedlovitými, krytými zvrásněnou kutikulou a s anomocytickými průduchy (2.8.3); četné šroubovitě a kruhovitě ztlustlé cévy; mnohovrstevný parenchym a kolenchym. Mohou být přítomné úlomky terčových květů obsahující světle žlutou amorfni hmotu a malé růžicovité krystaly šťavelanu vápenatého; kulovitá pylová zrna o průměru asi 25 μm se třemi klíčovými póry a ostnitou exinou.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá se 20 ml *methanolu R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku do sucha a zbytek se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *parthenolidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*. *Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *acetonu R* a *toluenu R* (15 + 85).

*Nanášení.* 20 μl; do proužků.

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *vanilinu R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *ethanolu bezvodého R* a *kyseliny sírové R* (20 + 80). Po 5 min se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části modrá hlavní skvrna odpovídající poloze, zbarvením a velikostí hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod hlavní skvrnou na chromatogramu zkoušeného roztoku může být další modrá skvrna. V dolní třetině chromatogramu jsou jedna nebo dvě modré skvrny. Mohou být přítomné další fialové skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 10,0 % stonků o průměru větším než 5 mm a nejvýše 2,0 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** Asi 50 g drogy se upráškuje (355) (2.9.12). Po homogenizaci se 1,00 g práškové drogy v baňce smíchá se 40 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 15 ml *methanolu R*. Zbytek drogy se smíchá se 40 ml *methanolu R* a postup se opakuje ještě jednou. Filtráty a promývací tekutiny se spojí a odpaří se za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml a zfiltruje se (0,45 µm).

**Porovnávací roztok.** 5,0 mg *parthenolidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60).

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Retenční čas.** Parthenolid asi 11,5 min.

Obsah parthenolidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 40}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku parthenolidu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku parthenolidu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost parthenolidu v porovnávacím roztoku v gramech.

## TARAXACI RADIX

7.0:1852

## Pampeliškový kořen

*Synonyma.* *Taraxaci officinalis radix*, Smetankový kořen

## DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Taraxacum officinale* F. H. WIGGERS.

## VLASTNOSTI

Hořká chuť.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Tmavě hnědý nebo načernalý křivý kořen je jen málo větvený a na svrchní straně je hluboce podélně brázditý. Kořenová hlava je ztlustlá s četnými jizvami po růžici listů. Lom je krátký. Na příčném řezu je patrná šedobílá nebo nahnědlá kůra se soustřednými vrstvami nahněd-

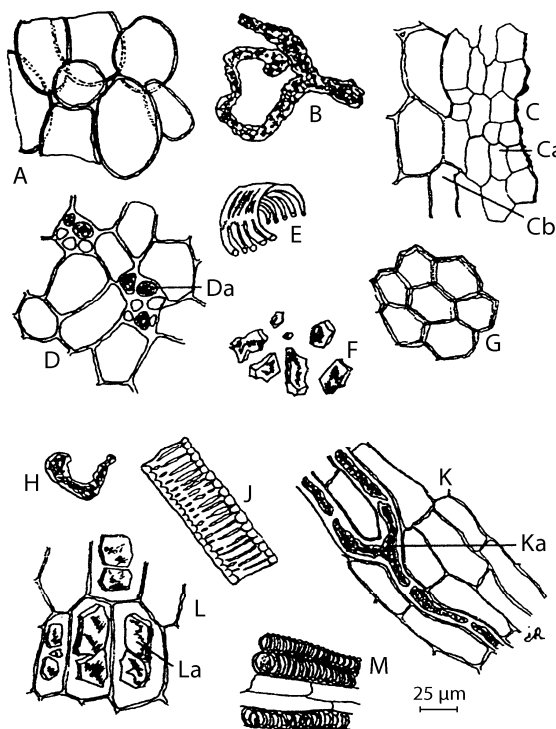
lých mléčnic a pórovité světle žluté dřevo, které není paprscitě uspořádáno.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášovaná droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky hnědého nebo červenohnědého korku v plošném pohledu [G] nebo v příčném řezu [C] se zploštělými tenkostěnnými buňkami [Ca], někdy doprovázené parenchymem [Cb]; síťovitě ztlustlé zděvnatělé cévy [E, J, M]; úlomky parenchymu [A, D, K, L], některé s rozvětvenými mléčnicemi v podélném řezu [Ka] nebo v příčném řezu [Da]; zrnitý obsah mléčnic [B, H]. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R*. V práškové droze jsou patrné četné hranaté nepravidelné úlomky inulinu, volné [F] nebo v parenchymatických buňkách [La].

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se ve vodní lázni při 60 °C nebo se na 10 min vloží do ultrazvukové lázně. Ochladí se a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *kyseliny chlorogenové R* a 2 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti *B* práškové drogy pampeliškového kořene

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC *R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu  $F_{254}$  pro TLC *R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 7 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Deska se 5 min zahřeje při 100 °C; postříká se nebo se krátce ponoří do roztoku *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a suší se 5 min při 100 °C; postříká se nebo se krátce ponoří do roztoku *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R* a suší se 5 min při 100 °C; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	světle modrá skvrna
kyselina chlorogenová: modrá skvrna	modrá skvrna (kyselina chlorogenová)
rutin: žlutohnědá skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

**Extrahovatelné látky.** Nejméně 20,0 %; ke 2,000 g práškové drogy (250) (2.9.12) se přidá 40 ml *vody R*, 1 h se třepe a zfiltruje se. 10 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a suší se 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 0,10 g.

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 100.

## TARAXACI RADIX CUM HERBA

7.5:1851

### Pampeliškový kořen s natí

*Synonyma.* *Taraxaci officinalis herba cum radice*,  
Smetankový kořen s natí

#### DEFINICE

Je to usušená celá nadzemní i podzemní část druhu *Taraxacum officinale* F.H.WIGGERS nebo její úlomky.

#### VLASTNOSTI

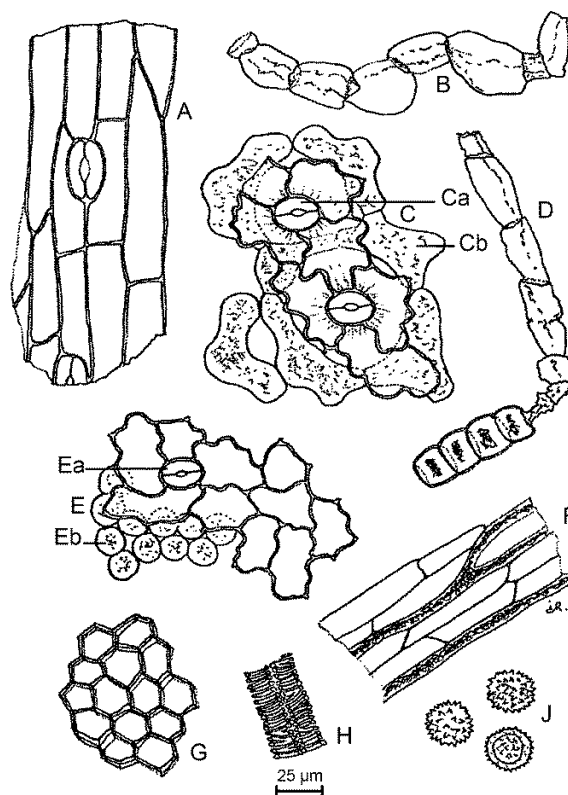
Hořká chuť.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Podzemní část sestává z úlomků kořenů, 2 cm až 3 cm dlouhých, na svrchní straně tmavě hnědých nebo načernalých hluboce podélně rýhovaných. Kořenová hlava je ztlustlá, s četnými jizvami po růžici listů. Lom je krátký. Na příčném řezu je patrná šedobílá nebo nahnědlá kůra s koncentrickými vrstvami nahnědlých mléčnic a s pórovitým světle žlutým dřevem, které není paprscitě

uspořádáno. Úlomky zelených, lysých nebo ochmýřených listů. Listy jsou zmačkané, na spodní straně mají obvykle jasně patrnou střední žilku. Okraj čepele je hluboce zubatý (peřenolaločný nebo kracovitě peřenodílný). Jednotlivá květenství (úborny) na dutém stvolu tvoří zelený listnatý zákrov, který obklopuje žluté paprskovité květy; v droze mohou být ojedinele přítomné nažky s bílým hedvábným odstálým chmýřem.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky korku [G] se zploštělými tenkostěnnými buňkami; síťovitě ztlustlé cévy [H] z kořene; úlomky parenchymu obsahující rozvětvené mléčnice [F]; úlomky listů v plošném pohledu s vrchní [E] a spodní [C] pokožkou tvořenou laločnatými propojenými buňkami a anomocytickými průduchy (2.8.3) [Ca, Ea]; protáhlé mnohobuněčné zaškrčené krycí chlupy více nebo méně četné v závislosti na varietě a subvarietě [B, D]; úlomky pokožky svrchní strany listu [E] provázené obvykle palisádovým parenchymem [Eb] a úlomky pokožky spodní strany listu [C] provázené houbovým parenchymem [Cb]; zdřevnatělé šroubovitě nebo prstencovitě ztlustlé cévy; úlomky pokožky květního stvolu s průduchy a s protáhlými buňkami s tuhými stěnami [A]; pylová zrna s tečkovanou exinou [J]. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R*. Jsou patrné hranaté, nepravidelné úlomky inulinu, buď volně, nebo v parenchymatických buňkách.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového pampeliškového kořene s natí

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 10 ml *methanolu R*, zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C nebo se na 10 min vloží do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 2 mg *rutinu R* a 2 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo *deska s vrstvou silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 7 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Deska se zahřeje 5 min při 100 °C, postříká se, nebo se krátce ponoří do roztoku *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a suší se 5 min při 100 °C; postříká se, nebo se krátce ponoří do roztoku *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R* a suší se 5 min při 100 °C; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny.

Horní okraj desky	
	slabá červená skvrna slabá žlutá skvrna
kyselina chlorogenová: modrá skvrna	dvě světle modré skvrny
rutin: žlutohnědá skvrna	světle modrá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %. 1,000 g práškové rostlinné drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 17,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 5,0 %.

**Extrahovatelné látky.** Nejméně 30 %. Ke 2,000 g práškové rostlinné drogy (250) (2.9.12) se přidá 40 g *vody R*, 1 h se míchá a zfiltruje se. 10 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a suší se 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek po vysušení váží nejméně 0,15 g.

**Číslo hořkosti** (2.8.15). Nejméně 100.

## TEREBINTHINAE ETHEROLEUM EX PINO PINASTRO

7.0:1627

Terpentýnová silice z borovice hvězdovité  
*Synonymum.* Terebinthinae aetheroleum a Pino pinastro

#### DEFINICE

Je to silice získaná z balzámu druhu *Pinus pinaster* AITON destilací s vodní parou a následujícím čištěním při teplotě do 180 °C. Může být přidána vhodná antioxidační látka.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Čirá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina charakteristického pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

1.: B.

2.: A.

A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1 ml se smíchá s *toluenem R* a zředí se jím na 10 ml.

**Porovnávací roztok.** 10 µl *β-pinenu R* a 10 µl *linalolu R* se smíchá s *toluenem R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *ethyl-acetátu R* a *toluenu R* (5 + 95).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
β-pinen: růžová skvrna	růžová skvrna (β-pinen) růžová skvrna
linalol: růžovošedá skvrna	3 slabé fialové skvrny slabá žlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Retenční časy piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům piků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,856 až 0,872.

**Index lomu** (2.2.6). 1,465 až 1,475.

**Optická otáčivost** (2.2.7). –40° až –28°; měří se úhel optické otáčivosti zkoušené látky.

**Číslo kyselosti** (2.5.1). Nejvýše 1,0.

**Číslo peroxidové** (2.5.5, Metoda B). Nejvýše 20.

**Mastné oleje a zpryskyřičnatěle silice** (2.8.7). Vyhovuje zkoušce.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Zkoušená látka.

*Porovnávací roztok (a).* 30 µl α-pinenu R, 10 mg kamfenu R, 20 µl β-pinenu R, 10 µl kar-3-enu R, 10 µl β-myrcenu R, 20 µl limonenu R, 10 µl longifolenu R, 10 µl β-karyofylenu R a 10 mg karyofylen-oxidu R se rozpustí v 1 ml hexanu R.

*Porovnávací roztok (b).* 5 µl β-karyofylenu R se rozpustí v hexanu R a zředí se jím na 1 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí hexanem R na 1 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,0 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 63.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–10	60
	10–80	60 → 200
	80–120	200
nástřikový prostor		200
detektor		250

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 0,5 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a); zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti:*

- *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem kar-3-enu a píkem β-myrcenu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují složky porovnávacího roztoku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Stanoví se obsah těchto složek v procentech. Limity jsou v následujících rozmezech:

- α-pinen: 70,0 % až 85,0 %;
- kamfen: 0,5 % až 1,5 %;
- β-pinen: 11,0 % až 20,0 %;
- kar-3-en: nejvýše 1,0 %;
- β-myrcen: 0,4 % až 1,5 %;
- limonen: 1,0 % až 7,0 %;
- longifolen: 0,2 až 2,5 %;
- β-karyofylen: 0,1 % až 3,0 %;
- karyofylen-oxid: nejvýše 1,0 %;

– *limit zanedbatelnosti:* plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**Zbytek po odpaření** (2.8.9). Nejvýše 2,5 %, před stanovením se 3 h zahřívá na vodní lázni.

SKLADOVÁNÍ

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.

## THYMI HERBA

6.4:0865

### Tymiánová nat'

DEFINICE

Jsou to usušené celé listy a květy druhů *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L., nebo směsi obou druhů, oddělené od předem usušených stonků.

*Obsah:*

- *silice:* nejméně 12 ml/kg (počítáno na bezvodou drogu);
- *thymol a karvakrol* (obojí C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O; M<sub>r</sub> 150,2) (součet obsahů): nejméně 40 % v silici.

VLASTNOSTI

Droga ostře aromatického pachu po thymolu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

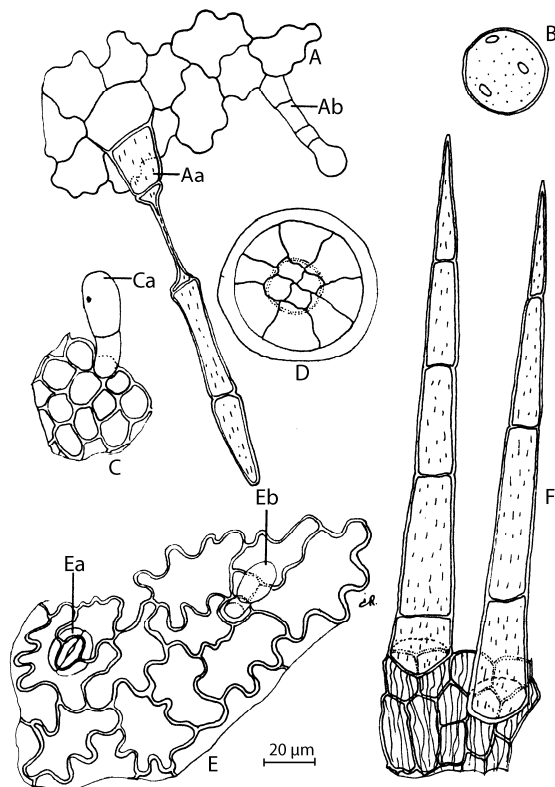
**A.** List druhu *Thymus vulgaris* je obvykle 4 mm až 12 mm

dlouhý a až 3 mm široký, přisedlý nebo velmi krátce řapíkatý. Čepel je tuhá, celokrajná, kopinatá nebo vejčítá, na obou stranách šedě nebo zelenošedě ochmýřená s okraji podvinutými. Střední žilka je na svrchní straně vpadlá, na spodní straně zřetelně vyniklá. Kalich je zelený, často s fialovými skvrnami, trubkovitý, se dvěma pysky, z nichž horní se třemi ušty je obrácen nazpět, dolní se dvěma brvitými ušty je delší než horní. Po odkvětu uzavírá kalich korunu dlouhými tuhými chlupy. Koruna je dvakrát delší než kalich, v suchém stavu obvykle nahnědlá, nezřetelně dvoupyšká.

List druhu *Thymus zygis* je obvykle 1,7 mm až 6,5 mm dlouhý a 0,4 mm až 1,2 mm široký, jehlicovitý nebo podlouhle kopinatý, zřetelně podvinutý. Čepel je na obou stranách zelená až zelenošedá, střední žilka je někdy fialová, okraj listu zejména na bázi s dlouhými bílými chlupy. Usušené květy jsou podobné druhu *Thymus vulgaris*.

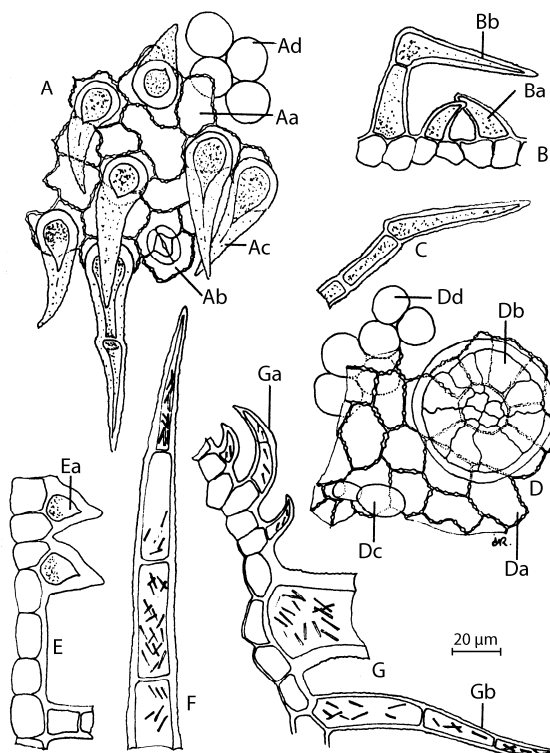
**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek z obou druhů je šedozelený nebo zelenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: pokožky listů se stěnami vlnitými, růžencovitě ztlustlými; průduchy diacytického typu (2.8.3); četné žláznaté chlupy až s dvanácti sekrečními buňkami, jejichž kutikula je většinou kulovitě až měchýřovitě vychlípena vylučovaným sekretem. Žláznaté chlupy mají jednobuněčnou nohu a kulovitou až vejčitou hlavičku. U obou druhů jsou na svrchní straně krycí chlupy s bradavčitými stěnami a zašpičatělou koncovou buňkou. Na spodní straně jsou různé typy chlupů s bradavčitými stěnami: jednobuněčné, přímé nebo lehce zahnuté, dvoubuněčné nebo třibuněčné, se zřetelně oddělenými buňkami často zahnutými do tvaru L (*Thymus vulgaris*); dvoubuněčné nebo třibuněčné chlupy, víceméně přímé (*Thymus zygis*). Úlomky kali-

cha s četnými jednořadými, pětibuněčnými nebo šesti-  
buněčnými chlupy se slabě rýhovanou kutikulou.  
Úlomky koruny s četnými jednořadými často kolabova-  
nými krycími chlupy a žláznatými chlupy většinou  
s dvanácti sekrečními buňkami. Poměrně zřídka jsou  
přítomna kulatá hladká pylová zrna, o průměru asi  
35  $\mu\text{m}$ , se šesti štěrbinovitými klíčovými póry. Prášek  
z *Thymus zygis* obsahuje také četné silné svazky vláken  
z hlavních žilek a z úlomků stonků.



- A = pokožka zevní strany koruny z plošného pohledu  
s krycím chlupem s kolabovanou buňkou (Aa)  
a žláznatým chlupem s jednobuněčnou hlavičkou  
(Ab)  
B = pylové zrno se šesti klíčovými póry (z nichž tři jsou  
patrné na obrázku)  
C = pokožka spodní části koruny se žláznatým chlupem  
(Ca)  
D = žláznatý dvanáctibuněčný chlup  
E = zevní pokožka horní části koruny v plošném pohle-  
du s diacytickým průduchem (Ea) a žláznatým  
chlupem (Eb)  
F = pokožka kalicha, v plošném pohledu, s krycími  
chlupy

**Obr. 1** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškové  
tymiánové nati z *Thymus vulgaris* (viz Zkoušku totož-  
nosti B)



- A = pokožka svrchní strany listu v plošném pohledu  
a buňkami s různocitně ztlustlými stěnami (Aa),  
diacytickým průduchem (Ab), krycími chlupy  
s bradavčitými stěnami (Ac) a palisádovým paren-  
chymem (Ad)  
B a E = pokožka na příčném řezu s jednobuněčnými  
krycími chlupy (Ba, Ea) a jednořadým dvoubuněč-  
ným krycím chlupem (Bb)  
C = jednořadý třibuněčný krycí chlup  
D = pokožka na spodní straně listu v plošném pohledu  
s buňkami se stěnami různocitně ztlustlými (Da),  
žláznatý chlup tvořený dvanácti žláznatými buňka-  
mi (Db), žláznatý chlup s jednobuněčnou hlavičkou  
(Dc) a palisádovým parenchymem (Dd)  
F = mnohobuněčný krycí chlup z báze listové čepele  
(*T. zygis*)  
G = pokožka na příčném řezu s dvoubuněčnými (Ga)  
a třibuněčnými (Gb) krycími chlupy (*T. zygis*)

**Obr. 2** Ilustrace ke zkouškám totožnosti práškové ty-  
miánové nati z *Thymus zygis* (viz Zkoušku totožnosti B)

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12)  
se protřepává 3 min s 5 ml *dichlormethanu R* a zfiltruje  
se přes asi 2 g *síranu sodného bezvodého R*.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *thymolu R* a 10  $\mu\text{l}$  *karvakro-  
lu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro  
TLC R.

**Mobilní fáze.** *Dichlormethan R*.

**Nanášení.** 20  $\mu\text{l}$ , do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce A.** Pozoruje se v ultrafialovém světle při  
254 nm.

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
thymol: zhášející skvrna	nápadná zhášející skvrna zhášející skvrna (thymol)
	zhášející skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Postříká se *anisaldehydem RS*, použije se 10 ml na čtvercovou desku o straně 200 mm a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Hodnocení B.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině přítomny ještě další skvrny. Intenzita skvrn thymolu a karvakrolu závisí na zkoušeném druhu.

Horní okraj desky	
thymol: hnědorůžová skvrna	hnědorůžová skvrna (thymol)
karvakrol: světle fialová skvrna	světle fialová skvrna (karvakrol)
	šedorůžová skvrna fialová skvrna (cineol a linalol) šedohnědá skvrna (borneol) fialovomodrá skvrna intenzivní fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu thymolu a karvakrolu.

*Hodnocení.* Retenční čas charakteristických píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 10 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí. Stonky mohou mít průměr nejvýše 1 mm a délku nejvýše 15 mm. Nejsou přítomny roztroušené chlupaté části rostliny a listy s dlouhými chlupy na bázi (*Thymus serpyllum* L.).

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (355) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice** (2.8.12). 30,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 1000ml baňce s kulatým dnem se 400 ml *vody R* jako destilační kapaliny; bez přídavku *xy-lenu R* do dělené trubice.

**Thymol a karvakrol.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* Silice ze zkoušky. Silice se přefiltruje přes malé množství *síranu sodného bezvodého R* a zředí se *hexanem R*, předem použitým k promytí aparatury a síranu sodného bezvodého, na 5,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 0,20 g *thymolu R* a 50 mg *karvakrolu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 30 m až 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* makrogol 20 000 *R* (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Dusík pro chromatografii *R* nebo helium pro chromatografii *R*.

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min až 2 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 100.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–45	40 → 220
nástříkový prostor		190
detektor		210

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřík.* 0,2 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok:

– *rozlišení:* nejméně 1,5 mezi píkem thymolu a píkem karvakrolu.

Za použití retenčních časů určených z chromatografického záznamu porovnávacího roztoku se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Vypočítá se obsah thymolu a karvakrolu v procentech.

## THYMI TYPO THYMOLO ETHEROLEUM

7.3:1374

Tymiánová silice thymolového typu

*Synonyma.* Thymi typo thymolo aetheroleum, Thymi etheroleum, Tymiánová silice

#### DEFINICE

Je to silice získaná z čerstvé kvetoucí natě druhů *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L. nebo směsi obou druhů destilací s vodní parou.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Čirá žlutá nebo velmi tmavá červenohnědá pohyblivá kapalina, charakteristického pachu připomínajícího thymol.

*Rozpustnost.* Mísitelná s ethanolem bezvodým a s petrol-etherem.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

1.: B.

2.: A.

**A. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).**

*Zkoušený roztok.* 0,2 ml se rozpustí v dichlormethanu R a zředí se jím na 10 ml.

*Porovnávací roztok.* 5 mg thymolu R a 10 µl karvakrolu R se rozpustí v dichlormethanu R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Dichlormethan R.

*Nanášení.* 10 µl [nebo 4 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být ještě další slabé skvrny.

Horní okraj desky	
	růžová skvrna
thymol: oranžovohnědá skvrna	intenzivní oranžovohnědá skvrna (thymol)
karvakrol: oranžovošedá skvrna	může být přítomna slabá oranžovošedá skvrna (karvakrol)
	růžová skvrna
	fialová skvrna
	hnědošedá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil (viz Zkoušky na čistotu).**

*Hodnocení.* Retenční časy charakteristických piků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům piků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,915 až 0,935.

**Index lomu** (2.2.6). 1,490 až 1,505.

**Chromatografický profil.** Plynová chromatografie (2.2.28), metoda normalizace.

*Zkoušený roztok.* 200 µl se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 5 µl β-myrcenu R, 5 µl α-terpine-*nu* R, 20 µl p-cymenu R, 10 µl γ-terpinenu R, 5 µl linalolu R, 5 µl terpinen-4-olu R, 40 mg thymolu R a 5 µl karvakrolu R se rozpustí v 5 ml heptanu R.

*Porovnávací roztok (b).* 10 µl karvakrolu R se rozpustí v heptanu R a zředí se jím na 10,0 ml. 100 µl tohoto roztoku se zředí heptanem R na 10,0 ml.

*Kolona:*

- *materiál:* tavený křemen;
- *rozměry:* délka 60 m, vnitřní průměr 0,25 mm;
- *stacionární fáze:* poly(difenyl)(dimethyl)siloxan R (tloušťka filmu 0,25 µm).

*Nosný plyn.* Helium pro chromatografii R.

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Dělicí poměr.* 1 : 50.

*Teplota:*

	Čas (min)	Teplota (°C)
kolona	0–75	65 → 215
nástřikový prostor		230
detektor		250

Rostlinné drogy a přípravky...

*Detekce.* Plamenoionizační detektor.

*Nástřik.* 1 µl.

*Eluční pořadí.* Viz pořadí uvedené ve složení porovnávacího roztoku (a). Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

*Test způsobilosti,* porovnávací roztok (a):

- *rozlíšení:* nejméně 1,5 mezi píkem thymolu a píkem karvakrolu.

*Identifikace piků.* Za použití retenčních časů určených z chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se identifikují látky na chromatogramu zkoušeného roztoku. Pík α-thujenu se eluuje s relativní retencí asi 0,8 vztaženou k β-myrcenu. Pík karvakrol-methyletheru se eluuje s relativní retencí asi 0,9 vztaženou k thymolu.

Vypočítá se obsah jednotlivých složek v procentech; obsah se pohybuje v následujících rozmezech:

- α-thujen: 0,2 % až 1,5 %;
- β-myrcen: 1,0 % až 3,0 %;
- α-terpinen: 0,9 % až 2,6 %;
- p-cymen: 14,0 % až 28,0 %;
- γ-terpinen: 4,0 % až 12,0 %;
- linalol: 1,5 % až 6,5 %;
- terpinen-4-ol: 0,1 % až 2,5 %;
- karvakrol-methylether: 0,05 % až 1,5 %;
- thymol: 37,0 % až 55,0 %;
- karvakrol: 0,5 % až 5,5 %;
- *limit zanedbatelnosti:* plocha hlavního piků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

**SKLADOVÁNÍ**

Při teplotě nepřevyšující 25 °C.



## TILIAE FLOS

6.0:0957

## Lipový květ

## DEFINICE

Jsou to celá usušená květenství druhů *Tilia cordata* MILL., *Tilia platyphyllos* SCOP., *Tilia × vulgaris* HEYNE, nebo jejich směs.

## VLASTNOSTI

Droga slabého aromatického pachu, nasládlé, slizovité chuti.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Květenství je žlutozelené. Hlavní stopka květenství nese jazykovitý blanitý žlutozelený téměř lysý listen. Hlavní žilka listenu je dolní polovinou délky srostlá s hlavní stopkou. Květenství je obvykle složené ze dvou až sedmi někdy až ze šestnácti květů. Kališní lístky jsou opadavé, až 6 mm dlouhé, na vnitřní straně lysé, na zevní straně a na okrajích pýřité. Pět korunních lístků je tenkých, kopist'ovitých, nažloutle bílých až 8 mm dlouhých, s jemnou žilnatinou, na okrajích lístků jen někdy jednotlivé chlupy. Tyčinky jsou četné, volné, obvykle uspořádané do pěti svazků. Semeník je svrchní, čnělka s pětilaločnou bliznou.

**B.** Květenství se rozdělí na jednotlivé části a pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka listenu je na svrchní straně z buněk se sedlovitými stěnami rovnými nebo jen mírně vlnitě zprohýbanými; na spodní straně buňky pokožky se sedlovitými stěnami vlnitě zprohýbanými a anomocytickými průduchy (2.8.3). Jednotlivé buňky mezofylu s malými drúzami šřavelanu vápenatého. V parenchymu kalicha, zejména v blízkosti žilek jsou četné slizové buňky a buňky s malými drúzami šřavelanu vápenatého. Pokožka kalicha na svrchní straně se zahnutými jednobuněčnými ztlustlými krycími chlupy nebo hvězdovitými chlupy, složenými až z pěti buněk. Pokožka koruny z buněk se sedlovitými stěnami přímými, krytá zvrásněnou kutikulou, bez průduchů.

V parenchymu koruny jsou drobné drúzy šřavelanu vápenatého a zejména v horní části lístků slizové buňky. Pylová zrna jsou oválná až nevýrazně trojhranná, o průměru asi 30 μm až 40 μm, se třemi klíčními póry a jemně zrnitou exinou. Semeník je lysý nebo pýřitý s chlupy často výrazně zprohýbanými, jednobuněčnými nebo hvězdovitými, složenými ze dvou až čtyř větví.

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 2,0 mg *kyseliny kávové R*, 5 mg *hyperosidu R* a 5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 10 μl; do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pak se postříká roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se asi 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v pořadí vzrůstající hodnoty  $R_F$  žlutooranžově nebo hnědooranžově fluoreskující skvrny *rutinu* a *hyperosidu* a zelenomodře fluoreskující skvrna *kyseliny kávové*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku fluoreskuje hlavní skvrna hnědožlutě nebo oranžově. Tato skvrna se nachází v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou *hyperosidu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

V denním světle tato skvrna zřetelně vyniká mezi ostatními jako hlavní skvrna. Skvrna odpovídající polohou  $R_F$  *rutinu* fluoreskuje také hnědožlutě. Pod ní mohou být dvě žlutě fluoreskující skvrny. Mezi skvrnami *rutinu* a *hyperosidu* jsou oranžově a žlutě fluoreskující skvrny. Mezi skvrnami *hyperosidu* a *kyseliny kávové* je až pět žlutě nebo oranžově fluoreskujících skvrn. Těsně pod skvrnou *kyseliny kávové* je skvrna fluoreskující modře.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 2 %, stanoví se se 30 g drogy.

Nejsou přítomna květenství s listenem na spodní straně s hvězdovitými chlupy složenými z pěti až osmi větví, s květy se zdánlivě dvouřadou korunou tvořenou přeměnou pěti tyčinek v petální staminodia a květy, které nemají laločnatou nebo vroubkovanou bliznu. Šestičetné květy mohou být přítomny jen výjimečně (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* MOENCH).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %, 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 8,0 %.

## TORMENTILLAE RHIZOMA

6.8:1478

## Nátržníkový oddenek

## DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek druhu *Potentilla erecta* (L.) RAEUSCH. (*P. tormentilla* STOKES) zbavený kořenů.

*Obsah.* Nejméně 7 % tříslovin, vyjádřeno jako *pyrogallol* ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oddenek je válcovitě větvenovitý, silně proměnlivého vzhledu, často tvoří zkroutené uzlovité hlízy až 10 cm dlouhé a 1 cm až 2 cm silné, velmi tvrdé, jen vzácně větvené. Oddenek je na povrchu hnědý až červenohnědý, svařetlý, se zbytky kořenů a příčně protáhlými, vpadlými bělavými jizvami po lodyhách. Na vrcholu oddenku mohou být zbytky četných nadzemních lodyh.

Oddenek je na lomu tmavočervený až hnědožlutý, lom je krátký, zrnitý.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je červeno-hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: hrubě ostnitě drúzy šřavelanu vápenatého o průměru až 60 µm; úlomky tenkostěnného parenchymu obsahujícího červenohnědé třísliviny; skupiny úzkých dvůrkovitě ztlustlých cév s širokými póry; ztlustlé a tečkované mnohohranné buňky parenchymu; skupiny a úlomky sklerenchymatických vláken; někdy úlomky korku s deskovitými hnědými tenkostěnnými buňkami. Při pozorování v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V) jsou patrná kulovitá nebo oválná škrobová zrna délky až asi 20 µm.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se protřepává 10 min s 10 ml *vody R* a zfiltruje se. Filtrát se protřepává dvakrát 10 ml *ethyl-acetátu R*. Spojené horní vrstvy se zfiltrují přes 6 g *síranu sodného bezvodého R*. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v 1,0 ml *ethyl-acetátu R*.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *katechinu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *etheru R*, *hexanu R* a *ethyl-acetátu R* (20 + 20 + 20 + 40).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 10 min až 15 min na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (5 g/l); objeví se načervenalé skvrny. Vrstva se vystaví působení par amoniaku; skvrny se zbarví intenzivněji červenohnědě. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
katechin: intenzivní červenohnědá skvrna	velmi intenzivní červenohnědá skvrna (katechin)
	slaběji zbarvená skvrna intenzivní skvrna
	slaběji zbarvené skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí** (2.8.2). Nejvýše 3 % kořenů a lodyh i oddenků na lomu zčernalých a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Kadmium** (2.4.27). Nejvýše 2,0 µg/g.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslivin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 0,500 g práškové drogy (180) (2.9.12).

## TORMENTILLAE TINCTURA

6.0:1895

### Nátržníková tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Tormentillae rhizoma* (1478).

*Obsah.* Nejméně 1,5 % tříslivin, vyjádřeno jako pyrogallol ( $C_6H_6O_3$ ;  $M_r$  126,1).

#### VÝROBA

Vyrábí se vhodným postupem z jednoho dílu drogy a pěti dílů ethanolu 70% (V/V).

#### VLASTNOSTI

Červená nebo červenohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 ml tinktury se smíchá s 1,0 ml ethanolu 70% (V/V) *R*.

*Porovnávací roztok.* 1,0 mg *katechinu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *etheru R*, *kyseliny octové ledové R*, *hexanu R* a *ethyl-acetátu R* (20 + 20 + 20 + 40).

*Nanášení.* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 10 min až 15 min na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (5 g/l). Objeví se načervenalé skvrny. Vrstva se vystaví působení par amoniaku, skvrny se zbarví intenzivněji červenohnědě. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
katechin: intenzivní skvrna	intenzivní skvrna (katechin)
	slaběji zbarvená skvrna intenzivní skvrna
	slaběji zbarvené skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ethanol** (2.9.10). 64 % (V/V) až 69 % (V/V).

**Methanol a propan-2-ol** (2.9.11). Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení tříslovin v rostlinných drogách (2.8.14); použije se 2,50 g zkoušené tinktury.

## TRAGACANTHA

6.3:0532

### Tragant

CAS 9000-65-1

#### DEFINICE

Je to lepkavý, na vzduchu tvrdnoucí sliz, vytékající samovolně nebo po naříznutí kmenu a větví druhu *Astragalus gummifer* LABILL. a některých dalších druhů rodu *Astragalus* ze západní Asie.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Tenké zploštělé pentlicovité bílé nebo nažloutlé průsvitné proužky, asi 30 mm dlouhé, 10 mm široké a až 1 mm silné, více nebo méně zakřivené, rohovité; lom je krátký; na povrchu jsou jemné, podélné rýhy a soustředná, příčná žebra. Mohou být přítomny také poněkud silnější kusy podobného tvaru, méně průsvitné a hůře se lámající.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je bílý nebo téměř bílý, tvoří slizovitý gel s asi desetinásobným množstvím vody R. Pozoruje se pod mikroskopem v glycerolu R 50% (V/V). Ve slizovité hmotě jsou patrné četné vrstevnaté buněčné membrány, které se barví chloridem zinečnatým s jodem RS fialově. Slizovitá hmota obsahuje škrobová zrna jednotlivá nebo v malých skupinách, většinou okrouhlá, někdy deformovaná, o průměru 4 μm až 10 μm, někdy až 20 μm; středové hilum je viditelné v polarizovaném světle (mezi příčnými Nikolovými hranoly).
- C.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Arabská klovatina (viz Zkoušky na čistotu).  
*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny odpovídající galaktose, arabinose a xylose. Může být přítomna nažloutlá skvrna v čele mobilní fáze a šedo zelená skvrna mezi skvrnami galaktosy a arabinosy.
- D.** 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se navlhčí 1 ml ethanolu 96% R a postupně za stálého protřepávání se přidává 50 ml vody R, dokud nevznikne homogenní sliz. 5 ml slizu se smíchá s 5 ml vody R a 2 ml hydroxidu barnatého RS; vznikne jemná vločkovitá sraženina. Zahřívá se 10 min na vodní lázni; vzniká intenzivní žluté zbarvení.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Arabská klovatina.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 100 mg práškové drogy (355) (2.9.12) se v silnostěnné odstředivací zkumavce smíchá se 2 ml roztoku kyseliny trifluoroctové R (100 g/l), silně se třepe do rozpuštění vzniklého gelu, zkumavka se uzavře a směs se zahřívá 1 h při 120 °C. Hydrolyzát se odstředí, čirá supernatantní tekutina se opatrně převede do 50ml baňky, přidá

se 10 ml vody R a roztok se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Ke konečnému čirému filmu se přidá 0,1 ml vody R a 0,9 ml methanolu R. Amorfni sraženina se odstředí a, je-li třeba, supernatantní tekutina se zředí methanolem R na 1 ml.

*Porovnávací roztok.* 10 mg arabinosy R, 10 mg galaktosy R, 10 mg rhamnosy R a 10 mg xylosy R se rozpustí v 1 ml vody R a zředí se methanolem R na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R (16 g/l), butan-1-olu R a acetonu R (10 + 40 + 50).

*Nanášení.* 10 μl, do proužků.

*Vyvíjení A.* Po dráze 10 cm.

*Sušení A.* Několik minut v proudě teplého vzduchu.

*Vyvíjení B.* Stejnou mobilní fází po dráze 15 cm.

*Sušení B.* 10 min při 110 °C.

*Detekce.* Postříká se anisaldehydem RS a 10 min se suší při 110 °C.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny (v pořadí vzrůstající hodnoty  $R_F$ ) odpovídající galaktose (šedo zelená nebo zelená), arabinose (žlutozelená), xylose (zelenošedá nebo žlutošedá) a rhamnose (žlutozelená). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žlutozelená skvrna odpovídající polohou skvrně rhamnosy na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Methylcelulosa.** Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Arabská klovatina.

*Hodnocení.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrná červená skvrna v blízkosti čela mobilní fáze.

#### Slizy z rostlin rodu *Sterculia*.

- A.** 0,2 g práškové drogy (355) (2.9.12) se v 10ml odměrném válci se zabroušenou zátkou děleném po 0,1 ml protřepává s 10 ml ethanolu 60% (V/V) R. Objem gelu je nejvýše 1,5 ml.
- B.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se protřepává se 100 ml vody R a pak se přidá 0,1 ml červeně methylové RS. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 5,0 ml hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS.

**Cizí látky.** Nejvýše 1,0 %; 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se ve 250ml baňce s kulatým dnem smíchají s 95 ml methanolu R a promíchá se krouživým pohybem tak, aby se zkoušená droga navlhčila. Přidá se 60 ml kyseliny chlorovodíkové RS, několik skleněných varných kuliček o průměru asi 4 mm a zahřívá se 3 h pod zpětným chladičem na vodní lázni za občasného protřepávání. Varné kuličky se odstraní a ještě horká suspenze se zfiltruje ve vakuu přes filtr ze slinutého skla (160) (2.1.2). Baňka se promyje malým množstvím vody R, promývací tekutina se zfiltruje. Zbytek na filtru se promyje asi 40 ml methanolu R a suší se při 110 °C do konstantní hmotnosti (asi 1 h). Nechá se ochladit v exsikátoru a zváží se. Zbytek váží nejvýše 20 mg.

**Doba průtoku.** Nejméně 10 s nebo nejméně 50 s, je-li látka určena pro přípravu emulzí; 1,0 g práškové drogy (125 až 250) (2.9.12) se v 1000ml baňce s kulatým dnem se zabroušenou zátkou smíchá s 8,0 ml ethanolu 96% R a baňka se uzavře. Promíchá se tak, aby suspenze pokryla

vnitřní stěny baňky, ale aby nesmácela zátku. Pak se přidá po malých dávkách 72,0 ml vody R, baňka se uzavře a 3 min se intenzivně protřepává. Nechá se stát 24 h a znovu se 3 min intenzivně protřepává. Vzduchové bubliny se ze slizu odstraní pomocí vakua (5 min). Sliz se převede do 50ml válce. Do slizu se ponoří skleněná trubice délky 200 mm a vnitřního průměru 6,0 mm, označená ve vzdálenosti 20 mm a 120 mm od dolního okraje. Trubice nesmí být umyta povrchově aktivními látkami. Když dosáhne hladina slizu horní značky, uzavře se trubice prstem. Pak se vyjme z válce, prst se odejme a stopkami se měří čas v sekundách potřebný k tomu, aby hladina slizu dosáhla dolní značky. Opakuje se čtyřikrát, vypočítá se průměrná hodnota posledních tří stanovení.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 4,0 %.

#### Mikrobiální kontaminace:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti  $10^4$  CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti  $10^2$  CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Escherichia coli* (2.6.13);
- nepřítomnost *Salmonella* (2.6.13).

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda látka je nebo není vhodná pro přípravu emulzí.

## TRIFOLII FIBRINI FOLIUM

6.0:1605

### Vachtový list

*Synonymum.* Menyanthis trifoliatae folium

#### DEFINICE

Je to celý usušený list druhu *Menyanthes trifoliata* L. nebo jeho úlomky.

#### VLASTNOSTI

Droga má velmi hořkou chuť, která dlouho přetrvává.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je dlouze řapíkatý, trojčetný, na bázi s dlouhou pochvou; řapík je až 5 mm silný, silně podélně rýhovaný, dole rozšířený v pochvu. Lístky jsou stejně velké, přisedlé, obvejčité až 10 cm dlouhé a až 5 cm široké, celokrajné, někdy oddáleně zubaté, na bázi kopistovitě, okraj čepele s nahnědlými nebo načervenalými hydatodami. Lístky jsou na svrchní straně tmavě zelené, lysé, na spodní straně světlejší se širokou bělavou jemně rýhovanou vyniklou střední žilkou.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky svrchní strany listu z mnohranných buněk s tenkými stěnami, úlomky pokožky spodní strany listu z buněk s vlnitě zprohýbanými stěnami; anomocytické průduchy (2.8.3) s průvodními buňkami paprsciť rýhovanými na obou stranách listu; pokožka nad žilkami z buněk s rovnými stěnami, na povrchu vyklenuťými; úlomky mezofylu z parenchymu s velkými inter-

celulárními dutinami (aerenchym); nepravidelné buňky zřídka se sklereidami; úlomky šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlých cév.

#### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min při 60 °C ve vodní lázni za míchání. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku ve vodní lázni při teplotě 60 °C do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2,0 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 5 mg *loganinu R* se rozpustí v 15 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *ethyl-acetátu R* (8 + 15 + 77).

**Nanášení.** 30 µl, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a suší se 10 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny.

Horní okraj desky	
loganin: šedofialová skvrna	fialová skvrna intenzivní modrá skvrna fialová až šedofialová skvrna šedá až šedomodrá skvrna nahnědlá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 10,0 %.

**Číslo hořkosti (2.8.15).** Nejméně 3000.

## TRIGONELLAE FOENUGRAECI SEMEN

6.6:1323

### Semeno pískavice řeckého sena

#### DEFINICE

Je to usušené zralé semeno druhu *Trigonella foenum-graecum* L.

#### VLASTNOSTI

Droga charakteristického silně aromatického pachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Semeno je tvrdé, hladké, hnědé nebo červenohnědé, více nebo méně kosodélníkové se zaoblenými okraji. Je 3 mm až 5 mm dlouhé, 2 mm až 3 mm široké a 1,5 mm až 2 mm silné. Nejširší povrch semene je znatelně roz-

dělen rýhou do dvou nestejných částí. Menší část obsahuje základ kořínku; větší část obsahuje dělohy.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: v příčném pohledu jsou patrné úlomky pokožky osemení z buněk lahvicovitě tvaru pokrytých silnou kutikulou, pod nimi velké buňky hypodermis tvaru komolého kužele, které jsou na horním konci užší, uprostřed zaskrcené a mřížkovitě ztlustlé; při plošném pohledu jsou patrné žlutohnědé úlomky pokožky z malých mnohohranných buněk se stěnami ztlustlými, tečkovanými, které jsou často provázány buňkami hypodermis s růžencovitě ztlustlými stěnami; úlomky níže ležící hypodermis z mnohohranných buněk, mřížkovitě ztlustlých na horních a dolních stěnách; parenchym osemení z protáhlých, obdélníkových buněk s mírně růžencovitě ztlustlými stěnami; úlomky endospermu s nepravidelně ztlustlými, někdy protáhlými buňkami obsahujícími sliz.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (710) (2.9.12) se v 25 ml kuželové baňce smíchá s 5,0 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C. Ochladí se a zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 3,0 mg *trigonellin-hydrochloridu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu *F<sub>254</sub>* pro TLC *R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (30 + 70).

*Nanášení.* 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku; do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce A.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní polovině skvrna žhášející fluorescenci odpovídající polohou a fluorescenci skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

*Detekce B.* Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS2*.

*Hodnocení B.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní oranžovočervená skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. V horní polovině je široká světle hnědožlutá skvrna (triacylglyceroly).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 6; stanoví se s práškovou drogou (710) (2.9.12).

## URTICAE FOLIUM

7.0:1897

### Kopřivový list

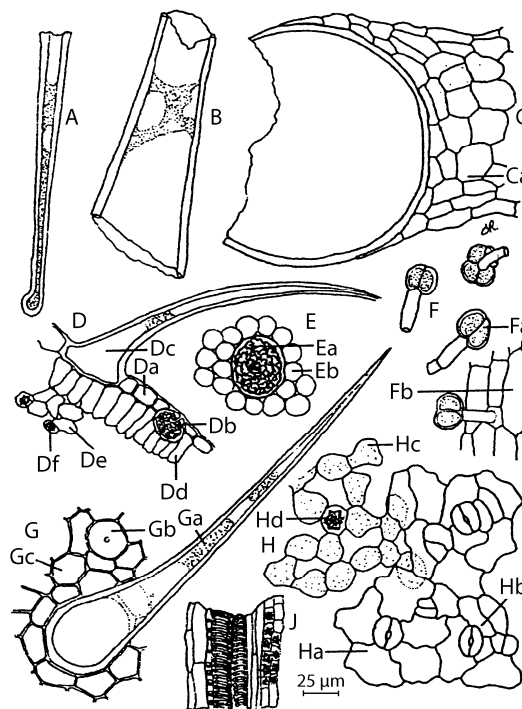
#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhů *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L. nebo směsi obou druhů.

*Obsah.* Nejméně 0,3 % součtu obsahů kyseliny kafeoyljablečné [kyselina *O*-(3,4-dihydroxycinnamoyl)jablečná] a kyseliny chlorogenové, vyjádřeno jako kyselina chlorogenová ( $C_{16}H_{18}O_9$ ;  $M_r$  354,3), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Listy jsou na svrchní straně tmavozelené, tmavě šedozelelé nebo hnědozelelé, na spodní straně světlejší; na obou stranách listu jsou roztroušené žahavé chlupy a krátké krycí chlupy, které jsou četnější na okraji čepele a na žilnatině spodní strany listu. Čepel je silně zmačkaná, vejčítá nebo kopinatá, až 100 mm dlouhá a až 50 mm široká, na okraji hrubě zubatá, se srdčitou až okrouhlouází. Žilnatina je síťovitá, na spodní straně listu zřetelně vyniklá. Řapík je zelený nebo hnědozelený, okrouhlý nebo zploštělý, asi 1 mm široký, podélně svrasklý a zkroucený, na povrchu se žahavými a krycími chlupy.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového kopřivového listu

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je zelený nebo šedozelelý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky jednobuněčných žahavých chlupů [A, B, C] až 2 mm dlouhé, tvořené protáhlou pentlicovitou buňkou přisedlou na mnohořadou zvýšenou bází [Ca], s lehce zduřelým žahavým snadno lámavým hrotem; malé žláznaté chlupy [F] (35 µm až 65 µm) s jednobuněčnou nebo dvoubuněčnou nohou a dvoubuněčnou nebo čtyřbuněčnou hlavičkou, jednotlivé [Fa] nebo na úlomcích pokožky [Fb]; úlomky svrchní po-

kožky listu v plošném pohledu [G] nebo v příčném řezu [D] s buňkami s lehce zprohýbanými stěnami [Da, Gc], jednobuněčné přímé nebo lehce zahnuté krycí chlupy, na bázi rozšířené, až 700 µm dlouhé [Dc, Ga] a četné velké cystolity [Db, Ea, Gb], které jsou prázdné nebo obsahují hustou zrnitou hmotu uhličitanu vápenatého; palisádový parenchym v plošném pohledu [E] s kulovitými buňkami [Eb] obklopujícími cystolity [Ea] nebo v příčném řezu [Dd]; úlomky spodní pokožky listu s buňkami se zprohýbanými nebo vlnitými stěnami [H], anomocytickými [Ha] nebo anisocytickými [Hb] průduchy (2.8.3) a houbovým mezofylem v plošném pohledu [Hc] a v příčném řezu [De] obsahujícím malé drúzy kalcium-oxalátu v plošném pohledu [Hd] a v příčném řezu [Df]; zřídka malé skupiny cév doprovázených parenchymem s drúzami kalcium-oxalátu [J].

### C. Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1 g práškované drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R*, vaří se 15 min pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje. Odpaří se do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok.** 1 mg *skopoletinu R* a 2 mg *kyseliny chlorogenové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (2,5 + 4 + 4 + 50).

**Nanášení.** 10 µl [nebo 4 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 8 cm [nebo 6 mm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Zahřívá se 5 min při 100 °C. Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být v dolní polovině přítomny další slabé modře nebo žlutě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
skopoletin: intenzivně modře fluoreskující skvrna	dvě červené skvrny modře fluoreskující skvrna (skopoletin)
	modře fluoreskující skvrna
kyselina chlorogenová: modře fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) hnědožlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % stonků a nejvýše 5 % ostatních cizích příměsí (včetně květenství).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 20,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1).

Nejvýše 4,0 %.

### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** K 0,200 g práškované rostlinné drogy (355) (2.9.12) se přidá 25,0 ml roztoku *methanolu R* 40% (V/V), 30 min se míchá v ultrazvukové lázni při 40 °C a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kyseliny chlorogenové CRL* se rozpustí ve 100,0 ml roztoku *methanolu R* 40% (V/V). 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *methanolu R* 40% (V/V) na 25,0 ml.

**Předkolona:**

– **rozměry:** délka 4 mm, vnitřní průměr 4 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R* (5 µm).

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R* (5 µm);

– **teplota:** 25 °C.

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (15 + 85), pH směsi se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 2,0;

– **mobilní fáze B:** *methanol R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–1	100	0
1–25	100 → 85	0 → 15
25–35	85	15
35–36	85 → 0	15 → 100

**Průtoková rychlost.** 1 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Relativní retence** vztažená ke kyselině chlorogenové (retenční čas asi 13 min). Kyselina kafeoyljablečná asi 2,2.

Obsah *kyseliny chlorogenové* a *kyseliny kafeoyljablečné* v procentech, vyjádřeno jako kyselina chlorogenová, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 20}$$

v němž značí:

$A_1$  – součet ploch pík *kyseliny kafeoyljablečné* a *kyseliny chlorogenové* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

- $A_2$  – plochu píku kyseliny chlorogenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost kyseliny chlorogenové CRL použité k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- $p$  – obsah kyseliny chlorogenové v kyselině chlorogenové CRL v procentech.

## UVAE URSI FOLIUM

7.1:1054

### Medvědicový list

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENG.

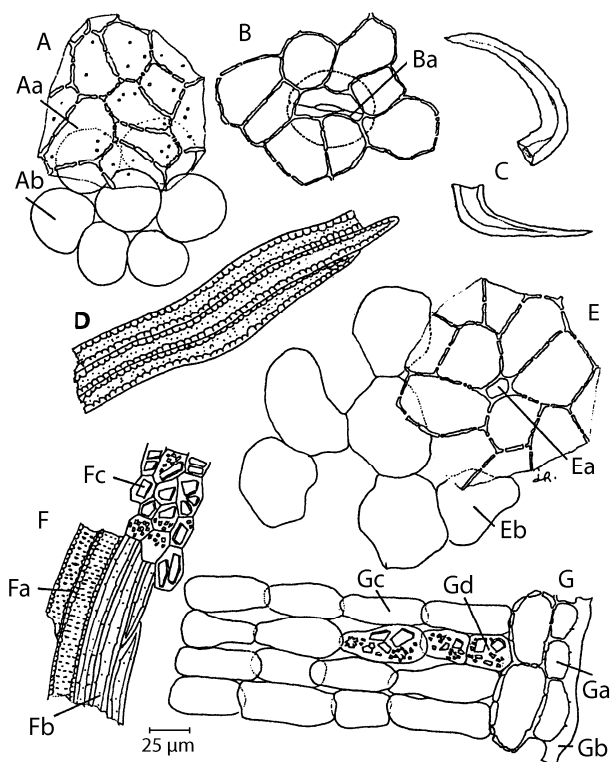
**Obsah.** Nejméně 7,0 % bezvodého arbutinu ( $C_{12}H_{16}O_7$ ;  $M_r$  272,3), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** List je lesklý, na svrchní straně tmavě zelený, na spodní straně světlejší, zpravidla 7 mm až 30 mm dlouhý a 5 mm až 12 mm široký, opakvejčitý, celokrajný s hladkou, často podvinutou čepelí, na bázi zúženou v krátký řapík. List je na vrcholku tupý nebo zašpičatělý, čepel je tlustá, kožovitá. Žilnatina je zpeřená, jemně síťovitá, dobře patrná na obou stranách listu. Svrchní strana má vpadlou žilnatinu tvořící charakteristický zmitý vzhled. Jen mladý list je na okraji brvitý, starší listy jsou lysé.
- B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelený, zelenošedý nebo žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky svrchní pokožky z plošného pohledu [A] se ztlustlými a nepravidelně tečkovanými mnohohrannými buňkami [Aa] obvykle provázenými palisádovým parenchymem [Ab]; úlomky svrchní pokožky v příčném řezu [G] s buňkami se stěnami přímými [Ga] kryté silnou hladkou kutikulou [Gb], a provázené palisádovým parenchymem [Gc] se třemi nebo čtyřmi vrstvami buněk nestejných délek, některé z nich obsahují četné hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Gd]; úlomky spodní pokožky v plošném pohledu [B, E], s anomocytickými [Ba] průduchy (2.8.3) obklopené pěti až jedenácti vedlejšími buňkami [B], jizvy bázi chlupů [Ea], a houbový parenchym [Eb]; skupiny dřevnatělých vláken pericyklu [D]; úlomky cévního systému [F] složeného z tečkovaných cév [Fa] a vláken [Fb] provázaných řadami buněk obsahujících hranolovité krystaly kalcium-oxalátu [Fc]; v parenchymatických buňkách jsou olejové kapky; občas kuželovité, jednobuněčné krycí chlupy [C].

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,5 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 5 ml směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem, ještě horká směs se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí stejnou směsí rozpouštědel a zředí se jí na 5 ml.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového medvědicového listu

**Porovnávací roztok.** 25 mg arbutinu R, 25 mg kyseliny gallové R a 25 mg hydrochinonu R se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (6 + 6 + 88).

**Nanášení.** 10 µl porovnávacího roztoku a 20 µl zkoušeného roztoku, do proužků.

**Vývíjení.** Po dráze 15 cm.

**Sušení.** Při 105 °C až 110 °C do odpaření mobilní fáze.

**Detekce.** Postříká se roztokem *dichlorchinonchlorimidu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *uhličitanu sodného bezvodého R* (20 g/l).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další dvě nebo tři modré skvrny a několik hnědých nebo hnědošedých skvrn.

Horní okraj desky	
hydrochinon: modrá skvrna	modrá skvrna
kyselina gallová: nahnědlá skvrna	nahnědlá skvrna
_____	_____
_____	_____
arbutin: světle modrá skvrna	světle modrá skvrna (arbutin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí** (2.8.2). Nejvýše 5 % stonků a nejvýše 3 % ostatních cizích příměsí.

**Jinak zbarvená droga.** Nejvýše 10 %; provede se způsobem uvedeným ve zkoušce Cizí příměsí (2.8.2).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 0,800 g práškové drogy (250) (2.9.12) se ve 100ml baňce se zabroušeným hrdlem smíchá se 20 ml vody R a směs se zahřívá 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se přes chomáček vaty. Vata se zbytkem drogy se vloží zpět do 100ml baňky, přidá se 20 ml vody R a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se přes papírový filtr. Spojené filtráty se zředí vodou R na 50,0 ml a zfiltrují se přes papírový filtr. Prvních 10 ml filtrátu se odstraní.

**Porovnávací roztok (a).** 50,0 mg arbutinu CRL se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 2,5 mg hydrochinonu R se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 10,0 ml.

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný deaktivovaný pro bazické látky R (5 µm).

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů methanolu R a vody R (10 + 90).

**Průtoková rychlost.** 1,2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Test způsobilosti:**

- rozlišení: nejméně 4,0 mezi píkem arbutinu a píkem hydrochinonu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Obsah arbutinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{F_1 \cdot m_2 \cdot p}{F_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$F_1$  – plochu píku arbutinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$F_2$  – plochu píku arbutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a);

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

$m_2$  – hmotnost arbutinu CRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;

$p$  – obsah arbutinu v procentech v arbutinu CRL.

## VALERIANAE EXTRACTUM AQUOSUM SICCUM

6.8:2400

## Kozlíkový vodný extrakt suchý

## DEFINICE

Je to extrakt vyrobený z drogy *Valerianae radix* (0453).

**Obsah.** Nejméně 0,02 % seskviterpenových kyselin, vyjádřeno jako kyselina valerénová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ;  $M_r$  234,34), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Připravuje se z drogy a vody při teplotě nejméně 60 °C vhodným postupem.

## VLASTNOSTI

**Vzhled.** Hnědý nebo nahnědlý hygroskopický prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g extraktu se suspenduje v 10 ml methanolu R a ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

**Porovnávací roztok.** 5 mg kyseliny acetoxyvalerénové R a 5 mg kyseliny valerénové R se rozpustí ve 20 ml methanolu R.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, ethyl-acetátu R a cyklohexanu R (2 + 38 + 60).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se anisaldehydem RS a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být přítomna méně intenzivní fialově zbarvená skvrna kyseliny valerénové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina valerénová: fialová skvrna	
kyselina acetoxyvalerénová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina acetoxyvalerénová)
	fialová skvrna (kyselina hydroxyvalerénová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 6,0 %.



## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Rozpouštěcí směs.* Směs stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R*.

*Zkoušený roztok.* 1,00 g extraktu se suspenduje ve 40 ml *vody R* v 300ml kuželové baňce za míchání kroužením.

Přidá se 40 ml *methanolu R* a míchá se kroužením 1 h při 200 ot/min. Suspenze se zfiltruje do odměrné baňky a kuželová baňka se třikrát promyje 5 ml rozpouštěcí směsí. Zředí se rozpouštěcí směsí na 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* Množství *kozlíkového extraktu suchého HRL* odpovídající 1,0 mg kyseliny valerenové se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml. Ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a pak se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

*Porovnávací roztok (b).* 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 50,0 ml.

*Kolona:*

- *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;
- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný *R* (5 μm).

*Mobilní fáze:*

- *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *acetonitrilu R1* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) (20 + 80);
- *mobilní fáze B:* směs objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) a *acetonitrilu R1* (20 + 80).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	55	45
5–18	55 → 20	45 → 80
18–22	20	80

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

*Nástrik.* 20 μl.

*Identifikace píků.* K identifikaci píků kyseliny acetoxyvalerenové a kyseliny hydroxyvalerenové se použije chromatogram dodávaný s *kozlíkovým extraktem suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku (a).

*Relativní retence vztážená ke kyselině valerenové (retenční čas asi 19 min).* Kyselina hydroxyvalerenová asi 0,2; kyselina acetoxyvalerenová asi 0,5.

*Obsah seskviterpenových kyselin v procentech, vyjádřeno jako kyselina valerenová, se vypočítá podle vzorce:*

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,2}{A_3 \cdot m_1},$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny hydroxyvalerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny acetoxyvalerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_3$  – plochu píku kyseliny valerenové na chromatogramu porovnávacího roztoku (b);
- $m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *kozlíkového extraktu suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku (a) v gramech;
- $p$  – obsah kyseliny valerenové v *kozlíkovém extraktu suchém HRL* v procentech.

## VALERIANAE EXTRACTUM SICCCUM

7.1:1898

## Kozlíkový extrakt suchý

*Synonymum.* Valerianae extractum hydroalcoholicum sicccum

## DEFINICE

Je to suchý extrakt vyrobený z drogy *Valerianae radix* (0453).

*Obsah.* Nejméně 0,25 % seskviterpenových kyselin, vyjádřeno jako kyselina valerenová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ;  $M_r$  234,3), počítáno na vysušený extrakt.

## VÝROBA

Připravuje se z drogy a ethanolu 30% (V/V) až 90% (V/V) nebo methanolu 40% (V/V) až 55% (V/V) vhodným postupem.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Hnědý hygroskopický prášek.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g se suspenduje v 10 ml *methanolu R* a ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *kyseliny acetoxyvalerenové R* a 5 mg *kyseliny valerenové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC *R* (2 μm až 10 μm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *cyklohexanu R* (2 + 38 + 60).

*Nanášení.* 20 μl [nebo 5 μl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fialově zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina valerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina valerenová)
kyselina acetoxyvalerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina acetoxyvalerenová)
	dvě slabé nebo velmi slabé fialové skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Ztráta sušením** (2.8.17). Nejvýše 6,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,00 g se suspenduje v 50,0 ml *methanolu R1*, ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a zfiltruje se přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Porovnávací roztok.** Množství *kozlíkového extraktu suchého HRL* odpovídající 1,0 mg kyseliny valerénové se rozpustí v *methanolu R1* a zředí se jím na 10,0 ml. Ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a pak se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm).

**Mobilní fáze:**

- **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *acetonitrilu R1* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) (20 + 80);
- **mobilní fáze B:** směs objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) a *acetonitrilu R1* (20 + 80).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	55	45
5–18	55 → 20	45 → 80
18–20	20	80
20–22	20 → 55	80 → 45

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

**Nástřik.** 20 μl.

**Identifikace píků.** K identifikaci píků kyseliny hydroxyvalerénové, acetoxyvalerénové a kyseliny valerénové se použije chromatogram dodávaný s *kozlíkovým extraktem suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **relativní retence** vztahená ke kyselině valerénové (retenční čas asi 19 min): kyselina hydroxyvalerénová asi 0,2; kyselina acetoxyvalerénová asi 0,5.

Obsah seskviterpenových kyselin v procentech, vyjádřeno jako kyselina valerénová, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_2 + A_3) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_4 \cdot m_1},$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny hydroxyvalerénové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny acetoxyvalerénové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_3$  – plochu píku kyseliny valerénové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_4$  – plochu píku kyseliny valerénové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušeného extraktu použitého k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *kozlíkového extraktu suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

$p$  – obsah kyseliny valerénové v *kozlíkovém extraktu suchém HRL* v procentech.

## VALERIANAE RADIX

6.8:0453

## Kozlíkový kořen

## DEFINICE

Jsou to celé usušené oddenky, kořeny a výběžky druhu *Valeriana officinalis* L. *sensu lato* nebo jejich úlomky.

**Obsah,** počítáno na vysušenou drogu:

- **silice:** nejméně 4 ml/kg;
- **seskviterpenové kyseliny:** nejméně 0,17 %, vyjádřeno jako kyselina valerénová (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>; M<sub>r</sub> 234,34).

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Oddenek je žlutošedý nebo světle hnědošedý, opačně kuželovitý nebo válcovitý, až asi 50 mm dlouhý, o průměru 30 mm; bazální část je prodloužená nebo zploštělá, zpravidla úplně pokrytá četnými kořeny. Na vrcholu je obvykle jamkovitá jizva po nadzemní části rostliny; zbytky stonku jsou přítomné jen zřídka. Na podélném řezu je patrná dřev s centrální dutinou, s přehrádkami. Četné, převážně válcovité kořeny o průměru 1 mm až 3 mm jsou většinou více než 100 mm dlouhé, mají stejnou barvu jako oddenek. Vlákňité postranní kořínky jsou lámavé a nepříliš početné. Lom je krátký. Výběžky jsou charakteristické nápadnými uzlinami oddělenými podélně rýhovanými internodii 20 mm až 50 mm dlouhými. Lom je vláknitý.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutošedý nebo světle šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: buňky obsahující světle hnědou pryskyřici nebo kapky silice; skupiny malých pravoúhlých sklereid se ztlustlými stěnami a úzkým lumen ve tvaru rozvětveného kanálku; příležitostně skupiny větších sklereid s tenčími stěnami ze zbytků stonků; zdřevnatělé síťovité ztlustlé cévy jednotlivě nebo v malých skupinách; tenkostěnné protáhlé buňky kořenové pokožky někdy s kořenovými vlásky; občas úlomky korku.
- Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná četná škrobová zrna čtyřčetná až šestičetná, často ale jen jednotlivá okrouhlá nebo nepravidelná, o průměru až 15 μm; většina zrn má nezřetelně štěrbinovité nebo paprscité hilum.
- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).
- Zkoušený roztok.** 1 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suspenduje v 10 ml *methanolu R* a ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.
- Porovnávací roztok.** 5 mg *kyseliny acetoxyvalerénové R* a 5 mg *kyseliny valerénové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.
- Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *cyklohexanu R* (2 + 38 + 60).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fialově zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina valerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina valerenová)
kyselina acetoxyvalerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina acetoxyvalerenová)
	dvě slabé nebo velmi slabé fialové skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi (2.8.2).** Nejvýše 5 % zbytků stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejvýše 12,0 %; 1,000 g dobře zhomogenizované práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel (2.4.16).** Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).** Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice (2.8.12).** 40,0 g čerstvě práškové drogy (500) (2.9.12) se destiluje 4 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min ve 2000ml baňce s 500 ml *vody R* jako *destilační kapaliny*. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

**Seskviterpenové kyseliny.** Kapalinná chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,50 g práškové drogy (710) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem smíchá se 20 ml *methanolu R1*. Směs se zahřívá 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se zbytkem drogy se převede zpět do 100ml baňky s kulatým dnem. Přidá se 20 ml *methanolu R1* a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtráty se spojí a zředí se *methanolem R1*, kterým byla předem promyta baňka i filtr, na 50,0 ml.

**Porovnávací roztok.** Množství *kozlíkového extraktu suchého HRL* odpovídající 1,0 mg kyseliny valerenové se rozpustí v *methanolu R1* a zředí se jím na 10,0 ml. Ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a pak se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** směs objemových dílů *acetonitrilu R1* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) (20 + 80);

– **mobilní fáze B:** směs objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) a *acetonitrilu R1* (20 + 80).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	55	45
5–18	55 → 20	45 → 80
18–22	20	80

**Průtoková rychlost.** 1,5 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

**Nástřik.** 20 µl.

**Identifikace piků.** K identifikaci piků kyseliny acetoxyvalerenové a kyseliny valerenové se použije chromatogram dodávaný s *kozlíkovým extraktem suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

**Test způsobilosti, porovnávací roztok:**

– **relativní retence** vztahovaná ke kyselině valerenové (retenční čas asi 19 min). *Kyselina acetoxyvalerenová* asi 0,5.

**Obsah seskviterpenových kyselin v procentech, vyjádřeno jako kyselina valerenová (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>), se vypočítá podle vzorce:**

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_3 \cdot m_1}$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku kyseliny acetoxyvalerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>2</sub> – plochu píku kyseliny valerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>3</sub> – plochu píku kyseliny valerenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;

*m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;

*m*<sub>2</sub> – hmotnost *kozlíkového extraktu suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;

*p* – obsah kyseliny valerenové v *kozlíkovém extraktu suchém HRL* v procentech.

## VALERIANAE RADIX MINUTATA

6.8:2526

### Kozlíkový kořen řezaný

#### DEFINICE

Jsou to řezané usušené oddenky, kořeny a výběžky druhu *Valeriana officinalis* L. *sensu lato*.

Vyrábí se z drogy *Valerianae radix* (0453) a je určen k přípravě čajů.

*Obsah*, počítáno na vysušenou drogu:

- *silice*: nejméně 3 ml/kg;
- *seskviterpenové kyseliny*: nejméně 0,10 %, vyjádřeno jako kyselina valerenová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ;  $M_r$  234,34).

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutošedý nebo světle šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky: buňky obsahující světle hnědou pryskyřici nebo kapky silice; skupiny malých pravouhlých sklereid se ztlustlými stěnami a úzkým lumenem ve tvaru rozvětveného kanálku; příležitostně skupiny větších sklereid s tenčími stěnami ze zbytků stonků; zdřevnatělé síťovitě ztlustlé cévy jednotlivě nebo v malých skupinách; tenkostěnné protáhlé buňky kořenové pokožky někdy s kořenovými vlásky; občas úlomky korku.

Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). Jsou patrná četná škrobová zrna čtyřčetná až šestičetná, často jednotlivá okrouhlá nebo nepravidelná, o průměru až 15 µm; většina zrn má nezřetelně šterbinovité nebo papsřčité hilum.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1 g práškované drogy (355) (2.9.12) se suspenduje v 10 ml *methanolu R* a ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *kyseliny acetoxyvalerenové R* a 5 mg *kyseliny valerenové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethyl-acetátu R* a *cyklohexanu R* (2 + 38 + 60).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 5 µl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fialové zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina valerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina valerenová)
kyselina acetoxyvalerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina acetoxyvalerenová)
	dvě slabé nebo velmi slabé fialové skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % zbytků stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí; stanoví se před nařezáním drogy.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g dobře zhomogenizované práškované drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 12,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Silice** (2.8.12). 40,0 g čerstvě práškované drogy (500) (2.9.12) se destiluje 4 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min ve 2000ml baňce s 500 ml *vody R* jako *destilační kapaliny*. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

**Seskviterpenové kyseliny.** Kapalinná chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 1,50 g práškované drogy (710) (2.9.12) se ve 100ml baňce s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem smíchá se 20 ml *methanolu R1*. Směs se zahřívá 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se zbytkem drogy se převede zpět do 100ml baňky s kulatým dnem. Přidá se 20 ml *methanolu R1* a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtráty se spojí a zředí se *methanolem R1*, kterým byla předem promyta baňka i filtr, na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok.* Množství *kozlíkového extraktu suchého HRL* odpovídající 1,0 mg *kyseliny valerenové* se rozpustí v *methanolu R1* a zředí se jím na 10,0 ml. Ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a pak se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

– *stacionární fáze:* *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* směs objemových dílů *acetonitrilu R1* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) (20 + 80);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (5 g/l) a *acetonitrilu R1* (20 + 80).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	55	45
5–18	55 → 20	45 → 80
18–22	20	80

*Průtoková rychlost.* 1,5 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

*Nástřik.* 20 µl.

*Identifikace píků.* K identifikaci píků *kyseliny acetoxyvalerenové* a *kyseliny valerenové* se použije chromatogram dodávaný s *kozlíkovým extraktem suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

*Test způsobilosti, porovnávací roztok:*

– *relativní retence vztahovaná ke kyselině valerenové (retenční čas asi 19 min): kyselina acetoxyvalerenová asi 0,5.*

Obsah seskviterpenových kyselin v procentech, vyjádřeno jako kyselina valerénová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_3 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny acetoxyvalerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_2$  – plochu píku kyseliny valerénové na chromatogramu zkoušeného roztoku;  
 $A_3$  – plochu píku kyseliny valerénové na chromatogramu porovnávacího roztoku;  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;  
 $m_2$  – hmotnost *kozlíkového extraktu suchého HRL* použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;  
 $p$  – obsah kyseliny valerénové v *kozlíkovém extraktu suchém HRL* v procentech.

## VALERIANAE TINCTURA

6.8:1899

### Kozlíková tinktura

#### DEFINICE

Je to tinktura vyrobená z drogy *Valerianae radix* (0453).

Obsah. Nejméně 0,015 % seskviterpenových kyselin, vyjádřeno jako kyselina valerénová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ;  $M_r$  234,34).

#### VÝROBA

Připravuje se z jednoho dílu drogy a pěti dílů ethanolu 60 % (V/V) až 80 % (V/V) vhodným postupem.

#### VLASTNOSTI

Vzhled. Hnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

Zkoušený roztok. 5 ml se smíchá s 5 ml ethanolu 70% (V/V) R.

Porovnávací roztok. 5 mg kyseliny acetoxyvalerenové R a 5 mg kyseliny valerénové R se rozpustí ve 20 ml methanolu R.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5  $\mu$ m až 40  $\mu$ m) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2  $\mu$ m až 10  $\mu$ m)].

Mobilní fáze. Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, ethyl-acetátu R a cyklohexanu R (2 + 38 + 60).

Nanášení. 20  $\mu$ l [nebo 5  $\mu$ l], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

Vyvíjení. Po dráze 10 cm [nebo 6 cm].

Sušení. Na vzduchu.

Detekce. Postříká se anisaldehydem RS a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení. Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromato-

gramu zkoušeného roztoku mohou být další fialově zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina valerénová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina valerénová)
kyselina acetoxyvalerenová: fialová skvrna	fialová skvrna (kyselina acetoxyvalerenová)
	dvě slabé nebo velmi slabé fialové skvrny
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Ethanol (2.9.10). 95 % až 105 % hodnoty uvedené v označení na obalu.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

Zkoušený roztok. 10,0 g se zředí methanolem R1 na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. Množství *kozlíkového extraktu suchého HRL* odpovídající 1,0 mg kyseliny valerénové se rozpustí v methanolu R1 a zředí se jím na 10,0 ml. Ponechá se 10 min v ultrazvukové lázni a pak se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45  $\mu$ m).

#### Kolona:

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5  $\mu$ m).

#### Mobilní fáze:

- mobilní fáze A: směs objemových dílů acetonitrilu R1 a roztoku kyseliny fosforečné R (5 g/l) (20 + 80);
- mobilní fáze B: směs objemových dílů roztoku kyseliny fosforečné R (5 g/l) a acetonitrilu R1 (20 + 80).

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–5	55	45
5–18	55 → 20	45 → 80
18–22	20	80

Průtoková rychlost. 1,5 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 220 nm.

Nástřik. 20  $\mu$ l.

Identifikace piků. K identifikaci piků kyseliny acetoxyvalerenové a kyseliny valerénové se použije chromatogram dodávaný s *kozlíkovým extraktem suchým HRL* a chromatogram porovnávacího roztoku.

#### Test způsobilosti, porovnávací roztok:

- relativní retence vztažená ke kyselině valerénové (retenční čas asi 19 min): kyselina acetoxyvalerenová asi 0,5.

Obsah seskviterpenových kyselin v procentech, vyjádřeno jako kyselina valerenová ( $C_{15}H_{22}O_2$ ), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(A_1 + A_2) \cdot m_2 \cdot p \cdot 5}{A_3 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – plochu píku kyseliny acetoxyvalerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku kyseliny valerenové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_3$  – plochu píku kyseliny valerenové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené tinktury použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost kozlíkového extraktu suchého HRL použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- $p$  – obsah kyseliny valerenové v kozlíkovém extraktu suchém HRL v procentech.

## VERBASCI FLOS

7.0:1853

### Diviznový květ

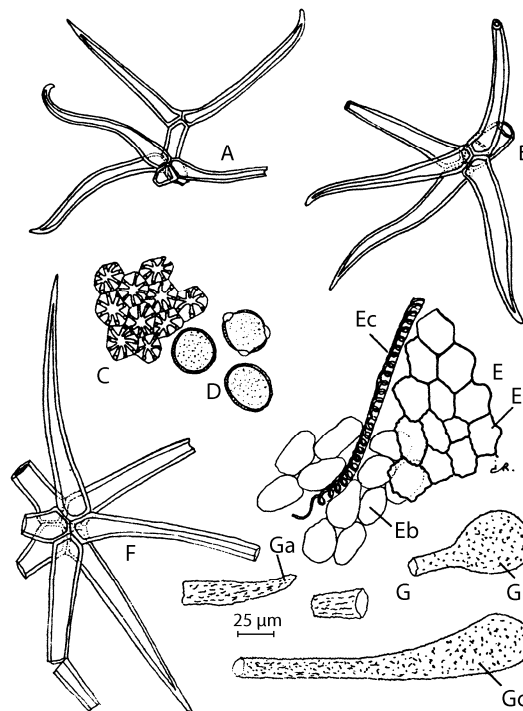
#### DEFINICE

Je to usušená květní koruna druhů *Verbascum thapsus* L., *V. densiflorum* BERTOL. (*V. thapsiforme* SCHRAD.) a *V. phlomoides* L.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** *V. thapsus* – koruna o průměru asi 20 mm je světle žlutá, žlutá nebo hnědá, kolovitá, lem s pěti mírně nesouměrnými odstálými cípy. Korunní cípy jsou na zevní straně chlupaté, na vnitřní straně lysé, s jemnou světle hnědou žilnatinou. Pět tyčinek se střídá s korunními cípy, dvě tyčinky jsou delší, s lými nitkami, tři kratší, s prašníky příčně postavenými.
- V. phlomoides* – koruna až asi 30 mm v průměru, světle žlutá nebo oranžová, prašníky jsou sbíhavé.
- V. densiflorum* – koruna o průměru asi 30 mm, téměř plochá, hluboce dělená do pěti lehce nesouměrných na konci zakulacených cípů.
- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je žlutý nebo žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): četné krycí chlupy koruny nebo jejich úlomky, mnohobuněčné kandelábrovitě přeslenitě větvené chlupy v bočním pohledu [A, B] nebo v plošném pohledu [F]; dlouhé trubicovité tenkostěnné jednobuněčné krycí chlupy nitek [G], na povrchu zřetelně zrnité nebo rýhované, se špičatým koncem [Ga] nebo někdy s kyjovitě rozšířeným koncem [Gb, Gc]; četná vejčitá pylová zrna s jemně zrnitou exinou a třemi klíčními póry [D]; úlomky vláknité vrstvy prašníků se ztlustlými stěnami a s charakteristickým hvězdicovitým vzhledem

[C]; žluté úlomky koruny v plošném pohledu [E], mnohohranné stejnostěnné buňky pokožky [Ea]; úlomky mezofyly z nepravidelných parenchymatických buněk [Eb], někdy provázené šroubovitě ztlustlými cévami [Ec].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového diviznového květu

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C za míchání. Ochladí se a zfiltruje.

*Porovnávací roztok.* 1 mg *kyseliny kávové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.  
*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *butan-2-onu R*, *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 30 + 50).

*Nanášení.* 10 µl porovnávacího roztoku a 30 µl zkoušeného roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Horká vrstva se postříká roztokem *difenyloboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Suší se na vzduchu 30 min a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: zeleno-modře fluoreskující skvrna	žlutě nebo žlutozeleně fluoreskující skvrna
hyperosid: žlutohnědě fluoreskující skvrna	namodrale fluoreskující skvrna nazelenale fluoreskující skvrna žlutozeleně fluoreskující skvrna namodrale fluoreskující skvrna
rutin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	nazelenale fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

**D.** 1,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se vaří 1 min s 15 ml vody R. Zfiltruje se. Filtrát se smíchá s 1 ml kyseliny chlorovodíkové R a vaří se 1 min; vzniká zelenomodré zbarvení, po několika minutách se tvoří zákal a pak černá sraženina (iridoidy).

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 % zhnědlých korun a nejvýše 2 % úlomků kalicha a ostatních cizích příměsí; stanoví se se 20 g drogy.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 9; stanoví se s práškovou drogou (710) (2.9.12) navlhčenou 2 ml ethanolu 96% R.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 2,0 %.

**SKLADOVÁNÍ**

Ve vzduchotěsných obalech.

**VERBENAE CITRIODORATAE FOLIUM**

7.3:1834

List aloisie citronové

**DEFINICE**

Je to celý usušený list druhu *Aloysia citrodora* PALÁU [syn. *Aloysia triphylla* (L'HÉR.) KUNTZE; *Verbena triphylla* L'HÉR.; *Lippia citriodora* KUNTH] nebo jeho úlomky.

**Obsah**, počítáno na vysušenou drogu:

– **akteosid** (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>; M<sub>r</sub> 625): nejméně 2,5 %, vyjádřeno jako kyselina ferulová;

– **silice**: nejméně 3,0 ml/kg (droga vcelku) a nejméně 2,0 ml/kg (úlomky drogy).

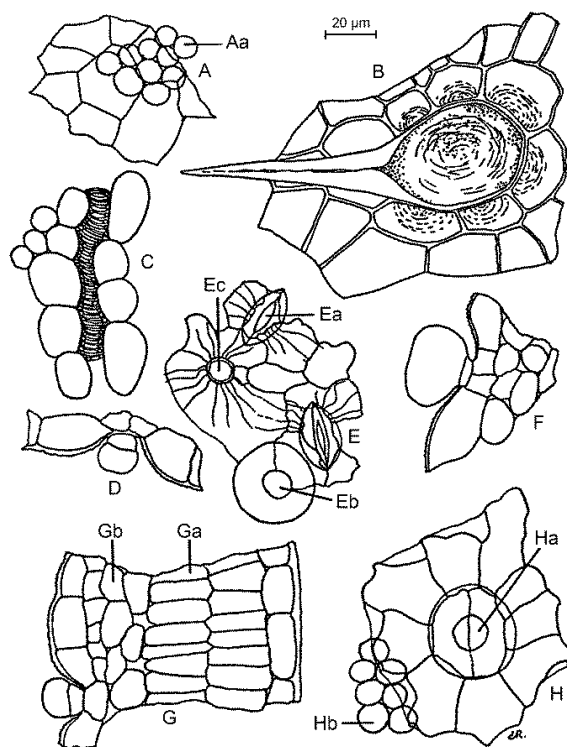
**VLASTNOSTI**

Po rozdrobení má droga charakteristický pach po citronu.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

**A.** Listy jsou jednotlivé, krátce řapíkaté, úzké, kopinaté, přibližně čtyřikrát delší než širší. Čepel je celokrajná, lehce zvlněný okraj se stáčí směrem nahoru. Svrchní strana listu je tmavě zelená, na omak drsná, spodní strana světlejší, s vyniklou střední žilkou a sekundárními žilkami probíhajícími čepelí k okraji listu.

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je světle zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky svrchní pokožky čepale listu v plošném pohledu [A, B, H], složené z mnohohranných buněk s četnými krátkými jednobuněčnými cystolitickými chlupy se ztlustlými stěnami, z nichž je každý na bázi obklopen různocovitě uspořádanými buňkami obsahujícími vápenaté konkrce [B] a se žláznatými chlupy s jednobuněčnou nohou a jednobuněčnou různě velkou kulovitou hlavičkou v plošném pohledu [Ha] a v příčném řezu [D, F]; tyto úlomky jsou často provázené palisádovým parenchymem [Aa, Hb]; úlomky spodní pokožky čepale listu v plošném pohledu [E] s rýhovanou kutikulou, složené z buněk více nepravidelných a někdy s lehce zvlněnými stěnami, četnými anomocytickými průduchy (2.8.3) [Ea] a četnými žláznatými chlupy v plošném pohledu [Eb] a/nebo s jizvami po nich [Ec]; úlomky čepale listu v příčném řezu [G] se dvěma vrstvami palisádového parenchymu [Ga] a houbovým parenchymem [Gb]; zdřevnatělá tkáň cév [C].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového listu aloisie citronové

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky na čistotu *Verbenae officinalis*.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další méně intenzivní skvrny. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být skvrny v poloze nižší, než je skvrna rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Horní okraj desky	
arbutin: modrá nebo hnědá skvrna	intenzivní šedozelená skvrna
rutin: tmavá hnědožlutá skvrna	modrá nebo fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Verbena officinalis.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,50 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C. Ochladí se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 10 mg *arbutinu R* a 10 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R* (2 µm až 10 µm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 27 + 100).

**Nanášení.** 20 µl [nebo 5 µl], do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není hnědošedá skvrna v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami *arbutinu* a *rutinu* na chromatogramu porovnávacího roztoku.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 13,0 %.

**Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové** (2.8.1). Nejvýše 3,5 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Akteosid.** Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Zkoušený roztok.** 1,00 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 50,0 ml porovnávacího roztoku a míchá se 2 h za použití magnetické míchačky. Odstředuje se

15 min a supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 µm).

**Porovnávací roztok.** 10,0 mg *kyseliny ferulové CRL* se rozpustí v *ethanolu 60% (V/V) R* a zředí se jím na 100,0 ml.

**Předkolona:**

– **rozměry:** délka 0,01 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm).

**Kolona:**

– **rozměry:** délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;

– **stacionární fáze:** *silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R* (5 µm);

– **teplota:** 20 °C.

**Mobilní fáze:**

– **mobilní fáze A:** roztok *kyseliny fosforečné R* (0,3%) (V/V);

– **mobilní fáze B:** *acetonitril R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	93 → 83	7 → 17
20–30	83	17
30–35	83 → 75	17 → 25
35–40	75 → 20	25 → 80
40–45	20 → 93	80 → 7

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 330 nm.

**Nástrík.** 20 µl.

**Test způsobilosti,** zkoušený roztok:

– **rozlíšení:** nejméně 3,5 mezi píkem *kyseliny ferulové* a píkem *akteosidu*.

Obsah *akteosidu* C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub> v procentech, vyjádřeno jako *kyselina ferulová*, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p \cdot 0,5 \cdot 3,1}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

*A*<sub>1</sub> – plochu píku *akteosidu* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

*A*<sub>2</sub> – plochu píku *kyseliny ferulové* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

*m*<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené drogy ve zkoušeném roztoku v gramech;

*m*<sub>2</sub> – hmotnost *kyseliny ferulové CRL* v porovnávacím roztoku v gramech;

*p* – obsah *kyseliny ferulové* v *kyselině ferulové CRL* v procentech;

3,1 – korelační faktor mezi *akteosidem* a *kyselinou ferulovou*.

**Silice** (2.8.12). 25,0 g čerstvě rozdrobněné rostlinné drogy se destiluje 3 h rychlostí 3,0 ml/min až 3,5 ml/min v 1000ml baňce s 500 ml roztoku *chloridu sodného R* (10 g/l) jako destilační kapaliny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.



## VERBENAE HERBA

7.5:1854

## Sporýšová nat'

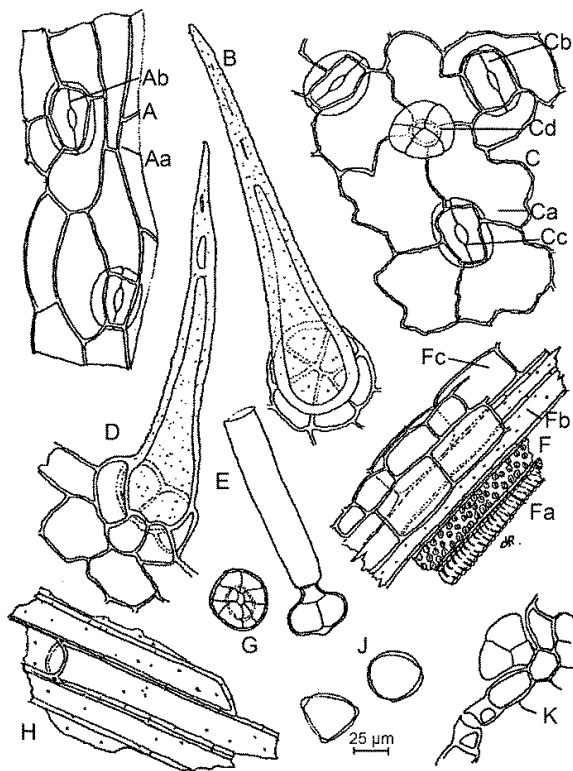
## DEFINICE

Je to celá usušená kvetoucí nadzemní část druhu *Verbena officinalis* L. nebo její úlomký.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % verbenalinu ( $C_{17}H_{24}O_{10}$ ;  $M_r$  388,4), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Lodyha je zelenohnědá, čtyřhranná, podélně rýhovaná, zejména na hranách drsně chlupatá. Větší listy jsou řapíkaté, hrubě vroubkované až dvakrát peřenoklané, menší listy jsou přisedlé, na okraji vroubkované až zubaté; čepel je tuhá, štětinatě chlupatá, zejména na žilnatině, která je na spodní straně listu vyniklá. Květy jsou četné, uspořádané do chudých klasů v paždí listenů podobných listům; kalich je pětičetný trubkovitý, s úzkými nestejně dlouhými cípy, koruna je řepicovitá, světle růžová až nafialovělá, dvakrát delší než kalich.



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškové sporýšové nati

**B.** Mikroskopické hodnocení (2.8.23). Prášek je zelenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. Prášková droga je charakteristická těmito znaky (viz obrázek 1): úlomky listů v plošném pohledu [C] s buňkami pokožky se zprohýbanými stěnami [Ca], s anizocytickými [Cb] nebo anomocytickými [Cc] průduchy (2.8.3) četnějšími na spodní straně listu; úlomky pokožky lodyhy [A] tvořené dlouhými mnohohrannými nebo obdélníkovitými buňkami pokožky [Aa] se ztlustlými stěnami a průduchy [Ab]; krycí chlupy jednobuněčné, se ztlustlými stěnami, až 500 μm dlouhé, na bázi

široké, obklopené jednoduchým prstencem vyklenutých okrouhlých buněk pokožky, v plošném pohledu [B] nebo v bočním pohledu [D]; zřídka žláznaté chlupy dvou typů: (a) s dlouhou nohou a plochou hlavičkou o průměru asi 35 μm tvořenou čtyřmi až osmi paprscitě uspořádanými buňkami v bočním pohledu [E] nebo v plošném pohledu [G], (b) s krátkou jednobuněčnou nohou a protáhlou vejčitou hlavičkou tvořenou čtyřmi paprscitě uspořádanými buňkami v plošném pohledu [Cd] nebo v příčném řezu [K]; trojúhelníkovitá až vejčitá nebo okrouhlá pylová zrna o průměru asi 30 μm se třemi klíčovými póry a hladkou exinou [J]; četné úlomky lodyhy [F] tvořené skupinami vláken [Fb], cév [Fa] a úlomky parenchymu [Fc]; jednotlivé úlomky vláken [H].

**C.** Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky B *Aloysia citriodora* (viz Zkoušky na čistotu).

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Horní okraj desky	
arbutin: modrá nebo hnědá skvrna	hnědá nebo zelená skvrna
rutin: tmavá hnědožlutá skvrna	intenzivní hnědošedá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

*Aloysia citriodora*

**A.** Pach po citronu indikující přítomnost druhu *Aloysia citriodora*.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 0,5 g práškové rostlinné drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 5 ml methanolu R a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 10 mg arbutinu R a 10 mg rutinu R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 μm až 40 μm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 μm až 10 μm)].

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové R, vody R a ethyl-acetátu R (11 + 11 + 27 + 100).

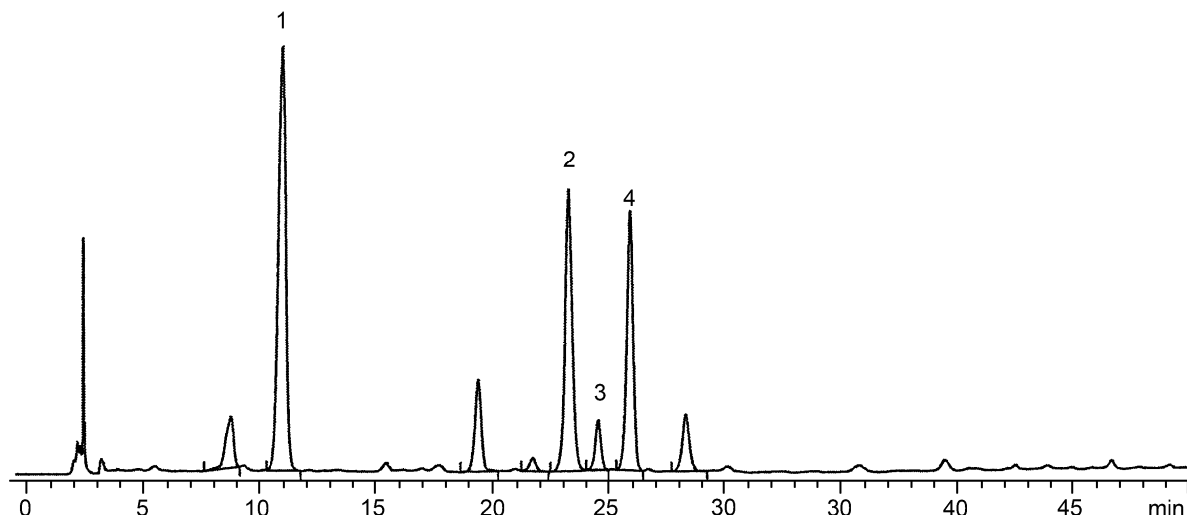
**Nanášení.** 20 μl [nebo 5 μl], do proužků 10 mm [nebo 8 mm].

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm [nebo 6 cm].

**Sušení.** Na vzduchu.

**Detekce.** Postříká se anisaldehydem RS a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

**Hodnocení.** Na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivní modrá nebo fialová skvrna v poloze odpovídající přibližně poloze skvrny rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.



1 = verbenalin      2 = kyselina ferulová      3 = neznámá látka (nemusí být přítomna)      4 = akteosid

**Obr. 2** Chromatogram ke zkoušce Stanovení obsahu ve sporýšové nati: zkoušený roztok

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškováné rostlinné drogy (710) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 10,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (2.8.1).  
Nejvýše 2,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

**Roztok vnitřního standardu.** 10,0 mg kyseliny ferulové R se rozpustí v ethanolu 60% (V/V) R a zředí se jím na 100,0 ml.

**Zkoušený roztok.** K 1,00 g práškováné rostlinné drogy (710) (2.9.12) se přidá 50,0 ml roztoku vnitřního standardu a míchá se 2 h za použití magnetické míchačky. Odstředí se 15 min a supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (jmenovitá velikost pórů 0,45 μm).

**Porovnávací roztok.** Obsah lahvičky verbenalinu CRL se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 5,0 ml.

**Předkolona:**

- rozměry: délka 0,01 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm).

**Kolona:**

- rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,0 mm;
- stacionární fáze: silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μm);
- teplota: 20 °C.

**Mobilní fáze:**

- mobilní fáze A: roztok kyseliny fosforečné R 0,3% (V/V);
- mobilní fáze B: acetonitril R.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0–20	93 → 83	7 → 17
20–30	83	17
30–35	83 → 75	17 → 25

**Průtoková rychlost.** 1,0 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 240 nm.

**Nástřik.** 20 μl.

**Test způsobilosti,** zkoušený roztok:

- získaný chromatogram odpovídá chromatogramu na obrázku 2;
- rozlišení: nejméně 3,5 mezi píkem kyseliny ferulové a píkem akteosidu.

Obsah verbenalinu (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot A_4 \cdot m_2 \cdot 1000}{A_2 \cdot A_3 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- A<sub>1</sub> – plochu píku verbenalinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A<sub>2</sub> – plochu píku verbenalinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- A<sub>3</sub> – plochu píku kyseliny ferulové na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A<sub>4</sub> – plochu píku kyseliny ferulové na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené rostlinné drogy použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- m<sub>2</sub> – hmotnost verbenalinu CRL v porovnávacím roztoku v gramech.

## VIOLAE HERBA CUM FLORE

6.0:1855

Violková nať kvetoucí

#### DEFINICE

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Viola arvensis* MURRAY a/nebo *Viola tricolor* L.

**Obsah.** Nejméně 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako violanthin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>; M<sub>r</sub> 578,5), počítáno na vysušenou drogu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Lodyha je hranatá a dutá. Listy jsou řapíkaté oválné na bázi srdčité nebo podlouhle kopisťovité s lyrovitě pře-

nosečnými palisty. Květy jsou pětičetné souměrné dlouze stopkaté, kališní lístky oválně kopinaté, na konci s přívěsky, spodní korunní lístek ostruhatý.

*Viola arvensis*: korunní lístky jsou kratší než kalich, spodní lístek je krémově zbarven s černými proužky, čtyři horní lístky jsou krémové nebo fialově modré;

*Viola tricolor*: korunní lístky jsou delší než kalich, jsou fialově zbarvené, s více nebo méně výrazným žlutým nádechem.

Tyčinek je pět, na konci s vláknitým konektivem ukončeným dvěma prašníky. Trojpouzdrý semeník má krátkou čnělku a kulovitou bliznu. Plod je trojpouzdrá člunkovitá žlutohnědá tobolka 5 mm až 10 mm dlouhá. Světle žlutá semena s masíčkem mají hruškovitý tvar a jsou asi 1 mm dlouhá.

- B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je nazelenalý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky listů z plošného pohledu z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými a s anomocytickými průduchy (2.8.3); krycí kuželovité jednobuněčné chlupy, na bázi rozšířené, ostře zašpičatělé, s proužkovanou kutikulou; v zoubcích čepele listu žláznaté chlupy s mnohobuněčnou hlavičkou a krátkou mnohobuněčnou nohou; v parenchymu někdy drúzy šťavelanu vápenatého; úlomky korunních lístků s pokožkou z buněk vlnitě zprohýbaných, s buňkami ze střední části, které jsou papilózní nebo mají lahvicovitý tvar, na bázi korunních lístků krycí chlupy až asi 300 µm dlouhé, s charakteristickou podélně bradavčitou kutikulou; okrouhlá nebo mnohohranná pylová zrna o průměru 60 µm až 80 µm s jemně tečkovanou exinou a s pěti (*V. arvensis*) nebo čtyřmi klíčovými póry (*V. tricolor*); někdy úlomky šroubovitě a síťovitě ztlustlých cév a skupiny vláken lodyhy.

- C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 2,0 g práškové drogy (355) (2.9.12) se smíchají s 10 ml *ethanolu 70% (V/V) R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého míchání. Ochladí se a zfiltruje.

**Porovnávací roztok.** 2,5 mg *rutinu R* a 2,5 mg *hyperosidu R* a 1,0 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *kyseliny octové RS*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (11 + 11 + 27 + 100).

**Nanášení.** 10 µl, do proužků.

**Vyvíjení.** Po dráze 12 cm.

**Sušení.** Při 100 °C až 105 °C.

**Detekce.** Vrstva se postříká roztokem obsahujícím *difenylboryloxyethylamin R* (10 g/l) a *makrogol 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

**Hodnocení.** Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
kyselina kávová: zelenomodře až světle modře fluoreskující skvrna	modře fluoreskující skvrna
hyperosid: žlutohnědě fluoreskující skvrna	žlutozeleně fluoreskující skvrna
rutin: žlutohnědě fluoreskující skvrna	intenzivní žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutin) žlutozeleně fluoreskující skvrna žlutozeleně fluoreskující skvrna žlutozeleně fluoreskující skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 3 %.

**Číslo bobtnavosti** (2.8.4). Nejméně 9; stanoví se s práškovou drogou (355) (2.9.12).

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškové drogy (355) (2.9.12) se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 15,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Základní roztok.** 0,300 g práškové drogy (250) (2.9.12) se ve 200ml baňce smíchá se 40 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se zbytkem drogy se vloží zpět do 200ml baňky, smíchá se se 40 ml *ethanolu 60% (V/V) R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C za častého protřepávání. Nechá se ochladit a zfiltruje se do téže odměrné baňky. 200ml baňka i filtr se promyjí *ethanolem 60% (V/V) R* a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky, spojené roztoky se zředí *ethanolem 60% (V/V) R* na 100,0 ml. Roztok se zfiltruje.

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. Přidá se 10,0 ml roztoku, který obsahuje *kyselinu boritou R* (25,0 g/l) a *kyselinu šťavelovou R*

(20,0 g/l) v *kyselině mravenčí bezvodé R*, a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml.

**Kontrolní tekutina.** 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. Přidá se 10,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 25,0 ml. Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 405 nm.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako violanthin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m},$$

v němž značí:

*A* – absorbanci při 405 nm;

*m* – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance violanthinu má hodnotu 400.

## ZINGIBERIS RHIZOMA

7.0:1522

### Zázvorový oddenek

#### DEFINICE

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek druhu *Zingiber officinale* ROSCOE, zbavený úplně nebo z větší části korku.

**Obsah sílice.** Nejméně 15 ml/kg drogy, počítáno na bezvodou drogu.

#### VLASTNOSTI

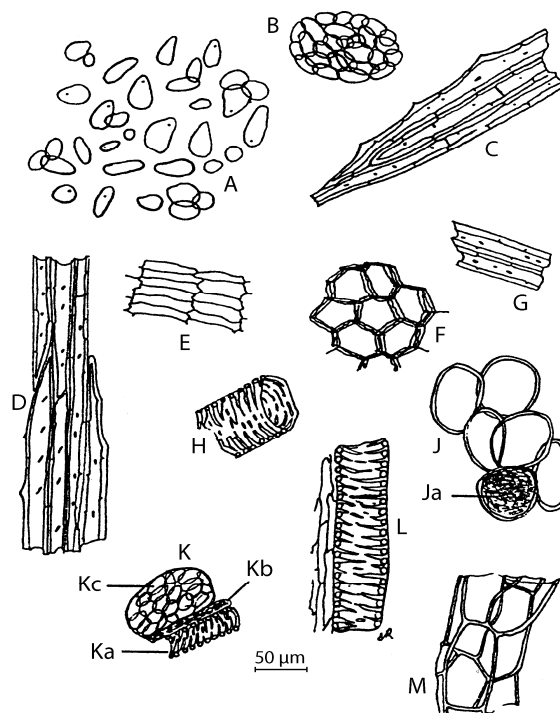
Droga charakteristického aromatického pachu a kořenitě pálivé chuti.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Oddenek je ze stran zploštělý, nahoře s krátkými plochými oválnými výběžky, každý často na horním konci s jizvou; celý oddenek je asi 5 cm až 10 cm dlouhý, 1,5 cm až 3 cm nebo 4 cm široký a 1 cm až 1,5 cm silný, často podélně rozštěpený. Loupaný oddenek je na svrchní straně světle hnědý, podélně rýhovaný, někdy vláknitý; zevní strana neloupaného oddenku je světle až tmavě hnědá, více nebo méně pokrytá korkem, se sbíhavými, úzkými, podélnými a příčnými rýhami; korek je odstraněn z bočních stran, mezi jednotlivými výběžky zůstává. Droga je na lomu krátká, škrobnatá, s vyčnívajícím vláknem. Na hladkém příčném řezu je patrná úzká kůra oddělená endodermis od široké dřeni; četné roztroušené svazky cévní a hojně roztroušené pryskyřičné buňky se žlutým obsahem. U neloupaného oddenku je patrná ještě zevní vrstva tmavohnědého korku.

**B.** Droga se upráškuje (355) (2.9.12). Prášek je světle žlutý nebo nahnědlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškováná droga je charakteristická těmito

znaky (viz obrázek 1): skupiny velkých tenkostěnných komůrkových vláken s jednou stěnou často zubatou [C, D, G]; úlomky [K] obsahující síťovitě ztlustlé cévy [Ka] často doprovázené úzkými tenkostěnnými buňkami s hnědým barvivem [Kb] a škrobnatým parenchymem [Kc]; četné velké síťovitě ztlustlé cévy, jednotlivé [H, L]; četný tenkostěnný parenchym dřeni [J, M], jehož některé buňky obsahují hnědou oleoprskyřiči [Ja]; úlomky hnědého korku, obvykle viditelné v plošném pohledu [F], ale někdy v příčném řezu [E]. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (V/V). V práškové droze jsou patrná četná škrobová zrna, jednoduchá, zploštělá, oválná nebo vejčitá nebo nepravidelná, až asi 50 μm dlouhá a 25 μm široká, s malým hilem na užším konci; škrobová zrna jsou někdy nezřetelně příčně vrstevnatá, mohou být jednotlivá [A], ve shlucích [B] nebo v parenchymatických buňkách [Kc].



**Obr. 1** Ilustrace ke zkoušce totožnosti B práškového zázvorového oddenku

**C.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 1,0 g práškové drogy (710) (2.9.12) se smíchá s 5 ml *methanolu R*. Protřepává se 15 min a zfiltruje se.

**Porovnávací roztok.** 10 μl *citralu R* a 10 mg *resorcino-lu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. Roztok se připraví těsně před použitím.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R. **Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *hexanu R* a *etheru R* (40 + 60).

**Nanášení.** 20 μl, do proužků.

**Vyvíjení.** V nenasycené komoře, po dráze 15 cm.

**Sušení.** Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *vanilinu R* (10 g/l) v *ky-selině sírové R*, zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a současně se pozoruje v denním světle.

*Hodnocení.* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině intenzivní červená skvrna (resorcinol) a v horní polovině dvě fialové skvrny (citrál). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě intenzivní fialové skvrny (gingeroly) v poloze odpovídající poloze pod skvrnou resorcinolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a ve střední části dvě jiné méně intenzivní fialové skvrny (šogaoly) v poloze odpovídající poloze mezi skvrnou resorcinolu a skvrnami citralu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další skvrny.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Voda**, stanovení destilací (2.2.13). Nejvýše 100 ml/kg; stanoví se s 20,0 g práškové drogy (710) (2.9.12).

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 6,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (2.8.12) v 1000ml baňce s kulatým dnem za použití 20,0 g čerstvě hrubě práškové drogy s 10 kapkami *parafinu tekutého R* nebo jiné vhodné protipěnové přísady a 500 ml *vody R* jako destilační kapaliny. Do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R* a destiluje se 4 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

# HOMEOPATICKÉ PŘÍPRAVKY

## ÚVOD

6.0:90006

Všechny obecné texty a jiné články Evropského lékopisu, které jsou důležité pro homeopatii, jsou použitelné.

Kapitola Homeopatické přípravky v Evropském lékopisu obsahuje obecné články a jednotlivé články popisující výchozí materiály a přípravky používané ve skutečnosti výhradně pro homeopatické léčení. Odkazy na tyto články pro jiné účely mají být schváleny oprávněnou autoritou.

## PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.2:1038

### Homeopatické přípravky

*Synonymum.* Praeparationes homoeopathicae

#### DEFINICE

Připravují se z látek, produktů nebo přípravků nazývaných výchozí suroviny pro výrobu v souladu s homeopatickými výrobními postupy. Označují se obvykle latinským názvem výchozí suroviny a stupněm ředění.

#### Suroviny

Suroviny pro výrobu homeopatických přípravků jsou přírodního nebo syntetického původu.

U surovin živočišného nebo lidského původu se musí vhodnými opatřeními zajistit minimalizace rizika přenosu infekčních agens, včetně virů (5.1.7), do homeopatického přípravku. Je třeba prokázat, že:

- metoda výroby zahrnuje krok nebo kroky, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují infekční agens;
- kde je to vhodné, vyhovují suroviny živočišného původu článku *Producta cum possibili transmissione vectorium encephalopathiarum spongiformium animalium* (1483);
- kde je to vhodné, splňují zvířata a živočišné tkáně, používané k získání surovin, požadavky oprávněné autority na zdraví zvířat určených pro účely výživy lidí;
- pro materiály lidského původu splňují dárci požadavky uplatňované na dárce lidské krve a darovanou krev [viz *Plasma humanum ad separationem* (0853)], není-li zdůvodněno a schváleno jinak.

Suroviny rostlinného, živočišného nebo lidského původu se mohou použít v čerstvém nebo sušeném stavu. Kde je to vhodné, může se čerstvý materiál skladovat hluboce zmrazený. Suroviny rostlinného původu vyhovují požadavkům článku *Plantae medicinales ad praeparata homeopathica* (2045).

Kde je to zdůvodněno a schváleno, může se čerstvý rostlinný materiál uchovávat k přepravním a skladovacím účelům v ethanolu 96% (V/V) nebo v ethanolu vhodné koncentrace za podmínky, že pro další zpracování se použije veškerý materiál včetně ethanolu.

Suroviny vyhovují všem požadavkům příslušných lékopisných článků.

#### Vehikula

Jsou to pomocné látky použité k přípravě určitých výchozích surovin pro výrobu nebo k potenciaci, např. čištěná voda, ethanol o vhodné koncentraci, glycerol a laktosa.

Vehikula vyhovují všem požadavkům příslušných lékopisných článků.

#### Výchozí suroviny pro výrobu

Jsou to látky, produkty nebo přípravky použité jako výchozí materiály pro výrobu homeopatických přípravků. Výchozími surovinami pro výrobu jsou obvykle matečné tinktury nebo glycerolové výluhy surovin rostlinného, živočišného nebo lidského původu nebo jednotlivé látky u surovin chemického nebo minerálního původu.

Matečné tinktury vyhovují požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

Glycerolové výluhy jsou tekuté přípravky získávané ze surovin rostlinného, živočišného nebo lidského původu za použití glycerolu, směsi glycerolu a ethanolu vhodné koncentrace nebo směsi glycerolu a roztoku chloridu sodného vhodné koncentrace.

#### Potenciace

Ředění a triturace se získávají z výchozích surovin potenciací v souladu s homeopatickými výrobními postupy, jako jsou postupná ředění a protřepávání nebo postupně vhodné triturace nebo kombinace obou postupů.

Potenciační kroky jsou obvykle následující:

- 1 díl výchozí suroviny pro výrobu a 9 dílů vehikula; lze je označit jako „D“ nebo „DH“ nebo „X“ (decimální, desetinné);
- 1 díl výchozí suroviny pro výrobu a 99 dílů vehikula; lze je označit jako „C“ nebo „CH“ (centezimální, setinné).

Počet potenciačních kroků určuje stupeň ředění. Např. symboly „D3“ nebo „3 DH“ nebo „3X“ znamenají tři decimální potenciační kroky a symboly „C3“ nebo „3 CH“ nebo „3C“ znamenají tři centezimální potenciační kroky.

„LM-“ nebo „Q-“ potenciace se vyrábějí specifickým způsobem.

#### Lékové formy

Léková forma homeopatického přípravku vyhovuje příslušnému lékopisnému článku lékové formy a následujícím požadavkům:

- u lékových forem pro homeopatické účely jsou za „léčivé látky“ považována „ředění nebo triturace homeopatických výchozích surovin“;
- tyto lékové formy jsou připraveny za použití vhodných pomocných látek;
- zkoušky Obsahová stejnoměrnost (2.9.6) nebo Stejnoměrnost dávkových jednotek (2.9.40) se běžně neprovádějí, avšak za určitých okolností je oprávněná autorita vyžaduje.

*Homeopatická léková forma „Pilule (Granule)“*

Homeopatické pilule (granule) jsou pevné přípravky ze sacharosy, laktosy nebo jiných vhodných pomocných látek. Mohou se připravit impregnační předem připravených pilulí (granulí) jedním nebo více ředěními homeopatických výchozích surovin pro výrobu nebo postupným přidáváním

těchto pomocných látek a přidáním jednoho nebo více ředění homeopatických výchozích surovin. Jsou určeny pro perorální nebo sublinguální podání.

*Homeopatická léková forma „Tablety“*

Tablety pro homeopatické použití jsou pevné přípravky ze sacharosy, laktosy nebo jiných vhodných pomocných látek, které vyhovují požadavkům článku *Tabletatae* (0478). Mohou se vyrobit buď lisováním jedné nebo více pevných léčivých látek s pomocnými látkami, nebo impregnací předem připravených tablet jedním nebo více ředění homeopatických výchozích surovin. Předem připravené tablety pro impregnaci obsahují sacharosu, laktosu nebo jiné vhodné pomocné látky v souladu s článkem *Tabletatae* (0478). Jsou určeny pro perorální nebo sublinguální podání.

*Metody přípravy*

Homeopatické přípravky se připravují za použití řady metod přípravy a jsou v různých lékových formách (uvedených v obecných člancích lékových forem). Metody přípravy jsou popsány v článku *Via praeparandi stirpes homeopathicas et potentificandi* (2371). Použití určitých přípravků získaných metodami uvedenými dále je vymezeno na určité lékové formy, jak uvádí následující tabulka.

Metody přípravy	Lékové formy
2.1.2	oční kapky roztoky pro injekce nosní přípravky
2.2.1, 2.2.2, 2.2.3	oční kapky pilule ( <i>globuli velati</i> ) roztoky pro injekce nosní přípravky masti, krémy a gely perorální prášky (trituratione) čípky
2.2.4	roztoky pro injekce
3.1.2, 3.2.2	oční kapky pilule ( <i>globuli velati</i> ) roztoky pro injekce nosní přípravky masti, krémy a gely čípky

Oprávněná autorita má právo přijmout nebo zamítnout specifické kombinace metod přípravy a látky.

**GRANULA AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA**

7.4:2153

Granule pro homeopatické přípravky

*Synonyma.* Granula ad praeparationes homoeopathicas

**DEFINICE**

Jsou to pevné přípravky ze sacharosy, laktosy nebo jiných vhodných pomocných látek. Mají vhodnou mechanickou odolnost, aby se při zacházení nedrolily nebo nelámaly.

Jsou určeny k impregnaci nebo potažení jedním nebo více homeopatickými přípravky. Výsledné granule vyhovují požadavkům článku *Granula homeopathica imbuta* (2079).

**VÝROBA**

Při výrobě, balení, skladování a distribuci granulí pro homeopatické přípravky se používají vhodná opatření k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití* (5.1.4). Pokud se prosévá, použijí se údaje uvedené v tabulce 1.

Tab. 1 – *Klasifikace granulí podle jejich hmotnosti a velikosti*

Kategorie	Počet granulí pro homeopatické přípravky	Hmotnost (g)	Jemnost (µm)
1	470–530	1,0	1000–1600
2	160–333	1,0	1400–2000
3	110–130	1,0	1800–2500
4	70–90	1,0	2000–2800
5	40–50	1,0	2500–3350
6	16–30	1,0	3150–4500
7	10	0,9–1,1	4000–5600
8	5	0,9–1,1	5600–6700
9	3	0,9–1,1	7100–8000
10	2	0,9–1,1	8000–9500

Poznámka: Pro kategorie 7 až 10 se hmotnost získá vážením specifikovaného počtu granulí.

**VLASTNOSTI**

**Vzhled.** Bílé nebo téměř bílé kuličky.

**Rozpustnost.** Obvykle snadno rozpustné ve vodě.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Pomocné látky použité k výrobě granulí pro homeopatické přípravky jsou identifikovány jednou nebo několika vhodnými zkouškami.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

*Pokud je prováděna zkouška Jemnost, není třeba provádět zkoušku Hmotnostní stejnoměrnost a naopak.*

**Hmotnostní stejnoměrnost.** Zkouška se provede za použití 20 granulí. 20 náhodně vybraných jednotek se zváží jednotlivě a vypočítá se průměr hmotností. Nejvýše dvě jednotlivé hmotnosti se liší o více než 10 % od průměrné hmotnosti dávky a žádná se neliší o více než 20 %.

**Jemnost** (2.9.35). Nejvýše 90 % granulí je v rozmezí daném odpovídající kategorii, jak je uvedeno v tabulce 1.

**Impregnace.** Použije se vhodná metoda. Průměr výsledných hodnot je v rozmezí validovaného rozsahu.

**Mikrobiální kontaminace:**

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>2</sup> CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti 10<sup>1</sup> CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (2.6.13);
- nepřítomnost *Pseudomonas aeruginosa* (2.6.13).

## OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- složení granulí;
- kde je to vhodné, velikost granulí.

## GRANULA HOMEOPATHICA IMBUTA

7.4:2079

## Granule homeopatické impregnované

## DEFINICE

Jsou to pevné přípravky ze sacharosy, laktosy nebo jiných vhodných pomocných látek. Mají vhodnou mechanickou odolnost, aby se při zacházení nedrolily nebo nelámaly. Jsou připraveny impregnací granulí pro homeopatické přípravky [*Granula ad praeparata homeopathica (2153)*] jedním nebo více tekutými homeopatickými přípravky. Jsou určeny pro sublingvální nebo perorální podání.

## VÝROBA

Impregnace se provádí použitím tekutých přípravků obsahujících ethanol obvykle o koncentraci nejméně 68% (V/V) (60%) v dávkách 1 hmotnostní díl kapaliny na 100 hmotnostních dílů granulí.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci homeopatických granulí se používají vhodná opatření k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou uvedena ve stati *Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití (5.1.4)*.

## VLASTNOSTI

**Vzhled.** Bílé nebo téměř bílé nebo slabě zbarvené kuličky.

**Rozpustnost.** Obvykle snadno rozpustné ve vodě.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Mikrobiální kontaminace.** Pokud není zdůvodněno, schváleno a označeno jinak, jsou granule určeny k sublingválnímu podání a vyhovují následujícím kritériím přijatelnosti:

- celkový počet aerobních mikroorganismů (TAMC): kritérium přijatelnosti  $10^2$  CFU/g (2.6.12);
- celkový počet kvasinek/plísní (TYMC): kritérium přijatelnosti  $10^1$  CFU/g (2.6.12);
- nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (2.6.13);
- nepřítomnost *Pseudomonas aeruginosa* (2.6.13).

PLANTAE MEDICINALES AD  
PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.3:2045

## Léčivé rostliny pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Plantae medicinales ad praeparationes homoeopathicas

## DEFINICE

Jsou to většinou celé, rozlámané nebo rozdrobněné rostliny nebo části rostlin, včetně řas, hub nebo lišejníků, v nezpracovaném stavu, obvykle čerstvé. Stav, ve kterém se drogy používají, čerstvé nebo sušené, se uvádí v jednotlivých

článcích Evropského lékopisu nebo, jestliže takový článek chybí, v jednotlivých článcích oficiálního národního lékopisu členského státu. Pokud takový článek neexistuje, musí se stav drogy před použitím definovat. Mezi léčivé rostliny určené pro homeopatické přípravky se řadí také vybrané exsudáty, které nejsou specificky zpracovávány. Léčivé rostliny pro homeopatické přípravky jsou jednoznačně definovány botanickým vědeckým názvem podle binominálního systému (rod, druh, odrůda a jméno autora).

Označení *celé* se používá u léčivých rostlin pro homeopatické přípravky, jejichž velikost nebyla zmenšena a jsou přítomné (sušené nebo nesušené) v podobě, v jaké byly sklizeny.

Označení *rozlámané* se používá u léčivých rostlin pro homeopatické přípravky, jejichž velikost byla po sklizni zmenšena pro snadnější zacházení s nimi, sušení a/nebo balení.

Označení *rozdrobněné* se používá u léčivých rostlin pro homeopatické přípravky, jejichž křehčí části se v průběhu sušení, balení nebo přepravy rozdrobily.

Označení *řezané* se používá pro sušené léčivé rostliny pro homeopatické přípravky, jejichž velikost byla zmenšena jiným způsobem než práškováním, kterým se zmenšuje velikost částic rostlinných drog na stupeň, ve kterém již nelze použít makroskopický popis v článku.

## VÝROBA

Získávají se z pěstovaných nebo z planě rostoucích rostlin. Jakost léčivých rostlin pro homeopatické přípravky je zaručena vhodným sběrem, pěstováním, sklizní, tříděním, sušením, rozdrobňováním a skladovacími podmínkami.

Léčivé rostliny pro homeopatické přípravky jsou, jak nejvíce je to možné, prosté nečistot, jako je zemina, prach, špína a jiné kontaminanty, jako jsou plísně, hmyz a ostatní živočišné kontaminanty. Léčivé rostliny nenesou známky hniloby.

Při použití dekontaminace je nutné prokázat, že obsahové látky v droze nebyly dotčeny a že droga neobsahuje škodlivé zbytky. Použití ethylenoxidu pro dekontaminaci léčivých rostlin určených k výrobě homeopatických přípravků není povoleno.

Čerstvé léčivé rostliny se zpracovávají co nejrychleji po sklizni. Kde je to zdůvodněno a schváleno, mohou být čerstvé drogy pro účely přepravy nebo skladování hluboce zmrazené nebo uložené v ethanolu 96% (V/V) nebo v ethanolu jiné vhodné koncentrace za předpokladu, že veškerý takovýto materiál včetně skladovacího média se dále využije ke zpracování.

Musí se přijmout vhodná opatření k zajištění mikrobiologické jakosti homeopatického přípravku obsahujícího jednu nebo více léčivých rostlin podle doporučení, která jsou uvedena v obecné stati *5.1.4 Mikrobiologická jakost nesterilních léčivých přípravků a látek pro farmaceutické použití*.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Totožnost léčivých rostlin pro homeopatické přípravky se prokazuje makroskopicky a, je-li třeba, mikroskopicky, dále se mohou požadovat další zkoušky (např. tenkovrstvá chromatografie).



## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Zkoušky Cizí příměsí a Ztráta sušením by měly být provedeny před jakýmkoliv dalším zpracováním čerstvé rostliny.

**Cizí příměsí (2.8.2).** Jestliže se jako výchozí surovina pro homeopatické přípravky použije čerstvá rostlina, obsah cizích příměsí je co nejnižší. Je-li třeba, je nejvyšší obsah cizích příměsí uveden v jednotlivých člancích.

Jestliže se jako výchozí surovina pro homeopatické přípravky použije usušená rostlina, provede se zkouška na cizí příměsí, není-li v jednotlivých člancích předepsáno jinak. Obsah cizích příměsí je nejvýše 2 %, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

**Padělání.** Léčivé rostliny pro homeopatické přípravky, pro které existuje riziko padělání nebo záměny, mohou být zkoušeny specifickou vhodnou zkouškou.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Zkouška se provede u usušených léčivých rostlin pro homeopatické přípravky.

Pokud se čerstvá rostlina zpracovává více než 24 h po sklizni, měla by být provedena zkouška Ztráta sušením. Minimální limit je uveden v jednotlivém článku.

**Voda,** stanovení destilací (2.2.13). Zkouška se provede u léčivých rostlin pro homeopatické přípravky s vysokým obsahem silic.

**Pesticidy (2.8.13).** Léčivé rostliny pro homeopatické přípravky vyhovují požadavkům zkoušky. Tyto požadavky zohledňují původ a charakter rostliny, je-li třeba i přípravek, v němž může být rostlina použita, a úplné záznamy o ošetření šarže rostliny, pokud jsou dostupné. Kde je to zdůvodněno, může být zkouška Pesticidy provedena s matečnou tinkturou podle požadavků článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica (2029)*.

*Je-li to vhodné, léčivé rostliny pro homeopatické přípravky vyhovují dalším zkouškám, např.:*

**Celkový popel (2.4.16).**

**Číslo hořkosti (2.8.15).**

**Těžké kovy (2.4.27).** Pokud není uvedeno v jednotlivém článku nebo pokud není zdůvodněno a schváleno jinak:

- *kadmium*: nejvýše 1,0 µg/g;
- *olovo*: nejvýše 5,0 µg/g;
- *rtuť*: nejvýše 0,1 µg/g.

Podle povahy nebo původu léčivé rostliny, nebo pokud to vyžaduje oprávněná autorita, definují se vhodné limity pro obsahy jiných těžkých kovů, jako je arsen nebo nikl.

Kde je to zdůvodněno, může být zkouška Těžké kovy provedena s matečnou tinkturou podle požadavků článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica (2029)*.

**Aflatoxin B<sub>1</sub> (2.8.18).** Kde je to vhodné, mohou se požadovat limity pro aflatoxin.

**Ochratoxin A (2.8.22).** Kde je to vhodné, může se požadovat limit pro ochratoxin A.

**Radioaktivní kontaminace.** V některých specifických případech je nutné zvážit riziko radioaktivní kontaminace.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kde je to vhodné, provede se u léčivých rostlin pro homeopatické přípravky stanovení obsahu vhodnou metodou.

## SKLADOVÁNÍ

Usušené léčivé rostliny se skladují chráněny před světlem.

## TINCTURAE MATERNAE AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.3:2029

## Matečné tinktury pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Tincturae maternae ad praeparationes homoeopathicas

## DEFINICE

Jsou to tekuté přípravky získávané vyluhováním surovin vhodným vehikulem. Suroviny jsou obvykle v čerstvém stavu nebo mohou být usušené. Matečné tinktury pro homeopatické přípravky se mohou též získat z rostlinných šťáv s přidáním nebo bez přidání vehikula. Pro některé přípravky může být surovina před extrakcí podrobena předběžné úpravě.

## VÝROBA

Připravují se macerací, digescí, infuzí, dekokcí, fermentací nebo postupem uvedeným v jednotlivých člancích, obvykle za použití ethanolu vhodné koncentrace.

Matečné tinktury pro homeopatické přípravky se získávají za uplatnění pevně stanoveného poměru suroviny k vyluhovacímu prostředku, přičemž se bere v úvahu obsah vlhkosti suroviny, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Pokud se používají rostliny v čerstvém stavu, je vhodným způsobem zajištěno zachování čerstvosti. Oprávněná autorita může požadovat, aby stav čerstvosti byl ověřen vhodnou zkouškou.

Matečné tinktury pro homeopatické přípravky jsou obvykle čiré. Stáním se může vytvořit nepatrný sediment, který je přípustný, pokud se složení tinktury významně nemění.

Výrobní postup se definuje tak, aby byl reprodukovatelný.

**Výroba macerací.** Pokud není předepsáno jinak, rozdrobí se surovina, která má být extrahována na kousky vhodné velikosti, důkladně se promíchá a extrahuje se předepsanou extrakční metodou předepsaným vyluhovacím prostředkem. Nechá se stát v uzavřené nádobě po předepsanou dobu. Zbytky se oddělí od vyluhovacího prostředku a, je-li to nutné, vylisují se. V tomto případě se obě získané tekutiny smíchají.

**Úprava obsahů složek.** Úprava obsahů složek může být realizována, je-li třeba, buď přidáním vyluhovacího prostředku vhodné koncentrace, nebo přidáním jiné matečné tinktury pro homeopatické přípravky z téhož rostlinného nebo živočišného materiálu použitého k přípravě.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Kde je to vhodné, provede se ověření totožnosti nejméně jednou chromatografickou zkouškou.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

Limity v jednotlivých člancích jsou uvedeny společně s oficiálními způsoby výroby. Pro každý definovaný způsob mohou být uvedeny specifické limity.

*Pokud je prováděna zkouška Relativní hustota, není třeba provádět zkoušku Obsah ethanolu a naopak.*

**Relativní hustota (2.2.5).** Matečná tinktura pro homeopatické přípravky vyhovuje požadavkům předepsaným v příslušném článku.

**Ethanol (2.9.10).** Obsah ethanolu vyhovuje požadavkům předepsaným v příslušném článku.

**Methanol a propan-2-ol (2.9.11).** Nejvýše 0,05 % (V/V) methanolu a nejvýše 0,05 % (V/V) propan-2-olu, není-li předepsáno jinak.

**Zbytek po odpaření. (2.8.16).** Kde je to vhodné, matečná tinktura pro homeopatické přípravky vyhovuje požadavkům předepsaným v příslušném článku.

**Pesticidy (2.8.13).** Kde je to vhodné, matečná tinktura pro homeopatické přípravky vyhovuje zkoušce. Tento požadavek je splněn, pokud surovina rostlinného původu sama o sobě vyhovuje zkoušce.

Zdůvodnění se provádí, pokud se zkouška Pesticidy provádí s matečnou tinkturou a nikoliv s rostlinnou drogou, podle požadavků článku *Plantae medicinales ad praeparata homeopathica (2045)*. Limity jsou nastaveny s přihlédnutím k původu a charakteru rostlinné drogy. Pro nastavení těchto limitů se do výpočtu zahrne zředovací faktor matečné tinktury a limit detekce metody.

**Těžké kovy (2.4.27).** Zdůvodnění se provádí v případech, pokud se zkouška Těžké kovy provádí s matečnou tinkturou a nikoliv s rostlinnou drogou, podle požadavků článku *Plantae medicinales ad praeparata homeopathica (2045)*. Limity jsou nastaveny s přihlédnutím k původu a charakteru rostlinné drogy. Pro nastavení těchto limitů se do výpočtu zahrne zředovací faktor matečné tinktury a limit detekce metody.

Pokud to vyžaduje oprávněná autorita, mohou být definovány vhodné limity pro jiné těžké kovy, jako je arsen nebo nikl.

**STANOVENÍ OBSAHU**

Kde je to vhodné, provede se stanovení obsahu s danými kvantitativními limity.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem. Může být uvedena nejvyšší teplota skladování.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- že se jedná o matečnou tinkturu pro homeopatické přípravky (označuje se jako „TM“ nebo „Ø“);
- latinský název suroviny podle lékopisného článku, pokud existuje;
- metoda přípravy;
- koncentrace ethanolu nebo jiného rozpouštědla v matečné tinktuře v procentech (V/V);

- poměr suroviny k matečné tinktuře;
- kde je to vhodné, podmínky skladování.

**VIA PRAEPARANDI STIRPES HOMEOPATHICAS ET POTENTIFICANDI****7.2:2371****Metody přípravy homeopatických výchozích surovin a potenciací**

*Synonymum.* Via praeparandi stirpes homoeopathicas et potentificandi

Homeopatické výchozí suroviny se připravují za použití vhodných metod ze surovin, které vyhovují požadavkům článku *Praeparata homeopathica (1038)*. Dále popsané metody kombinované se zavedenými metodami potenciací jsou příkladem metod, ale mohou se použít i jiné metody popsané v oficiálním národním lékopise členského státu. Kde se použije materiál živočišného původu, provede se důkladné porovnání s požadavky pro použití surovin živočišného nebo lidského původu uvedené v článku *Praeparata homeopathica (1038)*.

Je-li v tekutých zředěných přípravcích třeba, může se koncentrace ethanolu předepsaná v metodě nahradit ethanolem 36% (V/V) (ethanolem 30%) nebo ethanolem 18% (V/V) (ethanolem 15%).

Kde umožní jednotlivý článek, aby se matečná tinktura připravila z více než jednoho druhu rostliny, může se matečná tinktura připravit z předepsaných částí jednotlivého druhu rostliny nebo z jakékoliv jejich směsi.

Pokud není ustanoveno jinak, matečné tinktury se připravují macerací. Macerace trvá 10 dnů až 30 dnů.

Macerace se může nahradit dlouhodobou macerací (nejvýše 60 dnů) nebo velmi dlouhodobou macerací (nejvýše 180 dnů), pokud se prokáže, že jakost výsledné matečné tinktury je stejná jako jakost matečné tinktury připravené macerací.

Není-li v jednotlivém článku ustanoveno jinak, pojem „díl(y)“ značí „hmotnostní díl(y)“. Není-li v metodě ustanoveno jinak, je nejvyšší teplota pro přípravu 25 °C.

**1 MATEČNÉ TINKTURY****METODA 1.1****METODA 1.1.1 (odpovídající HAB<sup>1</sup> 1: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)**

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující obvykle více než 70 % vylisované tekutiny (šťávy) a neobsahující silice, pryskyřice nebo slizy. Matečné tinktury připravené podle této metody jsou směsi stejných dílů vylisované šťávy a ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%).

Rozdrobňená rostlinná droga se vylisuje a vylisovaná tekutina (šťáva) se ihned smíchá se stejným hmotnostním dílem ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%), směs se nechá stát v uzavřené nádobě nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje.

<sup>1</sup> Homeoëopathicches Arzneibuch

**Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku**

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah ve výše uvedeném filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;

$N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;

$N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

**Potenciace**

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

2 dílů matečné tinktury;

8 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

1 dílu prvního decimálního ředění;

9 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

První centezimální ředění (C1) se připraví ze:

2 dílů matečné tinktury;

98 dílů ethanolu 50% (V/V) [ethanolu 43%).

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

1 dílu prvního centezimálního ředění;

99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

**METODA 1.1.2 (odpovídající HAB 1b: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)**

Používá se ke zpracování mléčné šťávy z rostlinných drog.

Matečné tinktury připravené podle této metody jsou směsí čerstvé rostlinné mléčné šťávy a ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%). Smíchá se čerstvá mléčná šťáva se dvěma hmotnostními díly ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) a zfiltruje se.

**Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku**

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah ve výše uvedeném filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;

$N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;

$N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

**Potenciace**

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

3 dílů matečné tinktury;

7 dílů ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

1 dílu prvního decimálního ředění;

9 dílů ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

**METODA 1.1.3 (odpovídající HAB 2a: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)**

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující obvykle méně než 70 % vylisované tekutiny (šťávy) a více než 60 % vlhkosti (ztráta sušením) a neobsahující silice nebo pryskyřice.

Matečné tinktury připravené podle této metody (obsah ethanolu je asi 43 % [50 % (V/V)]) se připravují macerací dále uvedeným postupem.

Rostlinná droga se rozdrobí a odebere se vzorek pro zkoušku Ztráta sušením (2.2.32). Není-li předepsáno jinak, stanoví se ztráta sušením se 2,00 g až 5,00 g rozdrobněného rostlinného materiálu ve zvážené misce s plochým dnem o průměru 45 mm až 55 mm, která byla předem vysušena, jak je uvedeno pro rostlinný materiál. Droga se 2 h suší při 105 °C a nechá se ochladit v exsíkátoru.

K rozdrobněné rostlinné droze se ihned přidá nejméně polovina množství ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) a skladuje se v dobře uzavřených nádobách při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Množství ( $A_2$ ) ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) v kilogramech požadované pro hmotnost ( $m$ ) rostlinného materiálu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot T}{100},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost rostlinného materiálu v kilogramech;

$T$  – ztrátu sušením ve vzorku v procentech.

Potom se odečte již přidané množství ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) a rozdíl se přidá ke směsi.

Nechá se stát nejméně 10 dnů za občasného míchání krouživým pohybem při teplotě nepřevyšující 20 °C, potom se směs vylisuje a výsledná tekutina se zfiltruje.

**Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku**

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah výše uvedeného filtrátu v pro-

centech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;  
 $N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;  
 $N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

- 2 dílů matečné tinktury;
- 8 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

První centezimální ředění (C1) se připraví ze:

- 2 dílů matečné tinktury;
- 98 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### METODA 1.1.4 (odpovídající HAB 2b: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující obvykle méně než 70 % vylisované tekutiny (šťávy) a více než 60 % vlhkosti (ztráta sušením) a neobsahující silice nebo pryskyřice.

Matečné tinktury připravené podle této metody (obsah ethanolu je asi 30 % [36 % (V/V)]) se připravují macerací dále uvedeným postupem.

Rostlinná droga se rozdrobí a odebere se vzorek pro zkoušku Ztráta sušením (2.2.32). Není-li předepsáno jinak, ztráta sušením se stanoví se 2,00 g až 5,00 g rozdrobněného rostlinného materiálu ve zvážené misce s plochým dnem o průměru 45 mm až 55 mm, která byla předem vysušena, jak je uvedeno pro rostlinný materiál. Droga se 2 h suší při 105 °C a pak se nechá ochladit v exsíkátoru.

K rozdrobněné droze se ihned přidá nejméně polovina množství ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%), skladuje se v dobře uzavřených nádobách při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Množství ( $A_2$ ) ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%) v kilogramech požadované pro hmotnost ( $m$ ) rostlinného materiálu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot T}{100},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost rostlinného materiálu v kilogramech;  
 $T$  – ztrátu sušením ve vzorku v procentech.

Potom se odečte již přidané množství ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%) a rozdíl se přidá ke směsi.

Nechá se stát nejméně 10 dnů za občasného promíchání krouživým pohybem při teplotě nepřevyšující 20 °C, potom se směs vylisuje a výsledná tekutina se zfiltruje.

#### Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah výše uvedeného filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;  
 $N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;  
 $N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

- 2 dílů matečné tinktury;
- 8 dílů ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

#### METODA 1.1.5 (odpovídající HAB 3a: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující silice nebo pryskyřice nebo obvykle méně než 60 % vlhkosti (ztráta sušením).

Matečné tinktury připravené podle této metody (obsah ethanolu je asi 60 % [62 % (V/V)]) se připravují macerací dále uvedeným postupem.

Rostlinná droga se rozdrobí a odebere se vzorek pro zkoušku Ztráta sušením (2.2.32). Není-li předepsáno jinak, ztráta sušením se stanoví se 2,00 g až 5,00 g rozdrobněného rostlinného materiálu ve zvážené misce s plochým dnem o průměru 45 mm až 55 mm, která byla předem vysušena, jak je

uvedeno pro rostlinný materiál. Droga se 2 h suší při 105 °C a pak se nechá ochladit v exsikátoru.

K rozdrobněné rostlinné droze se ihned přidá nejméně polovina množství ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) a skladuje se v dobře uzavřených nádobách při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Množství ( $A_3$ ) ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) v kilogramech požadované pro hmotnost ( $m$ ) rostlinného materiálu se vypočítá podle vzorce,

$$\frac{2 \cdot m \cdot T}{100},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost rostlinného materiálu v kilogramech;

$T$  – ztrátu sušením ve vzorku v procentech.

Potom se odečte již přidané množství ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%) a rozdíl se přidá ke směsi.

Nechá se stát nejméně 10 dnů za občasného míchání krouživým pohybem při teplotě nepřevyšující 20 °C, potom se směs vylisuje a výsledná tekutina se zfiltruje.

#### Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah výše uvedeného filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;

$N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;

$N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

3 dílů matečné tinktury;

7 dílů ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

1 dílu prvního decimálního ředění;

9 dílů ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2. Pro ředění od D4 dále se použije ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%).

První centezimální ředění (C1) se připraví ze:

3 dílů matečné tinktury;

97 dílů ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%).

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

1 dílu prvního centezimálního ředění;

99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### METODA 1.1.6 (odpovídající HAB 3b: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující silice nebo pryskyřice nebo obvykle méně než 60 % vlhkosti (ztráta sušením).

Matečné tinktury připravené podle této metody (obsah ethanolu je asi 43 % [50 % (V/V)]) se připravují macerací dále uvedeným postupem.

Rostlinná droga se rozdrobní a odebere se vzorek pro zkoušku Ztráta sušením (2.2.32). Není-li předepsáno jinak, ztráta sušením se stanoví se 2,00 g až 5,00 g rozdrobněného rostlinného materiálu ve zvážené misce s plochým dnem o průměru 45 mm až 55 mm, která byla předem vysušena, jak je uvedeno pro rostlinný materiál. Droga se 2 h suší při 105 °C a nechá se ochladit v exsikátoru.

K rozdrobněné rostlinné droze se ihned přidá nejméně polovina množství ethanolu 80% (V/V) (ethanolu 73%), skladuje se v dobře uzavřených nádobách při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Množství ( $A_3$ ) ethanolu 80% (V/V) (ethanolu 73%) v kilogramech požadované pro hmotnost ( $m$ ) rostlinného materiálu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{2 \cdot m \cdot T}{100},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost rostlinného materiálu v kilogramech;

$T$  – ztrátu sušením ve vzorku v procentech.

Potom se odečte již přidané množství ethanolu 80% (V/V) (ethanolu 73%) a rozdíl se přidá ke směsi.

Nechá se stát nejméně 10 dnů za občasného míchání krouživým pohybem při teplotě nepřevyšující 20 °C, potom se směs vylisuje a výsledná tekutina se zfiltruje.

#### Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah výše uvedeného filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

$m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;

$N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;

$N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

**Potenciace**

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

- 3 dílů matečné tinktury;
- 7 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%).

Třetí decimální ředění (D3) se připraví z:

- 1 dílu druhého decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D3.

**METODA 1.1.7 (odpovídající HAB 3c: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)**

Používá se pro čerstvé rostlinné drogy obsahující obvykle méně než 60 % vlhkosti (ztráta sušením).

Matečné tinktury připravené podle této metody (obsah ethanolu je asi 30 % [36 % (V/V)]) se připravují macerací dále uvedeným postupem.

Rostlinná droga se rozdrobí a odebere se vzorek pro zkoušku Ztráta sušením (2.2.32). Není-li předepsáno jinak, ztráta sušením se stanoví se 2,00 g až 5,00 g rozdrobněného rostlinného materiálu ve zvážené misce s plochým dnem o průměru 45 mm až 55 mm, která byla předem vysušena, jak je uvedeno pro rostlinný materiál. Droga se 2 h suší při 105 °C a pak se nechá ochladit v exsikátoru.

K rozdrobněné rostlinné droze se ihned přidá nejméně polovina množství ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%), skladuje se v dobře uzavřených nádobách při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Množství ( $A_3$ ) ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) v kilogramech požadované pro hmotnost ( $m$ ) rostlinného materiálu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{2 \cdot m \cdot T}{100},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost rostlinného materiálu v kilogramech;
- $T$  – ztrátu sušením ve vzorku v procentech.

Potom se odečte již přidané množství ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) a rozdíl se přidá ke směsi.

Nechá se stát nejméně 10 dnů za občasného míchání krouživým pohybem při teplotě nepřevyšující 20 °C, potom se směs vylisuje a výsledná tekutina se zfiltruje.

**Nastavení na hodnotu uvedenou v jednotlivém článku**

Stanoví se zbytek po vysušení v procentech (2.8.16) nebo, kde je to předepsáno, obsah výše uvedeného filtrátu v procentech. Požadované množství ( $A_1$ ) ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) v kilogramech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost filtrátu v kilogramech;

$N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah ve filtrátu v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;

$N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah ve filtrátu v procentech.

Filtrát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%) a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom se zfiltruje, je-li třeba.

**Potenciace**

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

- 3 dílů matečné tinktury;
- 7 dílů ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

**METODA 1.1.8 (odpovídající HAB 4a: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)**

Používá se obecně pro sušené rostlinné drogy.

Matečná tinktura připravená podle této metody se připraví macerací nebo perkolací dále uvedeným postupem za použití 1 dílu sušené rostlinné drogy a 10 dílů ethanolu vhodné koncentrace: ethanolu bezvodého, ethanolu 96% (V/V) (ethanolu 94%), ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%), ethanolu 80% (V/V) (ethanolu 73%), ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%), ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%), ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%), ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%), není-li v jednotlivých článcích předepsáno jinak.

*Příprava macerací.* Není-li předepsáno jinak, rozdrobí se rostlinná droga, promíchá se důkladně s ethanolem vhodné koncentrace a nechá se vhodnou dobu stát v uzavřené nádobě. Zbytek se oddělí od macerátu a vylisuje se, je-li třeba. Později se obě získané tekutiny spojí.

*Příprava perkolací.* Je-li třeba, rostlinná droga se rozdrobí. Promíchá se důkladně s částí ethanolu vhodné koncentrace a nechá se vhodnou dobu stát. Převéde se do perkolátoru a nechá se zvolna protékat vyluhovadlem při teplotě místnosti, přičemž se zajistí, aby extrahovaná rostlinná droga byla dostatečně ponořena ve zbylém ethanolu. Zbytek se může vylisovat a vylisec se přidá k perkolátu.

K úpravě na danou koncentraci, je-li třeba, se vypočítá množství ethanolu (v kilogramech) vhodné koncentrace požadované k dosažení koncentrace specifikované nebo použité ve výrobě ( $A_1$ ) podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost macerátu nebo perkolátu v kilogramech;
- $N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;
- $N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah v macerátu nebo perkolátu v procentech.

Macerát nebo perkolát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu vhodné koncentrace, nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom, je-li třeba, se zfiltruje.

#### Potenciace

Matečná tinktura odpovídá prvnímu decimálnímu ředění ( $\emptyset = D1$ ).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury (D1);
- 9 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Třetí decimální ředění (D3) se připraví z:

- 1 dílu druhého decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Není-li specifikována jiná koncentrace ethanolu, použije se pro ředění od D4 dále ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%) a další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D3.

První centezimální ředění (C1) se připraví z:

- 10 dílů matečné tinktury (D1);
- 90 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%), není-li specifikována jiná koncentrace ethanolu.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### METODA 1.1.9 (odpovídající HAB 4b: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ)

Používá se obecně pro živočišné drogy.

Matečná tinktura připravená podle této metody se připraví macerací nebo perkolací dále uvedeným postupem za použití 1 dílu živočišné drogy a 10 dílů ethanolu vhodné koncentrace: ethanolu bezvodého, ethanolu 96% (V/V) (ethanolu 94%), ethanolu 90% (V/V) (ethanolu 86%), ethanolu 80% (V/V) (ethanolu 73%), ethanolu 70% (V/V) (ethanolu 62%), ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%), ethanolu 36% (V/V) (ethanolu 30%), ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%), není-li v jednotlivých člancích předepsáno jinak.

*Příprava macerací.* Není-li předepsáno jinak, rozdrobí se živočišný materiál, promíchá se důkladně s ethanolem vhodné koncentrace a nechá se vhodnou dobu stát v uzavřené nádobě. Zbytek se oddělí od macerátu a, je-li třeba, vylisuje se. Později se obě tekutiny spojí.

*Příprava perkolací.* Je-li třeba, živočišná droga se rozdrobí. Promíchá se důkladně s částí ethanolu vhodné koncentrace a nechá se vhodnou dobu stát. Převede se do perkolátoru a nechá se zvolna protékat vyluhovadlem při teplotě místnosti, přičemž se zajistí, aby extrahovaný živočišný materiál byl dostatečně ponořen ve zbylém ethanolu. Zbytek se může vylisovat a výlisek se přidá k perkolátu.

K úpravě na danou koncentraci, je-li třeba, se vypočítá množství ethanolu (v kilogramech) vhodné koncentrace požadované k dosažení koncentrace specifikované nebo použité ve výrobě ( $A_1$ ) podle vzorce:

$$\frac{m \cdot (N_x - N_0)}{N_0},$$

v němž značí:

- $m$  – hmotnost perkolátu nebo macerátu v kilogramech;
- $N_0$  – zbytek po vysušení v procentech nebo obsah v procentech podle požadavku v jednotlivém článku;
- $N_x$  – zbytek po vysušení v procentech nebo stanovený obsah v macerátu nebo perkolátu v procentech.

Macerát nebo perkolát se promíchá s vypočítaným množstvím ethanolu vhodné koncentrace a nechá se stát nejméně 5 dnů při teplotě nepřevyšující 20 °C a potom, je-li třeba, se zfiltruje.

#### Potenciace

Matečná tinktura odpovídá prvnímu decimálnímu ředění ( $\emptyset = D1$ ).

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury (D1);
- 9 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Třetí decimální ředění (D3) se připraví z:

- 1 dílu druhého decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Není-li specifikována jiná koncentrace ethanolu, použije se pro ředění od D4 dále ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%) a další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D3.

První centezimální ředění (C1) se připraví z:

- 10 dílů matečné tinktury (D1);
- 90 dílů ethanolu stejné koncentrace.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%), není-li specifikována jiná koncentrace ethanolu.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### METODA 1.1.10 (FRANCOUZSKÝ LÉKOPIS)

Používá se obecně pro rostlinné drogy. Zda se jedná o drogu čerstvou nebo sušenou se specifikuje v jednotlivých člancích.

Matečná tinktura se podle této metody připraví macerací. Rostlinná droga se vhodně rozdrobí a odebere se vzorek na stanovení ztráty sušením (2.2.32) 2 h při 105 °C nebo obsahu vody (2.2.13). Tato hodnota se vezme v úvahu, k droze se přidá vypočítané množství ethanolu vhodné koncentrace požadované k výrobě matečné tinktury s vyhovujícím obsahem ethanolu, v ředění 1 : 10 (matečná tinktura 1 : 10), není-li předepsáno jinak, a nechá se nejméně 10 dnů macerovat za dostatečného protřepávání.

Zbytek se oddělí od ethanolu (macerátu) a vystaví se tlaku, je-li třeba. Obě tekutiny se spojí, nechají se stát 48 h a zfiltrují se. Pro matečné tinktury s požadovaným stanovením

obsahu se může provést úprava, je-li třeba, přidáním ethanolu o stejné koncentraci, jaká byla použita při přípravě tinktury.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury;
- 9 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2 za použití ethanolu vhodné koncentrace.

První centezimální ředění (C1) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury;
- 99 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2 za použití ethanolu vhodné koncentrace.

#### METODA 1.1.11 (FRANCOUZSKÝ LÉKOPIS)

Používá se obecně pro živočišné drogy.

Matečná tinktura se podle této metody připraví macerací.

Hmotnostní poměr suroviny k matečné tinktuře je obvykle 1 : 20. Surovina se vhodně rozdrobní a přidá se množství ethanolu vhodné koncentrace požadované k výrobě matečné tinktury v ředění 1 : 20 a nechá se nejméně 10 dnů macerovat za dostatečného protřepávání. Dekantuje se a zfiltruje se, nechá se stát 48 h a znovu se zfiltruje. Pro matečné tinktury s požadovaným stanovením obsahu se může provést úprava, je-li třeba, přidáním ethanolu o stejné koncentraci, jaká byla použita při přípravě tinktury.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury;
- 9 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2 za použití ethanolu vhodné koncentrace.

První centezimální ředění (C1) se připraví z:

- 1 dílu matečné tinktury;
- 99 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů ethanolu vhodné koncentrace.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2 za použití ethanolu o vhodné koncentraci.

## 2 GLYCEROLOVÉ MACERÁTY

### METODA 2.1

Používá se k maceraci surovin živočišného nebo rostlinného původu glycerolem 85% nebo směsí glycerolu/ethanolu vhodné koncentrace. Patologický materiál se vyřadí.

Kde je to vhodné, surovina se před použitím jemně rozseká.

#### METODY 2.1.1 a 2.1.2 (odpovídající HAB 42a a 42b: MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ Z NICH PŘIPRAVENÁ)

Suroviny živočišného původu – použijí se čerstvě usmrcená zvířata, nebo jejich části. Zvířata se zpracují ihned po usmrcení.

#### Macerace

1 díl jemně rozsekaného živočišného materiálu se disperguje v: – 9 dílech (decimální ředění) nebo 99 dílech (centezimální ředění) glycerolu 85% podle metody 2.1.1 nebo; – 2,1 dílech glycerolu 85% podle metody 2.1.2.

Nechá se macerovat nejméně 2 h, pak se protřepe. Je-li třeba, zfiltruje se.

Pokud je schváleno, může se před rozsekáním k 1 dílu živočišného materiálu přidat 1 díl glycerolu 85%. Pokud se použije velmi malé množství živočišného materiálu, ředění se mohou připravit dispergováním 1 dílu jemně rozsekaného živočišného materiálu v 99 dílech glycerolu 85% (C1 nebo D2, pokud se použijí další decimální ředění).

#### Potenciace

Podle metody 2.1.1

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu glycerolového macerátu D1;
- 9 dílů glycerolu 85% nebo ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2, avšak s ethanolem 18% (V/V) (ethanolem 15%) jako vehikulem.

Druhé ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu glycerolového macerátu C1;
- 99 dílů ethanolu 18% (V/V) (ethanolu 15%).

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

Podle metody 2.1.2

První decimální ředění (D1) se připraví ze:

- 3 dílů glycerolového macerátu;
- 7 dílů vody na injekci.

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu D1;
- 9 dílů vody na injekci.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

#### METODA 2.1.3 (FRANCOUZSKÝ LÉKOPIS)

Používá se pro suroviny rostlinného nebo živočišného původu.

#### Macerace

Surovina se vhodným způsobem rozdrobní. Odebere se vzorek a stanoví se Ztráta sušením (2.2.32) 2 h při 105 °C nebo Obsah vody (2.2.13). Tato hodnota se započítá do



množství a surovina se přidá k množství směsi ethanolu/glycerolu o vhodné koncentraci, pokud není předepsáno jinak, 1 díl na 20 dílů glycerolového macerátu [glycerolový macerát (1 : 20)]. Maceruje se nejméně 3 týdny za dostatečného třepání. Slije se a odsaje se pod tlakem, je-li třeba. Spojené tekutiny se nechají stát 48 h a zfiltrují se.

#### Potenciace

První decimální ředění (D1) se připraví z:

- 1 dílu glycerolového macerátu;
- 9 dílů směsi vody/ethanolu/glycerolu vhodné koncentrace.

Druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění;
- 9 dílů směsi vody/ethanolu/glycerolu vhodné koncentrace.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2 nebo se použije jiné vhodné vehikulum.

První centezimální ředění (C1) se připraví z:

- 1 dílu glycerolového macerátu;
- 99 dílů směsi vody/ethanolu/glycerolu vhodné koncentrace.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů směsi vody/ethanolu/glycerolu vhodné koncentrace.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2 nebo se použije jiné vhodné vehikulum.

#### METODA 2.2

#### METODY 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 a 2.2.4 (odpovídající HAB 41a, 41b, 41c a 41d: GLYCEROLOVÉ MATEČNÉ TINKTURY A TEKUTÁ ŘEDĚNÍ Z NICH PŘIPRAVENÁ)

Používá se pro suroviny rostlinného nebo živočišného původu macerované v roztoku glycerolu obsahujícího chlorid sodný. Patologický materiál se vyřadí.

V metodách 2.2.1, 2.2.2 a 2.2.3 se použijí čerstvě usmrcená zvířata, jejich části nebo sekrety. Nižší živočichové se usmrtí oxidem uhličitým v uzavřené nádobě. Zvířata se zpracují ihned po usmrcení.

Složky z krve živých koní se použijí v metodě 2.2.4.

#### Odběr vzorku a/nebo předběžná úprava

Suroviny použité v metodách 2.2.1, 2.2.2 a 2.2.3 se před použitím, kde je to vhodné, jemně rozsekají.

Krev použitá v metodě 2.2.4 se odebere zvěrolékařem. Krev získaná ze zvířat usmrcených vykrvením se nesmí použít. Odebere se 200 ml krve a přidá se 5 m. j. heparinu sodné soli a 0,625 ml roztoku chloridu sodného (9 g/kg) na mililitr. Složky krve se oddělí frakčním odstředováním a každý jednotlivý buněčný sediment se resuspenduje v 1,1 ml roztoku chloridu sodného (9 g/kg). Tyto buněčné suspenze se použijí do glycerolového macerátu.

#### Macerace

1 díl jemně rozsekaného živočišného materiálu, sekretů nebo suspenze krevních buněk, podle použité metody, se smíchá s 5 díly roztoku chloridu sodného vhodné koncentrace (viz tabulku 1) a s 95 díly glycerolu. Nechá se stát za chránění před světlem nejméně 7 dnů, pak se dekantuje. Je-li třeba pro metody 2.2.1, 2.2.2 a 2.2.3, odstředí se před

dekantací pak se tekutina zfiltruje, je-li třeba. Dekantovaná tekutina nebo filtrát jsou glycerolový macerát.

Jakýkoliv přítomný sediment se musí před použitím glycerolového macerátu resuspendovat.

Tab. 1

Metody 2.2.1 a 2.2.4	Metoda 2.2.2	Metoda 2.2.3
chlorid sodný (15 g/kg) ve vodě purifikované	chlorid sodný (40 g/kg) ve vodě purifikované	chlorid sodný (80 g/kg) ve vodě purifikované

#### Vehikulum

Směs 0,2 dílů hydrogenuhličitanu sodného a 8,8 dílů chloridu sodného v 991 dílech vody na injekce nebo vody čištěné, podle toho, co je vhodné.

#### Potenciace

Glycerolový macerát odpovídá druhému decimálnímu ředění (D2) nebo prvnímu centezimálnímu ředění (C1).

Třetí decimální ředění (D3) se připraví z:

- 1 dílu druhého decimálního ředění;
- 9 dílů vhodného vehikula.

Další ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D3. Kde je to vhodné, připraví se čtvrté decimální ředění (D4) z 1 dílu třetího decimálního ředění, 5,6 dílů vehikula a 3,4 dílů vody na injekci.

Druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění;
- 99 dílů vhodného vehikula.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### 3 TEKUTÁ ŘEDĚNÍ

##### METODA 3.1

Metody 3.1.1, 3.1.2 a 3.1.3 se používají k disoluci jakéhokoliv anorganického nebo organického materiálu, např. minerálů nebo jedů.

Není-li předepsáno jinak, rozpustí se 1 díl výchozího materiálu v 9 dílech (D1) nebo 99 dílech (C1) tekutého vehikula a protřepe se.

Kde je to zdůvodněno a schváleno, v případě nedostatečné rozpustnosti výchozího materiálu ve specifickém vehikulu, se přímo připraví první možné ředění. Např. pokud výchozí materiál je těžce rozpustný, rozpustí se 1 díl výchozího materiálu v 99 dílech vehikula (C1 nebo D2 pro další decimální ředění).

#### METODY 3.1.1, 3.1.2 (odpovídající HAB 5a a 5b: ROZTOKY, VODNÉ ROZTOKY)

#### Vehikula

Mohou se použít vehikula uvedená v tabulce 2.

Tab. 2

Metoda 3.1.1	Metoda 3.1.2
ethanol bezvodý	voda na injekci
ethanol 96% (V/V) (ethanol 94%)	voda čištěná
ethanol 90% (V/V) (ethanol 86%)	
ethanol 80% (V/V) (ethanol 73%)	
ethanol 70% (V/V) (ethanol 62%)	
ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%)	
ethanol 36% (V/V) (ethanol 30%)	
ethanol 18% (V/V) (ethanol 15%)	
voda čištěná	
glycerol 85%	

Pokud se v metodě 3.1.1 použije ethanol 18% (V/V) (ethanol 15%), výchozí materiál se rozpustí v 7,58 dílech vody čištěné a v ethanolu, jehož koncentrace se při decimálním ředění upraví přidáním 1,42 dílu ethanolu 96% (V/V) (ethanol 94%) k roztoku. Pro centezimální ředění se použije 83,4 dílu vody čištěné a 15,6 dílu ethanolu 96% (V/V) (ethanol 94%).

Pokud v metodě 3.1.2 není výchozí materiál stabilní a/nebo dobře rozpustný ve vodě, může se k vehikulu pro potenciace vyšší než D4 přidat glycerol 85% o koncentraci nejvýše 35 %.

#### Potenciace

Není-li specifikováno jinak, druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění (D1);
- 9 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) podle metody 3.1.1 nebo 9 dílů vody na injekci (nebo vody čištěné, podle toho, co je vhodné) podle metody 3.1.2.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

Není-li specifikováno jinak, druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění (C1);
- 99 dílů ethanolu 50% (V/V) (ethanolu 43%) podle metody 3.1.1 nebo 99 dílů vody na injekci (nebo vody čištěné, podle toho, co je vhodné) podle metody 3.1.2.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### Přísady

Podle metody 3.1.1, pokud se v konečném ředění pozoruje reakce, jako je srážení, není-li specifikováno jinak, použijí se ke zvýšení stability a/nebo rozpustnosti následující přísady:

- kyselina octová ledová;
- kyselina chlorovodíková;
- kyselina mléčná;
- hydroxid sodný.

Pokud bylo v roztocích nebo ředěních upraveno pH, nesmí být dále potenciovány.

#### METODA 3.1.3

##### Vehikula

Mohou se použít vhodná vehikula, jako např. ethanol o vhodné koncentraci, glycerol nebo voda čištěná, samostatně nebo jejich směsí.

##### Potenciace

Není-li specifikováno jinak, druhé decimální ředění (D2) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimálního ředění (D1);
- 9 dílů vhodného vehikula.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro D2.

Není-li specifikováno jinak, druhé centezimální ředění (C2) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního ředění (C1);
- 99 dílů vhodného vehikula.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro C2.

#### METODA 3.2

Obvykle se používá k přípravě tekutých ředění triturací látek, které jsou z největší části mírně rozpustné až prakticky nerozpustné.

#### METODY 3.2.1, 3.2.2 (odpovídající HAB 8a, 8b: TEKUTÉ PŘÍPRAVKY PŘIPRAVENÉ Z TRITURACÍ, VODNÉ PŘÍPRAVKY PŘIPRAVENÉ Z TRITURACÍ)

Ředění přípravků se připravuje podle metod 3.2.1 a 3.2.2 z triturací D4, D5 a D6 nebo z triturací C4, C5 a C6, podle metody 4.1.1, nejméně ve dvou krocích potenciace.

##### Vehikula

Mohou se použít vehikula uvedená v tabulce 3.

Tab. 3

Metoda 3.2.1	Metoda 3.2.2
první potenciace voda čištěná	všechny potenciace voda na injekci voda čištěná
druhá potenciace ethanol 36% (V/V) (ethanol 30%)	
další potenciace ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%)	

##### Potenciace

Pro první tekutou potenciace se rozpustí 1 díl triturace, 1 díl předchozího ředění v 9 dílech (decimální ředění) nebo v 99 dílech (centezimální ředění) specifického vehikula (viz tabulku) a protřepe se.

Pro další potenciace se postupuje s jednou částí předchozího ředění.

Ředění D6, D7, C6 a C7 připravená výše uvedenou metodou se nepoužijí pro přípravu dalších ředění.

**METODA 3.2.3**

Ředění přípravků se připravují podle metody 3.2.3 z triturationi od D2 dále; z triturationi C1, C2, C3 a C4 se připravují podle metody 4.1.2.

**Vehikula**

Mohou se použít vhodná vehikula, jako je ethanol o vhodné koncentraci nebo voda čištěná.

**Potenciace**

Není-li specifikováno jinak, druhé první decimální tekuté ředění (Dn-1) se připraví z:

- 1 dílu prvního decimální trituratione (Dn-2);
- 9 dílů vody čištěné nebo odpovídajícího množství jiného vhodného vehikula.

Další decimální ředění (Dn) se připraví z:

- 1 dílu prvního tekutého decimálního ředění Dn-1;
- 9 dílů vhodného vehikula.

Další decimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro Dn.

Není-li specifikováno jinak, první centezimální tekuté ředění (Cn-1) se připraví z:

- 1 dílu centezimální trituratione Cn-2;
- 99 dílů vody čištěné nebo odpovídajícího množství jiného vhodného vehikula.

Další centezimální ředění (Cn) se připraví z:

- 1 dílu prvního centezimálního tekutého ředění Cn-1;
- 99 dílů vhodného vehikula.

Další centezimální ředění se připraví podle postupu uvedeného pro Cn.

**4.1 TRITURACE****METODA 4.1**

Metoda 4.1 se použije pro trituratione, které jsou tuhými ředěními surovin nebo triturationi připravených podle metod 4.2.1 nebo 4.2.2. Délka a intenzita trituratione jsou takové, aby byly dostačující pro dosažení homogennosti a potenciace.

**Vehikulum**

Není-li specifikováno jinak, použije se laktosa monohydrát.

**METODA 4.1.1 (odpovídající HAB 6: TRITURACE)**

Trituratione se připraví manuálně nebo mechanicky. Pro množství převyšující 1 kg se musí použít mechanická trituratione. Výsledná velikost částic suroviny v prvním decimálním nebo centezimálním ředění nepřevyšuje 100 µm, pokud není předepsáno v jednotlivém článku jinak.

**Poměry suroviny k vehikulu**

<b>Decimální trituratione</b>	<b>Centezimální trituratione</b>
První decimální trituratione (D1) se připraví z: 1 dílu suroviny 9 dílů vehikula	První centezimální ředění (C1) se připraví z: 1 dílu suroviny 99 dílů vehikula
Další decimální trituratione (Dn) se připraví podle postupu uvedeného pro D1, za použití 1 dílu předcházející trituratione (Dn-1).	Další centezimální trituratione (Cn) se připraví podle postupu uvedeného pro C1, za použití 1 dílu předcházející trituratione (Cn-1).

Kde se použije čerstvý rostlinný materiál, je množství přidaného vehikula takové, aby se z 1 dílu suroviny získalo 10 dílů trituratione (decimální trituratione) nebo 100 dílů trituratione (centezimální trituratione) (nahradí se ztráta vody z čerstvé rostliny odpovídajícím množstvím vehikula). Pro tuhá ředění může být třeba použití vhodného postupu sušení.

Kde je zdůvodněno a schváleno, může být pro další decimální ředění třeba použít C1 nebo D2, jako první triturationi pevné látky, připravené z 1 dílu suroviny a 99 dílů trituratione.

**Trituratione**

Pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, metoda sestává z rozdělení vehikula na 3 stejné díly a přidání suroviny k prvnímu dílu, pak přidání druhého a třetího dílu vehikula, s intenzivním roztíráním mezi každým z těchto přidání.

Pro mechanickou triturationi se použije zařízení umožňující dodržet požadavky na velikost částic v první decimální nebo centezimální tuhé triturationi. Zařízení je vybaveno seškrabávadlem umožňujícím rovnoměrné rozetření. Doba nutná k přípravě jedné trituratione je nejméně 1 h, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

Pro manuální triturationi se vehikulum rozdělí na tři stejné díly a krátce se první část rozetře v porcelánové třecí misce. Přidá se surovina, směs se 6 min roztírá, 4 min se seškrabuje vhodným nekovovým seškrabávadlem (např. porcelánovou stěrkou). Roztírá se dalších 6 min, znovu se další 4 min seškrabuje, potom se přidá druhý díl vehikula a pokračuje se, jak je uvedeno výše. Stejným způsobem se zpracuje i zbytek vehikula. Nejkratší doba potřebná pro celý postup je tedy 1 h.

Celý postup se opakuje stejným způsobem pro každé další tuhé ředění.

Trituratione D5 nebo C5 (a další) se mohou také připravit intenzivním mechanickým zpracováním vhodným míchacím zařízením následujícím způsobem: k jedné třetině vehikula se přidá tuhá trituratione a promíchá se, přidá se druhá část vehikula, promíchá se a s poslední třetinou vehikula se postupuje stejným způsobem. Celý postup trvá nejméně 1 h, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

Ve všech případech je ve 4., 5. a 6. decimální triturationi nebo centezimální triturationi možný přechod na tekuté medium, jak je popsáno v metodách 3.2.1 a 3.2.2.

**METODA 4.1.2 (FRANCOUZSKÝ LÉKOPIS)****Trituratione**

Trituratione se připravují následujícím způsobem:

**Decimální trituratione**

Jeden hmotnostní díl homeopatické suroviny se upráškuje. Opatrně se rozetře s malým množstvím vehikula. Vehikulum se přidává po malých množstvích až do devíti hmotnostních dílů použitého vehikula. Výsledná trituratione je první decimální triturationi (D1).

Jeden hmotnostní díl této trituratione se roztírá způsobem popsaným výše s devíti hmotnostními díly vehikula. Výsledná trituratione je 2. decimální trituratione (D2).

Ve všech případech je po sedmé decimální triturationi (D7) možný přechod na tekuté medium, jak je popsáno v metodě 3.2.3.

Tab. 4

Decimální trituratione	Centezimální trituratione
<b>Matečné tinktury připravené podle metod 1.1.1, 1.1.3 a 1.1.4</b>	
První decimální trituratione (D1) se připraví ze: 2 dílů matečné tinktury nejvýše 10 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)	První centezimální ředění (C1) se připraví ze: 2 dílů matečné tinktury nejvýše 100 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)
<b>Matečné tinktury připravené podle metod 1.1.2, 1.1.5, 1.1.6 a 1.1.7</b>	
První decimální trituratione (D1) se připraví ze: 3 dílů matečné tinktury nejvýše 10 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)	První centezimální ředění (C1) se připraví ze: 3 dílů matečné tinktury nejvýše 100 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)
<b>Matečné tinktury připravené podle metod 1.1.8 a 1.1.9</b> <i>Matečná tinktura odpovídá prvnímu decimálnímu ředění (D1).</i>	
Druhá decimální trituratione (D2) se připraví z: 1 dílu matečné tinktury nejvýše 10 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)	První centezimální ředění (C1) se připraví z: 10 dílů matečné tinktury nejvýše 100 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)
<b>Roztoky připravené podle metod 3.1.1 nebo tekutá ředění, směsi a společně potenciované směsi</b>	
Decimální trituratione n+1(Dn+1) se připraví z: 1 dílu ředění (Dn) nejvýše 10 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)	Centezimální trituratione n+1(Cn+1) se připraví z: 1 dílu ředění (Cn) nejvýše 100 dílů vehikula (bere se v úvahu hmotnost vysušeného zbytku)

#### Centezimální trituratione

Postupuje se stejným způsobem, ale v centezimálních řadách.

Ve všech případech je po třetí centezimální triturationi (C3) možný přechod na tekuté medium, jak je popsáno v metodě 3.2.3.

#### METODA 4.2

Metoda 4.2 se použije pro trituratione, které jsou tuhými ředěními tekutých přípravků, jako jsou matečné tinktury a roztoky, jejich ředění, směsi a společně potenciované směsi.

Postupně se impregnuje celkové množství vehikula, vlhká směs se mírně vysuší, rozmělní se a přesítuje se, je-li třeba. Potom se promíchá a roztírá se, dokud není dosaženo homogenity a požadované potenciace. Trituratione se dále provádí podle metod 4.1.1 nebo 4.1.2.

#### Vehikulum

Není-li specifikováno jinak, použije se laktosa monohydrát.

#### METODA 4.2.1 (odpovídající HAB 7: TRITURACE)

##### Poměr výchozího materiálu k vehikulu

Množství přidaného vehikula musí být vždy takové, aby se získalo 10 dílů trituratione (decimální trituratione) nebo 100 dílů trituratione (centezimální trituratione) z požadovaného počtu dílů tekutého přípravku (viz tabulky 4 a 5); v úvahu se bere hmotnost vysušeného zbytku. Kde je možné zanedbat množství vysušeného zbytku, použije se pro 1 díl tekutého přípravku 10 (decimální trituratione) nebo 100 (centezimální trituratione) dílů vehikula.

#### METODA 4.2.2

##### Poměry suroviny k vehikulu

Tab. 5

<b>Matečné tinktury připravené podle metod 1.1.10 a 1.1.11</b>	
První decimální trituratione (D1) se připraví z: 1 dílu matečné tinktury 10 dílů vehikula	První centezimální ředění (C1) se připraví z: 1 dílu matečné tinktury 100 dílů vehikula

#### 5 OSTATNÍ PŘÍPRAVKY

##### METODA 5.1

Metoda 5.1 se použije pro homeopatické přípravky připravené společnou potenciací dvou nebo více surovin a/nebo jejich ředěními, kde společná potenciace sestává ze smíchání několika surovin nebo jejich ředění, potom následuje jejich potenciace v jednom nebo více potenciačních krocích.

##### METODY 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 (odpovídající HAB 40a, 40b, 40c: SPOLEČNĚ POTENCIOVANÉ SMĚSI)

Může se použít surovina a/nebo ředění uvedená v tabulce 6.

Tab. 6

Metoda 5.1.1	Metoda 5.1.2	Metoda 5.1.3
suroviny roztoky	vodné přípravky glycerolové maceráty a z nich připravená vodná ředění	triturace
triturace tekutá ředění matečné tinktury, jejichž metoda přípravy specifi- kuje ředění 1 : 10 (nebo 1 : 100)	triturace	

**Vehikula**

Výběr vehikula je omezen a musí být v souladu se zvláštním požadavkem jak na jednotlivou surovinu, tak na lékovou formu (viz tabulku 7).

Metoda 5.1.1 se provádí, pokud se vychází z trituratione a kde je to zdůvodněno, použije se pro první potenciační krok voda čištěná.

Metoda 5.1.2 se provádí, pokud se vychází z glycerolového macerátu obsahujícího chlorid sodný, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak, použije se následující vehikulum: 0,2 díly hydrogenuhličitanu sodného a 8,8 dílů chloridu sodného v 991 dílu vody na injekci.

**Potenciace**

Pro každý krok potenciace se spojí a protřepe nebo rozetře 1 díl dané směsi s 9 díly (decimální ředění) nebo 99 díly (centezimální ředění) vhodného vehikula.

Tab. 7

Metoda 5.1.1	Metoda 5.1.2	Metoda 5.1.3
ethanol 96% (V/V) (ethanol 94%)	voda na injekci	laktosa monohydrát
ethanol 90% (V/V) (ethanol 86%)	voda čištěná	
ethanol 80% (V/V) (ethanol 73%)	sirup [sacharosa a voda čištěná (64 + 36)]	
ethanol 70% (V/V) (ethanol 62%)		
ethanol 50% (V/V) (ethanol 43%)		
ethanol 36% (V/V) (ethanol 30%)		
ethanol 18% (V/V) (ethanol 15%)		

**METODA 5.1.4**

**Vehikula**

Může se použít např. ethanol o vhodné koncentraci, voda čištěná nebo laktosa monohydrát.

**Potenciace**

Potenciace se může provést podle postupu metody 5.1.5, 5.1.2 a 5.1.3 buď v jednom stupni, nebo ve více stupních.

**METODA 5.1.5**

**Vehikula**

Může se použít např. ethanol o vhodné koncentraci, voda čištěná nebo laktosa monohydrát.

**Potenciace**

Pro společnou potenciaci centezimálních ředění, každé ředění (Cn-1) představuje 1 % konečného produktu a množství přidaného vehikula se proporcionálně snižuje o množství účinné látky [tj. 100 % – (1 % × počet účinných látek)]. Stejný postup se provádí, ve vhodných poměrech, při společné potenciaci decimálních ředění.

**ALLIUM SATIVUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA**

6.0:2023

**Česnek pro homeopatické přípravky**

*Synonymum.* Allium sativum ad praeparationes homoeopathicas

**DEFINICE**

Jsou to čerstvé cibule druhu *Allium sativum* L.

**VLASTNOSTI**

Droga má po rozřezání charakteristický pach.

**ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI**

Cibule je obvykle 3 cm až 5 cm široká, téměř okrouhlá; plochá báze nese zbytky četných, krátkých, šedohnědých adventivních kořenů. Cibule se skládá z asi deseti dceřiných cibulí (stroužků) uspořádaných pevně v kruhu kolem centrální osy. Jednotlivé dceřině cibule jsou 1 cm až 3 cm dlouhé, podélně zploštělé, na hřbetní straně vypuklé. Každá dceřiná cibule má tuhou bílou nebo načervenalou pokožku pokrývající masitý nebo válcovitý list, který tvoří více méně okrouhlý, protáhlý kužel zárodku listu a vegetativního vrcholku.

**ZKOUŠKY NA ČISTOTU**

**Voda** (2.2.13). Nejméně 55,0 %; stanoví se s 10,0 g jemně řezané drogy, jako důkaz čerstvosti drogy.

**Matečná tinktura**

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

**VÝROBA**

Vyrábí se z druhu *Allium sativum* L. macerací řezané drogy ethanolom vhodné koncentrace.

**VLASTNOSTI**

*Vzhled.* Hnědožlutá tekutina charakteristického, nepříjemného aromatického pachu.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Ke 2 ml matečné tinktury se přidá 0,2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*; vzniká žlutobílá sraženina.

**B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 5 ml matečné tinktury se protřepává dvakrát 10 ml *etheru R*. Etherové vrstvy se spojí, vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Filtrát se odpaří za nízké teploty ve vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,4 ml *methanolu R*.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *resorcinolu R*, 10 mg *thymolu R* a 30 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu F<sub>254</sub>* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *toluenu R* a *diisopropyletheru R* (10 + 40 + 50).

*Nanášení.* 40 µl zkoušeného roztoku; 10 µl porovnávacího roztoku.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a identifikuje se kyselina gallová; pak se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °C až 110 °C a pozoruje se do 10 min v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
thymol: oranžovočervená skvrna	intenzivní červenofialová skvrna
	intenzivní červenofialová skvrna
	fialová skvrna
	nažloutlá nebo nazelenalá skvrna
resorcinol: intenzivní oranžovočervená skvrna	
kyselina gallová: žlutá skvrna (skvrna zhášeující fluorescenci v ultrafialovém světle při 254 nm)	fialová skvrna
	zelenožlutá skvrna
	může být přítomna fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,885 až 0,960.

**Ethanol** (2.9.10). 50 % (V/V) až 70 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 4,0 %.

SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

**APIS MELLIFERA AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA**

6.0:2024

Včela medonosná pro homeopatické účely

*Synonymum.* Apis mellifera ad praeparationes homoeopathicas

DEFINICE

Je to živá dělnice druhu *Apis mellifera L.*

VLASTNOSTI

Viz Zkoušky totožnosti.

VÝROBA

V případě, že je včela vystavena účinkům látek určených k prevenci a léčbě chorob, musí být zajištěno, že jejich rezidua jsou minimální.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tělo včely je asi 15 mm dlouhé, černé, hedvábně lesklé, pokryté červenými chlupy s šedým nádechem. Široká holeň je bez tmů. Spodní plochy článků a nohy jsou hnědé, postupně přecházející do oranžovočerveného zbarvení. Kusadla jsou dvoučláneková, makadla jednočláneková. Na zadních nohách jsou košíčky nebo sběrací kartáčky pokryté štětinami. Křídla mají tři úplné kubitální buňky, radiální buňka je dvakrát tak dlouhá než široká; tři buňky na zadním okraji a tři střední buňky jsou uzavřené. Céva spojuje ostatné žihadlo s jedovým váčkem.

Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

VÝROBA

Vyrábí se z druhu *Apis mellifera L.* macerací ethanolem vhodné koncentrace.

VLASTNOSTI

Světle žlutá tekutina, která může stáním tmavnout.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Matečná tinktura.

*Porovnávací roztok.* 12 mg *kyseliny 4-aminobutanové R*, 12 mg *leucinu R* a 12 mg *prolinu R* se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *ethanolem 96% R* na 50 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R* a *ethanolu bezvodého R* (17 + 63).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
leucin: růžová skvrna	růžová skvrna růžová skvrna růžová skvrna růžová skvrna
prolin: oranžovožlutá skvrna	oranžovožlutá skvrna
kyselina 4-aminobutanová: růžová skvrna	růžová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,890 až 0,910.

**Ethanol** (2.9.10). 60 % (V/V) až 70 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 0,30 %.

## ARSENI SESQUIOXIDUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:1599

Oxid arsenitý pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Arsenii trioxidum ad praeparationes homoeopathicae

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>      M<sub>r</sub> 197,84      CAS 1327-53-3

DEFINICE

*Obsah.* 99,5 % až 100,5 % sloučeniny As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý prášek.

*Rozpustnost.* Prakticky nerozpustný až mírně rozpustný ve vodě. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** 20 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, přidají se 4 ml *vody R* a 0,1 ml *sulfidu sodného RS*; vznikne žlutá sraženina, která je rozpustná v *amoniaku zředěném RS1*.
- B.** 20 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, přidá se 5 ml *zkoumadla fosfornového R* a 15 min se zahřívá na vodní lázni; vzniká černá sraženina.

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Vzhled roztoku.** Roztok (100 g/l) v *amoniaku zředěném RS1* je čirý (2.2.1) a bezbarvý (2.2.2, *Metoda II*).

**Sulfidy.** Nejvýše (20 µg/g); 1,0 g se rozpustí v 10,0 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 0,05 ml *octanu olovnatého RS*. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem smícháním 10,0 ml roztoku *sulfidu sodného R* (0,015 g/l) v *hydroxidu sodném zředěném RS* a 0,05 ml *octanu sodného RS*.

STANOVENÍ OBSAHU

40,0 mg se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 3 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a promíchá se. Přidá se 1 ml *škrobu RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS*.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 4,946 mg As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## BARII CHLORIDUM DIHYDRICUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2142

Chlorid barnatý dihydrát pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Barii chloridum dihydricum ad praeparationes homoeopathicas

BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O      M<sub>r</sub> 244,27      CAS 10326-27-9

DEFINICE

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 % sloučeniny BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly.

*Rozpustnost.* Snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný nebo prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** 0,1 g se rozpustí v 1 ml *vody R* a přidá se 0,3 ml *kyseliny sírové zředěné RS*; vznikne bílá sraženina nerozpustná v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a v *kyselině dusičné zředěné RS*.
- B.** Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (2.3.1).

ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 10,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je čirý (2.2.1) a bezbarvý (2.2.2, *Metoda II*).

**Kysele nebo zásadité reagující látky.** K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

**Těžké kovy** (2.4.8). Nejvýše 10 µg/g; 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A. K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní roztok *olova (1 µg Pb/ml)*.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,200 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*. Přidá se 100 ml *methanolu R*, 10 ml *amoniaku 26% R* a 2 mg *ftaleinpurpuru R*. Titruje se *dinatrium-edetátem 0,1 mol/l VS* do změny fialového zbarvení na bezbarvé.

1 ml *dinatrium-edetátu 0,1 mol/l* odpovídá 24,43 mg sloučeniny  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

## CADMII SULFAS HYDRICUS AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2143

## Síran kademnatý hydrát pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Cadmii sulfas hydricus ad praeparationes homoeopathicas

$\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$   $M_r$  256,53

## DEFINICE

*Obsah.* 98,0 % až 102,0 % sloučeniny  $\text{CdSO}_4$ , počítáno na bezvodou látku.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

*Rozpustnost.* Snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (2.3.1).  
**B.** Ke 2 ml roztoku S (viz Zkoušky na čistotu) se přidají 2 ml *sulfidu sodného RS*; vznikne žlutá sraženina.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 5,0 g se rozpustí ve vodě *prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je čirý (2.2.1) a bezbarvý (2.2.2, *Metoda II*).

**Kysele nebo zásadité reagující látky.** K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *oranže methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

**Dusičnany.** Nejvýše 100 µg/g; 1,0 g se rozpustí ve vodě *R* a zředí se jí na 20,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml roztoku *kyseliny sulfanilové R* (10 g/l) v *kyselině octové RS* a 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku *naftylaminu R* (3 g/l) v *kyselině octové RS*. Po přidání *zinku R* vznikne do 5 min růžové zbarvení, které není intenzivnější než zbarvení současně připravené směsi 0,5 ml základního roztoku *dusičnanů* (10 µg  $\text{NO}_3/\text{ml}$ ) a 0,5 ml *vody R*.

**Síran zinečnatý, sírany alkalických zemin, sírany vzácných zemin.** 1,0 g se rozpustí v 17 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 g *thioacetamidu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni. Zředí se vodou *R* na 20,0 ml a zfiltruje se. 10,0 ml tohoto roztoku se odpaří v sušárně do sucha. Zbytek se žihá při teplotě asi

(800 ± 50) °C do konstantní hmotnosti. Zbytek váží nejvýše 2 mg.

**Arsen** (2.4.2, *Metoda A*). Nejvýše 2 µg/g; stanoví se s 5 ml roztoku S.

**Voda**, semimikrostanovení (2.5.12). 16,0 % až 20,0 %; stanoví se s 80 mg. Před stanovením se 10 min protřepává.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,200 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. Přidá se 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a 50 mg *černě eriochromové T s chloridem sodným R1* a titruje se *dinatrium-edetátem 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení z červeného na zelené.

1 ml *dinatrium-edetátu 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,85 mg  $\text{CdSO}_4$ .

## CALCII IODIDUM TETRAHYDRICUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2144

## Jodid vápenatý tetrahydrát pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Calcii iodidum tetrahydricum ad praeparationes homoeopathicas

$\text{CaI}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $M_r$  365,95 CAS 13640-62-5  
 $M_r$  bezvodého 293,90

## DEFINICE

*Obsah.* 97,0 % až 102,0 % sloučeniny  $\text{CaI}_2$ , počítáno na bezvodou látku.

## VLASTNOSTI

*Vhled.* Bílý nebo téměř bílý prášek, velmi hygroskopický.

*Rozpustnost.* Velmi snadno rozpustný až snadno rozpustný ve vodě a ethanolu 96%.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Roztok S (viz Zkoušky na čistotu) vyhovuje zkoušce (a) na vápník (2.3.1).  
**B.** Roztok S vyhovuje zkoušce (b) na jodidy (2.3.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 10,0 g se rozpustí ve vodě *destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je čirý (2.2.1) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok  $\text{ZŽ}_5$  (2.2.2, *Metoda II*).

**Volný jod a jodičnany.** K 5 ml roztoku S se přidají 2 ml *dichlormethanu R*. Protřepe se a nechá se stát; organická vrstva je bezbarvá (2.2.2, *Metoda I*) (volný jod). Přidá se 0,2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, protřepe se a nechá se stát; organická vrstva zůstane bezbarvá (jodičnany).

**Sírany** (2.4.13). Nejvýše 150 µg/g; 10 ml roztoku S se zředí vodou *destilovanou R* na 15 ml.

**Železo** (2.4.9). Nejvýše 10 µg/g; stanoví se s 10 ml roztoku S.



**Těžké kovy** (2.4.8). Nejvýše 10 µg/g; 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A. K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní roztok olova (1 µg Pb/ml).

**Voda**, semimikrostanovení (2.5.12). 18,0 % až 22,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

#### STANOVENÍ OBSAHU

0,300 g se rozpustí v 50 ml vody R. Přidá se 5 ml kyseliny dusičné zředěné RS a 25,0 ml dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS. Protřepe se, přidají se 2 ml síranu amonnoželezitého RS2 a titruje se thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS do změny zbarvení na červenožluté.

1 ml dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS odpovídá 14,70 mg CaI<sub>2</sub>.

#### SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsných obalech.

## CROCI STIGMA AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:1624

Šafrán pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Croci stigma ad praeparationes homoeopathicae

#### DEFINICE

Jsou to usušené blizny druhu *Crocus sativus* L. na bázi obvykle srostlé v krátkou čnělku.

#### VLASTNOSTI

Droga má charakteristický aromatický pach.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Blizny jsou tmavě cihlově červené, za sucha jsou 20 mm až 40 mm dlouhé, po navlhčení vodou asi 35 mm až 50 mm dlouhé. Kornoutkovité blizny se směrem k vrcholku rozšiřují, na jedné straně jsou hluboce nařiznuté, horní okraj je otevřený a jemně vroubkovaný. Čnělka spojující blizny je světle žlutá a není delší než 5 mm.
- B.** Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: protáhlé buňky pokožky často s krátkou centrální papilou; ve vodě uvolňují žlutě zbarvenou látku; buňky na horním okraji blizny jsou pokryty až 150 µm dlouhými prstovitými papilami; mezi nimi jsou jednotlivá kulovitá pylová zrna o průměru asi 100 µm s jemně tečkovanou exinou; svazky cévní s drobnými šroubovitě ztlustlými cévami, vlákna nejsou přítomna.
- C.** Drogy se opatrně rozdrtí na hrubší kousky a navlhčí se 0,2 ml kyseliny fosfomolybdénové RS. Kousky drogy se do 1 min až 2 min zbarví modře nebo zmodrá prostředí kolem nich.
- D.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).  
*Zkoušený roztok.* 0,1 g drogy se opatrně rozetře skleněnou tyčinkou, navlhčí se 0,2 ml vody R. Po 3 min se přidá 5 ml methanolu R, nechá se stát 20 min chráněn před světlem a zfiltruje se přes chomáček vaty.

*Porovnávací roztok.* 5 mg žluti naftolové R se rozpustí v 5 ml methanolu R a smíchá se s roztokem 5 mg červeně sudanové G R v 5 ml dichlormethanu R.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů vody R, propan-2-olu R, ethyl-acetátu R (10 + 25 + 65).

*Nanášení.* 10 µl zkoušeného roztoku a 5 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
červená skvrna	dvě žluté skvrny intenzivní žlutá skvrna (crocin)
žlutá skvrna	
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
červená skvrna	jedna nebo dvě skvrny zhášeující fluorescenci
žlutá skvrna	skvrna zhášeující fluorescenci
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce.* Postříká se *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
červená skvrna	jedna nebo dvě červené až červenofialové skvrny
modrá až modrozelená skvrna	červená až červenofialová skvrna  dvě modré až modrozele- né skvrny  intenzivní modrá až mod- rozelená skvrna (crocin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

- E.** 0,1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti D se smíchá s 1 ml methanolu R. 0,1 ml tohoto roztoku se kápne na filtrační papír, nechá se uschnout a postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v methanolu R. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna fluoreskuje intenzivně oranžovožlutě.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Barevnost.** 0,10 g se v 5 ml odměrné baňce smíchá s 5,0 ml vody destilované R a nechá se stát 8 h za protřepávání, vždy po 30 min, pak se nechá stát 16 h. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou destilovanou R na 500,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) při 440 nm za použití vody destilované R jako porovnávací tekutiny; absorbance je nejméně 0,44.

**Cizí příměsi.** Při pozorování pod mikroskopem nejsou přítomny buňky se ztlustlými stěnami, krystaly ani pylová zrna se třemi klíčovými póry.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 10,0 %; 0,200 g drogy se suší v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 7,0 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

## CUPRI ACETAS MONOHYDRICUS AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2146

Octan měďnatý monohydrát pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Cupri acetatas monohydricus ad praeparationes homoeopathicas

$\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $M_r$  199,65 CAS 6046-93-1

## DEFINICE

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 % sloučeniny  $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Zelenomodré krystaly nebo zelený prášek.

*Rozpustnost.* Dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný nebo velmi těžce rozpustný v ethanolu 96%.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Vyhovuje zkoušce (a) na octany (2.3.1).  
**B.** 0,1 g se rozpustí v 10 ml vody R a po kapkách se přidá amoniak zředěný RS1; vznikne tmavě modré zbarvení.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 3,0 g se rozpustí ve směsi 40 ml vody destilované R a 0,6 ml kyseliny octové ledové R zahřátím na 70 °C. Ochladí se a zředí se vodou destilovanou R na 45 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je čirý (2.2.1).

**Nečistoty nesrážené sirovodíkem.** Nejvýše 0,1 %, počítáno jako sírany.

Ke 2,000 g se přidá 92 ml vody R a 8,0 ml kyseliny sírové zředěné RS. Zahřívá se na 70 °C a zavádí se proud sirovodíku R, dokud se již netvoří sraženina sulfidu měďnatého. Nechá se ochladit a usadit, pak se zfiltruje. 50,0 ml filtrátu se v kelímku odpaří do sucha. Zbytek se žihá při asi (600 ± 50) °C do konstantní hmotnosti.

**Chloridy** (2.4.4). Nejvýše 50 µg/g; stanoví se s 15 ml roztoku S.

**Sírany** (2.4.13). Nejvýše 150 µg/g; stanoví se s 15 ml roztoku S.

**Železo** (2.4.9). Nejvýše 20 µg/g; 0,500 g se rozpustí v 10 ml vody R. Převede se do dělicí nálevky, přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové RS a 10 ml isobutyl(methyl)ketonu R, 3 min se intenzivně třepe a nechá se stát. Organická vrstva se převede do druhé dělicí nálevky a přidá se 10 ml vody R. 3 min se intenzivně třepe a nechá se stát. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo.

**Nikl.** Nejvýše 10 µg/g. Ke zbytku získanému ve zkoušce Nečistoty nesrážené sirovodíkem se přidají 2,0 ml kyseliny chlorovodíkové R a 1,0 ml kyseliny sírové R a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí ve směsi 3,0 ml kyseliny sírové zředěné RS a 17,0 ml vody R. Ke 4,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml vody R, 5,0 ml bromové vody R, 7,0 ml amoniaku zředěného RS1 a 3,0 ml roztoku dimethylglyoximu R (10 g/l) v ethanolu 90% (V/V) R. Tento roztok se do 1 min nezbarví intenzivněji než roztok připravený takto: 4,0 ml roztoku niklu (1 µg Ni/ml) připraveného ze základního roztoku niklu (10 µg Ni/ml), 4,0 ml vody R a 5,0 ml bromové vody R; opatrně se přidá 7,0 ml amoniaku zředěného RS1 a 3,0 ml roztoku dimethylglyoximu R (10 g/l) v ethanolu 90% (V/V) R.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,400 g se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 50 ml. Přidá se 6,0 ml kyseliny octové ledové R, 10,0 g jodidu draselného R a 1 ml škrobu RS. Titruje se thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS.

1 ml thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS odpovídá 19,97 mg  $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

## CUPRUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.0:1610

Měď pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Cuprum ad praeparationes homoeopathicas

Cu  $A_r$  63,55 CAS 7440-50-8

## DEFINICE

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 % Cu.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Červenohnědý prášek.

*Rozpustnost.* Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině chlorovodíkové a v kyselině dusičné, prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Ke 2 ml roztoku S (viz Zkoušky na čistotu) se přidá 0,5 ml hexakvanoželeznatanu draselného RS; vznikne červenohnědá sraženina.  
**B.** K 5 ml roztoku S se přidá 0,6 ml amoniaku 17,5% RS; vznikne modrá sraženina, která se přidáním 2 ml amoniaku 17,5% RS rozpustí na intenzivně modře zbarvený roztok.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 2,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny dusičné R*. Po ukončení vývoje dusíkatých dýmů se zředí *vodou destilovanou R* na 60 ml.

**Kysele nebo zásaditě reagující látky.** K 5,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a vaří se 1 min. Po ochlazení se zfiltruje a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 25,0 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RSI*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

**Chloridy (2.4.4).** Nejvýše 100 µg/g; 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy.

**Sírany (2.4.13).** Nejvýše 300 µg/g; 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany.

**Železo.** Nejvýše 50 µg/g; atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 1,00 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se podle potřeby zředěním základního roztoku železa (20 µg Fe/ml) roztokem *kyseliny dusičné R 1% (V/V)*.

*Zdroj záření.* Železná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 248,3 nm.

*Plamen.* Vzduch-acetylen.

**Olovo.** Nejvýše 100 µg/g; atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* Použije se zkoušený roztok připravený ve zkoušce Železo.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se podle potřeby zředěním základního roztoku olova (1 mg Pb/ml) roztokem *kyseliny dusičné R 1% (V/V)*.

*Zdroj záření.* Olověná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 283,3 nm.

*Plamen.* Vzduch-acetylen.

**Zinek.** Nejvýše 50 µg/g; atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* Použije se zkoušený roztok připravený ve zkoušce Železo.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se podle potřeby zředěním základního roztoku zinku (100 µg Zn/ml) roztokem *kyseliny dusičné R 1% (V/V)*.

*Zdroj záření.* Zinková lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 213,9 nm.

*Plamen.* Vzduch-acetylen.

## STANOVENÍ OBSAHU

0,100 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné R* a zahřívá se do vymizení dusíkatých dýmů. Přidá se 200 ml *vody R* a neutralizuje se (2.2.3) *amoniakem zředěným RSI*. Přidá se 1 g *chloridu amonného R* a 3 mg *murexidu R* a titruje se *dinatrium-edetátem 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení ze zeleného na fialové.

1 ml *dinatrium-edetátu 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,354 mg Cu.

FERRUM AD PRAEPARATA  
HOMEOPATHICA

7.0:2026

## Železo pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Ferrum ad praeparationes homeopathicas

Fe A<sub>r</sub> 55,85 CAS 7439-89-6

## DEFINICE

Získává se redukcí nebo sublimací jako jemný černošedý prášek.

*Obsah.* 97,5 % až 101,0 % Fe.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Jemný černošedý prášek bez kovového lesku.

*Rozpustnost.* Prakticky nerozpustný ve vodě a v ethanolu 96%. Rozpouští se zahřátím ve zředěných minerálních kyselinách.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

50 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na železo (2.3.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** K 10,0 g se přidá 40 ml *vody R*. Směs se vaří 1 min, potom se ochladí, zfiltruje a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

**Zásaditě reagující látky.** K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RSI*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

**Látky nerozpustné v kyselině chlorovodíkové.** 2,00 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Zahřívá se na vodní lázni, dokud se nepřestanou vyvíjet dýmy. Směs se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16) (2.1.2) a promyje se *vodou R*. Zbytek se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 20 mg (1,0 %).

**Látky rozpustné ve vodě.** 10,0 ml roztoku S se odpaří do sucha na vodní lázni a potom se suší 1 h při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 2 mg (0,1 %).

**Chloridy (2.4.4).** Nejvýše 50 µg/g; 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy.

**Sulfidy a fosfidy.** 1,0 g se opatrně promíchá v 100ml kuželové baňce s 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. *Papír s octanem olovnatým R* navlhčený *vodou R* a umístěný v ústí baňky se vznikajícími parami nezbarví do 30 s intenzivněji než světle hnědě.

**Arsen (2.4.2).** Nejvýše 5 µg/g; 0,2 g se vaří s 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do úplného rozpuštění. Roztok vyhovuje limitní zkoušce A.

**Měď.** Nejvýše 50 µg/g; atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, *Metoda I*).

*Zkoušený roztok.* 1,00 g se rozpustí ve směsi 60 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 10 ml *peroxidu vodíku zředě-*

*ného RS.* Objem se zmenší na 5 ml a zředí se vodou R na 50,0 ml.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se podle potřeby zředěním základního roztoku mědi (1 mg Cu/ml) roztokem kyseliny chlorovodíkové R 1% (V/V).

*Zdroj záření.* Měděná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 324,8 nm.

*Plamen.* Vzduch-acetylen.

**Olovo.** Nejvýše 50 µg/g; atomová absorpční spektrometrie (2.2.23, Metoda I).

*Zkoušený roztok.* 20 ml zkoušeného roztoku připraveného pro stanovení mědi se umístí do dělicí nálevky, přidá se 25 ml kyseliny chlorovodíkové prosté olova R a protřepe se třikrát s 25 ml diisopropyletheru R. Vodné vrstvy se spojí. Přidá se 0,10 g síranu sodného dekahydrátu R a odpaří se do sucha. Zbytek se převede do 1 ml kyseliny dusičné prosté olova R a zředí se vodou R na 20 ml.

*Porovnávací roztoky.* Připraví se podle potřeby zředěním základního roztoku olova (1 mg Pb/ml) roztokem kyseliny dusičné R 10% (V/V) obsahujícím síran sodný dekahydrát R (5 g/l).

*Zdroj záření.* Olověná lampa s dutou katodou.

*Vlnová délka.* 217 nm.

*Plamen.* Vzduch-acetylen.

#### STANOVENÍ OBSAHU

0,100 g se míchá ve 100ml kuželové baňce se zabroušenou skleněnou zátkou 10 min v horkém roztoku obsahujícím 1,25 g síranu měďnatého R ve 20 ml vody R. Rychle se zfiltruje a filtr se promyje. Filtrát a promývací tekutina se spojí a okyslí se kyselinou sírovou zředěnou RS a titruje se manganistanem draselným 0,02 mol/l VS do růžového zbarvení.

1 ml manganistanu draselného 0,02 mol/l VS odpovídá 5,585 mg Fe.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede, zda byla látka získána redukcí nebo sublimací.

## HEDERA HELIX AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.8:2092

Břečťan popínavý pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Hedera helix ad praeparationes homoeopathicas

#### DEFINICE

Jsou to čerstvé mladé úplně vyvinuté, ne však zdřevnatělé větve druhu *Hedera helix* L., sbírané těsně před rozkvetem nebo na začátku květu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Čerstvé mladé větve druhu *Hedera helix* L. jsou tenké, ohebné, pnoucí; podložky se přichytávají přísavnými kořínky. Listy jsou střídavé, jednoduché, řapíkaté. Řapík je na příčném řezu válcovitý. Listy jsou na svrchní straně lysé,

lesklé, tmavší než na spodní straně. Čepel listů na nekvetoucích větvích je obvykle dlaniťe trojlaločná až pětialočná; na kvetoucích větvích je konikovitá až široce kopinatá, na konci špičatá. Květenství je uspořádáno do polokulovitých okolíků skládajících koncový hrozen. Květní stopky jsou bíle chlupaté. Květy jsou pětičetné, kališní lístky v podobě krátkých zoubků, korunní lístky jsou pokryty velmi malými nazpět obrácenými chlupy.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %, jestliže to vyžaduje oprávněná autorita.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejméně 50 %, jestliže to vyžaduje oprávněná autorita; 5,0 g jemně řezané drogy se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

#### Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

#### VÝROBA

Vyrábí se z druhu *Hedera helix* L. macerací ethanolem vhodné koncentrace.

*Obsah.* Nejméně 0,15 % hederakosidu C (C<sub>59</sub>H<sub>96</sub>O<sub>26</sub>; M<sub>r</sub> 1221).

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Tmavá zelenohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Matečná tinktura.

*Porovnávací roztok.* 1 mg α-hederinu R a 1 mg hederakosidu C R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 2 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, vody R a butan-1-olu R (1 + 1 + 4).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze odpovídající polovině desky.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem kyseliny sírové R 10% (V/V) v methanolu R a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny.

Horní okraj desky	
α-hederin: fialová skvrna hederakosid C: hnědá skvrna	fialová skvrna (α-hederin) hnědá skvrna (hederakosid C)
	šedohnědá skvrna žlutá skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,890 až 0,925.

**Ethanol** (2.9.10). 60 % (V/V) až 70 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 2,0 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* 3,000 g zkoušené matečné tinktury se ve 20ml odměrné baňce zředí mobilní fází na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok.* 20,0 mg *hederakosidu C R* se v 50ml odměrné baňce rozpustí v mobilní fází a zředí se jí na 50,0 ml.

*Kolona:*

– *rozměry:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm;

– *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm).

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *vody R*, jejíž pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3 a *methanolu R* (35 + 65).

*Průtoková rychlost.* 1 ml/min.

*Detekce.* Spektrofotometrický detektor, 205 nm.

*Nástrik.* 20 µl.

*Retenční čas.* Hederakosid C asi 8 min.

Obsah *hederakosidu C* v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot C \cdot 0,4}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – plochu píku *hederakosidu C* na chromatogramu zkoušeného roztoku;

$A_2$  – plochu píku *hederakosidu C* na chromatogramu porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost matečné tinktury ve zkoušeném roztoku v gamech;

$m_2$  – hmotnost *hederakosidu C R* v porovnávacím roztoku v gamech;

$C$  – obsah *hederakosidu C R* v procentech.

## HYDRASTIS CANADENSIS AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.3:2500

Vodilka kanadská pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Hydrastis canadensis ad praeparationes homoeopathicas

Vyhovuje požadavkům článku *Hydrastidis radix* (1830).

## MATEČNÁ TINKTURA

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

## DEFINICE

Vyrábí se z celého nebo řezaného usušeného oddenku a kořenů druhu *Hydrastis canadensis* L.

*Obsah:*

– *hydrastin* (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>; M<sub>r</sub> 383,4): 0,10 % až 0,40 %;

– *berberin* (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 336,4): 0,20 % až 0,50 %.

## VÝROBA

Vyrábí se jednou z následujících metod popsanych v článku *Via praeparandi stirpes homeopathicas et potentificandi* (2371):

– metoda 1.1.8, za použití práškované rostlinné drogy (710) (2.9.12) a ethanolu 70% (V/V) (nebo ethanolu 62%);

– metoda 1.1.10, z rozlámané rostlinné drogy (o průměru kousků asi 1 cm) a ethanolu 65% (V/V) macerací po dobu 3 až 5 týdnů.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutohnědá tekutina.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkvrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená matečná tinktura.

*Porovnávací roztok.* Těsně před použitím se rozpustí 5 mg *hydrastin-hydrochloridu R* a 5 mg *berberinium-chloridu R* v 10 ml *methanolu R*.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (5 µm až 40 µm) [nebo deska s vrstvou silikagelu pro TLC R (2 µm až 10 µm)].

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethyl-acetátu R* (10 + 10 + 80).

*Nanášení.* 20 µl [nebo 5 µl], do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm [nebo 6 cm].

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě fluoreskující skvrny.

Horní okraj desky	
berberin: jasně žlutě fluoreskující skvrna	jasně žlutě fluoreskující skvrna (berberin)
hydrastin: tmavě modře fluoreskující skvrna	tmavě modře fluoreskující skvrna (hydrastin)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,890 až 0,905, pokud se použije metoda 1.1.8.

**Ethanol** (2.9.10). 60 % (V/V) až 70 % (V/V), pokud se použije metoda 1.1.10.

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 1,2 %.

## STANOVENÍ OBSAHU

Kapalinová chromatografie (2.2.29).

*Zkoušený roztok.* Asi 1,000 g přesně zvážené zkoušené matečné tinktury se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

*Porovnávací roztok.* Těsně před použitím se rozpustí 10,0 mg *hydrastin-hydrochloridu CRL* a 10,0 mg *berberi-*

*nium-chloridu CRL* v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

**Kolona:**

- **rozměry:** délka 0,125 m, vnitřní průměr 4 mm;
- **stacionární fáze:** silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (5 μm).

**Mobilní fáze.** 9,93 g dihydrogenfosforečnanu draselného R se rozpustí v 730 ml vody R, přidá se 270 ml acetonitrilu R a promíchá se.

**Průtoková rychlost.** 1,2 ml/min.

**Detekce.** Spektrofotometrický detektor, 235 nm.

**Nástřik.** 10 μl.

**Eluční pořadí.** Hydrastin, berberin.

**Identifikace píků.** K identifikaci píků hydrastinu a berberinu se použije chromatogram porovnávacího roztoku.

**Test způsobilosti,** porovnávací roztok:

- **rozlišení:** nejméně 1,5 mezi píkem hydrastinu a píkem berberinu.

Obsah hydrastinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5} \cdot 0,913,$$

obsah berberinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot p}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5} \cdot 0,905,$$

v nichž značí:

- $A_1$  – plochu píku hydrastinu nebo berberinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- $A_2$  – plochu píku hydrastinu nebo berberinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- $m_1$  – hmotnost zkoušené matečné tinktury použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech;
- $m_2$  – hmotnost *hydrastin-hydrochloridu CRL* nebo hmotnost *berberinium-chloridu CRL* použitá k přípravě porovnávacího roztoku v gramech;
- $p$  – obsah *hydrastin-hydrochloridu CRL* nebo obsah *berberinium-chloridu CRL* v procentech.

## HYOSCYAMUS NIGER AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2091

Blín černý pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Hyoscyamus niger ad praeparationes homoeopathicas

### DEFINICE

Je to celá čerstvá kvetoucí rostlina druhu *Hyoscyamus niger* L.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Blín je jednoletá nebo dvouletá rostlina s dobře vyvinutým hlavním kořenem. Mohutná přímá lodyha je dutá, téměř

oblá a až 80 cm dlouhá. Měkké lepkavě žláznaté matně tmavozelené listy jsou na obou stranách, zejména na žilnatině, vlnatě chlupaté. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté, lodyžní listy jsou v dolní části téměř objímavé, v horní části lodyhy objímavé. Čepel listu je až 25 cm dlouhá, v obrysu oválná až vejčitá, chobotnatě peřeně zubatá, se dvěma až pěti páry špičatých laloků. Střední žilka je dobře vyvinutá. Postranní žilky vyběhají z hlavní žilky pod širokým úhlem a končí ve špičkách laloků listu. Koncová květenství jsou hustě chlupatá, tvoří krátké vijany. Každý květ vyrůstá v úžlabí velkého listenu. Srostloplátečný kalich je vlnatě chlupatý, s pěti trojúhelníkovitými, pichlavě špičatými cípy. Srostloplátečná koruna s pěti téměř stejnými zaokrouhlenými cípy, je nažloutlá s jemnou hnědou až černofialovou žilnatinou. Plod, který je někdy přítomný v bazální části květenství, je na bázi rozšířený, břichatý.

### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsí (2.8.2).** Nejvýše 5 %, jestliže to vyžaduje oprávněná autorita.

**Ztráta sušením (2.2.32).** Nejméně 50,0 %, jestliže to vyžaduje oprávněná autorita; 5,0 g jemně řezané drogy se suší 2 h v sušárně při až 105 °C.

**Hyoscyamus albus L.** Droga neobsahuje listy ve střední a horní části lodyhy řapíkaté a soudečkovité, na bázi nafouklé plody.

### Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

### VÝROBA

Vyrábí se z druhu *Hyoscyamus niger* L. macerací ethanolem vhodné koncentrace.

**Obsah.** 0,002 % až 0,01 % celkových alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ;  $M_r$  289,4).

### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Tmavá zelenohnědá tekutina.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

**Zkoušený roztok.** 10 ml matečné tinktury se odpaří ve vodní lázni při 40 °C za sníženého tlaku. Zbytek se převede do 1 ml *amoniaku 17,5% RS* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Tekutina se odpaří na vodní lázni a zbytek se rozpustí v 0,50 ml *methanolu R*.

**Porovnávací roztok (a).** 50 mg *hyoscyamin-sulfátu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R* (roztok A). 15 mg *skopola-min-hydrobromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R* (roztok B). Smíchají se 4 ml roztoku A a 2 ml roztoku B a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

**Porovnávací roztok (b).** 20 mg *atropin-sulfátu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

**Stacionární fáze.** Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

**Mobilní fáze.** Směs objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90).

**Nanášení.** 20 μl, do proužků.

*Vývijení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 15 min při 100 °C až 105 °C.

*Detekce A.* Postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS* dokud se neobjeví oranžové skvrny. Pozoruje se v denním světle.

Horní okraj desky		
skopolamin: oranžová skvrna		oranžová skvrna (skopolamin)
hyoscyamin: oranžová skvrna	atropin: oranžová skvrna	oranžová skvrna (hyoscyamin/atropin)
		slabě zbarvená oranžová skvrna (start)
<b>Porovnávací roztok (a)</b>	<b>Porovnávací roztok (b)</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

*Detekce B.* Vrstva se následně postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby zmizela žlutá barva pozadí. Pozoruje se po 15 min v denním světle.

*Hodnocení B.* Viz zkouška na čistotu Atropin.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,930 až 0,960.

**Atropin.** Hodnotí se chromatogramy získané ve Zkouškách totožnosti.

*Hodnocení.* Zbarvení skvrny hyoscyaminu na chromatogramu zkoušeného roztoku se změní z oranžového na červenohnědé, ale nikoliv na šedomodré (atropin).

**Ethanol** (2.9.10). 40 % (V/V) až 50 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 1,2 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

100,0 g matečné tinktury se odpaří za sníženého tlaku při nízké teplotě do konečného objemu asi 10 g. Zbytek se kvantitativně převede do dělicí nálevky několika mililitry *ethanolu 70 % (V/V) R*. Přidá se 5 ml *amoniaku 26% R* a 25 ml *vody R*. Extrahuje se směsí objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3), dokud organická vrstva reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů poslední organické vrstvy se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetraiodotruťnatanem draselným RS*. Spojené organické vrstvy se protřepávají několikrát *kyselinou sírovou 0,25 mol/l RS*. Je-li třeba, oddělí se vrstvy odstředěním. Spojené kyselé vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se nejméně třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým vrstvám se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a směs se nechá stát 30 min za občasného protřepání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se odpaří na vodní lázni do

*Hodnocení A.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacích roztoků a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další slabě zbarvené skvrny.

sucha, odparek se zahřívá 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 10,0 ml *kyseliny sírové 0,005 mol/l VS* a chloroform se odstraní odpařením na vodní lázni. Přidá se *červeně methylová směsný indikátor RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,01 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{0,2894 \cdot (10 - n)}{m}$$

v němž značí:

*n* – spotřebu *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* v mililitrech;

*m* – hmotnost matečné tinktury v gramech.

## HYPERICUM PERFORATUM AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2028

Třezalka tečkovaná pro homeopatické účely

*Synonymum.* Hypericum perforatum ad praeparationes homoeopathicas

#### DEFINICE

Je to celá čerstvá rostlina druhu *Hypericum perforatum L.* na začátku květu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Vytrvalá rostlina s vřetenovitým kořenem a větveným oddenkem, z něhož vyrůstají četné dlouhé horizontální výběžky. Lodyha je válcovitá, přímá, na bázi dřevnatá, 0,2 m až 1 m vysoká, v horní části větvená, se dvěma podélnými lištami.

Listy jsou vstřícné, vejčité oválné, přisedlé, 15 mm až 30 mm dlouhé, celokrajné, bez palistů. Na okrajích listů jsou černé, žláznaté tečky, čepel s četnými malými olejovými nádržkami je prosvítavě tečkovaná.

Květy jsou pětičetné, pravidelné, uspořádané v koncovém širokém vrcholíku vidlanů. Kališní lístky jsou zelené, s ušty kopinatými, na okrajích s černými olejovitými žlázkami, korunní lístky oranžově žluté, zřetelně delší než lístky kališní, jen na okrajích s černými olejovitými žlázkami, četné oranžově žluté tyčinky uspořádané ve třech svazečcích. Semeník je třípouzdrý, blizna trojčetná, červená.

Korunní lístky jsou asymetricky lineárně vejčité s jedním okrajem celokrajným a druhým zubatým.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 4 % plodů a nejvýše 1 % jiných cizích příměsí.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Slouží k důkazu čerstvosti drogy; nejméně 55 %. 5,0 g jemně řezané drogy se suší v sušárně při 105 °C.

### Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

#### VÝROBA

Vyrábí se z druhu *Hypericum perforatum* L. macerací ethanolem vhodné koncentrace.

#### VLASTNOSTI

Tmavě červená až hnědočervená tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Matečná tinktura.

*Porovnávací roztok.* 5 mg rutinu R, 1 mg hypericinu R a 5 mg hyperosidu R se rozpustí v methanolu R a zředí se jím na 5 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou silikagelu pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R a ethyl-acetátu R (6 + 9 + 90).

*Nanášení.* 10 µl zkoušeného roztoku, 5 µl porovnávacího roztoku; do proužků (10 mm).

*Vývíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* 10 min při 100 °C až 105 °C.

*Detekce.* Postříká se roztokem difenylboryloxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak roztokem makrogolu 400 R (50 g/l) v methanolu R. Po 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být skvrna rutinu slabě zbarvena nebo může úplně chybět. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skupina modrých nebo žlutých skvrn s  $R_F$  podobným skvrně hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Horní okraj desky	
hypericin: červená skvrna	žlutá až modrá skvrna dvě červené skvrny
_____	_____
_____	několik skvrn
_____	_____
hyperosid: žlutá až oranžová skvrna	modré nebo žluté skvrny
rutin: žlutá až oranžová skvrna	žlutá až oranžová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,900 až 0,920.

**Ethanol** (2.9.10). 60 % (V/V) až 75 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 1,3 %.

## KALII DICHROMAS AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.1:2501

### Dichroman draselný pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Kalii bichromas ad praeparationes homoeopathicas

$K_2Cr_2O_7$

$M_r$  294,21

CAS 7778-50-9

#### DEFINICE

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 % sloučeniny  $K_2Cr_2O_7$ .

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Oranžové krystaly.

*Rozpustnost.* Snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Vyhovuje zkoušce (b) na draslík (2.3.1).

**B.** 10 mg se rozpustí v 5 ml vody R, přidá se 0,25 g kyseliny sírové zředěné RS, 0,5 ml peroxidu vodíku koncentrovaného R a 1 ml etheru R. Po protřepání je horní vrstva modrá.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S1.** 5,0 g se rozpustí ve vodě destilované R a zředí se jí na 50,0 ml.

**Roztok S2.** Ke 20,0 ml roztoku S1 se přidá 20 ml kyseliny chlorovodíkové R a 50 ml tributyl-fosfátu R. 2 min se třepe. Dolní vrstva se oddělí a protřepe se 10 ml etheru R. Dolní vrstva se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek po odpaření se rozpustí v 10 ml vody destilované R, přidává se amoniak zředěný R1 do neutrální reakce na lakmusový papír modrý R a zředí se vodou destilovanou R na 20,0 ml.

**Vzhled roztoku.** Roztok S1 je čirý (2.2.1).

**Vápník** (2.4.3). Nejvýše 500 µg/g; 2,0 ml roztoku S2 se zředí vodou destilovanou R na 15 ml.

**Chloridy** (2.4.4). Nejvýše 50 µg/g; 1,0 g se rozpustí v 15 ml kyseliny dusičné zředěné RS. Použije se 1 ml kyseliny dusičné R místo předepsané kyseliny dusičné zředěné RS.

**Sírany** (2.4.13). Nejvýše 150 µg/g; 10 ml roztoku S2 se zředí vodou destilovanou R na 15 ml.

#### STANOVENÍ OBSAHU

0,100 g se rozpustí ve 25 ml vody R, přidají se 2 g jodidu draselného RS a 25 ml kyseliny sírové R. Nechá se 10 min stát v temnu. Přidá se 150 ml vody R a titruje se thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS do změny modrého zbarvení na zelené. Krátce před koncem titrace se přidá 1 ml škrobu RS.

1 ml thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS odpovídá 4,903 mg  $K_2Cr_2O_7$ .



**NATRII TETRACHLOROHAURAS  
DIHYDRICUS AD PRAEPARATA  
HOMEOPATHICA**

7.1:2141

Tetrachlorozlatitan sodný dihydrát pro  
homeopatické přípravky

*Synonymum.* Natrii tetrachloroauras dihydricus ad  
praeparationes homoeopathicas

Na[AuCl<sub>4</sub>].2H<sub>2</sub>O      M<sub>r</sub> 397,80

## DEFINICE

Je to dihydrát tetrachlorozlatitanu sodného.

*Obsah.* 97,0 % až 101,0 % sloučeniny Na[AuCl<sub>4</sub>].2H<sub>2</sub>O.

## VLASTNOSTI

*Vzhled.* Oranžovožlutý hygroskopický prášek nebo krystaly.  
*Rozpustnost.* Velmi snadno rozpustný nebo snadno rozpustný ve vodě a ethanolu 96%.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** 20 mg se rozpustí ve 2,0 ml *kyseliny dusičné* 0,1 mol/l RS, přidá se 0,1 g *kyseliny šťavelové* R a vaří se 1 h na vodní lázni; vznikne usazenina kovového zlata.
- B.** Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (2.3.1).
- C.** Roztok S vyhovuje zkoušce (b) na sodík (2.3.1).

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 0,20 g se v porcelánovém kelímku žihá 30 min při (600 ± 50) °C. Nechá se ochladit a extrahuje se 3 ml *vody* R, je-li třeba zahřátím. Vzniklá supernatantní tekutina se použije ke zkoušce.

**Volná kyselina chlorovodíková.** Pokud se skleněná tyčinka předem namočená v *amoniaku* 26% R podrží v blízkosti zkoušené látky, netvoří se bílé dýmy.

**Dusičnany.** Nejvýše 200 µg/g; 0,20 g se rozpustí v 10 ml *vody prosté dusičnanů* R, přidají se 0,2 g *kyseliny šťavelové* R a tento roztok se zahřívá 30 min na vodní lázni, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje *vodou prostou dusičnanů* R a filtrát se zředí stejným rozpouštědlem na 20 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *vody prosté dusičnanů* R, 0,4 ml roztoku *chloridu draselného* R (100 g/l), 0,1 ml *difenylaminu* RS a po kapkách za třepání 5 ml *kyseliny sírové prosté dusíku* R. Zkumavka se vloží do vodní lázně 50 °C teplé, po 15 min není modré zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku přípraveného současně stejným způsobem za použití směsi 0,2 ml *základního roztoku dusičnanů* (10 µg NO<sub>3</sub>/ml) a 4,8 ml *vody prosté dusičnanů* R.

**Těžké kovy** (2.4.8). Nejvýše 100 µg/g; 0,20 g se rozpustí v 15 ml *vody*, přidá se 0,25 g *hydrazinsulfátu* R. Roztok se 30 min zahřívá na vodní lázni, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje *vodou* R a filtrát se zředí stejným rozpouštědlem na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce A. K přípravě porovnávacího roztoku se použije *základní roztok olova* (1 µg Pb/ml).

## STANOVENÍ OBSAHU

40,0 mg se rozpustí v 10 ml *jodidu draselného* RS. Nechá se 5 min stát a titruje se *thiosíranem sodným* 0,01 mol/l VS do odbarvení. Krátce před koncem titrace se přidá 0,5 ml *škrobu* RS.

1 ml *thiosíranu sodného* 0,01 mol/l VS odpovídá 1,989 mg Na[AuCl<sub>4</sub>].2H<sub>2</sub>O.

## SKLADOVÁNÍ

Ve vzduchotěsném obalu, chráněn před světlem.

**SEMECARPUS ANACARDIUM AD  
PRAEPARATA HOMEOPATHICA**

6.0:2094

Ledvinovník západní pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Semecarpus anacardium ad praeparationes  
homoeopathicas

## DEFINICE

Je to usušený plod druhu *Semecarpus anacardium* L.  
(*Anacardium orientale* L.).

*Obsah.* Nejméně 6,0 % celkových fenolových derivátů, vyjádřeno jako eugenol (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>; M<sub>r</sub> 164,2), počítáno na vysušenou drogu.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Usušený plod je oválný, víceméně srdčitý, asi 2 cm dlouhý, téměř 2 cm široký a 0,5 cm silný, na povrchu je hladký, lesklý a načernalý. Na příčném řezu je patrné dobře vyvinuté tuhé síťovité oplodí s širokými nádržkami obsahujícími hojnost husté červenohnědé šťavy. Oplodí kryje bílé rohovité jádro s načervenalou pokožkou. Součástí plodu může být načernalé masité ryhované čiškovité lůžko.

- B.** Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* 1,0 g vhodně řezané drogy se smíchá s 10 ml *ethanolu* 90% (V/V) R a zahřívá se 15 min na vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se.

*Porovnávací roztok.* 5 mg *kyseliny gallové* R a 5 mg *kyseliny kávové* R se rozpustí v *methanolu* R a zředí se jím na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu* pro TLC R.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *methanolu* R a *toluenu* R (15 + 85).

*Nanášení.* 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 15 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Vrstva se postříká roztokem obsahujícím *difenylboryloxyethylamin* R (10 g/l) a *makrogol* 400 R (50 g/l) v *methanolu* R. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvm na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně intenzivní skvrny.

Horní okraj desky	
	zelenomodře fluoreskující skvrna
	několik fialovomodře fluoreskujících skvrn žlutě fluoreskující skvrna
kyselina kávová: fialovomodře fluoreskující skvrna	
kyselina gallová: fialovomodře fluoreskující skvrna	fialovomodře fluoreskující skvrna (kyselina gallová)
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Anacardium occidentale L.** Nejsou přítomny plody druhu *Anacardium occidentale L.*, které jsou až 35 mm dlouhé, 30 mm široké, 20 mm silné, světle hnědé a zřetelně ledvinité. Oplodí je hladké nebo lehce svraštělé, místy tmavě mramorované.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g jemně rozdrobněné drogy se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

**Celkový popel** (2.4.16). Nejvýše 5,0 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Celkové fenolové deriváty.** Absorpční spektrofotometrie (2.2.25).

**Základní roztok.** 4,500 g rozdrobněné drogy se v baňce smíchá s 200 ml *ethanolu 90% (V/V) R* a vaří se 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Baňka se ochladí a obsah se kvantitativně převede do odměrné baňky a zředí se *ethanolem 90% (V/V) R* na 250,0 ml. Zfiltruje se přes papírový filtr o průměru 125 mm a prvních 50 ml filtrátu se odstraní. 5,0 ml filtrátu se zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 50,0 ml a protřepe se. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 10,0 ml a protřepe se.

**Zkoušený roztok.** 2,0 ml základního roztoku se smíchají s 1,0 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a 10 ml *vody R*, promíchá se a zředí se roztokem *uhlíčitany sodného R* (290 g/l) na 25,0 ml. Přesně po 3 min se tekutina zfiltruje přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) a prvních 5 ml filtrátu se odstraní.

**Porovnávací roztok.** 80,0 mg *eugenolu R* se rozpustí v *ethanolu 90% (V/V) R* a zředí se jím na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a 10 ml *vody R*, promíchá se a zředí se roztokem *uhlíčitany sodného R* (290 g/l) na 25,0 ml. Přesně po 3 min se tekutina zfiltruje přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) a prvních 5 ml filtrátu se odstraní.

Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku při 755 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah celkových fenolových derivátů v procentech, vyjádřeno jako eugenol, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 400}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

$A_1$  – absorbancí zkoušeného roztoku;

$A_2$  – absorbancí porovnávacího roztoku;

$m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v miligramech;

$m_2$  – hmotnost eugenolu v porovnávacím roztoku v miligramech.

#### Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

#### VÝROBA

Z usušeného plodu druhu *Semecarpus anacardium L.* (*Anacardium orientale L.*) macerací ethanolem vhodné koncentrace.

**Obsah.** 0,5 % až 1,0 % celkových fenolových derivátů, vyjádřeno jako eugenol.

#### VLASTNOSTI

**Vzhled.** Žlutohnědá nebo červenohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) postupem uvedeným ve Zkoušce totožnosti B rostlinné drogy s následujícími úpravami.

**Zkoušený roztok.** Matečná tinktura.

**Hodnocení.** Viz Zkoušku totožnosti B u rostlinné drogy.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,815 až 0,845.

**Ethanol** (2.9.10). 85 % (V/V) až 95 % (V/V).

**Zbytek po odpaření** (2.8.16). Nejméně 1,50 %.

#### STANOVENÍ OBSAHU

**Celkové fenolové deriváty.** Absorpční spektrofotometrie (2.2.25) postupem uvedeným ve zkoušce Stanovení obsahu u rostlinné drogy s následujícími úpravami.

**Základní roztok.** 8,000 g matečné tinktury se v odměrné baňce zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 20,0 ml.

**Zkoušený roztok.** 2,0 ml základního roztoku se smíchají s 1,0 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a 10 ml *vody R*, promíchá se a zředí se roztokem *uhlíčitany sodného R* (290 g/l) na 25,0 ml. Přesně po 3 min se tekutina zfiltruje přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) a prvních 5 ml filtrátu se odstraní.

**Porovnávací roztok.** 80,0 mg *eugenolu R* se smíchá s *ethanolem 90% (V/V) R* a zředí se jím na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem 90% (V/V) R* na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a 10 ml *vody R*, promíchá se a zředí

se roztokem *uhličitanu sodného R* (290 g/l) na 25,0 ml. Přesně po 3 min se tekutina zfiltruje přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) a prvních 5 ml filtrátu se odstraní. Po 30 min se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku při 755 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah celkových fenolových derivátů v procentech, vyjádřeno jako eugenol, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 80}{A_2 \cdot m_1}$$

v němž značí:

- $A_1$  – absorbanci zkoušeného roztoku;  
 $A_2$  – absorbanci porovnávacího roztoku;  
 $m_1$  – hmotnost zkoušené drogy v miligramech;  
 $m_2$  – hmotnost eugenolu v porovnávacím roztoku v miligramech.

## SULFUR AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

7.1:2515

### Síra pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Sulfur ad praeparationes homeopathicas

S  $A_r$  32,07 CAS 7704-34-9

#### DEFINICE

Získává se sublimací.

*Obsah.* 99,0 % až 101,0 %.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Žlutý prášek.

*Rozpustnost.* Prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v sirouhlíku, těžce rozpustná v rostlinných olejích.

*Teplota tání.* Asi 120 °C.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Zahřívána za přítomnosti vzduchu hoří modrým plamenem za vzniku oxidu siřičitého, který barví navlhčený papír *lakmusový modrý R* červeně.
- B.** 0,1 g se zahřívá s 0,5 ml *bromové vody R* do odbarvení. Přidá se 5 ml *vody R* a zfiltruje se. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na síranu (2.3.1).

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** K 5,0 g se přidá 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R*. Nechá se 30 min stát za častého protřepávání a zfiltruje se.

**Vzhled roztoku.** Roztok S je bezbarvý (2.2.2, *Metoda II*).

**Pach** (2.3.4). Zkoušená látka není cítit po sirovodíku.

**Kysele nebo zásaditě reagující látky.** K 5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RSI*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je červený. Přidá se 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,15 ml *červeně methylové RS*; roztok je oranžovočervený.

**Chloridy** (2.4.4). Nejvýše 100 µg/g; 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml.

**Sírany** (2.4.13). Nejvýše 100 µg/g; stanoví se s roztokem S.

**Sulfidy.** K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dusičnanu olovnatého R* (1,6 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a protřepe se. Po 1 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku současně připraveného za použití 1 ml základního roztoku *olova* (10 µg Pb/ml), 9 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R*.

**Arsen** (2.4.2, *Metoda B*). Nejvýše 8 µg/g; 2,5 g se 1 h protřepává s 50 ml *amoniaku zředěného RSI* a zfiltruje se, 25 ml filtrátu se odpaří do sucha. Ke zbytku po odpaření se přidají 2 ml *vody R* a 3 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se do sucha. Zbytek po odpaření vyhovuje zkoušce.

K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního roztoku *arsenu* (10 µg As/ml).

**Síranový popel** (2.4.14). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

#### STANOVENÍ OBSAHU

Provede se spalování organických látek v kyslíku (2.5.10) v 1000ml spalovací baňce s teflonovým páskem za použití 60,0 mg zkoušené látky. Spalné produkty se absorbují ve směsi 5 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* a 10 ml *vody R*; zahřeje se k varu, opatrně se 2 min vaří a ochladí se. Přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení z bezbarvého do červeného. Provede se slepá zkouška za stejných podmínek.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 1,603 mg S.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněna před světlem.

## URTICA DIOICA AD PRAEPARATA HOMEOPATHICA

6.0:2030

### Kopřiva dvoudomá pro homeopatické přípravky

*Synonymum.* Urtica dioica ad praeparationes homoeopathicas

#### DEFINICE

Je to celá čerstvá kvetoucí rostlina druhu *Urtica dioica* L.

#### VLASTNOSTI

Rostlina vyvolává na kůži pocit palčivosti a svědění.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Je to vytrvalá rostlina. Niťovitý kořen vybíhá v plazivé podzemní oddenky, na průřezu více méně čtyřhranné; z oddenků vyrůstají adventivní sekundární kořeny a četné nahnědlé vlasové kořínky. Lodyha je přímá, nevětvená, o průměru 3 mm až 5 mm, je 0,3 m až 1,5 m,

zřídka až 2,5 m vysoká, čtyřhranná, šedozelená, krytá krátkými štětinovitými a žahavými chlupy.

Listy jsou křížmostojné, 30 mm až 150 mm dlouhé a 20 mm až 80 mm široké. Řapík je štětinatý, obvykle o něco málo kratší než třetina délky čepele. Čepel je vejčitá nebo kopinatá, na bázi srdčitá nebo okrouhlá, hrubě zubatá. Koncový zub je zřetelně větší než zuby postranní. Svrchní strana listu je tmavě zelená, obvykle matná; na obou stranách listu jsou husté krátké chlupy spolu s dlouhými žahavými chlupy. Dva palisty jsou volné, čárkovitě šídlovité. Složitá květenství vyrůstají z paždí listu, květy jsou jednopohlavné, jednodomé nebo dvoudomé; květenství je výrazně delší než řapík. Po ztrátě pylu jsou prašníková květenství vztyčena v šikmém úhlu nebo jsou vodorovná; pestíková květenství jsou po odkvětu nicí. Všechny květy mají dlouhé stopky. Okvěti prašníkových květů je rozděleno do poloviny délky do dvou stejných zelených cípů, na bázi širších, na okraji s krátkými štětinovitými a žahavými chlupy. Tyčinky jsou stejné, zákorunní, každá tyčinka má dlouhou, bělavou nitku, nejprve obloukovitě dovnitř zakřivenou, později ven vyčnívající. Semeniky jsou rudimentární, knoflíkovitého nebo miskovitého tvaru. Okvěti pestíkových květů je na vnější straně chmýřité nebo štětínovité a skládá se ze dvou vnějších a dvou vnitřních segmentů; vnitřní segmenty jsou asi dvakrát delší než vnitřní. Svrchní vejčitý semeník nese velkou hlavičkovitou bliznu s kartáčkem štětínovitých chlupů. Jednosemenný plod je v době zralosti obalen dvěma zveličelými vnitřními segmenty okvěti, která mají podobu křidel (křídlovitá nažka).

**B.** Zkouška *Urtica urens* (viz Zkoušky na čistotu) je zároveň zkouškou totožnosti.

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Urtica urens.** Okraj čepele listu není pilovitý, se zuby dvakrát tak dlouhými než širokými. Klubičkovitá květenství v paždí listu jsou delší než řapík listu. Jednopohlavné, jednodomé, bezkorunné květy nevyrostají společně na téže rostlině a v tomtéž květenství.

**Cizí příměsi** (2.8.2). Nejvýše 5 %.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejméně 65,0 %; 5,0 g jemně řezané drogy se suší 2 h v sušárně při 105 °C, jako důkaz čerstvosti drogy.

#### Matečná tinktura

Vyhovuje požadavkům článku *Tincturae maternae ad praeparata homeopathica* (2029).

#### VÝROBA

Vyrábí se z druhu *Urtica dioica* L. macerací ethanolom vhodné koncentrace.

#### VLASTNOSTI

*Vzhled.* Zelenohnědá nebo oranžovohnědá tekutina.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Tenkvrstvá chromatografie (2.2.27).

*Zkoušený roztok.* Zkoušená matečná tinktura.

*Porovnávací roztok.* 10 mg *fenylalaninu R* a 10 mg *serinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

*Stacionární fáze.* Deska s vrstvou *silikagelu pro TLC R*.

*Mobilní fáze.* Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *acetonu R* a *butan-1-olu R* (10 + 20 + 35 + 35).

*Nanášení.* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení.* Po dráze 10 cm.

*Sušení.* Na vzduchu.

*Detekce.* Postříká se roztokem *ninhydrinu R* (1g /l) v *ethanolu 96% R*, deska se zahřívá 5 min až 10 min při 105 °C až 110 °C a pozoruje se do 10 min v denním světle.

*Hodnocení.* Viz dále uvedené pořadí skvrn na chromatogramech porovnávacího a zkoušeného roztoku.

Horní okraj desky	
fenylalanin: fialová až červenohnědá skvrna	čtyři červené až fialové skvrny
serin: červenofialová skvrna	fialová skvrna fialová skvrna
<b>Porovnávací roztok</b>	<b>Zkoušený roztok</b>

#### ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Relativní hustota** (2.2.5). 0,930 až 0,950.

**Ethanol** (2.9.10). 40 % (V/V) až 56 % (V/V).

**Methanol** (2.9.11). Nejvýše 0,10 % (V/V).

**Zbytek po vysušení** (2.8.16). Nejméně 1,1 %.

# CHIRURGICKÁ ŠICÍ VLÁKNA PRO POUŽITÍ U ČLOVĚKA

## ÚVOD

6.0:90004

Následující články se vztahují na vlákna pro humánní použití:

*Chorda resorbilis sterilis (0317),*

*Fila non resorbilia sterilis (0324),*

*Fila resorbilia synthetica monofilamenta sterilis (0667),*

*Fila resorbilia synthetica torta sterilis (0666).*

Články uvádějí vlastnosti vláken a mohou obsahovat zkoušky totožnosti. Vlákna jsou zdravotnickými prostředky, jak je uvedeno ve Směrnici 93/42 EEC.

Tyto články se mohou použít, aby se prokázalo, že vlákna vyhovují základním požadavkům definovaným v čl. 3 Směrnice 93/42 EEC, vztahujícím se na následující fyzikální vlastnosti: průměr, pevnost v jednoduchém uzlu, pevnost spojení s jehlou, na balení, sterilitu, informace poskytované výrobcem (viz 13. odstavec 1. přílohy Směrnice 93/42 EEC), označování.

Aby se prokázala shoda s ostatními základními požadavky, může se uvažovat o použití vhodných harmonizovaných norem, jak se uvádí v 5. článku Směrnice 93/42 EEC.

## CHORDA RESORBILIS STERILIS

### Catgut sterilní

6.0:0317

#### DEFINICE

Jsou to vlákna vyrobená z kolagenu podslizniční vrstvy střev savců. Po přečištění se střevní membrána podélně rozřeže na proužky různé síly, které se v počtu podle požadovaného průměru za tahu skájí, suší, leští, třídí a sterilizují. Vlákna se mohou chemicky upravovat např. chromitými solemi, čímž se prodlouží vstřebávání, a glycerolem pro zlepšení ohebnosti, a to za předpokladu, že použité látky nesnižují snášenlivost vlákna ve tkáních.

Původ použitých surovin a postup jejich zpracování z hlediska jejich biologické snášenlivosti je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Je to chirurgický prostředek pro sešití ran. Je to vstřebatelné vlákno, které slouží k přiblížení tkání po dobu hojení a později se proteolyticky metabolizuje.

#### VÝROBA

Výroba splňuje příslušné předpisy pro použití živočišných tkání ve zdravotnických prostředcích, zejména týkající se rizika přenosu původců zvirčí spongiformní encefalopatie. Validaci metod sterilizace, kontrolu dodržování zásad ochrany životního prostředí při výrobě, označování a balení je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Pro správnou funkčnost a účinnost použití tohoto druhu vlákna po dobu jeho použitelnosti je zapotřebí, aby byly specifikovány následující fyzikální vlastnosti: konzistentní průměr, dostatečná počáteční pevnost a pevnost spojení s jehlou.

Požadavky uvedené dále byly stanoveny s ohledem na namáhání, kterému je vlákno vystaveno při normálním použití. Tyto požadavky se mohou použít k prokázání, že jednotlivé výrobní šarže jsou vhodné k sešití ran při použití obvyklými chirurgickými postupy.

#### ZKOUŠKY

Jestliže jsou vlákna skladována v konzervačním roztoku, vyjmou se z obalu a ihned se v uvedeném pořadí změří délka, průměr a pevnost v jednoduchém uzlu. Jsou-li vlákna skladována v suchém stavu, vloží se na 24 h do ethanolu 96% R nebo do roztoku propan-2-olu R 90% (V/V) a potom se provedou měření uvedená dále.

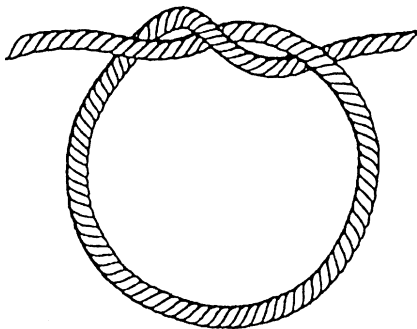
**Délka.** Při měření délky se vlákno nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se drželo rovně natažené. Zjištěná délka žádného vlákna není kratší než 90 % délky deklarované v označení na obalu a není delší než 350 cm.

**Průměr.** Zkouška se provede na pěti vláknech. Použije se vhodný přístroj schopný dosahovat přesnosti měření alespoň 0,002 mm. Přístroj musí mít kruhovou dotykovou destičku o průměru 10 mm až 15 mm. Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností  $(100 \pm 10)$  g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stlačení vlákna. Průměr se měří po celé délce vlákna v místech vzdálených od sebe 30 cm. Je-li vlákno kratší než 90 cm, měří se ve třech místech přibližně rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Vlákno se při měření nevystavuje většímu tahu, než je nutné k tomu, aby bylo rovně natažené. Průměrná hodnota měření zjištěná na zkoušených vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákně jsou v rozmezí hodnot předepsaných pro dané číslo vlákna ve sloupcích A tabulky 1. Žádné měření pro dané číslo vlákna není mimo rozmezí hodnot uvedených ve sloupcích B tabulky 1.

**Minimální pevnost v jednoduchém uzlu.** Zkouší se na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držený v pravé ruce přeloží přes druhý konec držený v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrázek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne. Zkouška se provede na pěti vláknech. Na vláknech delších než 75 cm se provedou vždy dvě měření, na kratších jedno. Síla potřebná k přetržení vlákna se měří vhodným trhacím strojem. Stroj má na uchopení vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky prokazatelně neplatné, je pro příslušné číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D.

Tab. 1 Průměry vláken a jejich pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)	
	A		B		C	D
	min.	max.	min.	max.		
0,1	0,010	0,019	0,005	0,025	–	–
0,2	0,020	0,029	0,015	0,035	–	–
0,3	0,030	0,039	0,025	0,045	0,20	0,05
0,4	0,040	0,049	0,035	0,060	0,30	0,10
0,5	0,050	0,069	0,045	0,085	0,40	0,20
0,7	0,070	0,099	0,060	0,125	0,70	0,30
1	0,100	0,149	0,085	0,175	1,8	0,40
1,5	0,150	0,199	0,125	0,225	3,8	0,70
2	0,200	0,249	0,175	0,275	7,5	1,8
2,5	0,250	0,299	0,225	0,325	10	3,8
3	0,300	0,349	0,275	0,375	12,5	7,5
3,5	0,350	0,399	0,325	0,450	20	10
4	0,400	0,499	0,375	0,550	27,5	12,5
5	0,500	0,599	0,450	0,650	38,0	20,0
6	0,600	0,699	0,550	0,750	45,0	27,5
7	0,700	0,799	0,650	0,850	60,0	38,0
8	0,800	0,899	0,750	0,950	70,0	45,0



Obr. 1 Jednoduchý uzel

**Rozpuštěné sloučeniny chromu.** 0,25 g se převede do kuželové baňky obsahující 1 ml vody R na každých 10 mg vzorku. Baňka se uzavře a ponechá se 24 h stát při teplotě  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , potom se ochladí a tekutina se slijí. 5 ml se přenesou do malé zkumavky a přidají se 2 ml roztoku difenylkarbazidu R (10 g/l) v ethanolu 96% R a 2 ml kyseliny sírové zředěné RS. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně smícháním 5 ml roztoku obsahujícího 2,83  $\mu\text{g}$  dichromanu draselného R v 1 ml, 2 ml kyseliny sírové zředěné RS a 2 ml roztoku difenylkarbazidu R (10 g/l) v ethanolu 96% R (1  $\mu\text{g}$  Cr/g).

**Pevnost spojení s jehlou.** Jestliže se vlákno dodává s neodělitelnou jehlou bez ouška, vyhovuje následující zkoušce. Zkouška se provede na pěti vláknech. Použije se vhodný trhací stroj, jako pro stanovení pevnosti v jednoduchém uzlu. Jehla a vlákno (bez uzlu) se upevní do čelistí přístroje tak, aby ta část jehly, v níž je vlákno zapuštěné, byla zcela

mimo čelist a aby byla orientována ve směru tahu vlákna. Pohyblivá část se uvede do pohybu a zaznamená se síla potřebná k tomu, aby se vlákno přetrhlo nebo oddělilo od jehly. Průměrná hodnota z pěti měření a žádná jednotlivá hodnota není nižší než hodnoty předepsané v tabulce 2 pro příslušné číslo vlákna. Pokud požadované hodnotě nevyhoví jen jedno z provedených zkoušení, zopakuje se zkouška na dalších deseti vláknech. Výrobek vyhovuje zkoušce, není-li výsledek žádného z těchto deseti měření nižší než jednotlivá hodnota v tabulce 2 pro dané číslo vlákna.

Tab. 2 Minimální pevnost spojení vlákna s jehlou

Číslo vlákna	Průměrná hodnota (v newtonech)	Jednotlivá hodnota (v newtonech)
0,5	0,50	0,25
0,7	0,80	0,40
1	1,7	0,80
1,5	2,3	1,1
2	4,5	2,3
2,5	5,6	2,8
3	6,8	3,4
3,5	11,0	4,5
4	15,0	4,5
5	18,0	6,0

#### SKLADOVÁNÍ (BALENÍ)

Vlákna se dodávají v individuálních obalech, které zajišťují udržení jejich sterility a umožňují odebrání a použití vlákna za aseptických podmínek. Sterilní catgut je možno skladovat suchý nebo v konzervačním roztoku, který může obsahovat protimikrobní látku, nikoliv však antibiotikum.

Vlákna v individuálním obalu (primární obal) jsou uložena v dalším ochranném obalu, který zajišťuje udržení jejich fyzikálních i mechanických vlastností až do doby použití. Dodatečně se má zvážit použití vhodných harmonizovaných norem na balení zdravotnických prostředků.

#### OZNAČOVÁNÍ

Může se udělat odkaz na příslušné harmonizované normy pro zdravotnické prostředky.

Na každém nebo v každém individuálním obalu (primární obalu) a na ochranném obalu jsou vyznačeny údaje bezpodmínečně nutné pro identifikaci vlákna uživatelem, a to alespoň:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo metrech;
- kde je to vhodné, že je jehla oddělitelná;
- název výrobku;
- určené použití (chirurgické šicí vlákno, vstřebatelné).

## FILA NON RESORBILIA STERILIA

6.0:0324

### Vlákna nevstřebatelná sterilní

#### DEFINICE

Jsou to vlákna, která v živém organismu nejsou metabolizována. Mohou být různého původu: živočišného, rostlinného nebo mohou být z kovových nebo syntetických materiálů. Dodávají se jako válcovitá vlákna monofilní nebo jako polyfilní vlákna tvořená základními vlákny, která byla skána, spletena nebo opletena. Vlákna mohou být upravena potažením, snížením jejich kapilarity nebo obarvením.

Původ použitých surovin a postup jejich zpracování z hlediska jejich biologické snášenlivosti je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Slouží k přiblížení tkání po dobu hojení a poskytují trvalou podporu rány.

Běžně se používají tyto materiály:

#### Hedvábí (*Filum bombycis*)

Hedvábná pletená nit sterilní se vyrábí splétáním jednotlivých vláken podle požadovaného průměru z čištěného hedvábí získaného ze zámoťků kukel bource morušového (*Bombyx mori* L).

#### Len (*Filum lini*)

Lněná nit sterilní je složená z pericyklických vláken ze stonků lnu setého (*Linum usitatissimum* L.). Základní vlákna dlouhá 2,5 cm až 5 cm se skládají do svazků dlouhých 30 cm až 80 cm a spřádají se na souvislou nit o vhodném průměru.

#### Poly(ethylen-tereftalát) (*Filum ethyleni polyterephthalici*)

Vlákno poly(ethylen-tereftalátové) sterilní se získává zvlákněním poly(ethylen-tereftalátu) vhodným zařízením a splétáním vhodného počtu velmi jemných vláken podle požadované tloušťky.

#### Polyamid 6 (*Filum polyamidicum-6*)

Vlákno polyamidové 6 sterilní se získává zvlákněním syntetického plastového materiálu, připraveného polymerací ε-kaprolaktamu, vhodným zařízením. Vlákno je buď hladké válcovité monofilní, nebo se skládá ze spletených vláken nebo vláken lehce skaných a potažených stejným materiálem.

#### Polyamid 6/6 (*Filum polyamidicum-6/6*)

Vlákno polyamidové 6/6 sterilní se získává zvlákněním syntetického plastového materiálu, připraveného polykondenzací hexamethylendiaminu a kyseliny adipové, vhodným zařízením. Vlákno je buď hladké válcovité monofilní, nebo se skládá ze spletených vláken nebo vláken lehce skaných a potažených stejným materiálem.

#### Polypropylen (*Filum polypropylenicum*)

Vlákno polypropylenové se získává zvlákněním polypropylenu vhodným zařízením. Je tvořeno hladkými válcovitými monofilními vlákny.

#### Monofilní a polyfilní nerezová ocel (*Filum aciei irrubiginibilis monofilamentum /multifilamentum*)

Chemické složení vláken z nerezové oceli sterilních je stanoveno v ISO 5832-1 – Kovové materiály pro chirurgické implantáty – Část 1: Specifikace pro tvářenou nerezovou ocel (ISO 5832-1 – Metallic materials for surgical implants – Part 1: Specification for wrought stainless steel) a vyhovují ISO 10007 – Implantáty pro chirurgii – Tvárné dráty pro použití jako vlákna a pro jiné chirurgické aplikace (ISO 10007 – Implants for surgery – Malleable wires for use as sutures and other surgical applications).

Vlákna z nerezové oceli jsou hladká válcovitá monofilní vlákna nebo skaná vlákna, nebo splétaná vlákna.

#### Poly(vinylidendifluorid) (PVDF) (*Filum poly(vinylidenidifluoridum)*)

PVDF vlákno sterilní se získává zvlákněním syntetického plastového materiálu připraveného polymerací 1,1-difluorethylenu vhodným zařízením. Je tvořeno hladkými válcovitými monofilními vlákny.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Nevstřebatelná vlákna lze prokázat chemickými zkouškami. Materiály přírodního původu je možno identifikovat také mikroskopickým prozkoumáním morfologie těchto vláken. Syntetické materiály je možno identifikovat infračervenou spektrofotometrií (2.2.24) nebo diferenční skenovací kalorimetrií.

#### Zkoušky totožnosti hedvábí

- A. Konec vlákna se pomocí jehly nebo jemné pinzety roztrpí, aby se oddělilo několik jednotlivých vláken. Ta bývají někdy podélně velmi jemně žlábkovaná paralelně s osou vlákna. Při mikroskopickém pozorování má průřez vláken více či méně trojúhelníkový až polokružovitý profil se zakulacenými okraji bez středové dutiny.
- B. Jednotlivá od sebe oddělená vlákna se impregnují roztokem jodidu draselného s jodem RS; vlákna se zbarví světle žlutě.

**Zkoušky totožnosti lnu**

- A.** Konec vlákna se pomocí jehly nebo jemné pinzety roztrpí, aby se oddělilo několik jednotlivých vláken. Pod mikroskopem jsou vlákna široká 12  $\mu\text{m}$  až 31  $\mu\text{m}$  a po větší části délky mají silné stěny, někdy jemně podélně žlábkované a s úzkou středovou dutinou. Tato vlákna se postupně zužují do dlouhého jemného hrotu. Někdy se na jedné straně nacházejí vyboulení s příčnými čarami.
- B.** Jednotlivá, od sebe oddělená vlákna se impregnují *chloridem zinečnatým s jodem RS*; vlákna se zbarví fialovo-modře.

**Zkoušky totožnosti poly(ethylen-tereftalátu)**

Je prakticky nerozpustný ve většině běžných organických rozpouštědel, avšak je rozrušován koncentrovanými alkalickými roztoky. Je inkompatibilní s fenoly.

- A.** 50 mg se obtížně rozpustí za horka v 50 ml *dimethylformamidu R*.
- B.** K asi 50 mg se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a nechá se stát 6 h; materiál zůstane neporušený.

**Zkoušky totožnosti polyamidu 6**

Je prakticky nerozpustný v běžných organických rozpouštědlech; není rozrušován zředěnými alkalickými roztoky (např. roztokem *hydroxidu sodného R* (100 g/l)), ale je rozrušován zředěnými minerálními kyselinami (např. roztokem *kyseliny sírové R* (20 g/l)), horkou *kyselinou octovou ledovou R* a roztokem *kyseliny mravenčí bezvodé R* (70%).

- A.** Asi 50 mg se 18 h zahřívá v zatavené skleněné zkumavce s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* při 110 °C a nechá se stát 6 h; nevyloučí se žádné krystaly.
- B.** 50 mg se rozpustí ve 20 ml roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (70%).

**Zkoušky totožnosti polyamidu 6/6**

Je prakticky nerozpustný v běžných organických rozpouštědlech; není rozrušován zředěnými alkalickými roztoky (např. roztokem *hydroxidu sodného R* (100 g/l)), ale je rozrušován zředěnými minerálními kyselinami (např. roztokem *kyseliny sírové R* (20 g/l)), horkou *kyselinou octovou ledovou R* a roztokem *kyseliny mravenčí bezvodé R* (80%).

- A.** V plameni taje a hoří s charakteristickým pachem po celeru a za vzniku zbytku ve tvaru tvrdých kulových částic.
- B.** Asi 50 mg se opatrně zahřívá ve svisle držené spalovací trubičce, až se začne vyvíjet hustý dým. Když dým vyplní trubičku, oddálí se trubička od plamene a vsune se do ní proužek *papíru nitrobenzaldehydového R*. Na papíru pomalu vzniká fialovohnědé zbarvení, které na vzduchu pomalu bledne; zmizí téměř ihned opláchnutím papíru *kyselinou sírovou zředěnou RS*.
- C.** K asi 50 mg se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Materiál se i za studena rozpadne a během několika minut se rozpustí.
- D.** 50 mg se nerozpustí ve 20 ml roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (70%), avšak rozpustí se ve 20 ml roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (80%).

**Zkoušky totožnosti polypropylenu**

Je rozpustný v dekahydranaftalenu, 1-chloranaftalenu a trichlorethylenu. Nerozpouští se v ethanolu 96%, etheru a cyklohexanonu.

- A.** Měkne při teplotách mezi 160 °C a 170 °C. Hoří modrým plamenem s pachem po hořícím parafinovém vosku a oktylalkoholu.
- B.** K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek roztoku se přeneše na tabletu *chloridu sodného R* a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Proveďte se infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24) a porovná se se spektrem *polypropylenu CRL*.
- C.** Ke 2 g se přidá 100 ml *vody R* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Relativní hustota (2.2.5) změřená po vychladnutí na hydrostatických vahách je 0,89 až 0,91.

**Zkoušky totožnosti nerezové oceli**

Vlákna z nerezové oceli se identifikují potvrzením jejich složení, které odpovídá ISO 5832-1 Část 1.

**Zkoušky totožnosti poly(vinylidendifluoridu)**

Je rozpustný v teplém dimethylformamidu. Je nerozpustný v ethanolu bezvodém, horkém a studeném propan-2-olu, ethyl-acetátu a tetrachlorethylenu.

- A.** Vlákno taje mezi 170 °C a 180 °C. Taje v plameni, avšak při vyjmutí z plamene nehoří. Malý kousek vlákna se položí na vyžehnaný měděný drát nebo plech a zahřívá se v oxidačním plameni; nevznikne zelené zbarvení.
- B.** 0,25 g vlákna se rozpustí v 10 ml *dimethylformamidu R* a zahřívá se pod zpětným chladičem asi 15 min. Několik kapek roztoku se nanese na destičku z *chloridu sodného R* a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C (1 h). Proveďte se infračervená absorpční spektrofotometrie (2.2.24). Spektrum vykazuje absorpční maxima při následujících vlnótech: (838,3  $\pm$  0,5)  $\text{cm}^{-1}$ , (873,3  $\pm$  1)  $\text{cm}^{-1}$ , (1070,0  $\pm$  2)  $\text{cm}^{-1}$ , (1165,0  $\pm$  10)  $\text{cm}^{-1}$ , (1275  $\pm$  0,5)  $\text{cm}^{-1}$ , (1399  $\pm$  5)  $\text{cm}^{-1}$ .
- C.** Ke 2 g vlákna se přidá 100 ml *vody R* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Nechá se vychladnout. Relativní hustota (2.2.5) materiálu je 1,71 až 1,78.

**VÝROBA**

Validaci metod sterilizace, kontrolu dodržování zásad ochrany životního prostředí při výrobě, označování a balení je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Pro správnou funkčnost a účinnost použití těchto vláken po dobu jejich použitelnosti je zapotřebí, aby byly specifikovány tyto fyzikální vlastnosti: konzistentní průměr, dostatečná počáteční pevnost a pevnost spojení s jehlou.

Požadavky uvedené dále byly stanoveny s ohledem na namáhání, kterému je vlákno vystaveno při normálních podmínkách použití. Tyto požadavky lze použít k prokázání, že jednotlivé výrobní šarže těchto vláken jsou vhodné k sešití ran obvyklými chirurgickými postupy.

**ZKOUŠKY**

*Vlákna se vyjmou z obalu a ihned se v uvedeném pořadí změří jejich délka, průměr a pevnost v jednoduchém uzlu.*

Při zkoušení lněného šicího materiálu se vzorek upraví takto: jestliže je v suchém stavu, vystaví se před měřením průměru na 4 h působení atmosféry s relativní vlhkostí



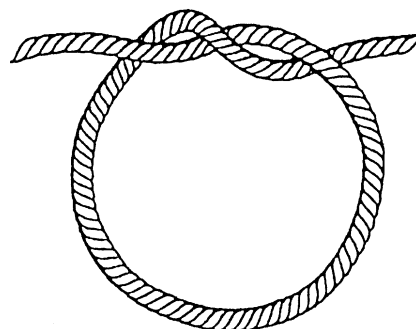
(65 ±5) % při (20 ±2) °C a pro měření pevnosti jednoduchého uzlu se těsně před zkouškou na 30 min při teplotě místnosti ponoří do vody R.

**Délka.** Měří se ve stavu, v jakém bylo vlákno dodáno. Vlákno se nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se drželo rovně natažené. Vlákno není kratší než 95 % délky deklarované v označení na obalu a není delší než 400 cm.

**Průměr.** Není-li předepsáno jinak, změří se průměr pěti vláken ve stavu, v jakém jsou dodávána, následující metodou. Použije se vhodný mechanický přístroj, schopný dosahovat přesnosti měření nejméně 0,002 mm a je opatřen kruhovou dotykovou destičkou o průměru 10 mm až 15 mm. Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností (100 ±10) g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stlačení vlákna. Průměr se měří po celé délce vláken v místech 30 cm od sebe vzdálených. Je-li vlákno kratší než 90 cm, měří se ve třech místech přibližně rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Při měření se monofilní vlákno nenapíná více, než je nutné k tomu, aby bylo rovně natažené. Polyfilní vlákna smí být vystavena tahu nejvýše jedné pětiny pevnosti jednoduchého uzlu uvedené v tabulce 1, sloupci C pro dané číslo vlákna a daný druh vlákna, nejvýše však 10 N. Vlákna z nerezové oceli není třeba při měření průměru napínat.

U polyfilních vláken s číslem vlákna nad 1,5 se v každém místě provedou dvě měření, přičemž před druhým měřením

se vlákno pootočí podél své osy o 90°. Jako průměr vlákna v daném místě se udává průměrná hodnota z těchto dvou měření. Průměrná hodnota měření zjištěná na vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákně jsou v rozmezí hodnot předepsaných v tabulce 1, ve sloupcích A pro dané číslo vlákna. Žádné měření není mimo rozmezí hodnot předepsaných v tabulce 1, ve sloupcích B pro daná čísla vláken.



Obr. 1 Jednoduchý uzel

**Minimální pevnost v jednoduchém uzlu.** Není-li předepsáno jinak, měří se dále popsaným způsobem, přičemž se vlákna měří ve stavu, v jakém jsou dodávána. Pevnost se zkouší na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držení v pravé ruce přeloží přes druhý konec držení v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrá-

Tab. 1 Průměry vláken a jejich minimální pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr vlákna (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)					
	A		B		Iněné vlákno		Ostatní nevstřebatelná vlákna		nerezová ocel	
	min.	max.	min.	max.	C	D	C	D	C	D
0,05	0,005	0,009	0,003	0,012	–	–	0,01	–		
0,1	0,010	0,019	0,005	0,025	–	–	0,03	–		
0,15	0,015	0,019	0,012	0,025	–	–	0,06	0,01		
0,2	0,020	0,029	0,015	0,035	–	–	0,1	–		
0,3	0,030	0,039	0,025	0,045	–	–	0,35	0,06		
0,4	0,040	0,049	0,035	0,060	–	–	0,60	0,15	1,1	
0,5	0,050	0,069	0,045	0,085	–	–	1,0	0,35	1,6	
0,7	0,070	0,099	0,060	0,125	1,0	0,3	1,5	0,60	2,7	
1	0,100	0,149	0,085	0,175	2,5	0,6	3,0	1,0	5,3	4,0
1,5	0,150	0,199	0,125	0,225	5,0	1,0	5,0	1,5	8,0	6,0
2	0,200	0,249	0,175	0,275	8,0	2,5	9,0	3,0	13,3	10,0
2,5	0,250	0,299	0,225	0,325	9,0	5,0	13,0	5,0	15,5	11,6
3	0,300	0,349	0,275	0,375	11,0	8,0	15,0	9,0	17,7	13,3
3,5	0,350	0,399	0,325	0,450	15,0	9,0	22,0	13,0	33,4	25,0
4	0,400	0,499	0,375	0,550	18,0	11,0	27,0	15,0	46,7	35,0
5	0,500	0,599	0,450	0,650	26,0	15,0	35,0	22,0	57,9	43,4
6	0,600	0,699	0,550	0,750	37,0	18,0	50,0	27,0	89,4	67,0
7	0,700	0,799	0,650	0,850	50,0	26,0	62,0	35,0	111,8	83,9
8	0,800	0,899	0,750	0,950	65,0	37,0	73,0	50,0	133,4	100,1
9	0,900	0,999	0,850	1,050					156,0	117,0
10	1,000	1,099	0,950	1,150					178,5	133,9

zek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne. Minimální pevnost vláken z nerezové oceli o čísle vlákna 3,5 a větším se měří na rovném vlákně. Zkouška se provede na pěti vláknech. Na vláknech delších než 75 cm se provedou vždy dvě měření, na kratších jedno. Síla potřebná k přetržení se měří vhodným trhacím strojem. Stroj má na uchopení vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky prokazatelně neplatné, je pro příslušné číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D pro odpovídající materiál.

**Pevnost spojení s jehlou.** Jestliže je vlákno dodáváno s neoddělitelnou jehlou bez ouška, vyhovuje následující zkoušce. Zkouška se provede na pěti vláknech. Použije se vhodný trhací stroj takový, jaký byl popsán pro stanovení pevnosti jednoduchého uzlu. Jehla a vlákno (bez uzlu) se upevní do čelistí přístroje tak, aby ta část jehly, v níž je vlákno zapuštěné, byla zcela mimo čelisti a aby byla orientována ve směru tahu vlákna. Pohyblivá část se uvede do pohybu a zaznamená se síla potřebná k tomu, aby se vlákno přetrhlo nebo oddělilo od jehly. Průměrná hodnota z pěti měření a žádná jednotlivá hodnota není nižší než hodnoty předepsané v tabulce 2 pro dané číslo vlákna. Pokud požadované hodnotě nevyhoví jen jedno z provedených měření, zopakuje se zkouška na dalších deseti vláknech. Výrobek vyhovuje zkoušce, není-li výsledek žádného z těchto deseti měření nižší než jednotlivá hodnota v tabulce 2 pro dané číslo vlákna.

**Tab. 2** Minimální pevnost spojení vlákna s jehlou

Číslo vlákna	Průměrná hodnota (v newtonech)	Jednotlivá hodnota (v newtonech)
0,4	0,50	0,25
0,5	0,80	0,40
0,7	1,7	0,80
1	2,3	1,1
1,5	4,5	2,3
2	6,8	3,4
2,5	9,0	4,5
3	11,0	4,5
3,5	15,0	4,5
4	18,0	6,0
5	18,0	7,0
6	25,0	12,5
7	25,0	12,5
8	50,0	25
9	50,0	25
10	75,0	37,5

**Vyluhovatelnost barviva.** Jsou-li vlákna obarvená a mají-li zůstat barevná i během použití, vyhovují zkoušce na vyluhovatelnost barviva. 0,25 g zkoušeného vzorku se přenese do kuželové baňky, přidá se 25,0 ml vody R a na baňku se nasadí krátký zpětný chladič. Povaří se 15 min, ochladí a doplní vodou R na původní objem. Podle toho, jak bylo vlákno obarveno, se ze základních barevných roztoků (2.2.2) připraví příslušný porovnávací barevný roztok o složení uvedeném v tabulce 3.

**Tab. 3** Porovnávací barevné roztoky

Zbarvení vlákna	Složení porovnávacího barevného roztoku (objemové díly)			
	základní červený roztok	základní žlutý roztok	základní modrý roztok	voda R
žlutohnědé	0,2	1,2	–	8,6
růžovočervené	1,0	–	–	9,0
zelenomodré	–	–	2,0	8,0
řialové	1,6	–	8,4	–

Zkoušený roztok se nezbarví intenzivněji než odpovídající porovnávací barevný roztok.

**Monomery a oligomery.** Vlákno z polyamidu 6 dále vyhovuje následující zkoušce.

1,00 g se 7 h extrahuje 30 ml methanolu R v přístroji pro kontinuální extrakci rychlostí nejméně 3 extrakce za hodinu. Extrakt se odpaří do sucha, odparek se suší 10 min při 110 °C a po vychladnutí v exsíkátoru se zváží. Hmotnost odparku je nejvýše 20 mg (2 %).

**SKLADOVÁNÍ (BALENÍ)**

Dodávají se ve vhodných obalech, které zajišťují udržení jejich sterility a umožňují odeírání a použití vlákná za aseptických podmínek. Mohou se skladovat suchá nebo v konzervačním roztoku, který může obsahovat protimikrobní látku, avšak nikoli antibiotika.

Jsou určena pouze pro jedno použití při prvním otevření obalu.

Vlákna v individuálním obalu (primární obal) jsou uložena v dalším ochranném obalu, který zajišťuje udržení jejich fyzikálních i mechanických vlastností až do doby použití. Dodatečně se má zvážít použití vhodných harmonizovaných norem na balení zdravotnických prostředků.

**OZNAČOVÁNÍ**

Označení odpovídá příslušným harmonizovaným normám pro zdravotnické prostředky.

Na každém individuálním obalu (primárním obalu) a na ochranném obalu jsou vyznačeny údaje bezpodmínečně nutné pro identifikaci vlákna uživatelem, a to alespoň:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo metrech;
- kde je to vhodné, že je jehla oddělitelná;
- název výrobku;
- určené použití (chirurgické šicí vlákno, nevstřebatelné);
- kde je to vhodné, že je vlákno barevné;
- kde je to vhodné, údaj o struktuře vlákna (pletené, monofilní, potažené).

Chirurgická šicí vlákna ... u člověka

## FILA RESORBILIA SYNTHETICA MONOFILAMENTA STERILIA

6.0:0666

### Vstřebatelná sterilní vlákna syntetická monofilní

#### DEFINICE

Jsou to vlákna vyrobená ze syntetického polymeru, polymerů nebo kopolymerů, která jsou živým organismem absorbována a nevyvolávají žádné nepřípustné podráždění tkáně. Jsou tvořena úplně polymerovaným materiálem. Vyrábějí se jako monofilní vlákna, která mohou být upravena pro snazší zacházení a mohou být obarvena.

Původ použitých surovin a postup jejich zpracování z hlediska jejich biologické snášenlivosti je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Jsou to chirurgické prostředky pro sešití ran. Jsou to vstřebatelná vlákna, která slouží k přiblížení tkání po dobu hojení a později ztrácejí pevnost v důsledku hydrolyzy.

#### VÝROBA

Validaci metod sterilizace, kontrolu dodržování zásad ochrany životního prostředí při výrobě, označování a balení je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Pro správnou funkčnost a účinnost použití těchto druhů vláken po dobu jejich použitelnosti je zapotřebí, aby byly specifikovány tyto fyzikální vlastnosti: konzistentní průměr, dostatečná počáteční pevnost a pevnost spojení s jehlou.

Požadavky uvedené dále byly stanoveny s ohledem na namáhání, kterému jsou vlákna vystavena za normálních podmínek. Tyto požadavky se mohou použít k prokázání, že jednotlivé výrobní šarže těchto vláken jsou vhodné k sešití ran při použití obvyklými chirurgickými postupy.

#### ZKOUŠKY

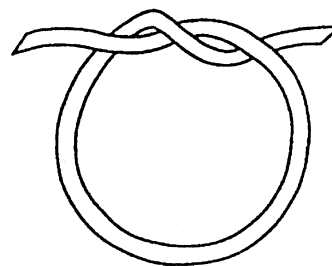
Následující zkoušky se provedou na vláknech v takovém stavu, v jakém jsou po vyjmutí z obalu.

**Délka.** Při měření se vlákno nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se udrželo rovně natažené. Délka vlákna není kratší než 95 % délky deklarované v označení na obalu a není delší než 400 cm.

**Průměr.** Pokud není předepsáno jinak, měří se průměr následujícím postupem na pěti vláknech v takovém stavu,

v jakém byla dodána. Použije se vhodný přístroj schopný měřit s přesností nejméně 0,002 mm. Přístroj má kruhovou dotykovou destičku o průměru 10 mm až 15 mm. Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností (100 ±10) g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stlačení vlákna. Průměr se měří po celé délce vlákna v místech 30 cm od sebe vzdálených. Je-li vlákno kratší než 90 cm, měří se ve třech místech přibližně rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Při měření se vlákno nenapíná více, než je nutné k tomu, aby bylo rovně natažené. Průměrná hodnota měření zjištěná na zkoušených vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákně jsou v rozmezí hodnot předepsaných pro dané číslo vlákna ve sloupcích A tabulky 1. Žádné měření pro dané číslo vlákna není mimo rozmezí hodnot uvedených ve sloupcích B tabulky 1.

**Minimální pevnost v jednoduchém uzlu.** Zkouší se na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držený v pravé ruce přeloží přes druhý konec držený v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrázek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne.



Obr. 1 Jednoduchý uzel

Zkouška se provede na pěti vláknech. Na vláknech delších než 75 cm se provedou vždy dvě měření, na kratších jedno. Síla potřebná k přetržení se měří vhodným trhacím strojem. Stroj má na upnutí vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 25 cm/min až 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma

Tab. 1 Průměry vláken a jejich pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr vlákna (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)	
	A		B		C	D
	min.	max.	min.	max.		
0,5	0,050	0,094	0,045	0,125	1,4	0,7
0,7	0,095	0,149	0,075	0,175	2,5	1,3
1	0,150	0,199	0,125	0,225	6,8	3,4
1,5	0,200	0,249	0,175	0,275	9,5	4,7
2	0,250	0,339	0,225	0,375	17,5	8,9
3	0,340	0,399	0,325	0,450	26,8	13,4
3,5	0,400	0,499	0,375	0,550	39,0	18,5
4	0,500	0,570	0,450	0,600	50,8	25,4
5	0,571	0,610	0,500	0,700	63,5	31,8

čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky označené za prokazatelně neplatné, je pro příslušné číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D pro dané číslo vlákna.

**Pevnost spojení s jehlou.** Jestliže je vlákno dodáváno s oddělitelnou jehlou bez ouška, vyhovuje následující zkoušce. Zkouška se provede na pěti vláknech. Použije se vhodný trhací stroj, jaký byl popsán pro stanovení pevnosti v jednoduchém uzlu. Jehla a vlákno (bez uzlu) se upevní do čelistí přístroje tak, aby ta část jehly, v níž je vlákno zapuštěné, byla zcela mimo čelisti a aby byla orientována ve směru tahu vlákna. Pohyblivá část se uvede do pohybu a zaznamená se síla potřebná k tomu, aby se vlákno přetrhlo nebo oddělilo od jehly. Průměrná hodnota z pěti měření a žádná jednotlivá hodnota není nižší než hodnoty předepsané v tabulce 2 pro příslušné číslo vlákna. Pokud požadované hodnotě neodpovídá jedno z provedených měření, opakuje se měření na dalších deseti vláknech. Výrobek vyhovuje zkoušce, není-li výsledek žádného z těchto deseti měření nižší než jednotlivá hodnota v tabulce 2 pro dané číslo vlákna.

**Tab. 2** Minimální pevnost spojení vlákna s jehlou

Číslo vlákna	Průměrná hodnota (v newtonech)	Jednotlivá hodnota (v newtonech)
0,5	0,80	0,40
0,7	1,7	0,80
1	2,3	1,1
1,5	4,5	2,3
2	6,8	3,4
2,5	9,0	4,5
3	11,0	4,5
3,5	15,0	4,5
4	18,0	6,0
5	18,0	7,0

### SKLADOVÁNÍ (BALENÍ)

Dodávají se ve vhodných obalech, které zajišťují udržení jejich sterility a umožňují odebrání a použití vlákna za aseptických podmínek. Vlákna se skladují suchá a jsou určena pouze pro jedno použití při prvním otevření obalu. Vlákna v individuálním obalu (primární obal) jsou uložena v dalším ochranném obalu, který zajišťuje udržení jejich fyzikálních i mechanických vlastností až do doby použití. Dodatečně se má zvážit použití vhodných harmonizovaných norem na balení zdravotnických prostředků.

### OZNAČOVÁNÍ

Označování odpovídá příslušným harmonizovaným normám pro zdravotnické prostředky.

Na každém individuálním obalu (primárním obalu) a na ochranném obalu jsou vyznačeny údaje bezpodmínečně nutné pro identifikaci vlákna uživatelem, a to alespoň:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo metrech;
- kde je to vhodné, že je jehla oddělitelná;
- název výrobku;
- určené použití (chirurgické vlákno, vstřebatelné);
- kde je to vhodné, že je vlákno barevné;
- struktura vlákna (monofilní).

## FILA RESORBILIA SYNTHETICA TORTA STERILIA

6.0:0667

### Vlákna syntetická vstřebatelná pletená sterilní

#### DEFINICE

Jsou to vlákna vyrobená ze syntetického polymeru, polymerů nebo kopolymerů, která jsou živým organismem absorbována a nevyvolávají žádné nepřipustné podráždění tkáně. Jsou tvořena úplně polymerovaným materiálem. Vyrábějí se jako polyfilní vlákna složená ze základních vláken spojených pletením. Vlákna mohou být upravena pro snazší zacházení a mohou být obarvena.

Původ použitých surovin a postup jejich zpracování z hlediska jejich biologické snášenlivosti je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Jsou to chirurgické prostředky k sešití ran. Jsou to vstřebatelná vlákna, která slouží k přiblížení tkání po dobu hojení a později ztrácejí pevnost v důsledku hydrolyzy.

#### VÝROBA

Validaci metod sterilizace, kontrolu dodržování zásad ochrany životního prostředí při výrobě, označování a balení je možno posuzovat podle příslušných harmonizovaných norem.

Pro správnou funkčnost a účinnost použití těchto druhů vláken po dobu jejich použitelnosti je zapotřebí, aby byly specifikovány tyto fyzikální vlastnosti: konzistentní průměr, dostatečná počáteční pevnost a pevné spojení s jehlou.

Požadavky uvedené dále byly stanoveny s ohledem na namáhání, kterému jsou vlákna vystavena za normálních podmínek použití. Tyto požadavky se mohou použít k prokázání, že výrobní šarže těchto vláken jsou vhodné k sešití ran obvyklými chirurgickými postupy.

#### ZKOUŠKY

*Následující zkoušky se provedou na vláknech v takovém stavu, v jakém jsou po vyjmutí z obalu.*

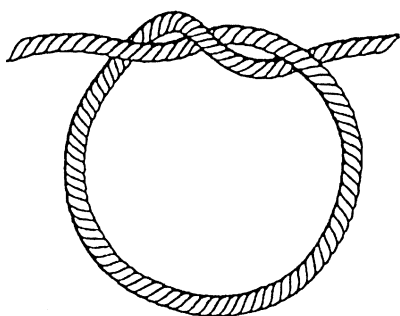
**Délka.** Při měření se vlákno nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se udrželo rovně natažené. Délka vlákna není kratší než 95 % délky deklarované v označení na obalu a není delší než 400 cm.

**Průměr.** Pokud není předepsáno jinak, měří se průměr následujícím postupem na pěti vláknech v takovém stavu, v jakém byly dodány. Použije se vhodný přístroj schopný měřit s přesností nejméně 0,002 mm, vybavený kruhovou dotykovou destičkou o průměru 10 mm až 15 mm. Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností (100 ± 10) g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stla-

Chirurgická  
šití vlákna  
... u člověka

čení vlákna. Průměr se měří po celé délce vlákna v místech 30 cm od sebe vzdálených. Je-li vlákno kratší než 90 cm, měří se ve třech místech přibližně rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Při měření se vlákno nenapíná více, než je jedna pětina pevnosti v jednoduchém uzlu uvedené ve sloupci C tabulky 1 pro dané číslo vlákna a typ materiálu, nejvýše však 10 N. Pro vlákna s číslem vlákna větším než 1,5 se provedou dvě měření v každém místě, přičemž pro druhé měření se vlákno pootočí o 90°. Průměr v tomto místě vlákna je průměrem obou měření. Průměrná hodnota měření zjištěná na zkoušených vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákně jsou v rozmezí hodnot předepsaných pro dané číslo vlákna ve sloupcích A tabulky 1. Žádné měření pro dané číslo vlákna není mimo rozmezí hodnot uvedených ve sloupcích B tabulky 1.

**Minimální pevnost v jednoduchém uzlu.** Zkouší se na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držený v pravé ruce přeloží přes druhý konec držený v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrázek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne.



Obr. 1 Jednoduchý uzel

Zkouška se provede na pěti vláknech. Na vláknech delších než 75 cm se provedou vždy dvě měření, na kratších jedno. Síla potřebná k přetržení se měří vhodným trhacím strojem. Stroj má na upnutí vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 25 cm/min až 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky prokazatelně neplatné, je pro příslušné číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D pro dané číslo vlákna.

**Pevnost spojení s jehlou.** Jestliže se vlákno dodává s neoddělitelnou jehlou bez ouška, vyhovuje následující zkoušce. Zkouška se provede na pěti vláknech. Použije se vhodný trhací stroj, jaký byl popsán pro stanovení pevnosti v jednoduchém uzlu. Jehla a vlákno (bez uzlu) se upevní do čelistí přístroje tak, aby ta část jehly, v níž je vlákno zapuštěné, byla zcela mimo čelisti a aby byla orientována ve směru tahu vlákna. Pohyblivá část se uvede do pohybu a zaznamená se síla potřebná k tomu, aby se vlákno přetrhlo nebo oddělilo od jehly. Průměrná hodnota z pěti měření a žádná jednotlivá hodnota není nižší než hodnoty předepsané v tabulce 2 pro příslušné číslo vlákna. Pokud požadované hodnotě neodpovídá jedno z provedených měření, opakuje se měření na dalších deseti vláknech. Vlákno vyhovuje zkoušce, není-li výsledek žádného z těchto

Tab. 1 Průměry vláken a jejich pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr vlákna (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)	
	A		B		C	D
	min.	max.	min.	max.		
0,01	0,001	0,004	0,0008	0,005	–	–
0,05	0,005	0,009	0,003	0,012	–	–
0,1	0,010	0,019	0,005	0,025	–	–
0,2	0,020	0,029	0,015	0,035	–	–
0,3	0,030	0,039	0,025	0,045	0,45	0,23
0,4	0,040	0,049	0,035	0,060	0,70	0,35
0,5	0,050	0,069	0,045	0,085	1,4	0,7
0,7	0,070	0,099	0,060	0,125	2,5	1,3
1	0,100	0,149	0,085	0,175	6,8	3,4
1,5	0,150	0,199	0,125	0,225	9,5	4,8
2	0,200	0,249	0,175	0,275	17,7	8,9
2,5	0,250	0,299	0,225	0,325	21,0	10,5
3	0,300	0,349	0,275	0,375	26,8	13,4
3,5	0,350	0,399	0,325	0,450	39,0	18,5
4	0,400	0,499	0,375	0,550	50,8	25,4
5	0,500	0,599	0,450	0,650	63,5	31,8
6	0,600	0,699	0,550	0,750	–	–
7	0,700	0,799	0,650	0,850	–	–

deseti měření nižší než jednotlivá hodnota v tabulce 2 pro dané číslo vlákna.

**Tab. 2** Minimální pevnost spojení vlákna s jehlou

Číslo vlákna	Průměrná hodnota (v newtonech)	Jednotlivá hodnota (v newtonech)
0,4	0,50	0,25
0,5	0,80	0,40
0,7	1,7	0,80
1	2,3	1,1
1,5	4,5	2,3
2	6,8	3,4
2,5	9,0	4,5
3	11,0	4,5
3,5	15,0	4,5
4	18,0	6,0
5	18,0	7,0

#### SKLADOVÁNÍ (BALENÍ)

Vlákna se dodávají ve vhodných obalech, které zajišťují udržení jejich sterility a umožňují odebrání a použití vlák-

na za aseptických podmínek. Vlákna se skladují suchá a jsou určena pouze pro jedno použití při prvním otevření obalu.

Vlákna v individuálním obalu (primární obal) jsou uložena v dalším ochranném obalu, který zajišťuje udržení jejich fyzikálních i mechanických vlastností až do doby použití. Dodatečně se má zvážit použití vhodných harmonizovaných norem na balení zdravotnických prostředků.

#### OZNAČOVÁNÍ

Označení odpovídá příslušným harmonizovaným normám pro zdravotnické prostředky.

Na každém individuálním obalu (primárním obalu) a na ochranném obalu jsou vyznačeny údaje bezpodmínečně nutné pro identifikaci vlákna uživatelem, a to alespoň:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo metrech;
- kde je to vhodné, že je jehla oddělitelná;
- název výrobku;
- určené použití (chirurgické vlákno, vstřebatelné);
- kde je to vhodné, že je vlákno barevné;
- struktura vlákna (pletené).

## CHIRURGICKÁ ŠICÍ VLÁKNA PRO POUŽITÍ U ZVÍŘAT

### CHORDA RESORBILIS STERILIS IN FUSO AD USUM VETERINARIUM

6.0:0660

Catgut sterilní v návínu pro veterinární použití

#### DEFINICE

Jsou to vlákna vyrobená z kolagenu podslizniční vrstvy střev savců. Po přečištění se střevní membrána podélně rozřeže na proužky různé síly, které se v počtu podle požadovaného průměru za tahu skájí, suší, leští, třídí a sterilizují. Vlákna se mohou chemicky upravovat např. chromitými solemi, čímž se prodlouží vstřebávání, a glycerolem pro zlepšení ohebnosti, a to za předpokladu, že použité látky nesnižují snášenlivost vlákna v tkáních.

Vlákno je dodáváno v návínu umožňujícím odběr a použití všech jeho částí za aseptických podmínek. Provedení obalu dovoluje při správném zacházení udržet sterilitu vnitřního obsahu i po odběru části vlákna. Vlákna mohou být skladována suchá nebo v konzervačním roztoku obsahujícím protimikrobní látku, nikoli však antibiotikum.

#### ZKOUŠKY

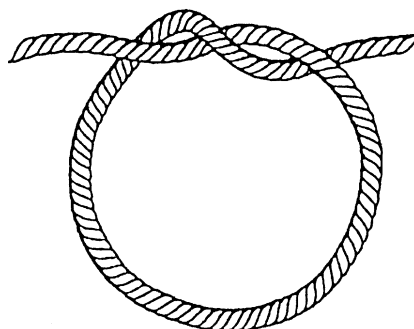
Jestliže jsou vlákna skladována v konzervačním roztoku, vyjmou se z obalu a ihned se v uvedeném pořadí změří délka, průměr a pevnost v jednoduchém uzlu. Jsou-li vlákna skladována v suchém stavu, vloží se na 24 h do ethanolu 96% R nebo do roztoku propan-2-olu R 90% (V/V) a potom se provedou měření uvedená dále.

**Délka.** Při měření délky se vlákno nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se drželo rovně natažené. Zjištěná délka žádného vlákna není kratší než 95 % délky deklarované v označení na obalu. Jestliže je vlákno spojeno uzly z několika částí, není délka žádné části kratší než 2,5 m.

**Průměr.** Použije se vhodný přístroj schopný dosahovat přesnosti měření nejméně 0,002 mm. Přístroj musí mít kruhovou dotykovou destičku o průměru 10 mm až 15 mm.

Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností (100 ± 10) g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stlačení vlákna. Na 2 m délky vlákna se provede nejméně jedno měření. Skládá-li se vlákno z několika částí spojených uzly, na každé části se provedou nejvýše tři měření. V žádném případě se neprovádí více než dvanáct měření. Vlákno se při měření nevystavuje většímu tahu, než je nutné k tomu, aby bylo rovně natažené. Měření se provádějí v místech pravidelně rozložených po celé délce vlákna nebo každé části. Průměrná hodnota měření zjištěná na zkoušených vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákne jsou v rozmezí hodnot předepsaných pro dané číslo vlákna ve sloupcích A tabulky 1. Žádné měření pro dané číslo vlákna není mimo rozmezí hodnot uvedených ve sloupcích B tabulky 1.

**Minimální pevnost v jednoduchém uzlu.** Zkouší se na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držený v pravé ruce přeloží přes druhý konec držený v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrázek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne.



Obr. 1 Jednoduchý uzel

Provede se nejméně jedno měření na 2 m délky vlákna. Skládá-li se vlákno z několika částí spojených uzly, na

Tab. 1 Průměry vláken a jejich pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr vlákna (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)	
	A		B		C	D
	min.	max.	min.	max.		
1	0,100	0,149	0,085	0,175	1,8	0,4
1,5	0,150	0,199	0,125	0,225	3,8	0,7
2	0,200	0,249	0,175	0,275	7,5	1,8
2,5	0,250	0,299	0,225	0,325	10	3,8
3	0,300	0,349	0,275	0,375	12,5	7,5
3,5	0,350	0,399	0,325	0,450	20	10
4	0,400	0,499	0,375	0,550	27,5	12,5
5	0,500	0,599	0,450	0,650	38,4	20,0
6	0,600	0,699	0,550	0,750	45,0	27,5
7	0,700	0,799	0,650	0,850	60,0	38,0
8	0,800	0,899	0,750	0,950	70,0	45,0

každé části se provedou nejméně tři měření a v každém případě nejméně jedno měření na 2 m délky v místech rovnoměrně rozmístěných podél vlákna nebo jeho částí. Síla potřebná k přetržení vlákna se měří vhodným trhačím strojem. Stroj má na uchopení vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky prokazatelně neplatné, je pro příslušné číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D.

**Rozpuštěné sloučeniny chromu.** 0,25 g se převede do kuzelové baňky obsahující 1 ml vody R na každých 10 mg vzorku. Baňka se uzavře a ponechá se 24 h stát při teplotě  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , potom se ochladí a tekutina se slije. 5 ml se přenesou do malé zkumavky a přidají se 2 ml roztoku difenylkarbazidu R (10 g/l) v ethanolu 96% R a 2 ml kyseliny sírové zředěné RS. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně smícháním 5 ml roztoku obsahujícího 2,83  $\mu\text{g}$  dichromanu draselného R v 1 ml, 2 ml kyseliny sírové zředěné RS a 2 ml roztoku difenylkarbazidu R (10 g/l) v ethanolu 96% R (1  $\mu\text{g}$  Cr/g).

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu používané pro catgut a další chirurgické šicí materiály. Zkouška se provede na třech částech, každá délky 30 cm, které se odstříhnou na začátku, ve středu a na konci vlákna.

#### SKLADOVÁNÍ

Chráněn před světlem a před teplem.

#### OZNAČOVÁNÍ

V označení na obalu se uvede:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo v metrech.

## FILA NON RESORBILIA STERILIA IN FUSO AD USUM VETERINARIUM

6.0:0605

### Vlákna nevstřebatelná sterilní v návinnu pro veterinární použití

*Ustanovení tohoto článku mají být uváděna do spojitosti s jednotlivými lékopisnými články na sterilní nevstřebatelná vlákna v návinnu pro veterinární použití. Požadavky se nemusí vždy vztahovat na sterilní nevstřebatelná vlákna, která nejsou předmětem těchto článků.*

#### DEFINICE

Jsou to vlákna, která v živém organismu nejsou metabolizována. Mohou být původu živočišného, rostlinného nebo mohou být ze syntetických materiálů. Dodávají se jako válcovitá vlákna monofilní nebo jako polyfilní vlákna tvořená základními vlákny, která byla skána, spletena nebo opletena. Tato vlákna mohou být potažena a mohou být upravena tak, aby se snížila jejich kapilarita, nebo obarvena barvivy schválenými oprávněnou autoritou. Vlákna jsou sterilizována.

Vlákna se dodávají ve vhodném návinnu umožňujícím odběr a použití všech částí vlákna za aseptických podmínek. Konstrukce obalu dovoluje při správném zacházení udržet sterilitu obsahu i po odběru části vlákna. Vlákna mohou být skladována suchá nebo v konzervačním roztoku, který může obsahovat protimikrobní látky, nikoli však antibiotika.

#### ZKOUŠKY

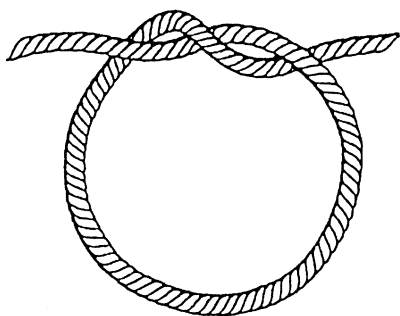
*Vlákno se vyjme z obalu a ihned se změří v uvedeném pořadí délka, průměr a pevnost v jednoduchém uzlu.*

**Délka.** Měří se ve stavu, v jakém bylo vlákno dodáno. Vlákno se nenapíná více, než kolik je právě třeba k tomu, aby se udrželo rovně natažené. Délka vlákna není kratší než 95 % délky uvedené v označení na obalu.

**Průměr.** Pokud není předepsáno jinak, měří se průměr vláken ve stavu, v jakém byla dodána, následujícím postupem. Použije se vhodný přístroj schopný měřit s přesností nejméně 0,002 mm, opatřený kruhovou dotykovou destičkou o průměru 10 mm až 15 mm. Dotyková destička a s ní spojené pohyblivé části přístroje mají měřené vlákno zatěžovat celkovou hmotností  $(100 \pm 10)$  g. Při měření je třeba spouštět dotykovou destičku zvolna, aby nedošlo ke stlačení vlákna. Provede se nejméně jedno měření na každé 2 m délky a nejméně dvanáct měření v místech rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Při měření se monofilní vlákno nenapíná více, než je nutné k tomu, aby bylo rovně natažené. Polyfilní vlákna smí být vystavena tahu nejvýše jedné pětiny pevnosti v jednoduchém uzlu uvedené v tabulce 1, sloupci C pro dané číslo vlákna a druh vlákna, nejvýše však 10 N. U polyfilních vláken s číslem vlákna nad 1,5 se v každém místě provedou dvě měření, přičemž před druhým měřením se vlákno pootočí podél své osy o  $90^\circ$ . Jako průměr v daném místě se udává průměrná hodnota z těchto dvou měření. Průměrná hodnota měření zjištěná na vláknech a nejméně dvě třetiny měření zjištěných na každém vlákně jsou v rozmezí hodnot předepsaných v tabulce 1, ve sloupcích A pro udané číslo vlákna. Žádné měření není mimo rozmezí hodnot předepsaných v tabulce 1, ve sloupcích B pro udaná čísla vlákna.

**Pevnost v jednoduchém uzlu.** Není-li předepsáno jinak, měří se dále popsaným způsobem, přičemž se vlákna měří ve stavu, v jakém jsou dodávána. Pevnost se zkouší na jednoduchém uzlu, který se udělá tak, že se jeden konec vlákna držný v pravé ruce přeloží přes druhý konec držný v levé ruce, prostrčí se vzniklou smyčkou (viz obrázek 1) a vytvořený uzel se pevně utáhne.





Obr. 1 Jednoduchý uzel

Provede se nejméně jedno měření na každé 2 m délky v místech rovnoměrně rozmístěných po délce vlákna. Síla potřebná k přetržení se zkouší vhodným trhacím strojem. Stroj má na uchopení vlákna dvě čelisti, z nichž jedna je pohyblivá a je poháněna konstantní rychlostí 30 cm/min. Čelisti jsou konstruovány tak, aby se do nich zkoušené vlákno dalo upevnit a nemohlo prokluzovat. Délka vlákna mezi oběma čelistmi na začátku zkoušky je 12,5 cm až 20 cm a uzel se nachází uprostřed mezi oběma čelistmi. Pohyblivá čelist se uvede do pohybu a zaznamená se síla, při které se vlákno přetrhne. Pokud se vlákno přetrhne v čelisti nebo ve vzdálenosti menší než 1 cm od ní, je výsledek neplatný a zkouška se provede znovu na jiném vlákně. Průměr všech výsledků, do něhož se nepočítají výsledky prokazatelně neplatné, je pro dané číslo vlákna shodný nebo větší než hodnota uvedená v tabulce 1, sloupec C a žádný jednotlivý výsledek není nižší než hodnota uvedená ve sloupci D tabulky 1 pro dané číslo vlákna a daný materiál.

**Sterilita (2.6.1).** Vyhovuje zkoušce na sterilitu pro catgut a jiné chirurgické šicí materiály. Zkouška se provede na třech částech, každé o délce 30 cm, odstříhnutých na počátku, ve středu a na konci vlákna.

Tab. 1 Průměry vláken a jejich pevnost v jednoduchém uzlu

Číslo vlákna	Průměr vlákna (v milimetrech)				Pevnost v jednoduchém uzlu (v newtonech)			
	A		B		Iněné vlákno		ostatní nevstřebatelná vlákna	
	min.	max.	min.	max.	C	D	C	D
0,5	0,050	0,069	0,045	0,085	–	–	1,0	0,35
0,7	0,070	0,099	0,060	0,125	1,0	0,3	1,5	0,60
1	0,100	0,149	0,085	0,175	2,5	0,6	3,0	1,0
1,5	0,150	0,199	0,125	0,225	5,0	1,0	5,0	1,5
2	0,200	0,249	0,175	0,275	8,0	2,5	9,0	3,0
2,5	0,250	0,299	0,225	0,325	9,0	5,0	13,0	5,0
3	0,300	0,349	0,275	0,375	11,0	8,0	15,0	9,0
3,5	0,350	0,399	0,325	0,450	15,0	9,0	22,0	13,0
4	0,400	0,499	0,375	0,550	18,0	11,0	27,0	15,0
5	0,500	0,599	0,450	0,650	26,0	15,0	35,0	22,0
6	0,600	0,699	0,550	0,750	37,0	18,0	50,0	27,0
7	0,700	0,799	0,650	0,850	50,0	26,0	62,0	35,0
8	0,800	0,899	0,750	0,950	65,0	37,0	73,0	50,0

**Vyluhovatelnost barviva.** Jsou-li vlákna obarvená a mají-li zůstat barevná i během použití, vyhovují zkoušce na vyluhovatelnost barviva. 0,25 g zkoušeného vzorku se převede do kuželové baňky, přidá se 25,0 ml vody R a do hrdla baňky se nasadí krátký zpětný chladič. Povaří se 15 min, ochladí a doplní vodou R na původní objem. Podle toho, jak bylo vlákno obarveno, se ze základních barevných roztoků (2.2.2) připraví příslušný porovnávací barevný roztok o složení uvedeném v tabulce 2.

Tab. 2 Porovnávací barevné roztoky

Zbarvení vlákna	Složení porovnávacího barevného roztoku (objemové díly)			
	základní červený roztok	základní žlutý roztok	základní modrý roztok	voda
žlutohnědé	0,2	1,2	–	8,6
růžovočervené	1,0	–	–	9,0
zelenomodré	–	–	2,0	8,0
fialové	1,6	–	8,4	–

Zkoušený roztok se nezbarví intenzivněji než odpovídající porovnávací roztok.

**SKLADOVÁNÍ**

Chráněny před světlem a teplem.

**OZNAČOVÁNÍ**

V označení na obalu se uvede:

- číslo vlákna;
- délka v centimetrech nebo v metrech;
- kde je to vhodné, že je vlákno barevné a má zůstat barevné i během použití.

## FILUM BOMBYCIS TORTUM STERILE IN FUSO AD USUM VETERINARIUM

6.0:0606

Hedvábná nit pletená sterilní v návínu pro veterinární použití

### DEFINICE

Získává se splétáním vhodného počtu jednotlivých vláken čištěného hedvábí získaného odvinováním zátoček kukel bource morušového *Bombyx mori* L. podle požadovaného průměru vlákna. Může být obarvena barvivy povolenými oprávněnou autoritou. Získaná nit se sterilizuje.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Konec niti se roztřepí pomocí jehly nebo jemné pinzety, aby se oddělilo několik jednotlivých fibrilek. Ty bývají někdy podélně velmi jemně žlábkované, a to souběžně s osou. Při pozorování pod mikroskopem má průřez fibrilek více či méně trojúhelníkový nebo polokruhovitý profil se zakulacenými okraji bez středové dutiny.
- B.** Jednotlivé, od sebe oddělené fibrilky se napustí *jodidem draselným s jodem RS*; fibrilky se zbarví světle žlutě.

### ZKOUŠKY

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

### SKLADOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

### OZNAČOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

## FILUM ETHYLENI POLYTEREPHTALICI STERILE IN FUSO AD USUM VETERINARIUM

6.0:0607

Vlákno poly(ethylen-tereftalátové) sterilní v návínu pro veterinární použití

### DEFINICE

Získává se zvlákňováním poly(ethylen-tereftalátu) vhodným zařízením. Vlákno je spleteno z vhodného počtu velmi jemných vláken podle požadovaného průměru. Může být zbarveno bělavě nebo barveno barvivy nebo pigmenty schválenými oprávněnou autoritou. Vlákno se sterilizuje.

### VLASTNOSTI

Vlákno je prakticky nerozpustné ve většině běžných organických rozpouštědel, avšak je rozrušováno koncentrovanými alkalickými roztoky. Je inkompatibilní s fenoly.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Obtížně se rozpouští za horka v *dimethylformamidu R* a v *dichlorbenzenu R*.

- B.** K asi 50 mg se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a ponechá se stát 6 h; materiál zůstane neporušený.

### ZKOUŠKY

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

### SKLADOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

### OZNAČOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

## FILUM LINI STERILE IN FUSO AD USUM VETERINARIUM

6.0:0608

Lněná nit sterilní v návínu pro veterinární použití

### DEFINICE

Skládá se z pericyklických fibrilek ze stonků *Linum usitatissimum* L. Fibrilky dlouhé 2,5 cm až 5 cm se skládají do svazků dlouhých 30 cm až 80 cm a jsou spřádány na souvislou nit o vhodném průměru. Nit může být smetanově bílá nebo může být obarvena barvivy povolenými oprávněnou autoritou. Získaná nit se sterilizuje.

### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A.** Koneček niti se pomocí jehly nebo jemné pinzety roztřepí, aby se oddělilo několik jednotlivých fibrilek. Při pozorování mikroskopem se jeví jako vlákna 12 µm až 31 µm široká, která po větší část své délky mají silné stěny, někdy jemně podélně rýhovaná a s úzkou středovou dutinou. Tato vlákna se postupně zužují do dlouhého jemného hrotu. Někdy se na jedné straně nacházejí vyboulení s příčnými čarami.
- B.** Jednotlivá, od sebe oddělená vlákna se napustí *chlorigem zinečnatým s jodem RS*; vlákna se zbarví fialovo-modře.

### ZKOUŠKY

Vyhovuje předepsaným zkouškám uvedeným v článku *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*. Pokud byla nit skladována v suchém stavu, má se těsně před měřením průměru ponechat 4 h při relativní vlhkosti (65 ± 5) % a při teplotě (20 ± 2) °C a před stanovením pevnosti v jednoduchém uzlu se těsně před provedením zkoušky namočí na 30 min do vody R při teplotě místnosti.

### SKLADOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

### OZNAČOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

**FILUM POLYAMIDICUM-6/6 STERILE  
IN FUSO AD USUM VETERINARIUM****6.0:0610**Vlákno z polyamidu 6/6 sterilní v návínu  
pro veterinární použití

## DEFINICE

Získává se zvlákněním syntetického plastového materiálu připraveného polykondenzací hexamethylendiaminu a kyseliny adipové vhodným zařízením. Vlákno je buď hladké válcovité monofilní, nebo se skládá ze spletených vláken nebo vláken lehce skaných a potažených stejným materiálem. Může být barveno barvivou nebo pigmenty schválenými oprávněnou autoritou. Vlákno se sterilizuje.

## VLASTNOSTI

Je prakticky nerozpustné v běžných organických rozpouštědlech; není rozrušováno zředěnými alkalickými roztoky (např. roztokem hydroxidu sodného (100 g/l)), ale je rozrušováno zředěnými minerálními kyselinami (např. kyselinou sírovou (20 g/l)), horkou kyselinou octovou ledovou a 80% roztokem kyseliny mravenčí bezvodé.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. V plameni taje a hoří s charakteristickým pachem po celeru a za vzniku zbytku ve tvaru tvrdých kulových částic.
- B. Asi 50 mg se opatrně zahřívá ve svisle držené spalovací trubičce, až se začne vyvíjet hustý dým. Když dým vyplní trubičku, vyjme se trubička z plamene a vsune se do ní proužek *papíru nitrobenzaldehydového R*. Na papíru pomalu vzniká fialovohnědé zbarvení, které na vzduchu pomalu bledne; ihned zmizí opláchnutím *kyselinou sírovou zředěnou RS*.
- C. K asi 50 mg se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Materiál se i za studena rozpadne a během několika minut se rozpustí.
- D. Nerozpouští se v roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (70%), avšak rozpustí se v roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (80%).

## ZKOUŠKY

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

## SKLADOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

## OZNAČOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

V označení na obalu se uvede, zda je vlákno pletené, monofilní nebo potažené.

**FILUM POLYAMIDICUM-6 STERILE  
IN FUSO AD USUM VETERINARIUM****6.0:0609**Vlákno z polyamidu 6 sterilní v návínu  
pro veterinární použití

## DEFINICE

Získává se zvlákněním syntetického plastového materiálu, připraveného polymerací  $\epsilon$ -kapolaktamu, vhodným zařízením. Vlákno je buď hladké válcovité monofilní, nebo se skládá ze spletených vláken nebo vláken lehce skaných a potažených stejným materiálem. Může být obarveno barvivou schválenou oprávněnou autoritou. Vlákno se sterilizuje.

## VLASTNOSTI

Je prakticky nerozpustné v běžných organických rozpouštědlech; není rozrušováno zředěnými alkalickými roztoky (např. roztokem hydroxidu sodného (100 g/l)), ale je rozrušováno zředěnými minerálními kyselinami (např. roztokem kyseliny sírové (20 g/l)), horkou kyselinou octovou ledovou a 70% roztokem kyseliny mravenčí bezvodé.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- A. Asi 50 mg se 18 h zahřívá v zatavené skleněné zkumavce s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* při 110 °C a nechá se 6 h stát; nevzniknou žádné krystaly.
- B. K asi 50 mg se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Materiál se i za studena rozpadne a během několika minut se rozpustí.
- C. Rozpustí se v roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (70%).

## ZKOUŠKY

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)* a této zkoušce:

**Monomery a oligomery.** 1,00 g se 7 h extrahuje 30 ml *methanolu R* v přístroji pro kontinuální extrakci rychlostí nejméně tři extrakce za hodinu. Extrakt se odpaří do sucha, odparek se suší 10 min při 110 °C a po zchladnutí v exsikatoru se zváží. Hmotnost odparku je nejvýše 20 mg (2 %).

## SKLADOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

## OZNAČOVÁNÍ

Viz článek *Fila non resorbilia sterilia in fuso ad usum veterinarium (0605)*.

V označení na obalu se uvede, zda je vlákno pletené, monofilní nebo potažené.

## VATY

## LANA CELLULOSI REGENERATI

6.0:0034

## Viskózová vata

*Synonymum.* Lanugo cellulosi absorbens

## DEFINICE

Jsou to nová bělená a pečlivě mykaná vlákna regenerované celulosy získané viskózovým postupem, s přísadkou nebo bez přísadky oxidu titaničitého, o délkové hmotnosti 1,0 dtex až 8,9 dtex (dtex = hmotnost 10 000 m vlákna, vyjádřeno v gramech) a nastříhaná na vhodnou délku. Neobsahuje žádné opticky zjasňovací látky.

## VLASTNOSTI

Je bílá nebo velmi slabě žlutá, lesklého nebo matného vzhledu a měkká na dotyk.

## ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

**A.** Vlákna viskózové stříže mohou být plná nebo dutá; dutá vlákna mohou mít buněčnou dutinu nekonečnou nebo mohou být dělená. Vlákna mají průměrnou délku 25 mm až 80 mm a při pozorování pod mikroskopem v suchém stavu nebo po promytí *ethanolem 96% R* a *vodou R* mají následující vlastnosti. Jsou obvykle přibližně stejné šířky, s mnoha podélnými rovnoběžnými čarami, které jsou nepravidelně rozmístěny po celé šířce. Ustřížené konce vláken jsou přibližně rovné. Matná vlákna obsahují četné granulované částičky o průměru asi 1  $\mu\text{m}$ .

*Plná vlákna.* V podélném pohledu může být povrch vláken nerovný nebo zoubkovaný. Vlákna s přibližně kruhovým nebo eliptickým příčným průřezem mají průměr asi 10  $\mu\text{m}$  až 20  $\mu\text{m}$ . Zploštělá vlákna a vlákna zkroucená do pásku mají kolísavou šířku od 15  $\mu\text{m}$  do 20  $\mu\text{m}$ , podle toho, jak zkroucení vlákna ukazuje nejprve hlavní osu a poté vedlejší osu. Tloušťka je asi 4  $\mu\text{m}$ . Jiné plné příčné útvary, jako je tvar Y, mají přečnívající okraje s hlavní osou o délce 5  $\mu\text{m}$  až 25  $\mu\text{m}$  a vedlejší osou 2  $\mu\text{m}$  až 8  $\mu\text{m}$  šíře.

*Dutá vlákna.* Vlákna s nekonečnou buněčnou dutinou mají průměr asi do 30  $\mu\text{m}$ ; jsou tenkostěnná s tloušťkou stěny asi 5  $\mu\text{m}$ . Po promytí *ethanolem 96% R* a *vodou R* se buněčná dutina v mnoha vláknech snadno zjistí, neboť je v ní zachyceno mnoho vzduchových bublin.

*Dělená vlákna.* Tato vlákna mohou mít průměr do 80  $\mu\text{m}$ ; jsou dutá a mají centrální buněčnou dutinu, která je rozdělena do několika úseků. Jednotlivé úseky mají kolísavou velikost, avšak typická délka je do asi 60  $\mu\text{m}$ . Napříč každého vlákna mohou mít více než jeden dělený úsek. Po promytí vláken *ethanolem 96% R* a *vodou R* vykazují některé úseky zachycené vzduchové bublinky.

**B.** Působením *chloridu zinečnatého s jodem RS* se vlákna zbarví fialově.

**C.** K 0,1 g se přidá 10 ml *chloridu zinečnatého v kyselině mravenčí RS*, zahřeje se na 40 °C a za občasných protřepání se 2 h 30 min udržuje při této teplotě. Vzorek se zcela rozpustí s výjimkou matové varianty, kde zůstanou částičky oxidu titaničitého.

**D.** Zbytek získaný ve zkoušce Síranový popel se rozpustí mírným povařením v 5 ml *kyseliny sírové R*. Po ochlazení se přidá 0,2 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*. Roztok získaný z lesklé varianty nezmění barvu; roztok získaný z matové varianty se zbarví oranžovožlutě; intenzita zbarvení závisí na množství přítomného oxidu titaničitého.

## ZKOUŠKY NA ČISTOTU

**Roztok S.** 15,0 g se vloží do vhodné nádoby a přidá se 150 ml *vody R*. Nádoba se uzavře a vzorek se nechá 2 h vyluhovat. Roztok se slije, zbytek kapaliny se pečlivě vytlačí ze vzorku pomocí skleněné tyčinky a zamíchá se. 10 ml roztoku se uschová pro zkoušku Povrchově aktivní látky a zbytek se zfiltruje.

**Kysele nebo zásaditě reagující látky.** K 25 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolfaleinu RS* a k dalším 25 ml se přidá 0,05 ml *oranže methylové RS*. Žádný z obou roztoků se nezbarví růžově.

**Cizí vlákna.** Při pozorování pod mikroskopem jsou patrna výhradně typická viskózová vlákna, pouze ojediněle může být přítomno několik izolovaných cizích vláken.

**Fluorescence.** Vrstva o tloušťce asi 5 mm se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Vzorek může vykazovat pouze slabě hnědofialovou fluorescenci, s výjimkou několika izolovaných vláken nevykazuje intenzivní modrou fluorescenci.

## Nasákavost.

*Zařízení.* Suchý válcovitý košíček z měděného drátu o výšce 8,0 cm a průměru 5,0 cm. Průměr měděného drátu je asi 0,4 mm, velikost ok 1,5 cm až 2,0 cm a hmotnost košíčku je (2,7  $\pm$  0,3) g.

*Čas potopení.* Nejvýše 10 s. Košíček se zváží s přesností na 0,01 g ( $m_1$ ). Do košíčku se volně vloží celkem 5,00 g, které se odeberou přibližně ve stejných množstvích z pěti různých míst zkoušeného výrobku, a naplněný košíček se zváží s přesností na 0,01 g ( $m_2$ ). Kádinka o průměru 11 cm až 12 cm se do výšky 10 cm naplní vodou o teplotě asi 20 °C. Košíček držený v horizontální poloze se z výšky asi 10 mm spustí do vody. Stopkami se změří čas, za který se košíček potopí pod hladinu vody. Výsledek se vypočítá jako průměr ze tří měření.

*Nasávací mohutnost.* Nejméně 18,0 g vody na gram. Po změření rychlosti potopení se košíček vyjme z vody, nechá se přesně 30 s odkapat nad kádinkou zavěšený ve vodorovné poloze, poté se přemístí do předem zvážené kádinky ( $m_3$ ) a zváží se s přesností na 0,01 g ( $m_4$ ). Nasávací mohutnost 1 gramu vaty se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_4 - (m_2 + m_3)}{m_2 - m_1}$$

Výsledek se vyjádří jako průměr ze tří měření.

**Látky rozpustné v etheru.** Nejvýše 0,30 %; 5,00 g se extrahuje *etherem R* 4 h v extrakčním přístroji rychlostí nejméně čtyři extrakce za hodinu. Etherový extrakt se odpaří a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

**Extrahovatelné barevné látky.** 10,0 g se pomalu extrahuje v úzkém perkolátoru *ethanolem 96% R*, až se získá 50 ml extraktu. Kapalina není zbarvena intenzivněji (2.2.2, *Metoda II*) než porovnávací barevný roztok Ž<sub>5</sub>, ŽŽ<sub>6</sub> nebo porovnávací modrý roztok připravený takto: ke 3,0 ml základního modrého roztoku se přidá 7,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l HCl). 0,5 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l HCl) na 10,0 ml.

**Povrchově aktivní látky.** 10 ml roztoku S odděleného před filtrací se převede do odměrného válce na 25 ml se zabrušenou skleněnou zátkou a s vnějším průměrem 20 mm a tloušťkou stěn menší než 1,5 mm, který byl předem vypláchnut třikrát *kyselinou sírovou R* a potom *vodou R*. Intenzivně se třicetkrát 10 s třepe, potom se nechá stát 1 min a třepání se opakuje. Po 5 min pěna nepokrývá celý povrch kapaliny.

**Látky rozpustné ve vodě.** Nejvýše 0,70 %; 5,00 g se 30 min vaří v 500 ml *vody R* za častého míchání. Odpařený objem vody se nahradí. Kapalina se slije, zbytek kapaliny se ze vzorku pečlivě vymačká pomocí skleněné tyčinky a zamíchá se. Ještě za horka se kapalina zfiltruje. 400 ml filtrátu (odpovídá 4/5 hmotnosti daného vzorku) se odpaří a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

**Sirovodík.** K 10 ml roztoku S se přidá 1,9 ml *vody R*, 0,15 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 1 ml *octanu olovnatého RS*. Po 2 min není roztok zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně z 0,15 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R*, 1,7 ml základního roztoku *olova* (10 µg Pb/ml) a 10 ml roztoku S.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 13,0 %; 5,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

**Síranový popel** (2.4.14). Nejvýše 0,45 % v lesklé variantě a nejvýše 1,7 % v matné variantě. 5,00 g se vloží do předem vyžíhaného, ochlazeného a zváženého kelímku. Opatrně se zahřívá nad přímým plamenem a pak se opatrně žihá do tmavočerveného žáru při 600 °C. Po ochlazení se přidá několik kapek *kyseliny sírové zředěné RS* a dále se zahřívá a žihá, až zmizí všechny černé částice. Po zchlazení se přidá několik kapek *uhličitanu amonného RS*. Odpaří se a opatrně žihá, potom se ochladí a znovu zváží. Žihání se opakuje v intervalech 5 min do konstantní hmotnosti.

#### SKLADOVÁNÍ

V prachotěsném obalu, chráněna před vlhkostí.

## LANA GOSSYPHII DEPURATA

7.0:0036

### Čištěná obvazová vata bavlněná

*Synonymum.* Lanugo gossypii absorbens

#### DEFINICE

Jsou to nová vlákna nebo rouna dobré kvality získaná ze semen různých druhů rodu *Gossypium L.* Upravují se praním, čištěním, bělením a poté pečlivým mykáním. Neobsahují opticky zjasňující látky.

#### VLASTNOSTI

Bílá nebo téměř bílá vlákna průměrné délky nejméně 10 mm, stanoveno vhodnou metodou, a obsahující nejvýše stopy zbytku listů, oplodí, slupek semen nebo jiných nečistot. Jsou značně odolná v tahu. Při mírném třepání uvolňují nepatrné množství prachu.

#### ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

- Mikroskopicky se každé vlákno jeví jako jednobuněčné o délce do asi 4 cm a šířce do 40 µm. Má tvar zploštělé a často zkroucené trubice se tlustými zaoblenými stěnami.
- Působením *chloridu zinečnatého s jodem RS* se vlákna zbarví fialově.
- K 0,1 g se přidá 10 ml *chloridu zinečnatého v kyselině mravenčí RS*, zahřeje se na 40 °C a za občasného třepání se 2 h 30 min nechá stát; vzorek se nerozpustí.

#### ZKOUŠKY

**Roztok S.** 15,0 g se vloží do vhodné nádoby a přidá se 150 ml *vody R*. Nádoba se uzavře a vzorek se nechá 2 h vyluhovat. Roztok se slije, zbytek tekutiny se pečlivě vytlačí ze vzorku pomocí skleněné tyčinky a zamíchá se. 10 ml roztoku se uchová pro zkoušku Povrchově aktivní látky a zbytek se zfiltruje.

**Kysele nebo zásadité reagující látky.** K 25 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a k dalším 25 ml se přidá 0,05 ml *oranže methylové RS*. Žádný z obou roztoků se nezbarví růžově.

**Cizí vlákna.** Při pozorování pod mikroskopem jsou patrna výhradně typická vlákna bavlny, pouze ojediněle může být přítomno několik izolovaných cizích vláken.

**Fluorescence.** Vrstva o tloušťce asi 5 mm se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Vzorek může vykazovat pouze slabě hnědofialovou fluorescenci a několik žlutých částic, s výjimkou několika izolovaných vláken nevykazuje intenzivní modrou fluorescenci.

**Nopky (uzlíčky).** Asi 1 g se stejnoměrně rozprostře mezi dvě bezbarvé průsvitné čtvercové desky o straně 10 cm. Zkouší se světelná propustnost vzorku a porovnává se s *vatovým standardem pro nopky CRL*. Zkoušený výrobek nemá více nopků než standard.

#### Nasákavost.

*Zařízení.* Suchý válcovitý košíček z měděného drátu o výšce 8,0 cm a průměru 5,0 cm. Průměr měděného

drátu je asi 0,4 mm, velikost ok 1,5 cm až 2,0 cm a hmotnost košíčku je  $(2,7 \pm 0,3)$  g.

**Čas potopení.** Nejvýše 10 s. Košíček se zváží s přesností na 0,01 g ( $m_1$ ). Do košíčku se volně vloží 5,00 g, které se odeberou přibližně ve stejných množstvích z pěti různých míst zkoušeného výrobku, a naplněný košíček se zváží s přesností na 0,01 g ( $m_2$ ). Kádinka o průměru 11 cm až 12 cm se do výšky 10 cm naplní vodou o teplotě asi 20 °C. Košíček držený v horizontální poloze se z výšky asi 10 mm spustí do vody. Stopkami se změří čas, za který se košíček potopí pod hladinu vody. Výsledek se vypočítá jako průměr ze tří měření.

**Nasávací mohutnost.** Nejméně 23,0 g vody na gram. Po změření rychlosti potopení se košíček vyjme z vody, nechá se přesně 30 s odkapat nad kádinkou zavěšený ve vodorovné poloze, poté se přemístí do předem zvážené kádinky ( $m_3$ ) a zváží se s přesností na 0,01 g ( $m_4$ ). Nasávací mohutnost 1 gramu vaty se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_4 - (m_2 + m_3)}{m_2 - m_1}$$

Výsledek se vyjádří jako průměr ze tří měření.

**Látky rozpustné v etheru.** Nejvýše 0,50 %. 5,00 g se 4 h v extrakčním přístroji extrahuje *etherem R* rychlostí nejméně čtyři extrakce za hodinu. Etherový extrakt se odpaří a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

**Extrahovatelné barevné látky.** 10,0 g se pomalu extrahuje v úzkém perkolátoru *ethanolem 96% R*, až se získá 50 ml extraktu. Tekutina není zbarvena (2.2.2, *Metoda II*) intenzivněji než porovnávací barevný roztok  $Z_5$ ,  $Z_6$  nebo roztok připravený takto: ke 3,0 ml základního modrého roztoku se přidá 7,0 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l HCl); 0,5 ml tohoto roztoku se zředí

roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l HCl) na 10,0 ml.

**Povrchově aktivní látky.** 10 ml roztoku S odděleného před filtrací se převede do 25ml odměrného válce se zabroušenou skleněnou zátkou, s vnějším průměrem 20 mm a tloušťkou stěn nejvýše 1,5 mm, který byl předem vypláchnut třikrát *kyselinou sírovou R* a potom *vodou R*. Intenzivně se třicetkrát 10 s třepe, potom se nechá stát 1 min a třepání se opakuje. Po 5 min nesmí pěna pokrýt celý povrch tekutiny.

**Látky rozpustné ve vodě.** Nejvýše 0,50 %. 5,000 g se 30 min vaří v 500 ml *vody R* za častého míchání. Odpařený objem vody se nahradí. Tekutina se slije, zbytek tekutiny se ze vzorku pečlivě vytlačí pomocí skleněné tyčinky a zamíchá se. Ještě za horka se tekutina zfiltruje. 400 ml filtrátu (odpovídá 4/5 hmotnosti daného vzorku) se odpaří a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

**Ztráta sušením** (2.2.32). Nejvýše 8,0 %; 5,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

**Síranový popel** (2.4.14). Nejvýše 0,40 %. 5,00 g se vloží do předem vyžihaného, ochlazeného a zváženého kelímku. Opatrně se zahřívá nad přímým plamenem a pak se opatrně žihá do tmavočerveného žáru při 600 °C. Nechá se ochladit, přidá se několik kapek *kyseliny sírové zředěné RS* a dále se zahřívá a žihá, až zmizí všechny černé částice. Nechá se ochladit, přidá se několik kapek *uhlíkatu amonného RS*. Odpaří se a opatrně se žihá, potom se nechá ochladit a znovu se zváží. Žihání se opakuje v intervalech 5 min do konstantní hmotnosti.

#### SKLADOVÁNÍ

V prachotěsném obalu, chráněna před vlhkostí.