

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**STUDIUM PROBLEMATIKY STABILITY
LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ METODOU HPLC**

Disertační práce

2006

Mgr. Lucie Havlíková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, Doc. RNDr. Petru Solichovi Csc., za jeho odborné vedení po celou dobu mého postgraduálního studia. Díky za jeho rady, podporu, nápady a připomínky a díky za schválení a podporu účastnit se studijních pobytů na zahraničních univerzitách.

Moc a moc děkuji PharmDr. Lucii Novákové PhD. za její trpělivost a ochotu okamžitě mi pomoci a zodpovědět moje dotazy. Můj velký dík patří i PharmDr. Ludmile Matysové za její cenné rady při řešení dílčích problémů při vývoji a validaci metod. Oběma moc děkuji za příjemnou spolupráci a diskusi o odborných i neoborných problémech.

Děkuji grantovým agenturám FRVŠ a GAUK za finanční podporu mé práce a za možnost prezentovat získané výsledky na zahraničních konferencích. Dále děkuji stipendijní agentuře Landesstiftung Baden-Württemberg a Fondu mobility Univerzity Karlovy za finanční podporu mých zahraničních pobytů.

Můj největší dík patří mé rodině, zejména mým rodičům a sestře Ivě, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali, „fandili“ mi a snášeli moje rozporuplné psychické pochody.

Ráda bych poděkovala všem mým mladým kolegům na katedře analytické chemie, zejména Mgr. Janě Klimundové PhD., za přátelskou a prima kamarádskou atmosféru na pracovišti.

Prohlašuji, že předloženou disertační práci jsem vypracovala samostatně a že bylo čerpáno jen z uvedených citovaných zdrojů.

Lucie Havlíková

Seznam použitých zkratk

AAS	atomic absorption spectrometry - atomová absorbční spektrometrie
ACN	acetonitril
ADI	acceptable daily intake – akceptovatelný denní příjem
AES	atomic emission spectrophotometry - atomová emisní spektrometrie
AP	applicants part DMF - otevřená část DMF
API	atmospheric pressure ionization - ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku
APCI	atmospheric pressure chemical ionization - chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	atmospheric pressure photoionization – fotoionizace za atmosférického tlaku
ASMF	Active Substance Master File
BEH	bridged ethylsiloxane/silica hybrid – hybridní technologie silikagelu a polymeru
CAD	charged aerosol detector
CE	capillary electrophoresis - kapilární elektroforéza
CI	chemical ionization - chemická ionizace
CTD	Common technical document
ČL 2005	Český Lékopis 2005
DAD	diode array detector – detektor s diodovým polem
(E)DMF	Drug Master File – základní dokument o léčivé látce
EI	electron ionization - elektronová ionizace
ELSD	evaporative light scattering detector
ESI	electrospray ionization - ionizace elektrosprejem
FAB	fast atom bombardment - ionizace urychlenými atomy
FD	fluorescence detektor - fluorescenční detektor
FDA	Food and Drug Administration
FI	field ionization - ionizace polem
FIB	fast ion bombardment - ionizace urychlenými ionty
FT	Fourier transformation - Fourierova transformace
GC	gass chromatography - plynová chromatografie

HETP	height equivalent of theoretical plate – výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	high performance liquid chromatography - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ID	inner diameter - vnitřní průměr analytické kolony
IR	infra-red - infračervená oblast světla, infračervený
IS	internal standard - vnitřní standard
IT	ion-trap – iontová past
LC	liquid chromatography - kapalinová chromatografie
LD	laser desorption - desorpce laserem
LLE	liquid-liquid extraction - extrakce organickými rozpouštědly
LOD	limit of detection - limit detekce
LOQ	limit of quantitation - limit kvantifikace
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization - laserem indukovaná ionizace za účasti matrice
MeOH	methanol
MP	mobile phase - mobilní fáze
MS detektor	mass spectrometric detector - hmotnostně spektrometrický detektor
MS	mass spectrometry - hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandem mass spectrometry - tandemové spojení hmotnostních analyzátorů
NMR	nuclear magnetic resonance - nukleární magnetická rezonance
NP	normal phase – normální fáze
ODS	octadecylsilica - oktadecylsilyl, oktadecylsilika
PDA	photo-diode array – fotodiodové pole
PDE	permitted daily exposure – povolená denní expozice
Ph. Eur. 5	European Pharmacopoeia 5th Edition - Evropský Lékopis 5
Q	quadrupole - kvadrupólový analyzátor
QC	Quality Control – kontrola kvality (v oblasti léčiv)
QqQ	triple quadrupole - trojitý kvadrupól

RAM	restricted access material – materiál s omezeným přístupem
RIC	reconstructed ion current – rekonstruovaný iontový proud
RI detektor	refractive index detektor - refraktometrický detektor
RP	reversed phase – obrácené fáze, reverzní fáze
RP	restricted part DMF – uzavřená část DMF
RSD	relative standard deviation - relativní směrodatná odchylka
SFE	supercritical fluid extraction - superkritická fluidní extrakce
SLP	správná laboratorní praxe
SP	stationary phase - stacionární fáze
SPE	solid phase extraction - extrakce na pevnou fázi
SPME	solid phase microextraction - mikroextrakce na pevnou fázi
SST	System Suitability Test - Test vhodnosti systému
SÚKL	Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv
SVP	správná výrobní praxe
TDI	tolerable daily intake – tolerovaný denní příjem
TDI	total daily intake – celkový denní příjem
TIC	total ion current – celkový iontový proud
TLC	thin layer chromatography - tenkovrstvá chromatografie
TOF	time of flight - analyzátor doby letu
TSI, TS	thermospray ionization - ionizace termosprejem
UPLC	ultraperformance liquid chromatography – ultra-účinná kapalinová chromatografie
USP 29	United States Pharmacopeia 29 - Americký lékopis 29
UV	ultra-violet - ultrafialový/á
UV-VIS	ultra-violet/visible - ultrafialová-viditelná oblast světla

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl.....	9
3	Teoretická část	10
3.1	Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků	10
3.1.1	Léčivá (účinná) látka	15
3.1.2	Léčivý (konečný) přípravek.....	15
3.1.3	Protokol o stabilitě	17
3.2	Nečistoty v léčivých látkách a léčivých přípravcích	20
3.2.1	Nečistoty v léčivých substancích.....	24
3.2.2	Nečistoty v léčivých přípravcích	26
3.3	Základní dokument o léčivé látce (Active Substance Master File, ASMF) ...	32
3.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	35
3.4.1	Instrumentace v HPLC.....	37
3.4.1.1	Zásobník mobilní fáze	38
3.4.1.2	Vysokotlaká čerpadla.....	38
3.4.1.3	Zařízení pro dávkování vzorku	39
3.4.1.4	Chromatografické kolony	40
3.4.1.5	Detektory	44
3.5	Charakteristiky chromatografického procesu	47
3.5.1	Retenční data.....	47
3.5.2	Chromatografická data.....	48
3.5.3	Separční data	50
3.5.4	Dynamická van Deemterova teorie.....	53
3.6	Postup při vývoji nové chromatografické metody	54
3.6.1	Kvalitativní a kvantitativní analýza	59
3.7	Validace analytické metody	61
3.7.1	Analytický postup	62
3.7.2	Test způsobilosti chromatografického systému	62
3.7.3	Vlastní validace analytické metody	64
3.8	Analýza léčivých přípravků	68
3.8.1	Příprava vzorků léčivých přípravků.....	68
3.8.2	Příprava vzorků biologického materiálu.....	70
3.9	Spojení kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS)	71
3.9.1	Hmotnostní spektrometrie.....	71
3.9.2	Ionizační techniky	72
3.9.3	Hmotnostní analyzátory	75
3.9.4	Spojení kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS) .	77
3.10	Ultra Performance Liquid Chromatography	80
4	Experimentální část.....	83
4.1	Indomethacin gel.....	83
4.2	Terbinafin krém	84
4.3	Calcium Pantotenát mast	85
4.4	Estrogel gel	85
4.5	Amastol neo	86
4.6	Heparin gel.....	88
4.7	UPLC analýza vitamínu A a E.....	93
4.8	Erythromycin	96
4.8.1	HPLC analýza erythromycin-estolátu.....	97
4.8.2	HPLC/MS analýza erythromycin-laktobionátu	102

5	Přílohy.....	108
5.1	Přehled publikovaných prací	108
5.2	Příloha 1:.....	111
5.3	Příloha 2:.....	119
5.4	Příloha 3:.....	128
5.5	Příloha 4:.....	134
5.6	Příloha 5:.....	143
5.7	Příloha 6:.....	154
6	Shrnutí.....	179
7	Summary.....	182
8	Závěr	184
9	Seznam použité literatury	186

1 ÚVOD

V současné době je kladen stále větší důraz na zajištění co nejvyšší kvality a bezpečnosti léčivých přípravků.

Většina léčivých přípravků obsahuje směs chemicky odlišných individuí, od účinných látek přes různé pomocné látky, až po možné degradační produkty a případně jiné nečistoty z výrobního procesu.

Přítomnost nečistot a degradačních produktů je nepochybně nežádoucí a je nutné provádět identifikaci a sledovat hladiny přítomných nečistot případně vzniklých rozkladných produktů účinných látek. V kontrolních laboratořích se provádí kontrola výchozích surovin pro výrobu farmaceutických přípravků, výrobků při mezioperační kontrole a rovněž souhrnné hodnocení konečných produktů buď ve formě jednotlivých substancí nebo konkrétních léčivých přípravků. Sleduje se měnící se koncentrace rozkladných produktů v průběhu doby uchovávání (tzv. stabilitní testy). Koncentrace vznikajících rozkladných produktů ve srovnání s účinnými látkami či konzervačními přísadami bývají většinou velmi nízké (nečistota bývá obsažena v množství maximálně 0,1 – 2 % původního obsahu hlavní účinné látky), proto je důležité, aby metoda byla dostatečně citlivá a vhodná pro stanovení látek v dostatečně širokém koncentračním rozmezí.

Je tedy nutné vyvíjet a validovat nové analytické metody pro stanovení nejen účinných látek, ale také především jejich degradačních produktů v různých typech léčivých přípravků. Tyto nové analytické metody by měly umožnit v jednom kroku dokonalou separaci obsažených látek zároveň s jejich identifikací a kvantifikací. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) výše uvedené požadavky splňuje, je zde metodou volby. Výhodou jejího použití je právě možnost provedení kompletní analýzy vzorku v jednom kroku, zahrnující separaci několika látek směsi zároveň s jejich identifikací za použití standardu a kvantifikací v širokém koncentračním rozmezí po vytvoření kalibrační závislosti a ověření linearity.

2 CÍL

Cílem předložené disertační práce je vyvinout nové HPLC metody pro současné stanovení hlavní účinné látky, požadovaných nečistot a případně konzervačních přísad ve vybraných topických léčivých přípravcích. Tyto metody je potřeba zvalidovat, aby mohly být následně použity pro účely stabilitních studií ve farmaceutické praxi.

Prvním krokem při vypracování každé analytické metody je zpracování podrobné rešerše o daném problému, s využitím dostupných databází (Science Direct a Analytical abstract 1980-2004 na CD-ROM). Cílem takovéto rešerše je shrnutí základních poznatků o sledovaných látkách a již v minulosti vyvinutých metodách.

Ve specifikaci daného léčivého přípravku a léčivé látky je předem určené, jaké nečistoty se budou vedle hlavní účinné látky sledovat.

Důležitým krokem při vývoji nové chromatografické metody je optimalizace separačních podmínek pro stanovení daných látek především ve smyslu nalezení nejvhodnější mobilní fáze a jejího průtoku, detekční vlnové délky a porovnání jednotlivých typů stacionárních fází s následnou volbou vhodné chromatografické kolony.

Nezbytnou součástí využívané metodiky je samozřejmě i vhodný izolační postup pro účinnou látku a degradační produkty. Výsledky analýzy může zvolený způsob extrakce výrazně ovlivnit. Nutností je tedy dostatečná reprodukovatelnost a účinnost zvoleného způsobu izolace.

Po optimalizaci chromatografických a izolačních podmínek následuje validace nové metody, tedy ověření vhodnosti metody pro její zamýšlené užití. Nezbytnou součástí je určení parametrů SST (System suitability test, který zahrnuje opakovatelnost analýzy, rozlišení a asymetrii píků a účinnost chromatografické kolony) a validačních parametrů zvoleného chromatografického systému (správnost, přesnost, linearita v testovacím koncentračním rozmezí, selektivita, robustnost a limit detekce a kvantifikace).

Výsledky provedených experimentů při vývoji a validaci HPLC metod pro sledování stability vybraných léčivých přípravků jsou shrnuty v Experimentální části předložené práce a byly většinou již publikovány v mezinárodních vědeckých časopisech.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Stabilita léčivých látek a léčivých přípravků^a

Testování stability slouží k ověření stability účinné látky nebo léčivého přípravku, což je vlastnost léčiva, zachovat si ve stanovených mezích, po určitou dobu a za stanovených podmínek skladování deklarované jakostní znaky, a tím i bezpečnost, účinnost a aplikovatelnost.

Cílem stabilitních zkoušek je prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů prostředí, doporučit podmínky uchovávání a stanovit dobu reatestace pro léčivou látku („re-test period“) a dobu použitelnosti pro konečný přípravek („shelf-life“).

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), která se sešla v roce 1995 v Japonsku, zavedla směrnice (guidelines) týkající se testování stability nových léčivých látek a přípravků: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2) [1], Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B [2] a Stability Testing for New Dosage Forms Q1C [3]. Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) vypracoval pokyn [4] týkající se zásad provedení stabilitní studie, informace o stabilitě léčivé látky a konečného přípravku jsou součástí registrační dokumentace.

Mírou stability je doba použitelnosti léčivé látky nebo léčivého přípravku. Pro přípravky připravované v lékárně postačuje doba použitelnosti několik týdnů nebo dnů v závislosti na charakteru přípravku. Pro hromadně vyráběné léčivé přípravky (HVLP) se deklaruje doba použitelnosti 2 až 5 let. Stabilita přípravku se hodnotí stabilitním testem, kdy v určitých časových intervalech jsou posuzovány změny jakosti, např. změna obsahu účinné látky. Při vývoji léčivých přípravků se sleduje také kompatibilita jednotlivých složek. Sledování kompatibility je krátkodobá zkouška (řádově hodiny až týdny). Stabilitní zkoušky probíhají měsíce až roky.

Při zavádění nového léčivého přípravku na trh je vhodné znát chování přípravku při styku s vodou, kyselinami nebo látkami oxidujícími či redukujícími. Provádí se tzv. stresové zkoušky (zátěžové zkoušky). Sleduje se odolnost struktury vůči extrémním vlivům - UV záření a oxidace, rozklad za zvýšené teploty, chování v kyselém a zásaditém prostředí, sledují se podmínky, za kterých se látka rozkládá, provádí se

^a Text kapitoly 3.1 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [4][5][6][7] a [7].

identifikace rozkladných produktů a zjišťuje se chemismus rozkladných reakcí. Rozkladné reakce se kvantifikují a je sledována jejich kinetika. Tím se rozumí zjištění řádu rozkladné reakce, výpočet rychlostní konstanty, výpočet $t_{0,9}$ – doby, kdy koncentrace klesne na 90%, výpočet aktivační energie (E_a).

Extrapolace doby použitelnosti a kinetika rozkladných reakcí

Doba použitelnosti při dlouhodobých stabilitních zkouškách přímo vyplývá z hodnocení vzorků v termínovaných odběrech. Při kratším průběhu stabilitního testu za předepsaných podmínek je zde možnost předpovědi doby použitelnosti přípravku z parametrů rozkladné reakce.

Rozkladné reakce probíhají nejčastěji podle kinetiky 1. řádu. Reakce prvního řádu jsou charakterizovány tím, že reakční rychlost je za dané teploty přímo úměrná koncentraci pouze jediné výchozí látky. Graficky můžeme průběh reakce 1. řádu znázornit například zakreslením okamžité koncentrace proti času. Křivka, kterou takto získáme, je klesající exponenciála.

Pro reakce prvního řádu platí rovnice:

$$\log c = \log c_0 - \frac{K \cdot t}{2,303}$$

v němž značí:

- K rychlostní konstanta [s^{-1}]
- t čas
- c koncentrace sledované látky
- c_0 počáteční koncentrace sledované látky

Grafem závislosti $\log c = f(t)$ je přímka. Pro výpočet rychlostní konstanty se používá hodnota směrnice ($\text{tg } \alpha$) této přímky:

$$K = -2,303 \text{ tg } \alpha$$

Pro reakce prvního řádu platí, že hodnota $t_{0,9}$ nezávisí na původní koncentraci sledované látky.

$$t_{0,9} = \frac{0,1054}{K}$$

Aktivační energie E_a vyjadřuje energii, kterou musí molekula získat, aby rozkladná reakce proběhla. Teplotní závislost rychlostní konstanty vyplývá z Arrheniovy rovnice (teplotní závislost rychlostní konstanty K).

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{2,303 \cdot RT}$$

v němž značí:

- A frekvenční faktor
- R univerzální plynová konstanta
- T absolutní teplota kelviny
- E_a aktivační energie

Na základě znalosti hodnoty rychlostní konstanty a aktivační energie lze pomocí uvedených vzorců vypočítat dobu použitelnosti léčivého přípravku při dané skladovací teplotě. Dobu použitelnosti je také možné odečíst z grafu při extrapolaci hodnot koncentrace.

Mezi faktory, které mohou ovlivňovat stabilitu patří: čas, teplota, vlhkost, místo výroby, světlo, léková forma, dodavatelé, velikost a typ obalu, naplněný objem, šarže a síla přípravku.

Sleduje se stabilita fyzikální, chemická, biologická a mikrobiální. V tabulce 1 jsou uvedeny požadavky jakosti při stabilitní zkoušce.

Znaky jakosti	Požadavky na stabilitu
Fyzikální	Původní fyzikální vlastnosti včetně vzhledu zůstávají zachovány ve stanovených mezích
Chemické	Obsah léčivých látek, pomocných látek a rozkladných produktů je ve stanovených mezích (minimálně 90% účinné látky, 80% konzervačních přísad)
Biologické	Biologická účinnost se nemění nebo její míra zůstává ve stanovených mezích, nedochází ke zvýšení toxicity a jiných negativních biologických jevů
Mikrobiologické	Zůstává zachována požadovaná mikrobiologická čistota

Tab. 1: Požadavky na znaky jakosti při stabilitní zkoušce.

Fyzikální změny

Fyzikální nestabilita se u směsí tuhých látek projevuje nejčastěji změnou krystalické struktury, obsahu vody (vlhkosti), případně sublimací. Pokud jsou tuhé látky

dispergované v kapalině nebo je dispergovaná směs omezeně mísitelných kapalin, projevuje se nestabilita změnou velikosti částic, oddělením fází, snížením obsahu těkavých látek. Je-li pevná látka rozpuštěna v kapalině, může se vysrážet a krystalizovat.

Chemické změny

Léčivé látky a přípravky jsou náchylné zejména na hydrolýzu a oxidativní změny. Dále může dojít k dekarboxylaci, fotolýze, racemizaci, redukci nebo polymerizaci.

Hydrolýza – hydrolytickému rozkladu podléhají nejčastěji látky typu esterů (např. kyselina acetylsalicylová), amidy, anilidy a karbamáty, ale i laktony, thioestery a thioamidy a další. Hlavní ochranou před hydrolýzou je příprava jiných lékových forem, než jsou vodné roztoky. Pokud se vodné roztoky připravují a skladují, je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím stabilitu volba optimálního pH. U pevných lékových forem může hydrolýzu vyvolat obsah vody přítomný v tabletách či tobolkách (vlhkost). Vhodnou volbou úpravy účinných a pomocných látek lze hydrolýze předejít (např. vysušení látek, mkrokapsulace).

Oxidace – na oxidaci jsou citlivé především sloučeniny obsahující ve své molekule násobné vazby (nenasyčené mastné kyseliny, terpeny), oxidaci podléhají aldehydy, ketony, fenoly, terciární aminy a další skupiny látek. Oxidace je často spojena s přijetím kyslíku nebo s odebráním vodíku. Redoxní reakce probíhají často ve více stupních. Látka se oxiduje tím snadněji, čím má menší redoxní potenciál, a tak se bude její oxidace při vyšším pH zrychlovat (redoxní potenciál se zmenšuje zvýšením pH). U některých léčivých látek byly nalezeny vhodné hodnoty pH na potlačení oxidativního rozkladu. Oxidaci vzdušným kyslíkem ovlivňuje kromě pH i světlo, teplo, katalyticky působí těžké kovy. Látky podléhající oxidativnímu rozkladu lze stabilizovat vyloučením faktorů, které oxidaci způsobují, iniciují a urychlují (např. použití inertních plynů u parenterálií ve vzduchotěsném obalu, snížení pH ve vodných roztocích), nebo použitím antioxidačních látek. Primární antioxidanty jsou látky, které mají nižší redoxní potenciál než léčivé látky a oxidují se rychleji a vychytávají kyslík, který ohrožuje léčivou látku. Sekundární antioxidanty bývají komplexotvorné látky.

Fotolýza – fotochemický rozklad (fotolýza) způsobuje ultrafialová a viditelná část spektra. K látkám citlivým na světlo patří například: furosemid, nitrazepam a tetracyklin. Světlo může mít negativní vliv i na pomocné látky. Nejlepší ochranou před fotolýzou je volba vhodného obalu.

Změna optické aktivity – ke změně optické aktivity dochází u chirálních látek. Při racemizaci se opticky aktivní sloučenina mění na směs enantiomerů. Přitom jeden z enantiomerů může mít odlišný farmakodynamický efekt, což se projeví ztrátou účinnosti (isoprenalin, hyoscyamin). Stabilizace chirálních látek se provádí ochranou před světlem, skladováním za nižších teplot a hledáním optimální hodnoty pH.

Dekarboxylace – dekarboxylace závisí na pH, rozpouštědle a případném katalytickém vlivu vícemocných kationů.

Biologická stabilita

Změny v biologické aktivitě bývají výsledkem změn chemických, ale i fyzikálních v hotovém léčivém přípravku. Většinou se biologicky hodnotí enzymaticky aktivní peptidy, různé hormony. Zabránit nežádoucím změnám v biologické aktivitě u citlivých látek lze skladováním za snížené teploty, ochranou před vzdušným kyslíkem, přípravou vhodných lékových forem (např. lyofilizáty) a vhodným pH prostředí během výroby. Projevem biologické nestability může být i změna toxicity léčivé látky.

Mikrobiologická stálost

Při výrobě a skladování jsou léčivé látky vystaveny nebezpečí mikrobiologické kontaminace bakteriemi, kvasinkami a plísněmi. Důsledkem mikrobiální kontaminace je vždy porušení jakosti přípravku. Mikrobiologické zkoušky se provádějí při dlouhodobých stabilitních testech na počátku a pak v ročních intervalech.

Stabilitní studie účinných látek slouží tedy k ověření vhodnosti způsobu syntézy, určení kritických vlastností látek, určení rozkladných produktů, určení podmínek uchovávání a vhodného typu obalu, získání limitů zkoušek a stanovení termínu reanalýzy. U léčivého přípravku je účelem testů ověření vhodného složení a výrobního postupu, vhodnosti zvoleného obalu, stanovení doby použitelnosti a podmínek skladování, získání limitů zkoušek a zdůvodnění použití konzervačních látek.

Ve stabilitní studii se sledují všechny parametry konečného přípravku, které se mohou během skladování měnit a které by mohly mít vliv na jeho kvalitu, bezpečnost nebo účinnost. Stabilitní studie hodnotí fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické vlastnosti, obsah konzervačních látek či antioxidantů, zkoušky funkčnosti (např. zkouška homogenity podané dávky u inhalačních přípravků) v závislosti na použité lékové formě. Zkoušky musí být provedeny za použití validovaných a stabilitu indikujících kontrolních metod.

3.1.1 Léčivá (účinná) látka

Informace o stabilitě léčivé látky jsou nedílnou součástí dokumentace k hodnocení stability léčivého přípravku. U nelékopisné léčivé látky je nutné uvést informace o mechanismu degradace buď jako odkaz na vědeckou literaturu, nebo je potřeba provést zátěžové zkoušky. U lékopisné léčivé látky, v jejíž monografii jsou informace o rozkladných produktech, není potřeba udávat žádné údaje. Ve specifikaci jsou uvedeny rozkladné produkty, které by mohly vznikat během dlouhodobé a zrychlené stabilitní studie. U zkoušek jsou uvedeny číselné limity, rozmezí, příp. další kritéria popsanych zkoušek. Zdůvodnění těchto limitů má být založeno na požadavcích bezpečnosti nebo účinnosti. Dále je doloženo, že všechny potenciální nečistoty (rozkladné produkty i nečistoty pocházející ze syntézy nebo výrobního prostupu) jsou dostatečně kontrolovány.

3.1.2 Léčivý (konečný) přípravek

Stabilitní studie léčivého přípravku vždy vycházejí ze znalosti chování a vlastností účinné látky a lékové formy.

Stabilita se ověřuje dlouhodobými stabilitními zkouškami za skutečných podmínek skladování, které musí pokrýt celou dobu použitelnosti. Dlouhodobé stabilitní zkoušky jsou prováděny s četností poskytující informace o stabilitním profilu léčivého přípravku. Přípravek se hodnotí na počátku studie, dále každé 3 měsíce během prvního roku, každých 6 měsíců během druhého roku a dále jednou ročně až do navrhované doby použitelnosti, poslední stabilitní charakteristikou je výstupní kontrola dané šarže. Dlouhodobé zkoušení se provádí za podmínek skladování shodných s podmínkami uvedenými na obalu přípravku, teplota je udržována na horní hranici předepsaného rozmezí teplot při relativní vlhkosti 60 %. Není-li na obalu způsob skladování vyznačen, rozumí se skladování za normálních podmínek (do 25°C a 60 % relativní vlhkost).

Dlouhodobé stabilitní zkoušky může za určitých podmínek nahradit stabilitní studie zrychlená, prováděná obvykle 6 měsíců při teplotě 40°C a relativní vlhkosti 75 % nebo po dobu 1 roku při teplotě 30°C a 60 % relativní vlhkosti. U zrychlené stabilitní studie se stanovení provádí v období 0, 3 a 6 měsíců.

Jestliže dojde v průběhu 6 měsíců za podmínek zrychlené stabilitní studie k významné změně, provede se další stabilitní studie za přechodných ("intermediate") podmínek uchovávání a vyhodnotí se podle kritéria pro „významnou změnu“. Za významnou změnu je považována situace, kdy nastane 5 % pokles obsahu léčivé látky vzhledem k počáteční hodnotě a pokud obsah jakéhokoli rozkladného produktu nevyhovuje specifikaci. Dále pokud specifikaci nevyhovuje hodnota pH, fyzikální vlastnosti a zkoušky funkčnosti. U stabilitní studie za přechodných ("intermediate") podmínek uchovávání se stanovení provádí v časovém rozmezí 0, 6, 9 a 12 měsíců.

Zrychlené zkoušky jsou doplněny alespoň půlroční dlouhodobou stabilitní studií. Z těchto zkoušek lze odvodit dobu použitelnosti nejvýše 2 roky při skladování do 25°C.

Stabilitní studie se provádí na šaržích léčivého přípravku stejného složení, ve stejném obalu a se stejným uzávěrem, jaký je navržen pro farmaceutický trh. Stabilitní studie jsou prováděny pro každou jednotlivou sílu konečného přípravku a pro každou velikost vnitřního obalu.

Provádí se stanovení obsahu účinné látky (obsah účinné látky nesmí být nižší než 90 % deklarace) přítomných konzervačních látek (obsah konzervačních látek nesmí být nižší než 80 % deklarace), event. dalších pomocných látek, sleduje se obsah případných rozkladných produktů (s uvedením limitů, metod a validace). Léčivý přípravek je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 25 °C a 60 % relativní vlhkosti po dobu 2 let a za podmínek uchovávání 40 °C a 75 % relativní vlhkosti po dobu 6 měsíců.

Při podání žádosti o registraci musí být výsledky dlouhodobé stabilitní studie doloženy nejméně v délce 6 měsíců nebo 12 měsíců a studie má pokračovat dále do délky celé navrhované doby použitelnosti. Jestliže v době, kdy je registrace schválena, nejsou doloženy kompletní výsledky dlouhodobé stabilitní studie v délce celé schválené doby použitelnosti, je třeba, aby se žadatel zavázal k tomu, že stabilitní studie bude pokračovat tak, aby byla doba použitelnosti potvrzena.

Podmínky uchovávání pro dlouhodobé, zrychlené a přechodné stabilitní studie konečného přípravku jsou upřesněny v následující tabulce (Tab. 2). Pro přípravky, které je nutno uchovávat v chladu, se dlouhodobé zkoušky provedou v režimu 5 °C ± 3 °C po dobu minimálně 6 měsíců a zrychlené zkoušky v režimu 25 °C ± 2 °C/60 % RV (relativní vlhkost) ± 5 % RV po dobu 6 měsíců. Pro přípravky, které je nutno

uchovávat v mrazu se provedou dlouhodobé zkoušky v režimu $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálně 6 měsíců.

	Podmínky uchovávání	Minimální délka při podání žádosti o registraci
Dlouhodobé zkoušky*	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$ nebo $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$	6 měsíců (běžné LF) 12 měsíců (kritické, nestabilní LL)
Přechodné zkoušky	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$	6 měsíců
Zrychlené zkoušky	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$	6 měsíců

Tab. 2: Podmínky uchovávání pro provedení stabilitních studií.

* Je na uvážení, zda se provedou dlouhodobé stabilitní studie při $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RV}$ (relativní vlhkost) $\pm 5\%$ nebo při $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RV} \pm 5\% \text{ RV}$. V druhém případě nejsou již zapotřebí žádné další výsledky zkoušek prováděných za přechodných ("intermediate") podmínek uchovávání.

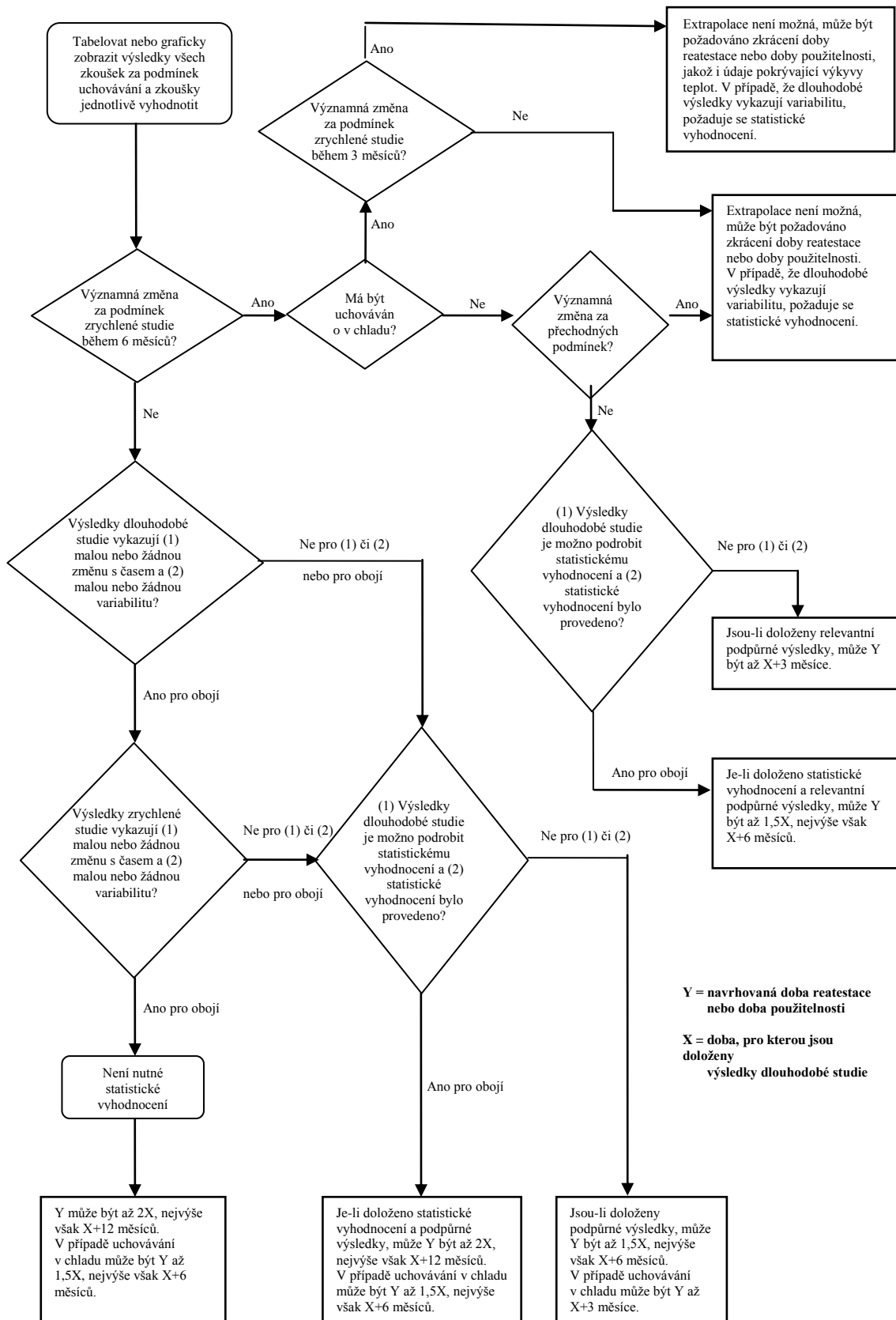
Specifikace pro konečný produkt (léčivý přípravek) by měly obsahovat následující údaje (více ke specifikaci v kapitole 2.1.):

- a) předepsaný název produktu, případně referenční označení,
- b) složení produktu, nebo odkaz na dokument, kde je lze nalézt,
- c) popis lékové formy (látky) a podrobné údaje o obalu,
- d) předepsaný způsob odběru vzorků a jejich zkoušení nebo odkaz na dokument, kde je lze nalézt,
- e) kvalitativní a kvantitativní požadavky, včetně jejich limitů,
- f) podmínky skladování, případná další opatření pro skladování,
- g) doba použitelnosti produktu

3.1.3 Protokol o stabilitě

Na základě výsledku testování stability je vyhotoven protokol o stabilitě. Protokol obsahuje název přípravku, výrobce, sílu a lékovou formu, čísla a velikosti zkoušených šarží, datum a místo výroby, složení zkoušených šarží, výrobce léčivé látky a popis vnitřního obalu. V protokolu jsou uvedeny limity pro jednotlivé zkoušky a použité metody. Výsledky zkoušek jsou shrnuty v tabulkách. V tabulce jsou uvedeny počáteční

hodnoty, výsledky zkoušek provedených v předepsaných intervalech a limity jednotlivých zkoušek. Na základě vyhodnocení výsledků jsou určeny podmínky pro uchovávání, druh vnitřního obalu a doba použitelnosti. Na Obr. 1 je uvedeno rozhodovací schéma pro vyhodnocení výsledků stabilitní studie.



Obr. 1: Rozhodovací schéma pro vyhodnocení výsledků stabilitní studie a navržení doby reatestace léčivé látky/doby použitelnosti konečného přípravku.

3.2 Nečistoty v léčivých látkách a léčivých přípravcích^b

Stále větší důraz je kladen na zajištění kvalitních léčivých přípravků. Součástí testování je sledování hladiny výskytu nečistot a rozkladných produktů v léčivých přípravcích.

Dnes je většina léčivých substancí syntetického původu. Jsou vyráběny v šaržích a používány pro svůj terapeutický efekt ve farmaceutických přípravcích. Bezpečnost léčivých přípravků je podmíněna farmakologicko-toxikologickým profilem léčivé látky, ale souvisí také s nepříznivým efektem způsobeným přítomností nečistot v léčivé substanci a přípravku. Nečistoty obsažené v léčivém přípravku mohou mít negativní vliv na zdraví pacienta. Je proto nutné, aby léčivý přípravek určený k humánnímu užití byl co možná nejpodrobněji charakterizován. Kvalita a bezpečnost léčivých přípravků jsou zajišťovány monitorováním a kontrolou nečistot obsažených v léčivém přípravku. Je vždy nutné najít vhodnou analytickou metodu k charakterizaci nečistot v léčivých přípravcích.

Nečistoty v léčivém přípravku jsou různého původu a mohou vznikat v různých fázích výroby a přípravy léčivého přípravku. Je nutné provádět kontrolu kvality léčivé látky na několika úrovních (vstupní, mezioperační a výstupní kontrola). Neexistuje ostrá hranice mezi nečistotami vzniklými během syntézy a rozkladnými produkty.

Výrobce léčivé látky je povinen sledovat nečistoty, které v ní mohou být obsaženy. Musí být uveden jejich původ (zda se jedná o látky pocházející ze syntézy nebo o rozkladné produkty) a vyvinuta a validována analytická metoda na jejich stanovení. Nečistoty ze syntézy není nutné v konečném přípravku sledovat, ale je nutné sledovat rozkladné produkty, případně stresovými zkouškami doložit, že k rozkladu nedochází. Výrobce léčivého přípravku pak poskytne tyto informace v Applicants Part of EDMF (European Drug Master File – viz kapitola 3.3). Dále musí jasně uvést specifikaci přípravku, kde jsou také stanoveny limity pro jednotlivé nečistoty a rozkladné produkty. Povolené limity stanoví výrobce léčivé látky a výrobce léčivého přípravku, odpovědná autorita – SÚKL – hodnotí, jestli jsou limity v souladu s příslušnými pokyny.

^b Text kapitoly 3.2 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [16][17][18][19] a [20].

Nejpoužívanější metodou pro analýzu léčivých substancí a přípravků v oblasti sledování profilu nečistot a provádění stabilitních studií je v současné době HPLC. Často používanými metodami jsou také tenkovrstevná chromatografie, plynová chromatografie a kapilární elektroforéza. HPLC je metoda vysoce automatizovaná a poskytuje výsledky s vysokou citlivostí v závislosti na typu detekce. Široký výběr různých typů stacionárních fází a možnost pracovat v systému izokratickém či gradientovém umožňují použít HPLC pro analýzu všech tříd léčiv. V kontrole léčivých přípravků se spíše dává přednost izokratickému způsobu eluce, který poskytuje reprodukovatelnější výsledky než je tomu při použití gradientu. Další výhodou je poměrně snadná příprava vzorků k analýze. V posledních letech roste také význam použití HPLC-MS pro získání kompletního profilu nečistot, v rutinní kontrole však zůstává HPLC metodou volby.

V dnešní době je dohled nad kvalitou léčivých přípravků důležitější než v minulosti. Až do počátku 20. století byly léčivé přípravky vyráběny a prodávány bez jakékoli důkladné kontroly. Kvalita přípravků byla obecně velmi nízká. V průběhu první poloviny 20. století se objevilo několik afér v souvislosti s používáním nedostatečně kontrolovaných léčivých přípravků, jejichž důsledkem byl zvýšený důraz na jejich kvalitu.

Před zavedením HPLC do farmaceutické kontroly se téměř výhradně používaly metody titrační, gravimetrické a spektrofotometrické. Tyto metody však postrádaly potřebnou selektivitu. Čistota léčivých přípravků byla kontrolována na základě hodnocení fyzikálních konstant (např. bod tání, barva, čírost roztoku). Zavedení chromatografických metod – TLC a HPLC umožnilo detekci, separaci, identifikaci a stanovení organických nečistot, které se staly od této doby měřitelnými. Selektivní chromatografické metody byly vhodné pro spolehlivé stanovení také hlavních účinných látek a to i v komplikovaných směsích. HPLC patří mezi nejvíce používané metody v Evropském a zejména v Americkém lékopisu pro hodnocení léčivých látek. Hlavním důvodem je, že je to metoda selektivní a přesná. Přesných a správných výsledků je dosaženo pouze tehdy, pokud jsou předem stanovené parametry SST a metoda je validována.

Konkrétním příkladem směru vývoje v otázce sledování obsahu nečistot je hormonální přípravek Estrogel gel. V roce 2003 byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení estradiolu (účinná látka) a jejího rozkladného produktu estronu [9]. V roce 2005 však SÚKL ve svých požadavcích uvedl dalších šest nečistot, které je potřeba

sledovat. Byla vyvinuta nová HPLC metoda pro stanovení hlavní účinné látky estradiolu a sedmi nečistot (příloha 5.5). Metoda je prakticky používána v kontrolně-analytické laboratoři k hodnocení stability přípravku.

ICH, FDA (Food and Drug Administration) ve svých směrnících podávají základní pokyny pro sledování profilu nečistot v analyzovaných přípravcích. ČL 2005, USP 29 a Ph. Eur. 5 se také zabývají tematikou hodnocení nečistot.

V Evropském lékopisu 5 a Českém lékopisu 2005 je na konci téměř 60% monografií uveden seznam nečistot, které mají být sledovány. Popsané nečistoty jsou však často nevyhovující současným požadavkům na kvalitu léčivých přípravků. Některé nečistoty jsou zde uvedeny spíše jen z historického hlediska a v substancích se již téměř nevyskytují a nebo naopak často v seznamu chybí některé nové uniformace. Vždy je nezbytné předem určit, jaké nečistoty je potřeba stanovit.

V Českém lékopisu (ČL 2005) [10] se ve zkouškách na příbuzné látky se obvykle používá buď metoda vnějšího standardu s jedním porovnávacím roztokem, nebo metoda normalizace. Jestliže je u metody normalizace nebo u metody vnějšího standardu používán pro porovnání zředěný roztok zkoušené látky, jsou odezvy příbuzných látek podobné odezvě účinné látky (odezvový faktor 0,8 až 1,2), jinak jsou uvedeny v textu korekční faktory (převrácená hodnota odezvového faktoru). Odezvový faktor je poměrná hodnota, která je rovna odezvě jedné látky vztažené k odezvě stejného množství jiné látky za podmínek popsanych ve zkoušce. Jestliže je ve zkoušce na příbuzné látky předepsáno sečítání nečistot nebo stanovení obsahu některé nečistoty, je důležité zvolit vhodné nastavení prahové hodnoty a vhodné podmínky pro integraci ploch píků. U takovýchto zkoušek je limit pro zanedbatelnost píků (např. hodnota plochy, kterou nejvýše mohou mít píky, k nimž se při hodnocení nepřihlíží) obecně 0,05 %. Nastavení prahové hodnoty systému pro sběr dat odpovídá nejméně polovině tohoto limitu. Plochy píků nečistot, které nejsou úplně odděleny od hlavního píku, jsou přednostně integrovány za použití extrapolace sedlo – sedlo (tangenciální oddělení minoritního píku). Píky rozpouštědla nebo rozpouštědel použitých pro rozpuštění vzorku se rovněž zanedbávají.

Americký lékopis (USP 29) [11] obsahuje několik kapitol týkajících se analýzy nečistot, které vysvětlují definice jednotlivých skupin nečistot - cizí substance, toxické nečistoty, významné a běžné nečistoty. Identifikace není vyžadována pro běžné nečistoty, vyžaduje se však pro významné a toxické nečistoty. Výrobce musí identifikovat nečistoty, pokud se vyskytují na hladině vyšší než je 0,1% a jejich obsah

musí být deklarován. Suma všech nečistot nesmí překročit 2%, pokud není specifikováno jinak.

Také Evropský lékopis (Ph. Eur. 5) [12] obsahuje obecnou kapitolu o nečistotách a jejich definicích.

Hodnocením nečistot v léčivých přípravcích se podrobně zabývají ICH směrnice: Impurities in New Drug Substances Q3A(R1) [13], Impurities in New Drug Products Q3B(R2) [14] a Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R3) [15]. ICH směrnice tedy slouží jako výchozí podklady při přípravě registrační dokumentace v části týkající se přítomnosti nečistot v nové léčivé substanci nebo léčivém přípravku, jejich kvalifikace a kvantitativního hodnocení.

ICH definuje nečistotu jako jakoukoliv složku nové léčivé substance, která není chemickou entitou definovanou jako nová léčivá substance. Pod pojmem profil nečistot se rozumí popis definovaných a nedefinovaných nečistot v léčivé substanci a přípravku. Definované nečistoty jsou individuálně vyjmenovány a limitovány ve specifikaci a jsou buď známé (byla provedena identifikace jejich struktury) nebo neznámé struktury. Nečistoty neznámé struktury jsou definované pouze kvalitativní analytickou vlastností (například retenční čas). Nedefinované nečistoty jsou limitovány obecným akceptačním kritériem a nemají vlastní specifické rozmezí tolerance jejich přítomnosti. Degradační (rozkladný) produkt je definován jako nečistota pocházející z chemické změny v substanci během výrobního procesu a nebo vznikající během skladování léčivého přípravku vlivem světla, teploty, pH, vlhkosti nebo reakcí s pomocnou látkou nebo obalovým materiálem. Rozkladné produkty jsou buď definované nebo nedefinované (pro rozdělení platí stejná pravidla jako bylo uvedeno u nečistot). Rozkladné produkty mohou být tedy považovány, podle výše uvedené definice, za podskupinu nečistot.

ICH dále zavádí pojem identifikační práh, který znamená horní hranici nad kterou by nečistota měla být identifikována a kvalifikační práh, který popisuje limit, nad kterým by měla být nečistota kvalifikována, což znamená stanovení biologické bezpečnosti nečistoty.

Kvalifikace je proces získání a vyhodnocení dat, který určuje biologickou bezpečnost každého rozkladného produktu nebo daného degradačního profilu na specifikovaných hladinách.

3.2.1 Nečistoty v léčivých substancích

První směrnice týkající se nečistot ve farmaceutické analýze - Q3A [13] definuje nečistoty v nové léčivé látce a diskutuje jejich přítomnost z chemického hlediska a z hlediska bezpečnosti. Zahrnuje rozdělení nečistot a jejich charakterizaci, vytváření reportu o přítomnosti nečistot, pravidla uvádění nečistot ve specifikacích a také podmínky pro použité analytické metodiky.

Každá šarže léčivé látky je kontrolována na totožnost, účinnost, čistotu a bezpečnost. Z těchto dat je vytvořena specifikace látky a jsou odvozeny referenční standardy, se kterými pak budou porovnávány všechny následně vyrobené šarže pro kontrolu homogenity a reprodukovatelnosti šarže.

Nečistoty podle chemického hlediska mohou být organické, anorganické a nebo zbytková rozpouštědla.

Organické nečistoty mohou vznikat během výrobního procesu nebo během uchovávání léčivé látky. Mohou být definované nebo nedefinované, zahrnují výchozí substance, meziprodukty reakce, rozkladné produkty, katalyzátory a další reagentie. V případě organických nečistot by žadatel o registraci nové léčivé substance měl uvést aktuálně přítomné nečistoty a nečistoty potenciálně vznikající během syntézy, čištění produktu a uchovávání nové účinné látky.

Anorganické nečistoty pocházejí z výrobního procesu. Bývají převážně známé a patří mezi ně reagentia, ligandy, katalyzátory, těžké kovy nebo ostatní rezidua kovů, anorganické soli a ostatní materiály (jako jsou např. filtry nebo aktivní uhlí). Anorganické nečistoty jsou obvykle detekovány nebo kvantifikovány s využitím lékopisných nebo jiných vhodných metod.

Zbytková rozpouštědla ve farmaceutické substancí jsou definována jako těžké organické látky, které se používají nebo vznikají při výrobě léčivé látky, pomocných látek nebo léčivého přípravku. Směrnice Q3C [15] se zabývá tematikou zbytkových rozpouštědel. Jejím účelem je doporučit akceptovatelné hladiny zbytkových rozpouštědel v léčivém přípravku z pohledu bezpečnosti pacienta. Směrnice doporučuje použití méně toxických rozpouštědel a definuje hladiny považované za toxikologicky akceptovatelné. Protože rozpouštědla nemají žádnou terapeutickou hodnotu, měla by být odstraněna až na minimum obsahu, který splňuje specifikaci produktu, SVP a případně další požadavky kvality. Některá rozpouštědla mají známé neakceptovatelné toxické účinky a jejich použití při výrobě účinných látek, pomocných látek nebo

léčivých přípravků má být eliminováno nebo pečlivě posouzeno. Směrnice Q3C zavádí pojem povolená denní expozice (PDE - permitted daily exposure), který stanovuje farmaceuticky akceptovatelný příjem zbytkového rozpouštědla.

Kromě limitů pro obsah účinné látky jsou stanoveny také limity pro jednotlivé nečistoty a pro celkovou sumu nečistot účinné látky. Sem patří vedlejší produkty syntetické reakce, nečistoty přítomné ve výchozích surovinách, nečistoty vzniklé izomerizací, přítomné enantiomery, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla a anorganické nečistoty. Léčivé látky vyrobené biotechnologicky musí být také testovány na přítomnost látek, se kterými přišly do kontaktu během působení kultivačních médií a ostatních aditiv.

Jako prahovou hodnotu pro identifikaci a izolaci nečistoty z nové účinné látky ICH stanovila hodnotu 0,1 %.

Výsledky analytického hodnocení musí být uvedeny pro všechny vyrobené šarže nové léčivé substance, ať už slouží pro klinické hodnocení, stabilitní testy nebo později pro komerční využití. Měla by být uvedena laboratorní studie, která vedla k detekci nečistot v léčivé substanci jak u komerčně vyrobené šarže, tak během stresových stabilitních zkoušek, které se většinou používají k identifikaci potenciálních nečistot vznikajících při uchovávání látky a také k popisu kinetiky degradačních reakcí vedoucích ke vzniku těchto nečistot.

Specifikace látky stanovuje soubor kritérií, která musí daná látka splňovat, aby mohla být považována za přijatelnou pro zamýšlené použití. Jde v podstatě o seznam zkoušek s odkazy na analytické metody a také s uvedenými kritérii přijatelnosti pro jednotlivé zkoušky, případně rozmezími přijatelnosti nebo dalšími kritérii pro popsání zkoušky. Specifikace je kritický standard kvality, který je navrhován a posuzován výrobcem a poté schválen příslušnými autoritami (Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug substances And New Drug Products: Chemical Substances Q6A [21]).

Ve Specifikaci nové léčivé substance by měl být uveden seznam nalezených nečistot. Pro předpoklad výskytu těchto nečistot v komerčním produktu se používají data ze stabilitní studie, chemických vývojových studií a z rutinní analýzy předešlých šarží. Mělo by být uvedeno i zdůvodnění proč byly nebo nebyly uvedené nečistoty zařazeny do specifikace látky. Obvykle se uvádí definované známé nečistoty, definované neznámé nečistoty (značené jako A, B... atd., příp. charakterizované

např. (retenčním časem), pro něž jsou přesně určeny limity, a pak nedefinované nečistoty. Pro nečistoty, které vykazují toxický nebo neočekávaný farmakologický efekt, by měl být stanoven limit detekce a kvantifikace až na minimální hladiny látky, které je třeba kontrolovat. Měla by být uvedena kritéria přijatelnosti pro nedefinované nečistoty a také pro celkovou sumu nečistot.

Specifikace nové účinné látky by tedy měla zahrnovat:

- organické nečistoty
každou definovanou známou nečistotu
každou definovanou neznámou nečistotu
jakoukoliv nedefinovanou nečistotu a kritérium její tolerance
celkovou sumu nečistot
- anorganické nečistoty
- zbytková rozpouštědla

3.2.2 Nečistoty v léčivých přípravcích

Vodítkem problematiky nečistot v léčivých přípravcích je směrnice Impurities in new drug products Q3B [14]. Tento dokument poskytuje směrnici pro registrační žádosti na obsah a identifikaci nečistot v nových léčivých přípravcích vyrobených z nových dosud neregistrovaných léčivých látek. Tato směrnice se zabývá pouze nečistotami v nové léčivé substanci, které jsou klasifikovány jako rozkladné produkty účinné látky nebo reakční produkty účinné látky s pomocnými látkami nebo s obalovým materiálem. Obecně platí, že nečistoty přítomné v nové léčivé substanci nemusí být monitorovány v léčivém přípravku, pokud nejsou také degradačními produkty.

U léčivého přípravku je vždy potřeba vyjmenovat degradační produkty pozorované během výroby nebo během stabilitních studií léčivého přípravku.

Degradační produkty pozorované během stabilitních studií prováděných za doporučených skladovacích podmínek by měli být identifikovány, pokud jsou přítomny na hladině vyšší než je identifikační prahová hodnota (směrnice Q3B [14]). Pokud identifikace degradačního produktu není proveditelná, souhrn laboratorních studií demonstrujících neúspěšnou snahu o identifikaci je součástí dalších dokumentů. Degradační produkty přítomné na hladině nižší než je identifikační prahová hodnota nemusí být identifikovány. Nicméně, analytické postupy by měly být vyvinuty pro ty

degradační produkty, u kterých je očekáván toxický nebo farmakologický účinek i na hladinách nižších než je prahová hodnota.

V registrační žádosti by mělo být zdokumentováno, že analytická metoda byla validována a je vhodná pro detekci a kvantifikaci degradačních produktů (viz směrnice Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [55]). Validace analytické metody by měla zahrnovat parametry přesnosti a zejména selektivity pro definované i nedefinované rozkladné produkty. Pokud jsou analytickou metodou odhaleny jiné píky kromě sledovaných rozkladných produktů (nečistoty pocházející ze syntézy, výchozí látky) mají být tyto píky označeny a jejich původ by měl být diskutován ve validačním protokolu

Hladiny rozkladných produktů by měly být měřeny různými metodami, včetně těch, které porovnávají analytické odpovědi degradačních produktů k vhodným referenčním standardům nebo odpovědi vlastní účinné látky. Porovnávací standardy použité pro kontrolu degradačních produktů by měly být vyhodnoceny a charakterizovány podle jejich zamýšleného užití.

Analytické výsledky by měly být dostupné v registrační dokumentaci pro všechny důležité šarže nového léčivého přípravku použité pro klinické, bezpečnostní a stabilitní testy. Dostupné by měly být i analytické výsledky šarží, které jsou reprezentativní k zamýšlenému komerčnímu procesu. Kvantitativní výsledky by měly být prezentovány číselně. Obvykle jsou uvedeny jak hodnoty pro jednotlivé nečistoty tak celková suma nečistot spolu s uvedením použité analytické metodiky.

Výsledky v hodnotách nižší než 1% mají být charakterizovány s přesností na dvě desetinná místa a výsledky větší než 1% mohou být uvedeny na jedno desetinné místo. Je doporučeno výsledky dokumentovat tabulkami.

Chromatogramy (v případě použití chromatografie jako analytické metody) s označenými píky z reprezentativních šarží, zahrnující i chromatogramy z validace a z dlouhodobých a zrychlených stabilitních studií mají být k dispozici stejně jako kompletní profil rozkladných produktů formou chromatogramu.

Pro každou jednotlivou šarži popsanou v registrační dokumentaci je uvedeno: popis, síla a velikost šarže, datum a místo výroby, výrobní postup, použitý obalový materiál, obsah rozkladných produktů, použití šarže (účely klinické a stabilitní studie), použitá referenční analytická metoda, číslo šarže substance použité v léčivém přípravku, skladovací podmínky pro stabilitní studie.

Specifikace nového léčivého přípravku by měla zahrnovat seznam rozkladných produktů, u kterých se očekává, že se objeví během výrobního procesu a za doporučených skladovacích podmínek. Specifikace výběru rozkladných produktů by měla být založena na degradačních produktech nalezených v šarži vyrobené k předpokládanému komerčnímu použití. Tyto degradační produkty se specifickými akceptačními kritérii zahrnující specifikaci pro nový přípravek jsou označeny v tomto dokumentu jako specifikované rozkladné produkty. Specifikované rozkladné produkty mohou být definované nebo nedefinované. Odůvodnění zahrnutí nebo vyloučení rozkladných produktů ze specifikace by mělo být prezentováno.

Kritérium přijatelnosti pro daný rozkladný produkt by mělo být stanoveno s ohledem na kritéria přijatelnosti, která platí pro léčivou látku, na hladinu kvalifikace degradačního produktu a na nárůst jeho koncentrací během stabilitních studií a také na navrhovanou použitelnost a skladovací podmínky nového léčivého přípravku. Jakékoliv kritérium přijatelnosti by navíc nemělo být nastaveno výše, než je kvalifikovaná hladina degradačního produktu.

Specifikace nového přípravku by měly zahrnovat:

- každý definovaný známý rozkladný produkt
- každý definovaný neznámý rozkladný produkt
- jakýkoliv nedefinovaný degradační produkt s akceptačním kritériem
- celkovou sumu přítomných rozkladných produktů

Směrnice Q3B [14] uvádí také opatření pro kvalifikaci degradačních produktů v případě, je-li identifikační a kvalifikační práh překročen. Hodnoty jednotlivých prahů pro degradační produkty požadovaných směrnicí jsou uvedeny v tabulce 3.

Maximální denní dávka	Práh uvedení v reportu
≤ 1 g	0,1 %
≥ 1 g	0,05 %
Identifikační práh	
< 1 mg	1,0 % TDI nebo 5 µg, hodnota, která je nižší
1 mg – 100 mg	0,5 % TDI nebo 20 µg, hodnota, která je nižší
> 100 mg – 2 mg	0,2 % TDI nebo 2 mg, hodnota, která je nižší
> 2 g	0,10 %
Kvalifikační práh	
< 10 mg	1,0 % TDI nebo 50 µg, hodnota, která je nižší
10 mg – 100 mg	0,5 % TDI nebo 200 µg, hodnota, která je nižší
> 100 mg – 2 mg	0,2 % TDI nebo 3 mg, hodnota, která je nižší
> 2 g	0,15 %

Tab. 3: Hodnoty jednotlivých prahů pro rozkladné produkty požadované směrnicí Q3B. Prahy degradačních produktů jsou vyjádřeny buď jako % léčivé látky nebo jako TDI (total daily intake = celkový denní příjem) rozkladného produktu. Pro neobvykle toxické látky je vhodné stanovit nižší práh.

Hladina každého rozkladného produktu přítomného v novém léčivém přípravku, který byl přiměřeně testován v bezpečnostních nebo klinických studiích, by měla být kvalifikována. Proto je vhodné zahrnout všechny dostupné informace o aktuálním obsahu rozkladných produktů v konkrétní šarži, v čase užití, v bezpečnostních a klinických studiích.

Sledované charakteristiky [22]

Stanovení obsahu definovaných nečistot

Definované nečistoty a jejich povolené limity jsou uvedené v DMF výrobce léčivé látky a analytickou metodou se hodnotí jejich obsah v léčivém přípravku. Obsah nečistoty se vyjadřuje v mg/g léčivého přípravku a přepočítává se v procentech obsahu účinné látky.

Připraví se roztoky standardu v předepsaném rozpouštědle o daném obsahu účinné látky a 0,5 mg/100 ml jednotlivých nečistot ze dvou samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.

Provedou se dvě nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeného ve validační zprávě (viz kapitola 3.7). Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.

Výpočet obsahu jednotlivých definovaných nečistot (% účinné látky) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_v / A_{IS} \cdot m_s \cdot F \cdot 1000 \cdot X}{A_s / A_{IS} \cdot m_v \cdot Z}$$

c_i	=	obsah stanovené složky v % účinné látky
A_v, A_s	=	plocha píku vzorku, standardu
A_{IS}	=	plocha píku vnitřního standardu
m_v, m_s	=	navážka vzorku, standardu v g
F	=	faktor korekce na obsah referenční látky
Z	=	faktor zředění ($Z = 5$)
X	=	faktor zohledňující obsah účinné látky v přípravku

Celkový obsah nečistot

Připraví se porovnávací roztok standardů v předepsaném rozpouštědle o koncentraci dané validační zprávou. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí předepsaným rozpouštědlem na 100 ml. Roztok se změří třikrát.

Vyhodnotí se chromatogramy získané proměřením zkoušeného roztoku vzorku a porovnávacího roztoku standardů.

V některých případech se zaznamená analýza zkoušeného roztoku vzorku po dobu odpovídající obvykle v lékopisu předepsaném násobku retenčního času účinné látky. Plocha píku jakékoliv nečistoty kromě definované, nesmí být větší než 0,2 násobek hlavní plochy porovnávacího roztoku standardů (0,2%).

Obsah nedefinovaných nečistot (%)

Obsah nedefinovaných nečistot představuje sumu ploch píků na chromatogramu, kromě píku účinné látky, vnitřního standardu, definované nečistoty a konzervačních přísad. Množství se vztahuje k ploše píku účinné látky. Vyjadřuje se jako % počítáno jako účinná látka. Limit, který se nesmí překročit není v tomto případě pevně daný. Hodnotí se změna sumy nečistot v čase.

Obsah nedefinovaných nečistot (%) se vypočte podle vzorce:

$$\% = \frac{A_V}{A_S \cdot m_V \cdot 2}$$

A_V	= součet ploch všech píků, kromě píku účinné látky, vnitřního standardu a definované nečistoty zkoušeného roztoku vzorku
A_S	= plocha píku účinné látky v porovnávacím roztoku standardu
m_V	= navážka vzorku v g

Celkový procentuální obsah nečistot (%)

Celkový obsah nečistot představuje sumu ploch píků na chromatogramu, kromě píku účinné látky, vnitřního standardu a konzervačních přísad. Množství se vztahuje k ploše píku účinné látky o 100 násobně nižší koncentraci. A vyjadřuje se jako % počítáno jako účinná látka. Limit, který se nesmí překročit není v tomto případě pevně daný. Hodnotí se změna sumy nečistot v čase.

Celkový procentuální obsah nečistot (%) se vypočte podle vzorce:

$$\% = \frac{A_{V1}}{A_{S1} \cdot m_V \cdot 2}$$

A_{V1}	= součet ploch všech píků (kromě píků účinné látky a vnitřního standardu) zkoušeného roztoku vzorku
A_{S1}	= plocha píku účinné látky v porovnávacím roztoku
m_V	= navážka vzorku v g

Homogenita

Homogenita znamená obsahovou stejnorodost. Hodnotí se obsah látek šarže z výrobního procesu. Obsah účinné látky se nesmí lišit o 5%, obsah konzervačních přísad se nesmí lišit o 10%.

3.3 Základní dokument o léčivé látce (Active Substance Master File, ASMF)^c

Základní dokument o léčivé látce (Active Substance Master File, ASMF, nebo-li také European Drug Master File, EDMF) je dokument, který vyhotovuje výrobce účinné látky. Základním dokumentem o léčivé látce může výrobce léčivé látky zpřístupnit důvěrné informace regulačním autoritám a také žadatelům o registraci zajistit možnost převzít úplnou odpovědnost za jakost a kontrolu léčivé látky a za léčivý přípravek s jejím obsahem.

EDMF slouží tedy jako podklad k žádosti o registraci či o změnu v registraci léčivého přípravku.

Nejnovější pokyn, který upravuje postup předkládání základního dokumentu o léčivé látce v rámci registračního řízení nebo změny v registraci je pokyn „Guideline on Active Substance Master File Procedure“ (CPMP/QWP/227/02 - EMEA/CVMP/134/02) [26].

Základní dokument o léčivé látce musí obsahovat podrobné informace o léčivé látce. Hlavní požadavky na jednotlivé body a kapitoly jsou uvedeny v základním pokynu pro žadatele o registraci léčivých přípravků v členských státech Evropské komise (Notice to Applicants for Marketing Authorisations for Medicinal Products in the Member States of the European Union [27]). EDMF, které se týkají humánních léčivých přípravků, se předkládají v CTD formátu (Common Technical Document).

Údaje se v EDMF rozdělují do dvou samostatných částí.

Otevřená část (Applicants Part, AP) je přístupná žadateli o registraci nebo držiteli rozhodnutí o registraci a regulační autoritě. AP obsahuje informace, které držitel EDMF nepovažuje ve vztahu k žadateli o registraci nebo držiteli rozhodnutí o registraci za důvěrné. V každém případě má AP obsahovat takové informace, které postačí k tomu, aby žadatel o registraci mohl převzít plnou odpovědnost za kontrolu jakosti léčivé látky při výrobě daného léčivého přípravku.

Uzavřená část (Restricted Part, RP) obsahuje informace, které držitel EDMF považuje za důvěrné a tato část je přístupná jen regulační autoritě. RP obsahuje informace o jednotlivých krocích výrobního postupu a informace o kontrole jakosti v průběhu výroby. EDMF dále obsahuje obsah a samostatné souhrny AP a RP (Quality Overall Summary).

^c Text kapitoly 3.3 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [23][24] a [25].

EDMF lze předložit pouze jako podklad k žádosti o registraci nebo o změnu v registraci léčivého přípravku. EDMF lze uplatnit pro všechny léčivé látky, tj. nové léčivé látky, známé léčivé látky neobsažené v Evropském lékopisu (Ph.Eur.) ani v lékopisech členských států EU, lékopisné léčivé látky obsažené v Ph.Eur. či v lékopisech členských států EU. Držitel EDMF může mít pro jednu léčivou látku EDMF i Certifikát shody s článkem Evropského lékopisu (CEP).

Držitelé EDMF mají zajistit obsahovou aktuálnost svých EDMF s ohledem na vlastní proces syntézy i výroby. Postupy kontroly jakosti mají být neustále v souladu s aktuálními regulačními požadavky a vědeckými poznatky.

V tabulce 4 jsou uvedeny jednotlivé kapitoly EDMF. Vzhledem k tomu, že se většinou vypracovává v angličtině, není tabulka přeložena do češtiny.

Common Technical Document (CTD)

CTD je společný formát pro prezentaci technické dokumentace sestavený podle mezinárodních standardů, který vznikl jako výsledek dohody mezi státy EU, USA a Japonska a přispěl k celosvětové harmonizaci terminologie a formátu dokumentace popisující vývoj léčivého přípravku. CTD formát usnadňuje výměnu informací a společný pohled na posuzování dokumentace mezi farmaceutickými společnostmi a regulačními autoritami.

NtA CTD format	Applicants Part	Restricted Part
General information	x	
Nomenclature	x	
Structure	x	
General properties	x	
Manufacturer(s)	x	
Description of manufacturing process and process controls	x	x
Control of materials		x
Control of critical steps and intermediates	x	x
Process validation and/or evaluation		x
Manufacturing process development		x
Characterisation	x	
Elucidation of structure and other characteristics	x	
Impurities	x	x
Control of drug substance	x	
Specifications	x	
Analytical procedures	x	
Validation of analytical procedures	x	
Batch analysis	x	
Justification of specification	x	x
Reference standards or materials	x	
Container closure system	x	
Stability	x	
Stability summary and conclusion	x	
Post-approval stability protocol and stability commitment	x	
Stability data	x	

Tab. 4: Obsah EDMF

3.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie^d

Chromatografické metody jsou separační metody, které se používají k oddělení analyzovaných složek ve směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High performance liquid chromatography) je velmi rozšířenou metodou v instrumentálních analytických laboratořích. Chromatografický proces může být charakterizován jako přenos hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Během separace dochází k postupnému mnohonásobnému opakovanému ustavování řady fázových rovnováh součástí analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (stacionární a mobilní), které jsou relativně vůči sobě v pohybu. Hybnou silou v chromatografickém procesu při HPLC je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Stacionární fáze je definována jako nepohyblivý materiál naplněný do chromatografické kolony. Na chromatografické koloně dochází k separaci směsi na jednotlivé složky. Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány (retardovány) podle jejich afinity a síly interakcí probíhajících mezi analytem, mobilní a stacionární fází.

Základní interakce, které se uplatňují při chromatografickém procesu jsou: dipól - indukovaný dipól, dipól – dipól, hydrofobní interakce, vodíková vazba a elektrostatická interakce.

Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze dělit podle několika hledisek:

1. princip separace – chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová, afinitní, chirální
2. způsob vyvíjení – eluční, frontální, vytěšňovací
3. skupenství mobilní fáze - kapalina (LC), plyn (GC)
4. použité vyvíjecí techniky – sloupcová (kolonová), papírová, na tenké vrstvě

Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie je založena na různé schopnosti látek v roztoku adsorbovat se na povrchu pevné stacionární fáze - adsorbentu. Je to tedy chromatografie ve fázi pevná látka - kapalina (LSC). Chromatografie probíhá ve dvou stupních –

^d Text kapitoly 3.4 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [28][29][30][31][32][34][35] a [36].

v prvním stupni dojde k adsorpci látek na adsorbent podle jejich afinity k adsorbentu, ve druhém stupni látky desorbují z povrchu adsorbentu a jsou eluovány z chromatografické kolony.

Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze silně polární povahy (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (např. n-hexan, tetrahydrofuran). Polární látky jsou na polárním povrchu stacionární fáze zadržovány více a tedy déle než látky nepolární.

Při chromatografii na reverzních fázích je stacionární fáze nepolární povahy (např. hydrofobní modifikace silikagelu jako je C₁₈ nebo C₈), zatímco mobilní fáze je polární kapalina – například směs vody a methanolu nebo acetonitrilu. Zde naopak platí, že nepolární látky jsou zadržovány déle než látky polární.

Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie probíhá na iontovýměnném povrchu sorbentu stacionární fáze. Mechanismus separace spočívá v opakovaném ustalování iontovýměnné rovnováhy. Tato technika se používá téměř výhradně pro látky ionizovatelné a látky iontové povahy. Iontovýměnný povrch sorbentu stacionární fáze má opačný náboj než ionty analytu. Čím silnější je náboj vzorku, tím silněji bude vázán na iontový povrch sorbentu, a tak bude eluován později. Pro přípravu mobilní fáze se používá vodný roztok pufru, eluce analytů je ovlivňována jeho hodnotou pH a iontovou silou.

Vylučovací chromatografie

Při vylučovací chromatografii dochází k dělení látek na základě velikosti a tvaru jejich molekuly. Analyty jsou separovány, když jsou jejich molekuly odlišných průměrů, než je velikost pórů náplně kolony. Menší molekuly difundují hlouběji a eluují nejpozději, větší molekuly zůstávají při povrchu a jsou rychle vymyty z kolony. Tento typ chromatografie se také nazývá gelová filtrace nebo gelově permeační chromatografie, přestože dnešní stacionární fáze nejsou omezeny pouze na „gel“.

Rozdělovací chromatografie

Rozdělovací chromatografie je založena na rozdělení chromatografovaných látek mezi dvěma kapalnými fázemi, kdy kapalná stacionární fáze je zakotvená (na celulóze nejčastěji voda) na vhodném nosiči (silikagel, celulóza). K dělení látek dochází

na základě jejich rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

Afinitní chromatografie

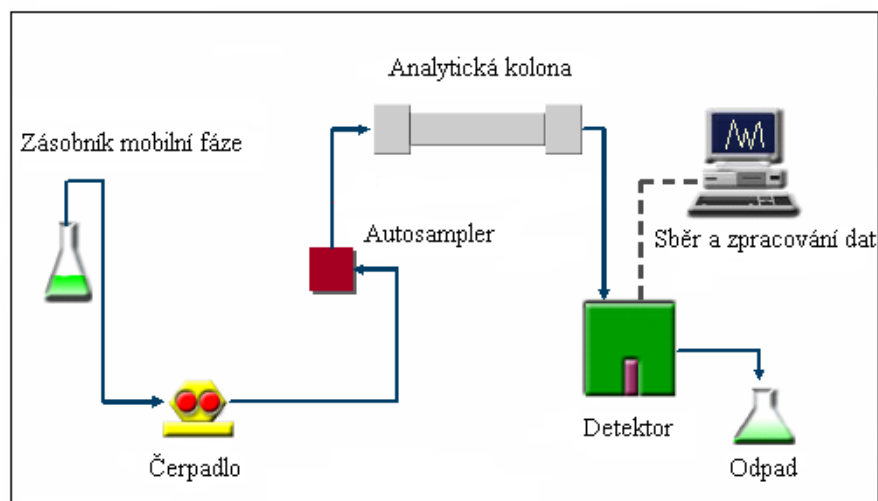
Afinitní chromatografie je určena k separaci biologických makromolekul. Její výhodou je specifika jejich interakcí. Na nosič je navázán kovalentní vazbou vhodný afinitní ligand (např. protilátky nebo enzymové inhibitory), který je schopen vytvářet specifický komplex s určitou biologickou makromolekulou. Ta zůstává vázaná v koloně, zatímco ostatní složky vzorku jsou vymyty.

Chirální chromatografie

Chirální chromatografie je používána k separaci chirálních látek. K chirální separaci se používá chirální stacionární fáze a nebo se přidává chirální aditivum do mobilní fáze.

3.4.1 Instrumentace v HPLC

HPLC přístroj (Obr. 2) se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony (může být termostatována), detektoru a zařízení na zpracování dat. Mobilní fáze je do systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků a protéká kolonou a poté detektorem.



Obr. 2: Schematický obrázek HPLC systému.

3.4.1.1 Zásobník mobilní fáze^e

V zásobníku mobilní fáze jsou umístěny filtry pro odstranění pevných částic (kovový nebo teflonový filtr 0,20 μm). Zásobník musí být dobře uzavřený, aby z nich kapalina mohla odtékat, ale přitom aby její páry neunikaly do okolní atmosféry.

3.4.1.2 Vysokotlaká čerpadla

Na čerpadla použitá pro kapalinovou chromatografii jsou kladeny vysoké požadavky: výstupní tlaky na čerpadlech se musí pohybovat v širokém rozmezí 1 až 60 MPa, musí umožňovat změnu průtoku v širokém rozmezí (nejčastěji 0,1 až 10 ml/min), průtok mobilní fáze musí být reprodukovatelný (do 1%) a přesný (do 1%), průtok musí být bezpulzní, vnitřní objem čerpadel by měl být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze. Obvyklým zařízením k protlačování mobilní fáze je pístové čerpadlo. Díky vyvíjenému konstantnímu tlaku je průtok skrz kolonu plynulý, bez rázů a je také reprodukovatelně nastavitelný. To umožňuje použití i nejcitlivějších detektorů.

Čerpadla se rozlišují na pulzní a bezpulzní. Pulzní čerpadla mají objem pracovní komory relativně malý. K dosažení potřebného průtoku musí dojít k mnohonásobnému vypuzení mobilní fáze. Bezpulzní čerpadla pracují s poměrně velkým objemem pracovní komory (až 400 cm^3). Nejlepších výsledků je dosaženo spojením dvou čerpadel. V momentě, kdy je první čerpadlo ve fázi sání, je druhé ve fázi výtlačku.

Vyvíjení v kapalinové chromatografii je možné realizovat dvěma způsoby. První možností je eluce izokratická, při které se složení mobilní fáze nemění po celou dobu vyvíjení. V druhém případě hovoříme o gradientové eluci, kdy se složení mobilní fáze programově mění směrem k vyšší eluční schopnosti v závislosti na čase, a to buď kontinuálně nebo diskontinuálně (vícestupňová eluce). Gradientovou elucí lze dosáhnout lepší a rychlejší separace látek a urychlení analýzy. Využívá se při dělení komplikovaných směsí. Kromě koncentračního gradientu lze použít i gradient pH. Pro kontrolní laboratoře, ve kterých jsou prováděny rutinní analýzy je výhodnější izokratický způsob eluce, který přináší reprodukovatelnější výsledky a nevyžadují čas na ekvilibraci chromatografického systému.

Při gradientové eluci jsou používány čerpací systémy, které dodávají rozpouštědlo či rozpouštědla z více zásobníků a mísení rozpouštědel se dosahuje buď

^e Text kapitol 3.4.1.1, 3.4.1.2 a 3.4.1.3 byl vypracován ze zdrojů [28][33] a [36].

před natlakováním (nízkotlaký gradient), nebo v tlakované části čerpadla nebo čerpadel (vysokotlaký gradient). Nízkotlaký gradient – složky mobilní fáze se míchají za atmosférického tlaku před vstupem do čerpadla v malé směšovací komůrce, přičemž se poměr směšovaných složek řídí otevíráním a zavíráním ventilů na vstupu komůrky nebo pomocí podávaných nízkotlakých mikročerpadel nebo pomocí rychlého proporcionálního ventilu. Vysokotlaký gradient – každá složka mobilní fáze má své vysokotlaké čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou.

3.4.1.3 Zařízení pro dávkování vzorku

Pro dávkování vzorku do chromatografického systému se používají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače různé konstrukce.

Dávkovací vysokotlaké ventily

Tyto ventily umožňují dávkovat vzorek i při tlaku 60 až 80 MPa a to pouze konstantní objem vnitřního prostoru ventilu nebo při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky. Komerčně dostupné dávkovače (Rheodyne, Waters) mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2 μl do 2000 μl . Dávkovací ventily mohou být elektricky nebo pneumaticky ovládané.

Automatické dávkovače – autosamplery

Automatické dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny vialky (mikronádobky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Existuje je několik druhů konstrukčního spojení injekční stříkačky dávkovače a zásobníku:

- injekční stříkačka je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlu stříkačky, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. Pohyb zásobníku je buď osový nebo kruhový (tzv. karusel), záleží na typu konstrukce
- zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky ve směru osy x-y-z
- zásobník i injekční stříkačka jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky, kde může docházet k dalšímu zpracování vzorku (tzv. robotické autosamplery).

3.4.1.4 Chromatografické kolony^f

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Nejčastější rozměry komerčně dodávaných chromatografických kolon, jsou 50 mm, 75 mm, 100 mm, 125 mm, 150 mm a 250 mm s vnitřním průměrem 2 až 5 mm. Chromatografické kolony se v současné době dodávají jako klasické kovové kolony nebo kovové kolony typu „cartridge“ a při skladování a transportu jsou plněné mobilní fází.

Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce.

Většina analytických kolon je založena na bázi silikagelu, který má dobré chromatografické a mechanické vlastnosti, ale dostupné jsou i mnohé další fáze jako jsou třeba stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého nebo organických polymerů.

Stacionární fáze na bázi silikagelu

Pro chromatografii na normálních fázích je používán jako stacionární fáze silikagel. Silikagel je polární adsorbent, jeho povrch je tvořen hydroxylovými skupinami, které jsou schopné tvořit vodíkové můstky a tak interagovat se separovanými látkami. Silikagel má spíše kyselé vlastnosti, které způsobují silné zadržování bazických látek. Během vývoje chromatografie bylo využití normálních fází spíše potlačeno ve prospěch chromatografie na reverzních fázích.

Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (systém reverzních fází) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi. Pro navázání postranních řetězců se používají silanizační reakce s monochlordimethyl alkylsilany nebo trichloralkylsilany. Tato činidla však nereagují se silanolovými skupinami povrchu silikagelu a nezreagované zbytkové silanoly mohou stále ionizovat a způsobovat

^f Text kapitoly 3.4.1.4 byl vypracován ze zdrojů [37][38][39][40][41][42][43][44][45][46] a [47].

zhoršený tvar píku, zejména u bazických analytů. V dalším vývoji tedy byly zkoumány způsoby tzv. endcappingu (krytí zbývajících silanolových skupin).

Náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na nosič mají od původně používaných stacionárních fází (silikagel, oxid hlinitý) řadu výhod. Především je to možnost programově měněné teploty nebo složení mobilní fáze a rychlejší utváření rovnováhy mezi sorbentem a mobilní fází. Nejčastěji používaným nosičem je právě silikagel. Chemicky vázané organické ligandy významně mění vlastnosti silikagelového povrchu.

Dnes jsou na trhu nejvíce zastoupeny stacionární fáze s postranním řetězcem C18 a C8. Dostupné jsou dále sorbenty s fluorovaným alkylovým řetězcem nebo s fenylovou skupinou. Kyano a amino modifikované stacionární fáze, které se využívají v normální chromatografii, nalézají své použití i v chromatografii reverzní. Přehled stacionárních fází používaných v reverzní chromatografii je uveden v tabulce 5.

Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0.

Moderním trendem je vyvíjet takové stacionární fáze, které usnadňují analýzu problematických látek, jako jsou třeba látky bazické nebo extrémně polární. Dále je velmi žádoucí zkrácení doby trvání analýzy. Toho se dosahuje zkrácením délky kolony a použitím menších částic (3,5 μm nebo 1,8 μm), které zvyšují adsorbční plochu sorbentu a tím i separační účinnost chromatografické kolony.

Nové typy stacionárních fází jsou buď na bázi klasické ODS a C8 nebo mají navázané úplně jiné typy funkčních skupin. Reverzní stacionární fáze tedy zahrnují C18 a C8 funkční skupiny speciálním způsobem vázané na silikagelu tak, aby sorbent byl odolný proti zvýšené teplotě a proti extrémním hodnotám pH, což rozšiřuje oblast jejich aplikace. Tak například pro kyselou oblast lze využít specificky upravené a stabilní kolony firmy Agilent Zorbax SB-C18 (stable bond), v běžném rozmezí pH okolo sedmi je vhodná kolona Zorbax XDB-C18 (extra density bonded, tedy vysoce endcapovaná struktura), zatímco pro bazickou oblast pH je nejlepší využít Zorbax Eclipse C18 (omezuje tailing píku apod.). Pro práci v širokém rozmezí teplot i pH lze také využít kolony X-Terra (Waters), jejichž sorbent je tvořen kombinací speciálně upraveného silikagelu a polymeru (hybridní sorbent) a umožňuje práci při pH 1-12.

Vázaná fáze	Funkční skupina
oktadecylsilyl (C18, ODS)	-O-Si(R2)-(CH2)17-CH3
oktylsilyl (C8) (příp. C4 a C6)	-O-Si(C4H9)-(CH2)17-CH3 endcappovaná -O-Si(R2)-(CH2)7-CH3
fenyl	-O-Si(R2)-(CH2)2-O-C6H5 -O-Si(R2)-(CH3)2-C6H5
amidová fáze	-O-Si(CH3)2-(CH3)2-NHCO-C15H31 -O-Si(CH2)3-O-CO-NH-C8H17
alkyl a aryl fluorované fáze	-O-Si(R2)-C6F13 -O-Si(R2)-C(CF3)2-C3F7 -O-Si(R2)-C6F5
kyano	-O-Si(R2)-(CH2)3-CN
amino	-O-Si(R2)-(CH2)3-NH2

Tab. 5: Přehled stacionárních fází využívaných v reverzním modu kapalinové chromatografie [37].

Další typy stacionárních fází zahrnují navázání kyano skupiny nebo fenylové skupiny. Tato modifikace posouvá polaritu sorbentu a je možné takto separovat některé skupiny látek, které nelze oddělit na reverzních fázích. Úplně odlišným typem stacionární fáze jsou kolony se sorbentem typu oxidu zirkoničitého namísto silikagelu (Sigma-Aldrich). Tento sorbent je odolný proti vysoké teplotě (až do 200 °C) a umožňuje práci při širokém rozmezí pH.

Speciálními typy stacionárních fází jsou pak monolitické kolony (Chromolith, Merck), kde sorbent není tvořen částicemi, ale porózním materiálem, ať už silikagelem nebo silikagelem s modifikacemi C18 a C8 skupinou.

Hybridní stacionární fáze - sorbenty X-Terra

Kolona X-Terra firmy Waters byla připravena díky nové revoluční technologii „Hybrid Particle Technology“. Hlavním principem této technologie je syntéza organického/anorganického hybridu, což je materiál obsahující jak anorganické (např. silikagel), tak organické (např. organosiloxany) elementy, a tím pádem poskytuje výhody obou těchto materiálů. Výsledkem je sorbent s minimálně o 1/3 nižším obsahem volných silanolových skupin. Tyto sorbenty mají zvýšenou teplotní a pH stabilitu se zachovanou účinností a selektivitou podobnou konvenčním C18 vázaným

materiálům, díky zredukovanému obsahu volných silanolů zaručuje symetrické píky bazických sloučenin.

K sorbetům X-Terra 2.generace se řadí tzv. XBridge analytické kolony vyvinuté pro spojení s přístrojem Acquity UPLC (viz kapitola 3.10).

Monolitické kolony

Monolitické kolony jsou vyrobeny pomocí nové „Sol-Gel“ technologie, která využívá hydrolýzu a polykondenzaci alkoxyasilanů (tetramethoxysilan) v přítomnosti ve vodě rozpustných polymerů. Takto vyrobený sorbent na bázi silikagelu obsahuje dva druhy pórů. Větší póry (obvykle 1-2 μm) se nazývají makropóry, díky nimž je odpor kolony velmi malý a umožňuje použití vyšších průtoků mobilních fází bez negativního zvýšení zpětného tlaku. Menší póry - mezopóry (obvykle 12 nm) zvětšují účinný povrch sorbentu pro separaci, a tím umožňují dosažení velmi dobré separační účinnosti takto naplněných analytických kolon. Porozita sorbentu umožňuje aplikaci vyšších průtoků bez zvýšení zpětného tlaku na koloně, což je výhodné z hlediska zkrácení doby analýzy.

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Výhodou oxidu zirkoničitého oproti silikagelu je unikátní chromatografická selektivita kombinovaná s chemickou a teplotní stabilitou. Na rozdíl od silikagelu je zirkonia stabilní v celém rozmezí pH (1-14) a při teplotě až do 200° C. Zirkoniové sorbenty tak dovolují rychlejší a selektivnější separaci s vysokými účinnostmi.

Příkladem kolony na bázi ZrO_2 jsou kolony Discovery ZR-Carbon a Discovery Zr-Carbon C18 firmy Sigma-Aldrich. Ve struktuře kolony Discovery Zr-Carbon jsou částice ZrO_2 pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Fáze je určena pro separace geometrických izomerů a diastereomerů. Povrch je vysoce hydrofobní, nedoporučuje se pro analýzu aromatických sloučenin s planární strukturou, které jsou zadržovány příliš silně. U kolony Discovery Zr-Carbon C18 je uhlíková vrstva následně modifikována kovalentně vázanými oktadecylovými skupinami. Tato fáze je hodnocena jako univerzální, ideální pro separace látek kyselých, bazických i neutrálních. Její selektivita je naprosto odlišná od oktadecylových kolon se silikagelovým nosičem.

3.4.1.5 Detektory^g

Hlavní požadavky kladené na detektory používané v HPLC jsou: vysoká citlivost, reprodukovatelnost a široká linearita odezvy, malý mrtvý objem (aby nedocházelo k rozšiřování zón), nedestruktivnost, dále schopnost detekovat všechny analyzované složky vzorku (univerzálnost detekce) a nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze, průtokové rychlosti a teplotě. Vysoká citlivost dovoluje detekovat nízké koncentrace analytů s možností velmi rychle měnit složení mobilní fáze.

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich obecných nebo specifických vlastností.

Detektory používané pro HPLC:

- refraktometrický detektor
- fluorescenční detektor
- elektrochemické detektory (konduktometrický, potenciometrický, ampérometrický, coulometrický, Coul-Array)
- UV-VIS spektrometrický detektor (DAD a UV-VIS)
- charged aerosol detector (CAD)
- evaporative light scattering detektor (ELSD)
- hmotnostně spektrometrické detektory
- infračervené (IR)
- detektory s nukleární magnetickou rezonancí (NMR)
- radiochemické detektory
- polarimetrické detektory
- AAS/AES detektory

Citlivost detektoru je jednou z jeho nejdůležitějších vlastností. Je to schopnost detektoru rozlišovat mezi malými rozdíly v koncentraci analyzované látky. Citlivost detektoru souvisí se sklonem kalibrační křivky. Čím vyšší je sklon kalibrační křivky, tím je vyšší citlivost detektoru pro danou látku. Citlivost detektoru ale není minimální množství látky, které může být detekováno. Tato hodnota je ovlivněna chromatografickými podmínkami. Píky analytu s nižším retenčním časem (eluovány na počátku

^gText kapitoly 3.4.1.5 byl vypracován ze zdrojů [28][37] a [48].

chromatogramu) jsou obvykle ostré, zatímco pík s vyšším retenčním časem (eluován později) je širší a často obtížně odlišitelný od šumu základní linie.

Selektivita detektoru je vysoce žádoucí vlastností detektorů. Selektivní detektor umožňuje selektivní detekci sledovaných látek i přes ko-eluci s jinými látkami.

Spektrometrický detektor

UV-VIS spektrometrický detektor je nejpoužívanějším detektorem v kapalinové chromatografii. Spektrometrický detektor je založený na principu interakce látek s elektromagnetickým polem. Paprsek elektromagnetického světla prochází průtokovou celou detektoru, některé látky absorbují část energie a to se projeví absorbním pásem. Lze jej použít pro detekci mnoha látek, které absorbují v oblasti od 190-400 nm (UV) a 400 – 800 nm (VIS). Absorbance závisí na vlnové délce a na přítomnosti funkčních skupin v detekované látce. Většina organických látek absorbuje v UV oblasti, protože obsahují dvojně vazby nebo nevazebné elektrony. Absorbance je pak podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci látky procházející optickou celou a délkou této optické cely.

UV-VIS detektor může být použit s mnoha různými mobilními fázemi, používaná rozpouštědla však nesmí absorbovat v UV-VIS oblasti. Citlivost detektoru je dosahuje ($10^{-9} - 10^{-10} \text{ g ml}^{-1}$) a vykazuje širokou oblast linearitu odezvy.

Spektrometrický detektor s diodovým polem (DAD - Diod Array Detektor, PDA - Photo Diode Array)

Spektrometrický detektor s diodovým polem umožňuje snímat celé absorbní spektrum v závislosti na čase, jehož výsledkem je záznam ve formátu 3D (závislost absorbance na vlnové délce a na čase). DAD detektor tvoří křemíková destička, která obsahuje 1024 fotodiod, proměřený spektrální rozsah je v rozmezí 190 – 800 nm. Z trojrozměrného obrazu se extrahuje výsledný chromatogram o dané vlnové délce. 3D záznam z DAD detektoru slouží především k posouzení čistoty sledovaného píku. Citlivost je asi o jeden řád nižší než u UV/VIS detektorů, tedy $10^{-7} - 10^{-8} \text{ g ml}^{-1}$.

Hmotnostní detektor (MS)

Hmotnostní spektrometr může být použit buď samostatně k identifikaci neznámých látek pomocí naměřených spekter, nebo může být zapojen jako detektor

separační metody – kapalinové chromatografie, plynové chromatografie nebo kapilární elektroforézy. Hmotnostní detektor ve spojení s HPLC je nejselektivnější detektor se spíše univerzálním použitím a vysokou citlivostí pohybující se v rozmezí 10^{-12} - 10^{-15} g ml⁻¹ podle typu použitého analyzátoru a charakteru látky. Více k hmotnostní spektrometrii je uvedeno v kapitole 3.9.

3.5 Charakteristiky chromatografického procesu^h

Výsledný záznam separace se nazývá chromatogram. Chromatogram představuje grafický nebo jiný záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii.

3.5.1 Retenční data

Retenční čas a retenční objem

Měření retence v eluční chromatografii může být vyjádřeno retenčním časem (t_R) přímo definovaným jako vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané látce. Z retenčního času může být vypočítán retenční objem (V_R) podle vzorce:

$$V_R = t_R \cdot v$$

v němž značí:

t_R – retenční čas,

v – průtoková rychlost mobilní fáze

Kapacitní faktor (hmotnostní distribuční poměr nebo retenční faktor) (k')

Kapacitní faktor je definován jako:

$$k' = \frac{\text{množství látky rozpustné v SP}}{\text{množství látky rozpustné v MP}} = K_C \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

v němž značí:

SP – stacionární fáze

MP – mobilní fáze

K_C – rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta)

V_S – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

^h Text kapitoly 3.5 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [12][28] a [39].

Kapacitní faktor složky může být určen také z chromatogramu s použitím vzorce:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem), nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

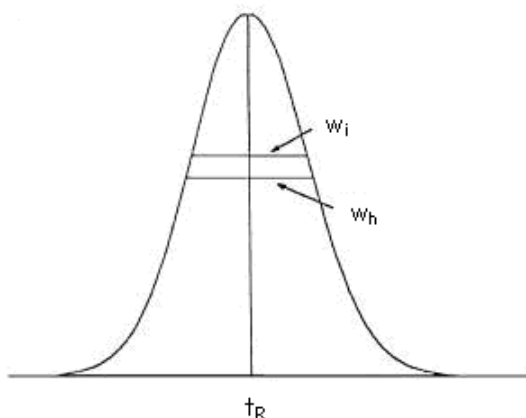
t_M – mrtvý čas (nebo objem), nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

Kapacitní faktor popisuje retenci látky na analytické koloně. Vyjadřuje míru separace látky od mrtvého retenčního času. Čím vyšší je jeho hodnota, tím více je látka zadržována na koloně, eluuje později a tím lépe je tedy oddělena od mrtvého retenčního času.

3.5.2 Chromatografická data

Pík může být definován plochou píku (A) nebo výškou píku (h) a šířkou píku v poloviční výšce (w_h), nebo výškou píku (h) a šířkou píku mezi body inflexe (w_i). Pro gaussovské píky (Obr. 3) platí vzorec:

$$w_h = 1,18 w_i$$



Obr. 3: Znázornění charakteristik chromatografického píku.

Faktor symetrie (A_s)

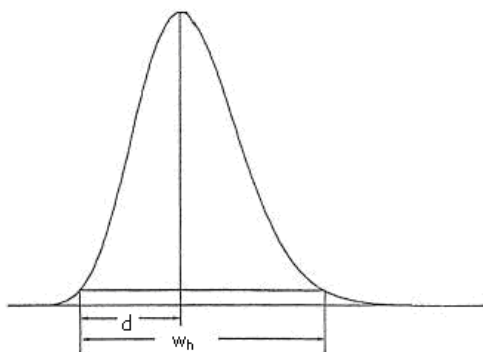
Faktor symetrie se vypočítá ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

v němž značí:

$w_{0,05}$ – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky - Obr. 4



Obr. 4: Určení faktoru symetrie píku.

Faktor symetrie vyjadřuje symetrii chromatografického píku. Hodnota 1,0 značí pík ideálně (úplně) symetrický, vyšší hodnota znamená mírné chvostování píku (tailing), naopak nižší hodnota znamená „frontování“ (fronting). Hodnoty faktoru symetrie akceptované požadavky lékopisů pro splnění SST musí být v rozmezí 0,8 - 1,5. Hodnota symetrie je důležitá z hlediska integrace plochy píku a získání správných kvantitativních dat.

Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater (N)

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater analytické kolony z dat získaných v závislosti na použité technice za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických. Pro výpočet se používá vzorec:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem), nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a s retenčním časem. Na výslednou hodnotu má vliv délka kolony, vnitřní průměr a i velikost částic. Větší počet teoretických pater N znamená větší účinnost analytické kolony. Pro porovnání účinnosti analytických kolon různé délky se používá parametr výškový ekvivalent teoretického patra (H).

Výškový ekvivalent teoretického patra (H)

Do rovnice pro výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra H [μm], (někdy také HETP) je zahrnuta i délka analytické kolony [49]. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na počtu teoretických pater N je závislost nepřímo úměrná, a tak menší hodnoty H značí vyšší účinnost analytické kolony.

$$H = \frac{l}{N}$$

N - počet teoretických pater

l - délka analytické kolony [μm]

3.5.3 Separční data

Rozlišení (R_S)

Rozlišení mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, může být vypočteno ze vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$,

v němž značí:

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce.

Rozlišení vyjadřuje míru separace dvou složek. Lékopisy požadují pro rozlišení hodnotu větší než 1,5 (rozlišení 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii).

Alternativní vzorec pro výpočet rozlišení [50] s využitím tří hlavních faktorů, které jsou důležité pro chromatografickou separaci je složen ze tří členů: selektivita, kapacita a účinnost. Ze vzorce vyplývá, jakým způsobem jednotlivé parametry ovlivňují míru chromatografické separace.

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{k + 1} \right) \cdot \sqrt{N}$$

v němž značí:

α – selektivita chromatografického systému

k – kapacitní faktor

N – počet teoretických pater

Jednotlivé faktory lze ovlivnit různými úpravami podmínek chromatografického systému:

faktor selektivity (velmi důležitý) - změna stacionární fáze, změna mobilní fáze, rychlost toku mobilní fáze

faktor kapacity - množství stacionární fáze v koloně, změna stacionární nebo mobilní fáze, teplota

faktor účinnosti - rychlost toku mobilní fáze, délka kolony velikost částic sorbentu, teplota, viskozita

Poměr výšky píku k sedlu

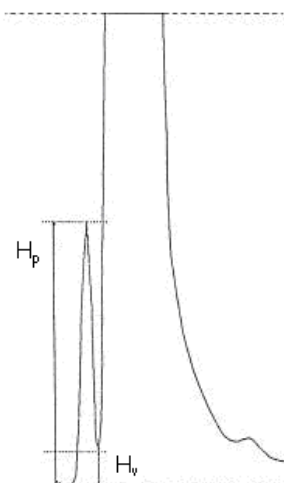
Jestliže stanovovaná nečistota není zcela oddělena od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému parametr poměr výšky píku k sedlu (p/v):

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

v němž značí:

H_p – výška píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií

H_v – výška nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií – Obr. 5



Obr. 5: Určení poměru výšky píku k sedlu.

Relativní retence (r)

Relativní retence se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

v němž značí:

t_{R2} – retenční čas sledovaného píku

t_{R1} – retenční čas referenčního píku

t_M – mrtvý retenční čas

3.5.4 Dynamická van Deemterova teorie

V roce 1956 představil J. J. Van Deemter rovnice popisující vztahy pro jednotlivé procesy ovlivňující rozšiřování chromatografických zón a vyjádřil také závislost účinnosti (HETP, H) na průtokové rychlosti. Van Deemterova dynamická teorie respektuje neideální chromatografické chování složek v koloně a připisuje rozšiřování zóny třem hlavním vlivům - turbulentní difúzi v mobilní fázi, molekulární difúzi analytu v mobilní fázi a odporu vůči přenosu hmoty mezi mobilní a stacionární fází [51].

3.6 Postup při vývoji nové chromatografické metodyⁱ

Optimalizace chromatografické metody

Optimalizace chromatografické metody znamená nalezení takových chromatografických podmínek, aby všechny sledované látky byly na chromatogramu dokonale oddělené, detekované s dostatečnou citlivostí a aby při analýze byly splněny všechny požadavky týkající se parametrů SST a validace. Cílem je i vyvinout metodu, při které jsou látky separované v co nejkratším čase.

Při optimalizaci podmínek se vychází z výsledků zpracované rešerše, které mohou poskytnout první nápady k experimentální práci. Další kroky se odvíjejí od prvních pokusů a rychlost dosažení výsledků je často závislá na povaze analytu a na erudici analytika.

Analytická kolona - stacionární fáze

Analytickou kolonu pro HPLC analýzu je třeba volit s ohledem na požadavky analýzy. Výběr stacionární fáze a typu chromatografie závisí na povaze vzorku (fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost). Podmínky analýzy je nutné optimalizovat jako kompromis s ohledem na dobu analýzy, požadované rozlišení a zatížení chromatografické kolony. Při požadavku vysokého rozlišení se doba analýzy obvykle prodlouží. Je-li nutné provést analýzu v co nejkratší době, bude dosaženo horšího rozlišení. Rozměry kolony (délka L a vnitřní průměr r) mají vliv na rozlišení (délka kolony), šířku píku (délka kolony), dobu analýzy (délka kolony), mez stanovitelnosti (vnitřní průměr kolony) tlakový spád na koloně (vnitřní průměr kolony) a na objemový průtok mobilní fáze (vnitřní průměr kolony).

Doba analýzy klesá s klesajícími rozměry kolony (L, r), zvyšujícím se objemovým průtokem a snižujícím se kapacitním faktorem (zvyšující se eluční silou mobilní fáze). Zkrácením délky kolony L se zvýší mez stanovitelnosti (LOQ), citlivost, zkrátí se doba analýzy (sníží se spotřeba rozpouštědel), sníží se tlakový spád na koloně, ale sníží se také účinnost kolony N a rozlišení.

HPLC separace – vliv pH

U běžných typů kolon na reverzní fázi se použitelné rozmezí pH mobilní fáze pohybuje od 2 do 8.

ⁱ Text kapitoly 3.6 byl vypracován ze zdrojů [28][37][38][52] a [53].

Při $\text{pH} < 2,5$ dochází k hydrolyze silikagelu, což se projevuje snížením retenčního času a také snižováním životnosti kolony. V tomto případě je lepší použití polymerních kolon nebo speciálních kolon určených k tomuto účelu (např. X-Terra).

Při $\text{pH} > 7,0$ se silikagel začíná rozpouštět a dochází ke snížení účinnosti kolony (vlivem zvýšení mrtvého objemu kolony). Dochází ke snížení retenčního času a zpětný tlak na koloně vzrůstá. V tomto případě je výhodnější použití polymerních kolon.

Použití analytické kolony

Obecně před každým použitím analytické kolony (ať nové nebo již skladované) se kolona musí ekvilibrovat. Před ekvilibrací je nutné se vždy přesvědčit, zda ekvilibrující mobilní fáze je mísitelná s mobilní fází, kterou je kolona naplněna. Obsahuje-li mobilní fáze soli nebo pufrů, je nutné před ekvilibrací kolony touto mobilní fází propláchnout kolonu asi 10 kolonovými objemy vody nebo směsí voda - methanol v poměru 1:1 (postačují asi 3 kolonové objemy). Následně je kolona promyta směsí pufr - methanol v poměru 1:1 a poté již lze ekvilibrovat samotnou mobilní fází.

Při změně mobilní fáze, při přechodu z jedné mobilní fáze na druhou je nutné postupně zvyšovat průtok nové mobilní fáze od $0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ do $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ při přírůstku asi $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Doba ekvilibrace kolony závisí na používané mobilní fází a obvykle je třeba množství mobilní fáze odpovídající 10-ti kolonovým objemům (do stabilizace základní linie a zpětného tlaku na koloně). V případě použití chromatografie iontových párů se objem mobilní fáze zvyšuje na 100 až 200 kolonových objemů.

Během analýzy musí být udržována konstantní teplota mobilní fáze a kolony. Většina separací se provádí při pokojové teplotě, ale kolony mohou být také zahřívány na vyšší teplotu pro dosažení vyšší účinnosti. Doporučuje se, aby kolony nebyly zahřívány na teplotu vyšší než $60 \text{ }^\circ\text{C}$, vzhledem k nebezpečí degradace stacionární fáze nebo změn ve složení mobilní fáze.

Uchovávání analytických kolon

Při uchovávání analytických kolon, které se nepoužívají déle jak 72 hodin, by se mělo postupovat podle následujících doporučení, samozřejmě v souladu s doporučeními výrobce dané analytické kolony:

- nikdy nenechávat kolonu vyschnout, vždy ji uchovávat naplněnou doporučenou mobilní fází, zásadně ne pufr

- kolonu s reverzní fází je nejlépe uchovávat naplněnou 10 % vodným roztokem isopropanolu, ACN nebo MeOH, které zabraňují mikrobakteriálnímu růstu
- uchovávat kolonu uzavřenou originálními uzávěrkami na suchém, ale ne příliš teplém místě
- chránit kolonu před vibracemi a nárazy
- po každé analýze kolonu propláchnout mobilní fází o vysoké eluční síle (reverzní fáze - MeOH, ACN, normální fáze – hexan/ACN) a poté ji naplnit mobilní fází, pod kterou se bude kolona uchovávat
- při použití pufrů (na reverzní fází) je bezpodmínečně nutné neopomenout nejprve propláchnout kolonu vodou nebo mobilní fází methanol/voda (30:70 maximálně 50:50), v opačném případě může dojít k vysrážení pufrů v systému.

Mobilní fáze

Mobilní fáze je pohyblivou složkou chromatografického systému. V normálním modu kapalinové chromatografie se jako mobilní fáze používají nepolární organická rozpouštědla, jako jsou chloroform, hexan nebo ether, zatím co v reverzním uspořádání kapalinové chromatografie bývají mobilní fáze polárního charakteru – organickou složkou bývá nejčastěji acetonitril, methanol, tetrahydrofuran a vodnou složkou voda, zředěné roztoky kyselin, pufrů nebo iontpárová činidla.

Příprava mobilní fáze

V mnoha případech jsou problémy, které vznikají v chromatografickém systému, způsobeny špatnou přípravou a užitím mobilní fáze. Problémy, které souvisí s přípravou a užitím mobilní fáze, se mohou týkat zavzdušnění hlavy chromatografické pumpy, přítomnosti vzduchových bublinek v cele detektoru, nízké přesnosti a reprodukovatelnosti nástřiku vzorku, zanesení in-line filtrů, frit nebo kapilár vlivem přítomných nečistot v mobilní fází. Uvedené problémy se projevují zejména zvýšeným tlakovým spádem na koloně, zvýšeným šumem základní linie, kolísavými retenčními časy a abnormálním profilem chromatografického píku.

Při přípravě mobilní fáze je proto nutné používat vždy čistá rozpouštědla, pokud možno co nejvyšší čistoty (HPLC grade). Toto platí i pro všechna aditiva (kyseliny, soli, báze) přidávaná do mobilní fáze. Všechny připravené mobilní fáze by se měly filtrovat přes filtr 0,45 μm nebo menší. Toto je zejména kritické při použití mobilních fází obsahující soli a pufrů. Je vhodné se ujistit, zda použitý filtr je kompatibilní s danou

mobilní fázi. Pro filtraci vodných roztoků se používají celulosové membránové filtry, pro filtraci organických a vodně-organických roztoků se používají teflonové membránové filtry (obecně fluoropolymery).

Voda používaná k přípravě mobilní fáze musí být čistoty ultračistá nebo HPLC grade. Kvalita vody je kritická zejména při použití gradientové eluce.

Nevhodné je uchovávat vodu resp. mobilní fáze v plastických nádobách (polypropylen, polyethylen), neboť dochází k uvolňování látek použitých při výrobě plastu a dochází tak ke kontaminaci vody resp. mobilní fáze.

Při uchovávání vody nebo mobilní fáze ve skleněných nádobách je nutné mít na paměti, že dochází k absorpci všech aditiv použitých při přípravě mobilní fáze na skleněný povrch. Je vhodné používat k přípravě a uchovávání mobilní fáze stejné zásobní láhve. Před přípravou a uchováním je vhodné vždy nádobu vypláchnout mobilní fází, není doporučeno používat k vymývání těchto nádob detergentů, které se adsorbují na povrch nádoby a mohou být vymývány mobilní fází a toto pak může vést k driftu na základní linii, zejména při gradientové eluci. Umístění zásobníku mobilní fáze má být vždy výše než je vstup do chromatografické pumpy. K ověření správného umístění zásobníku mobilní fáze se otevře vypouštěcí ventil a mobilní fáze musí samovolně vytékat.

Odvzdušnění a odplynění mobilní fáze je velmi důležitým krokem při přípravě mobilní fáze, protože může odstranit většinu problémů vznikajících při chromatografické analýze. Odvzdušnění mobilní fáze přináší reprodukovatelné retenční časy, stabilní průtok mobilní fáze, nízký šum základní linie a vysokou citlivost u mnoha typů chromatografických detektorů. K odvzdušnění mobilní fáze se používá pět metod, které se mohou vzájemně kombinovat: vakuová filtrace, ultrazvuková lázeň, probublávání mobilní fáze heliem, ohřev mobilní fáze (u velmi těkavých rozpouštědel je však tento způsob nepoužitelný) a in-line vakuový degaser, přičemž nejčastěji se kombinuje vakuová filtrace a ultrazvuková lázeň, vakuová filtrace a probublání heliem. Většina moderních přístrojů má již zabudovaný vakuový degaser. Výhodou vakuové filtrace (podtlaková filtrace) při použití 0,45 mm filtru je i dokonalé zbavení mobilní fáze mechanických nečistot. Tento krok by neměl chybět při každé přípravě mobilní fáze. K zamezení vstupu mechanických nečistot do chromatografického systému je nutné použití in-line filtru mobilní fáze (kovový, teflon).

Mobilní fáze obsahující pufr

Při přípravě mobilní fáze jsou často používána aditiva, která slouží k úpravě pH nebo iontové síly mobilní fáze. Při přípravě pufovaných mobilních fází je vhodné pracovat v oblasti pK daného pufru, kdy se dosahuje nejvyšší pufovací kapacity. Pufovací kapacita kvantitativně vyjadřuje, jak se změní pH pufru při přidavku malého množství kyseliny nebo báze.

Při přípravě pufovaných mobilních fází se většinou upravuje pH mobilní fáze a to s přesností na 0,1 jednotky pH, protože i malá změna pH mobilní fáze může vést ke změně retence analytu. pH mobilní fáze se většinou měří a upravuje před přidavkem organického rozpouštědla, protože pH v organických rozpouštědlech se výrazně liší od pH vodných rozpouštědel. Obvykle se pH vodné složky mobilní fáze upravuje na hodnotu o dvě jednotky nižší než je pKa kyselého analytu, resp. o dvě jednotky vyšší než je pKa bazického analytu. Je tak dosaženo nejvyšší pufovací kapacity.

Průtok mobilní fáze

Rychlost průtoku mobilní fáze je optimalizováno tak, aby doba analýzy byla co nejkratší při zachování všech požadavků na separaci, účinnost a selektivitu systému. Maximální rychlost průtoku mobilní fáze je omezena tlakovými nároky na chromatografický systém a analytickou kolonu.

Vlnová délka detekce

Vlnová délka HPLC s UV detekcí se volí na základě znalosti UV spektra analyzovaných součástí vzorku. Jsou-li dostupné standardy analytů, je vhodné změřit jejich UV spektra v příslušných rozpouštědlech před započítáním optimalizace HPLC podmínek. Vlnová délka vybraná pro detekci je kompromis různých absorbancí sledovaných analytů přítomných v různých koncentračních rozmezích (např. při farmaceutické analýze je dobré zohlednit nízká množství nečistot vzhledem k vysokým množstvím účinných látek) a také skutečnosti, že při nižších vlnových délkách (oblast kolem 210 nm) absorbuje velká řada různých nečistot, které jsou na chromatogramu nežádoucí. Důležitým aspektem je fakt, že mobilní fáze musí dostatečně propouštět vybranou vlnovou délku.

Objem nástřiku

Kapacita analytické kolony je vyjádřena jako maximální množství vzorku, které je daná kolona ještě schopna separovat, kdy tedy ještě nedojde k jejímu přetížení („overload“). Přetížení kolony je definováno jako množství vzorku nadávkované na kolonu, které způsobí pokles účinnosti na 90 % normální účinnosti. Kapacita závisí na mnoha faktorech – na typu analytické kolony, složení mobilní fáze, složení samotného vzorku, způsobu detekce atd. Pro analytickou kolonu o vnitřním průměru 4,6 mm a délce 250 mm se doporučuje maximální objem nástřiku 200 μ l.

Teplota analýzy

Při optimalizaci podmínek v kapalinové chromatografii je parametr teploty používán méně než je tomu u plynové chromatografie. Teplotní rozmezí je limitováno zejména bodem varu, bodem tání a také viskozitou běžně používaných rozpouštědel. Zvýšení teploty o 1° C sníží kapacitní faktor asi o 1-2 %. Změna kapacitního faktoru může vést i ke změně selektivity chromatografického systému. Optimalizací teploty chromatografického systému lze tedy vhodně měnit selektivitu i bez potřeby změny stacionární fáze, která má obvykle na selektivitu největší vliv.

Zvýšením teploty roste účinnost chromatografické kolony, klesá viskozita mobilní fáze a zvyšují se difúzní koeficienty, zkracuje se doba analýzy a dochází ke zvýšení účinnosti kolony N. Dále dochází ke snížení tlakového spádu na koloně.

3.6.1 Kvalitativní a kvantitativní analýza^j

Základní kvalitativní charakteristikou je v kapalinové chromatografii retenční čas píku a základní kvantitativní charakteristikou je plocha píku, popřípadě výška chromatografického píku.

Pro stanovení jednotlivých složek směsí se používá metoda vnějšího nebo vnitřního standardu, metoda normalizace nebo kalibrační postup.

Metoda vnějšího standardu spočívá ve dvou krocích. V prvním kroku se na kolonu nadávkuje roztok analyzovaného vzorku a po registraci záznamu se v druhém kroku nadávkován roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard

^j Text kapitoly 3.6.1 byl vypracován ze zdrojů [30] a [39].

stanovované látky (CRL – chemická referenční látka) nebo v případě směsi se použije jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píku jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

Při použití **metody vnitřního standardu** se ke známému objemu roztoku vzorku přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a je přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti sledovaných látek, musí mít podobnou odezvu a musí být chemicky inertní. Metoda vnitřního standardu se používá v případě složitějšího postupu přípravy vzorku, při kterém by mohlo dojít například k odpaření použitého rozpouštědla a zkoncentrování vzorku, a tím k získání chybných výsledků.

Při použití **metody normalizace** se obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech vypočítá z plochy píku nebo píků jako procento celkové plochy všech píků, včetně píků rozpouštědel nebo píků jakýchkoliv přidaných činidel a píků, jejichž plocha je pod limitem zanedbatelnosti.

U **kalibračního postupu** se stanoví vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem a množstvím (koncentrace, hmotnost atd.) stanovované látky a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce.

3.7 Validace analytické metody^k

SÚKL zavedl od 1.1.1992 standardní požadavky na registrační dokumentace, jejichž základem jsou požadavky evropského společenství a požadavky amerického lékopisu. Každá analytická metoda musí být stručně charakterizována a zdůvodněna její volba. Součástí registrační dokumentace léčivého přípravku je také doložení výsledků kompletní validace vyvinuté analytické metody.

Cílem validace analytické metody je prokázat pomocí experimentálních dat a jejich matematického a statistického zpracování, že nově vyvinutá metoda je vhodná pro zamýšlené použití a získané výsledky jsou reprodukovatelné a spolehlivé. Jednotlivé kroky validace a získané výsledky se dokumentují validační zprávou (validačním protokolem). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) vytvořila směrnici pro provedení validace (Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [55]). ICH se pokusila celosvětově sjednotit a vytvořit návrh definicí a pravidel pro provedení validace. Validace se také řídí předpisy americké Food and Drug Administration (FDA), platnými lékopisy ČL 2005, Ph. Eur. 5 a USP 29, dále pak vnitřními normami a předpisy odpovídajícími pravidlům správné výrobní a laboratorní praxe nebo akreditace, a také požadavky SÚKL. SÚKL vydal ve svém věstníku 1/1994 požadavky týkající se validace analytických metod v kontrole léčiv.

Je tedy zřejmé, že existuje řada odlišných dokumentů týkajících se validace. Jednotlivé autority se liší ve svých požadavcích na parametry, které musí být součástí validace, liší se i v hodnotách požadovaných limitů. K nedorozumění může dojít i v otázce pojmenování jednotlivých parametrů. Je nutné si uvědomit a předem definovat podmínky, za kterých se má metoda použít a které autority budou metodu posuzovat. Jednotlivé laboratoře si vypracují vlastní plán validací, který musí být v souladu s požadavky autorit.

Kompletní validace se musí provést u každé nově vyvinuté metody. U lékopisných metod pro danou látku nebo přípravek jsou požadavky na validaci menší, předpokládá se, že lékopisná metoda je validovaná. Revalidace analytické metody musí být provedena při každé změně výrobního postupu, při změně složení přípravku nebo při změnách požadavcích na sledované degradační produkty. Rozsah revalidace je dán povahou změn.

^k Text kapitoly 3.7 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdroje[54][55][56] a [39].

Detailní postup kompletní validace je popsán ve validační zprávě.

Validační zpráva obsahuje tři základní části:

1. Analytický postup
2. Test způsobilosti chromatografického systému
3. Vlastní validaci analytické metody

3.7.1 Analytický postup

Součástí validační zprávy je podrobně vypracovaný postup přípravy vzorků a standardu, včetně uvedení použitých chemikálií, jejich výrobce a čistoty. V protokolu je uveden výrobce a typ použitého analytického zařízení, popsány parametry chromatografické kolony, složení mobilní fáze a její přípravy, způsob vnesení vzorků a standardů a metody a postup vyhodnocování výsledků včetně použitých vzorců pro výpočet obsahu účinných látek a hodnocení obsažených nečistot.

3.7.2 Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti systému (System suitability test, SST) je nedílnou součástí metody, slouží k zajištění účinnosti chromatografického systému a k prokázání, že analytický postup byl zvolen správně. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají parametry: účinnost kolony (zdánlivá účinnost), kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Vzorce pro výpočet jednotlivých parametrů jsou uvedeny v kapitole 3.5. Během testování způsobilosti systému se také hodnotí opakovatelnost analýzy. Obecně je test způsobilosti chromatografického systému popsán v ČL 2005.

Ve validační zprávě jsou uvedeny jednotlivé vzorce pro výpočet charakteristik a získané výsledky jsou uvedeny v přehledných tabulkách a jsou porovnávány s číselnými limity. Pro provedení SST se používají roztoky standardních látek, obvykle o koncentraci blízké koncentracím očekávaným ve vzorku. Doporučené limity jednotlivých sledovaných veličin jsou znázorněny v tabulce 6.

Opakovatelnost analýzy

Z jednoho roztoku standardu látky se provede 6-8 analýz. Hodnotí se relativní směrodatné odchylky retenčního času a plochy píků.

Parametr SST		Doporučený limit
Opakovatelnost-retenční čas	R.S.D (%)	$X < 1\%$
Opakovatelnost-plocha píku	R.S.D (%)	$X < 1\%$
Počet teoretických pater		$N > 2000$
Asymetrie		$T = 0,8-1,5$
Rozlišení		$R_{ij} > 1,5$

Tab. 6: Parametry Testu vhodnosti systému a jejich doporučené limity.

Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic.

Test způsobilosti systému by měl být proveden před každou sérií měření a hodnoty jednotlivých parametrů by měly vyhovovat požadavkům validační zprávy, lékopisných monografií, případně dalších norem. Pokud hodnoty parametrů nevyhovují, předepisuje lékopis povolený rozsah, v němž mohou být různé parametry chromatografické zkoušky upraveny tak, aby kritéria způsobilosti systému byla splněna.

Lékopisem povolené úpravy chromatografických podmínek:

- ✧ složení mobilní fáze: minoritní složka $\pm 30\%$ relativních nebo 2% absolutní, další složky ne více než 10% absolutních
- ✧ pH vodné složky: $\pm 0,2$ jednotky pH,
je-li látka neutrální, pak $\pm 1,0$ jednotky pH
- ✧ koncentrace solí u pufrů: $\pm 10\%$
- ✧ vlnová délka: nelze měnit
- ✧ stacionární fáze: délka kolony: $\pm 70\%$
průměr kolony: $\pm 25\%$
velikost částic: zmenšení až na 50% , zvětšení nelze
- ✧ průtoková rychlost: $\pm 50\%$
- ✧ teplota: $\pm 10\%$, maximálně však 60°C
- ✧ dávkovaný objem: lze snížit, pokud je detekce píků a opakovatelnost stanoveného píku vyhovující

3.7.3 Vlastní validace analytické metody

Vlastní validace analytické metody zahrnuje parametry: přesnost, správnost, linearita, robustnost, selektivita, detekční a kvantitativní limit. Požadavky na provedení jednotlivých kroků validace se liší podle typu použití metody –viz Tab. 7 – požadavek SÚKL. ICH uvádí ve svých směrnících ještě metodu identifikační, u které je vyžadováno pouze doložení selektivity.

Analytická metoda	Kvantitativní stanovení účinné látky	Kvantitativní stanovení nečistot	Limitní zkoušky pro nečistoty
Parametr validace			
Správnost	+	+	případně
Přesnost			
- Opakovatelnost	+	+	-
- Intermediární přesnost	+	+	-
Selektivita	+	+	+
Linearita	+	+	-
Limit kvantifikace	-	+	-
Limit detekce	-	-	+
Robustnost	+	+	+

Tab. 7: Typy analytických procedur a doporučení příslušných validačních parametrů.

Ve validační zprávě je uveden postup nutný k získání každé charakteristiky, v tabulkách jsou uvedené výsledky. Součástí zprávy je definovaný požadavek na hodnotu každého parametru a je zhodnoceno, zda byl požadavek splněn nebo ne.

Jednotlivé validační parametry, jejich vyjádření a obvykle používané limity jsou uvedeny v tabulce 8.

Parametr		Doporučený limit
Validace		
Přesnost	R.S.D.(%)	$X < 5\%$
Linearita	Korelační koeficient	$R > 0,9990$
Správnost	výtěžnost (%)	$X = 100 \pm 5\%$
	R.S.D (%)	$X < 5\%$
Selektivita	chromatogram	
Stabilita		
laboratorní teplota	% změny	1%
Stabilita 4°C	% změny	1%

Tab. 8: Validační parametry a obvykle používané limity.

Přesnost

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Přesnost se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka [% R.S.D.] z minimálně šesti nezávislých analýz vzorku.

- Opakovatelnost (Repeatibility)

Opakovatelnost je ověření přesnosti metody jedním analytikem, během jednoho dne, na jednom přístroji. Vzorek je připraven kompletním postupem odpovídajícím popisu ve validačním protokolu. Připravuje se 6 vzorků, každý se analyzuje třikrát.

- Intermediární přesnost (Intermediate precision)

Intermediární přesnost, nebo-li intra-laboratorní přesnost, znamená provedení analýzy jiný den, jiným analytikem a na odlišném přístroji.

- Reprodukovatelnost (Reproducibility)

Reprodukovatelnost, nebo-li inter-laboratorní přesnost, není nezbytnou součástí validace. Provádí se při přenosu metody mezi různými laboratořemi.

Linearita

Linearita je schopnost metody dávat v definovaném koncentračním intervalu výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Linearita se obvykle stanovuje v rozmezí 50-150% deklarovaného obsahu látky, s minimálně pěti různými koncentracemi stanovované látky. Výsledky linearity se dokládají korelačním koeficientem a rovnicí přímky (i jejím grafickým znázorněním), popřípadě dalšími parametry lineární regrese.

Správnost

Správnost je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Správná hodnota se zjistí jinou nezávislou metodou, nebo analýzou modelového vzorku – placebo s přidaným standardem. Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti R_i .

R_i (%) = 100. koncentrace stanovená u modelového vzorku / skutečná hodnota (koncentrace ve standardu)

Selektivita

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti látek jiných. Při HPLC analýze farmaceutických přípravků se selektivita dokládá přiloženými chromatogramy standardního roztoku, placebo a vzorku. Analyzuje se roztok standardů s obsahem účinných látek, konzervačních přísad a degradačních produktů, dále se proměří placebo léčivého přípravku připravené popsaným způsobem a nakonec se nastříkne vzorek léčivého přípravku připravený stejným způsobem. Důkazem selektivity je, že žádný pík v placebo nemá stejný retenční čas jako látky sledované a že rozlišení mezi jednotlivými píky je vyšší než hodnota 1,5.

Robustnost

Robustnost je míra schopnosti metody dávat výsledky správné a přesné i při menších změnách pracovních podmínek. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. V tomto testu se pracuje se standardem analyzovaných látek a záměrně se mění pracovní podmínky. Je možné dokládat robustnost číselně stanovením reprodukovatelnosti (relativní směrodatná odchylka plochy a retenčního času analyzovaných látek). SÚKL nepožaduje číselné doložení. Mezi parametry měněné při ověřování robustnosti metody v kapalinové chromatografii patří procentuální složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota, průtoková rychlost, změna analytické kolony (jak šarže, tak výrobce) atd. Podle výsledků robustnosti si analytik může vytvořit představu o stabilitě a spolehlivosti analytické metody.

Do parametru robustnost je možné zahrnout i stabilitu roztoku standardních látek v roztoku při uchovávání za laboratorních podmínek a při snížené teplotě po dobu 72 hodin.

Detekční a kvantitativní limit

Oba tyto parametry souvisejí s citlivostí vyvinuté metody.

Detekční limit (Limit of detection, LOD) je nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestavovaná kvantitativně.

Kvantitativní limit (Limit of quantitation, LOQ) je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

LOD se definuje jako trojnásobek a LOQ jako desetinásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu (šumu). Směrodatná odchylka šumu se odhadne při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky.

Na závěr validační zprávy je připojeno prohlášení o vhodnosti metody pro zamýšlený účel a tento účel je přesně charakterizován. Validační zpráva je kontrolována a schvalována všemi zodpovědnými osobami pro kontrolní laboratoř, je stvrzena jejich podpisy a vhodně zálohována.

3.8 Analýza léčivých přípravků¹

Výsledná kontrola léčivého přípravku je jedním z nejdůležitějších kroků ve farmaceutické kontrole léčiv. Hodnocení farmaceutických přípravků je komplexní analytický postup, který kromě základních fyzikálních a chemických zkoušek předepsaných lékopisem (vzhled vzorku, zápach vzorku, pH, spektrální měření atd...) zahrnuje také identifikaci a kvantifikaci účinných látek a konzervancí, ale také hodnocení nečistot (podle lékopisu zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení obsahu). U léčivých přípravků a látek se tedy hodnotí identita látek, čistota, obsah účinné látky a dále stabilita, bezpečnost a účinnost. Metody hodnocení farmaceutických přípravků dále zahrnují zkoušky homogenity léčivých přípravků, zkoušky disoluce u tabletových lékových forem a také zkoušky liberace u topických lékových forem.

Před vlastním hodnocením přípravku pomocí HPLC je potřeba vzorek analyzovaného přípravku upravit vhodným způsobem. Proto je pro většinu stanovení nutná izolace analytu a zakoncentrování nebo naopak naředění vzorku před provedením vlastní analýzy. Během izolace se analyt uvolňuje z matrice a odstraňují se interferující látky tak, aby došlo ke zvýšení selektivity a citlivosti metody. Úpravou se získá reprezentativní část analyzovaného vzorku. Příprava a úprava vzorku bývá často časově nejnáročnějším a nejkritičtějším krokem analýzy. Volba metody pro přípravu vzorku závisí na povaze vzorku – zda se jedná o léčivý přípravek (volba metody závisí na lékové formě), biologický nebo rostlinný materiál.

3.8.1 Příprava vzorků léčivých přípravků

Přímý nástřik

U tekutých lékových forem lze použít metoda přímého nástřiku, kdy po potřebném naředění je vzorek dávkován přímo na analytickou kolonu.

Extrakce organickými rozpouštědly – LLE (liquid-liquid extrakce)

Princip extrakce organickými rozpouštědly spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny podle rozdělovacího poměru K. Rozdělovací poměr se určí jako poměr koncentrace látky v organické fázi ku koncentraci látky ve fázi vodné.

¹ Text kapitoly 3.8 byl vypracován ze zdroje [37][57] a [58].

Nejjednodušším provedením liquid-liquid extrakce je tedy protřepání daného podílu vodného roztoku s odpovídajícím objemem nemísitelného organického rozpouštědla. Tento postup je užitečný zejména pokud je analyt rozpustný v jedné vrstvě a interferující látky v druhé. Výhodou LLE extrakční metody je její jednoduchost a nenáročnost na provedení a přístrojové vybavení. Při vývoji liquid-liquid extrakčního postupu se vychází z fyzikálně chemických vlastností rozpouštědla. Optimalizuje se pH vodné fáze (úprava pH vzorku v případě izolace látek kyselé nebo bazické povahy), vliv poměru nemísitelných fází, způsob a doba extrakce.

Extrakce pevné lékové formy do kapaliny

Extrakce pevné lékové formy do kapaliny se používá například při analýze tablet. Izolace může být provedena relativně jednoduchým postupem zahrnujícím výběr rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, která poskytuje ideální rozpustnost pro analyzovanou látku a minimální rozpustnost pro interferující látky.

Superkritická fluidní extrakce – SFE

V současné době se rozvíjí technika superkritické fluidní extrakce. Postup využívá extrakce pomocí tzv. superkritických tekutin. Jako kapalina se používá většinou oxid uhličitý v superkritickém (nadkritickém) stavu (31°C, 7,3 MPa).

Extrakce na pevnou fázi – SPE (solid-phase extrakce)

K extrakci na pevnou fázi se používají speciální kolony naplněné pevným sorbentem. K plnění SPE kolonek se používají obdobné materiály, jaké jsou používány k plnění HPLC kolon. Velikost částic se pohybuje mezi 40-80 µm, průměr kolonek bývá 10 mm.

Analýza topických léčivých přípravků

Mezi topické léčivé přípravky se řadí masti, krémy, pasty a gely. Masti a krémy jsou polotekuté komplexní lékové formy obsahující jednu nebo více účinných látek dispergovaných v příslušném základu.

Úprava těchto lékových forem zahrnuje rozpuštění krému nebo masti v rozpouštědle nebo v organické mobilní fázi. Důležitým aspektem je rozpustnost látky ve zvoleném rozpouštědle a kompatibilita rozpouštědla s HPLC systémem. Nejčastěji se používá aceton, acetonitril, chloroform, ethanol, methanol a voda.

Často je však obtížné dosáhnout účinné extrakce analytů adsorbovaných nebo absorbovaných v krémech, mastích nebo ostatních polotekutých formách. Často je potřeba polotekutý léčivý přípravek zahřát na vodní lázni až do rozpuštění. Vzorek se

dále protřepe, popřípadě se zchladí v ledové lázni. V některých případech je potřeba provést liquid-liquid extrakci. Pro gelové lékové formy se používá např. rozpuštění ve zředěné kyselině chlorovodíkové, nebo dispergování do acetonitrilu případně liquid-liquid extrakce směsí chloroform-pufr.

Před chromatografickou analýzou je třeba odstranit pevné částice menší než 2 μm , které by se jinak dostaly na chromatografickou kolonu a mohly by způsobit pokles její účinnosti. Pro účinné odstranění těchto částic se používá filtrace přes filtry o velikosti pórů 0,45 μm .

3.8.2 Příprava vzorků biologického materiálu

Před analýzou biologického materiálu je nutné provést vhodnou izolaci látek, protože matrice obsahují velké množství balastů. Sledované látky nebo jejich metabolity jsou většinou přítomny v nízkých koncentracích. Výběr metody úpravy vzorku záleží na druhu biologického materiálu, na chemické struktuře izolované látky, na její polaritě a rozpustnosti. Biologické materiály používané pro analýzu jsou například krev, plazma, sérum, moč, sliny, nebo plodová voda.

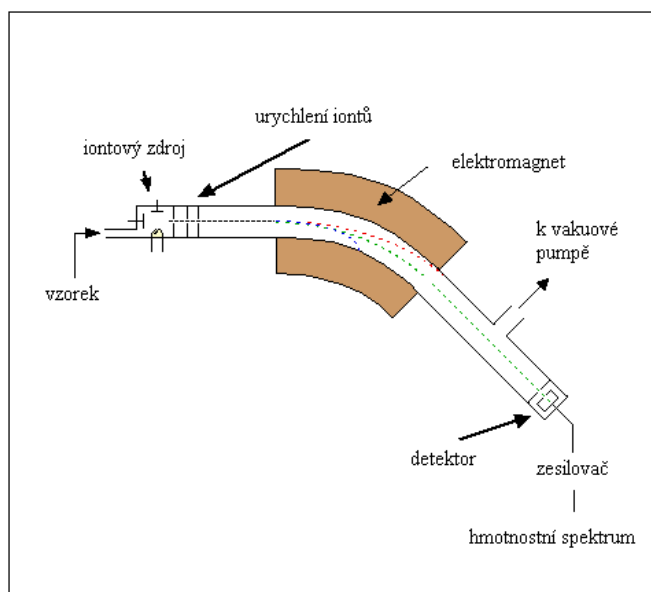
Při úpravě biologických materiálů se používají tyto typy úpravy vzorku před vlastní analýzou: přímý nástřik, extrakce organickými rozpouštědly (LLE), extrakce na pevných fázích (SPE), superkritická fluidní extrakce (SFE), mikroextrakce na pevných fázích (SPME), deproteinace, materiály s omezeným přístupem (RAM – restricted access material) a technika přepínání kolon.

3.9 Spojení kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS)^m

V posledních letech se jednou z nejdůležitějších analytických technik stala metoda HPLC/MS, která se velmi rychle vyvíjí a je metodou volby pro mnoho aplikací. Výhodou této metody je, že kromě separace analytů, jejich identifikace pomocí standardů a naměřených spekter a následné kvantifikace, poskytuje také informaci o molekulové hmotnosti analytu a o jeho struktuře. Díky MS detektoru je často možné identifikovat doposud neznámé nečistoty a rozkladné produkty, které se vyskytují v minimálním množství a které mohou vznikat v průběhu testování stability léčivých přípravků.

3.9.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, při které jsou molekuly převedeny na ionty a dochází k rozlišení iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Mezi výhody hmotnostní spektrometrie patří vysoká citlivost a minimální spotřeba vzork. MS umožňuje analytikovi zjistit molekulovou hmotnost a získat i další informace o struktuře analyzované látky interpretací spekter.



Obr. 6: Schéma hmotnostního spektrometru [62].

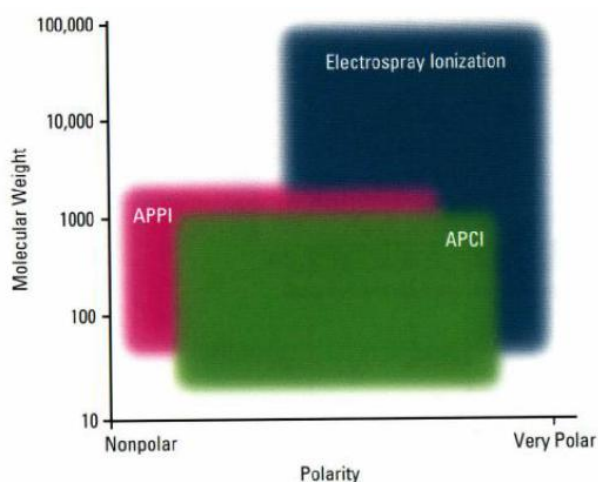
^mText kapitoly 3.9 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [59][60] a [61].

Základní části hmotnostního spektrometru

Hmotnostní detektor (Obr. 6) se skládá ze tří základních částí – z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. K dalším částem přístroje patří vakuový systém, zařízení pro zavádění vzorků, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač na sběr a zpracování dat a ladění spekter. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analyzovaných látek na nabitě částice (tzv. ionizace). V hmotnostním analyzátoru dochází k rozdělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů.

3.9.2 Ionizační techniky

Existuje řada ionizačních technik a je potřeba zvolit vhodný způsob ionizace pro analyzovanou látku. Mezi nejvíce využívané patří ionizace elektrosprejem (ESI), ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI) a elektronová ionizace (EI). ESI a MALDI se používají pro analýzu biomolekul. Volba ionizační techniky závisí na povaze analyzovaných látek a řídí se podle těkavosti látky (vhodné jsou EI, CI, FI), podle tepelné stability látky (pro termolabilní látky např. ESI), molekulové hmotnosti (asi do $M_R = 1000$ EI/CI, do několika tisíc APCI a FAB, do stovek tisíc ESI a MALDI) a podle polaroty látky (pro nepolární oblast je více vhodná APCI, pro polární ESI – Obr. 7). Pokud je analyzovaná směs látek, volí se spojení MS s vhodnou separační technikou – kapalinovou chromatografií, plynovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou.



Obr. 7: Rozdělení nejpoužívanějších technik podle polaroty a molekulové hmotnosti analytu.

Způsoby ionizace

Neutrální molekuly analytu jsou v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru převedeny na nabitě částice (ionty).

Elektronová ionizace (Electron Ionization, EI)

EI je nejvíce prozkoumanou metodou ionizace, jsou podrobně popsány fragmentační mechanismy pro jednotlivé skupiny látek. Existují rozsáhlé knihovny spekter umožňující porovnání získaného spektra s databází a umožňující rychlou identifikaci neznámé látky. Při elektronové ionizaci dochází k ovlivnění elektromagnetických polí, v důsledku čehož dochází k uvolnění valenčního elektronu a vzniku molekulárního iontu $M^{+\bullet}$ ($M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$).

EI je někdy označovaná jako „tvrdá“ ionizační technika, protože ionizovaná molekula při ní získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekuly na menší části. Podmínkou pro použití této techniky je těkavost látek. Proto se dnes s výhodou používá ve spojení s GC.

Měkké (šetrné) ionizační techniky

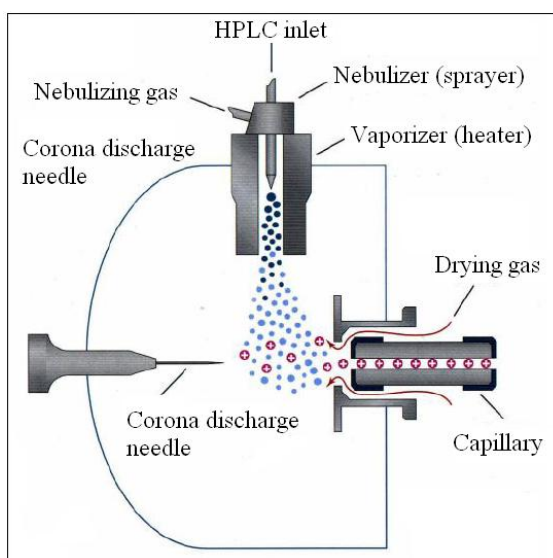
Při ionizaci vznikají protonované molekuly $[M+H]^+$ (při záznamu kladných iontů) nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$ (při záznamu záporných iontů). Nejšetrnější je ionizace ESI a MALDI. Ionizace termosprejem (TSI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) se řadí mezi techniky zavedené pro spojení HPLC/MS. K dalším, méně používaným ionizačním technikám patří ionizace urychlenými atomy (FAB) nebo ionty (FIB) a chemická ionizace (CI), ionizace polem (FI), desorpce polem (FD) a další ionizační techniky.

Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization, API)

Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (ESI, APCI a APPI) znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS - nyní díky API je HPLC/MS naprosto rutinní a spolehlivá analytická technika s obrovským významem pro strukturní analýzu organických látek ve směsích, identifikaci reakčních produktů a nečistot, stopovou analýzu a zejména díky ESI přináší zcela nové možnosti v oblasti biochemie.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)

Tato technika byla navržena pro spojení s HPLC a je plně kompatibilní s HPLC v rozsahu průtoků cca 0,1-2 ml/min. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku působením dostatečně intenzivního elektrického pole v okolí elektrody udržované na potenciálu několika kV a vystavené proudu dusíku. Tak vzniká koronární výboj, kterým jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze (protože jsou v obrovském přebytku) a následně ionmolekulárními reakcemi reakčního plynu (=ionizovaných molekul mobilní fáze) jsou ionizovány molekuly analytu; vzniklé ionty jsou urychleny elektrodami do analyzátoru. Vznikají téměř výhradně ionty se sudým počtem e^- ($M + H$)⁺ nebo ($M - H$)⁻ v závislosti na podmínkách ionizace. Schéma je znázorněno na Obr. 8.



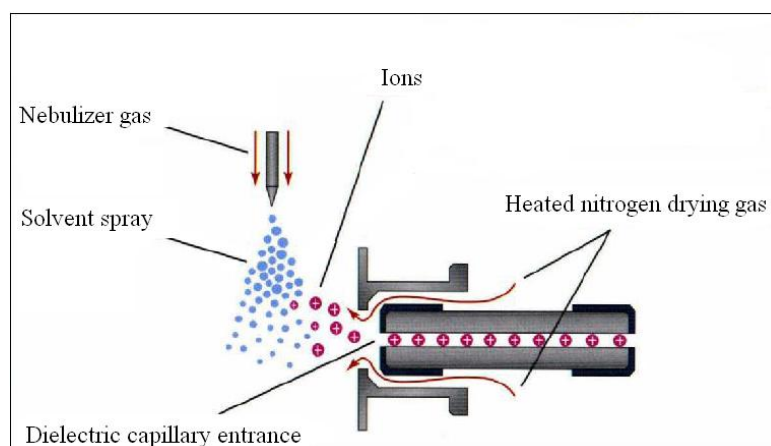
Obr. 8: Chemická ionizace za atmosférického tlaku.

Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization, ESI)

ESI je považována za vůbec nejšetrnější ionizační techniku. Princip elektrospreje je znázorněn na obrázku Obr. 9. Analyt rozpuštěný ve vhodném eluentu je přiveden kovovou kapilárou do iontového zdroje. Na kapiláru je vloženo vysoké napětí (3 – 5 kV), takže po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci koaxiálně přiváděného dusíku jako zmlžujícího plynu, vznikají kapičky, které nesou velké množství nábojů. Povrchová hustota nábojů postupně vzrůstá s dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček a tím i zmenšujícím se objemem a povrchem malých kapiček. Při překročení kritické hodnoty dochází ke Coulombické explozi - rozpadu nabitě

kapičky na řadu ještě menších kapiček nesoucích náboj. Ionty vznikají tzv. vypařováním iontů. Kapičky nesou mnohonásobně větší množství nábojů na svém povrchu, což umožňuje vznik mnohonásobně nabitých iontů u ESI, díky čemuž je možné analyzovat biopolymery s molekulovými hmotnostmi v desítkách tisíc Daltonů s běžným kvadrupólovým analyzátozem s hmotnostním rozsahem do m/z 3000 (podle molekulové hmotnosti a počtu bazických míst molekuly můžeme pozorovat až několik desítek nábojů).

Při použití ESI spojení s HPLC se obvykle používají vodné roztoky různých organických rozpouštědel (při spojení HPLC/MS volené podle podmínek separace) o průtoku řádově v jednotkách až desítkách $\mu\text{l}/\text{min}$ (cca 1-100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Pro podpoření ionizační účinnosti se často modifikuje pH eluentu přidávkem organické kyseliny (octová, mravenčí) o koncentraci obvykle 0,05-1%, nebo amoniaku (0,05-1%), octanu nebo mravenčanu amonného (5-10 mmol/l).



Obr. 9: Ionizace elektrosprejem.

3.9.3 Hmotnostní analyzátozy

Existuje několik typů hmotnostních analyzátozů, které pracují na různých principech. Rozdíly v účinnosti hmotnostních analyzátozů jsou v zásadě dány hmotnostním rozsahem, ve kterém mohou být měřeny poměry m/z a rozlišovací schopností (resolving power, RP). Podle základní definice se RP určí jako poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu iontů m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem, přičemž platí, že píky obou iontů jsou stejně vysoké a údolí mezi píky je 10%, tj. překrývají se z 10% (definice založená na překryvu dvou píků). Alternativní definice RP (platí zejména pro kvadrupóly a iontové pasti) využívá pro výpočet poměr hmotnosti iontu m a šířky

tohoto iontu v polovině jeho výšky. Rozlišují se analyzátoři s nízkým rozlišením ($RP = 1 - 5000$), ke kterým se řadí kvadrupólový analyzátor a iontová past. K analyzátorům s vysokým rozlišením (RP v desítkách až stovkách tisíc) patří sektorový analyzátor s dvojitou fokusací iontů, iontová cyklotronová rezonance a průletový analyzátor s reflektorem.

Úkolem hmotnostního analyzátoru je separace iontů v plynné fázi podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). K separaci dochází za vysokého vakua (přibližně $10^{-3} - 10^{-6}$ Pa). Existují různé typy analyzátorů, které využívají různé principy:

- magnetický analyzátor - v magnetickém poli dochází k zakřivení dráhy iontů, které je závislé na hodnotě m/z (m/z je úměrné druhé mocnině poloměru dráhy iontu r^2)
- průletový analyzátor - urychlené ionty se pohybují různou rychlostí v závislosti na hodnotě m/z ("menší" ionty se pohybují rychleji)
- kvadrupólový analyzátor - v daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z a tento iont projde kvadrupólovým analyzátořem, ionty s jinými hodnotami m/z mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, změnou napětí postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z . Trojitý kvadrupól (QqQ) – tři kvadrupóly jsou řazeny za sebou, prostřední z nich se využívá jako kolizní cela, v prvním kvadrupólu je vybrán iont, v kolizní cele dojde ke kolizní aktivaci pomocí kolizního plynu a následné fragmentaci, vlastní analýza probíhá ve třetím kvadrupólu, lze tedy provádět MS^2
- iontová past – v iontové pasti dochází k opakovanému selektivnímu vypuzení iontů podle hodnoty m/z z iontové pasti na detektor, možnost MS^n analýzy

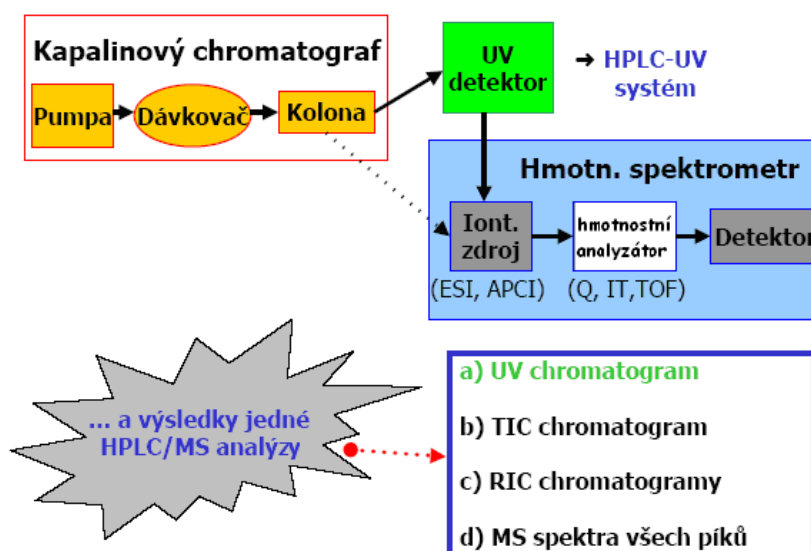
Iontová past (Ion Trap, IT)

V iontové pasti jsou ionty pulzně přivedeny do pasti, zde jsou zachyceny a potom jsou postupně vypuzovány na detektor podle jejich m/z . Iontová past se skládá ze dvou koncových a jedné kruhové elektrody. Akumulační časy pro záchyt iontů se přibližně pohybují v rozmezí $10 \mu s - 200 ms$ v závislosti na množství přiváděných iontů, doba excitace a kolize v pasti se pohybuje v rozmezí $20 - 60 ms$. Vhodnými poměry stejnosměrného a střídavého napětí vloženými na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti (účinnost záchytu přibližně 5 %) a postupnou

změnou těchto napětí jsou podle jejich m/z vypuzovány na detektor výstupním otvorem. Do pasti se zavádí helium jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi $5 \cdot 10^{-4}$ Pa, protože tlumí oscilace v ose z , čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení zachytu iontů. Množství iontů dávkovaných do pasti musí být regulováno, protože v případě přeplnění pasti může dojít ke vzniku tzv. prostorového náboje, který způsobí ovlivnění harmonického pohybu iontů a rezonance iontů každé hodnoty m/z bude přes širší rozsah frekvencí, což rozšíří pík.

3.9.4 Spojení kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS)

HPLC/MS analýza má vyšší informační hodnotu než samotná analýza kapalinovou chromatografií. Výsledkem jedné analýzy je pak nejen chromatografický záznam s UV detekcí (případně UV spektra z DAD), ale také hmotnostní spektra všech sledovaných píků a tzv. RIC (reconstructed ion current) a TIC (total ion current) chromatogram, které slouží především k odhalení píků šumu a tím vedou ke zvýšení selektivity a spolehlivosti metody (Obr. 10).



Obr. 10: Schéma spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem, výsledky analýzy spojených technik.

Spojení HPLC/MS umožňuje v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek. Podle typu analytu se pro spojení HPLC/MS dá využít několik typů ionizačních technik. Jako první byla pro spojení HPLC/MS použita ionizace termosprejem (TSI), ale dnes se již používá málo. Nejpoužívanějšími způsoby ionizace jsou ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (API) – ionizace

elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Dalšími metodami je ionizace a desorpce laserem za účasti matrice (MALDI) a elektronová ionizace (EI) s použitím Particle Beam převodníku.

Dříve bylo spojení HPLC/MS problémem hlavně z hlediska vhodného rozhraní mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem. Největším úskalím byl rozdíl tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (např. nejběžnější kvadrupólový analyzátor - 10^{-3} Pa) a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (tj. 10^5 Pa), a dále, že analyt vychází z HPLC v toku mobilní fáze (průtok asi 1 ml/min), která je v nadbytku a musí být odstraněna před vstupem do vakuové části přístroje. Mezi kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr je nutno zařadit některé z dále uvedených rozhraní:

– rozhraní pro přímý vstup kapalin: mobilní fáze je rozprášena a rozpouštědlo je odpařeno před vstupem do iontového zdroje;

– rozhraní pro vstup desolvatovaného vzorku: zajišťuje rozprášení mobilní fáze (do maximálního průtoku 0,6 ml/min) a následné odsušení kapalně fáze v desolvatační komůrce; vzorek v podobě neutrálních částic vstupuje do vlastního prostoru iontového zdroje; tato technika je vhodná pro analýzu málo polárních látek s hmotností do 1000 Da;

– rozhraní s pohybujícím se páskem: mobilní fáze se vzorkem, s maximální průtokovou rychlostí do 1 ml/min, je kontinuálně nanášena na smyčku z kovového pásku a přes systém vakuových uzávěrů je unášena do prostoru iontového zdroje; během pohybu dochází k odpaření rozpouštědla a vzorek je v prostoru iontového zdroje ionizován; tato metoda není vhodná pro analýzu vysoce polárních a tepelně nestálých látek.

Ostatní typy rozhraní (elektrosprej, termosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku) jsou ve své podstatě ionizačními metodami a jsou dále popsány v odstavci věnovaném způsobům ionizace.

Volbě rozpouštědel pro HPLC/MS je nutno věnovat velkou pozornost. V systému obrácených fází, který je nejčastější, se obvykle používá methanol nebo acetonitril, přičemž platí, že nejlepší odezva je obvykle při vysoké koncentraci organického rozpouštědla (70-90 %). MS je kompatibilní s HPLC v průtocích od $0,1 \mu\text{l min}^{-1}$ (ESI) do 1 ml min^{-1} (APCI, ESI) nebo až 2 ml min^{-1} (APCI), při použití nanelektrospreje se volí průtok v nl/min. Maximální citlivost a stabilita je dosažena při nižších průtocích.

Systémy s normálními fázemi jsou většinou špatně kompatibilní s ESI, lepší je kompatibilita s APCI. V mobilní fázi musí být určitý obsah (>5%) proton-donorního rozpouštědla, např. 2-propanol. Signál nelze získat ve 100% hexanu. Z důvodu kontaminace zdroje a zhoršení stability signálu je nutné vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům (CH_2Cl_2 , CH_3Cl , CCl_4), protože kontaminují zdroj a zhoršují stabilitu signálu.

Pro podpoření ionizace je nutné použít jako složku mobilní fáze vhodné aditivum. Přednost mají těkavá činidla v co nejnižších koncentracích - kyselina mravenčí nebo octová, amoniak o koncentraci 0,05 – 1%, octan nebo mravenčan amonný (5–10 mmol/l). Při použití TFA není vhodná příliš silná koncentrace, protože tvoří iontové páry, což zhoršuje pozadí.

S velkou výhodou se dnes používá tzv. tandemové spojení hmotnostních spektrometrů – MS/MS analýza (jako příklad lze uvést iontovou past, trojitý kvadrupól – QqQ, lineární iontovou past, spojení TOF-TOF analyzátorů), kdy lze provádět MS^n analýzu, nebo lze sledovat, pomocí specifické izolace iontu, rozpadové reakce, a tak snížit limit detekce. Taková spojení poskytují další selektivitu a vyšší citlivost.

3.10 Ultra Performance Liquid Chromatographyⁿ

Trend posledních let v analytické laboratoři je snaha provést co nejvíce analýz v co nejkratším čase s co největší úsporou materiálu. V kapalinové chromatografii to znamená urychlení a zkrácení analýzy se současným zachováním separační účinnosti, rozlišení, citlivosti metody, snížení spotřeby mobilní fáze, prodloužení životnosti analytických kolon a umožnění jejich použití pro co nejselektivnější nebo naopak pro co nejuniverzálnější aplikace. Jedním z nových trendů v oblasti kapalinové chromatografie je UPLC „Ultra Performance Liquid Chromatography“, pro který se zatím pouze hledá český ekvivalent.

UPLC

ACQUITY UPLC je přístroj firmy Waters, který nabízí nové možnosti nasazení kapalinové chromatografie v oblasti tzv. UPLC. Tato oblast využívá k separaci látek sorbentů s malými částicemi (menšími než 2 μm). Tyto sorbenty jsou svoji fyzikální a chemickou strukturou optimalizovány pro dělení látek v UPLC oblasti, kdy separace probíhá při vysokém tlaku systému (15.000 psi). Přínosem do oblasti chromatografie je především mnohonásobná účinnost dělicího procesu, kratší doba analýzy a vyšší citlivost. Přístroj nepřichází pouze s pokročilým přístupem dělení látek analytu, ale zahrnuje nové přístupy v oblasti uživatelského rozhraní, obsluhy, monitorování a diagnostiky systému. UPLC přístroj se stejně jako HPLC skládá ze čtyř základních modulů (Obr. 11).

ⁿ Text kapitoly 3.10 byl kromě uvedených citací vypracován ze zdrojů [37][63][64] a [65].



Obr. 11: UPLC analytický systém firmy Waters složený ze čtyř modulů – autosampler, kolonový termostat, binární pumpa a detektor.

Mobilní fáze je do systému dopravována pomocí Acquity UPLC binárního vysokotlakého gradientu. K základním vlastnostem se řadí nízký mrtvý objem, vakuový degaser, možnost výběru ze čtyř rozpouštědel a čtyři pístové akumulátorové komory vybavené snímači tlaku. Pumpa umožňuje nastavení průtoků v rozmezí od 0,01 - 2,00 ml/min (s přesností < 0,075 % RSD). Maximální pracovní tlak je asi 100 MPa (15 000 psi), což podporuje maximální využití sorbentů s velmi malým zrněním plněných do kolon s úzkým průměrem.

Přístroj je vybaven termostatovaným autosamplerem (sample manager) v rozsahu teplot od +4°C do +40°C. Sample manager umožňuje dávkování v rozsahu 0,1 - 50,0 μ L. Pro oplach jehly používá dvě kapaliny, tzv. silnou a slabou, volitelné podle povahy analyzovaných vzorků. Doba mezi nástřiky je velmi krátká, čímž je velmi urychlen dávkovací cyklus.

Jako detektor je instalován dvoukanálový UV/VIS nebo DAD detektor s vysokou citlivostí. Detektor umožňuje rychlý sběr dat (80 bodů za sekundu).

UPLC využívá nových typů sorbentů připravených patentovanou technologií „bridged ethyl/siloxane silica hybrid“ (BEH), která vykazuje právě velmi vysokou účinnost a velkou odolnost v širokém rozmezí pH (1-12). Analytické kolony jsou dostupné s vázanou C18 a C8 stacionární fází, kdy je využito včlenění trifunkčního

ligandu pro lepší stabilitu při nízkém pH. Pro dosažení lepšího tvaru píku je použita nová technologie endcappingu.

Kolonový termostat udržuje teplotu kolony v rozsahu od +5°C do +65°C. Kolony jsou vybaveny neodnímatelným mikročipem, který pomocí technologie eCord™ zaznamenává kompletní historii životního cyklu kolony (Obr. 12.) Lze tedy zpětně zjistit celkový počet měřených vzorků, celkový počet provedených nástřiků, kompletní tlakovou historii kolony a záznamy dat ze System Suitability testů.



Obr. 12: UPLC Acquity kolona s technologií eCord™.

UPLC je vhodnou alternativou HPLC, zejména ve vysoce produktivních analytických laboratořích, jako jsou např. farmaceutické laboratoře zabývající se hodnocením klinických studií léčivých přípravků, kontrolou finálních produktů i meziproductů ve farmaceutické výrobě nebo laboratoře zabývající se monitorováním lékových hladin.

O důležitosti významu techniky UPLC svědčí i to, že v roce 2006 byl představen další přístroj na bázi UPLC. Firma Thermo Electron Corp. uvádí na trh přístroj Accela High Speed LC [66].

Přenos metod mezi HPLC a UPLC je relativně jednoduchý, protože v UPLC jsou zachovány stejné mechanismy separace a chromatografické principy jako v HPLC. Při přenosu metody je tedy obvykle nutné pouze snížit průtokovou rychlost, zvýšit rychlost sběru dat a snížit objem vzorku dávkovaný na chromatografickou kolonu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

HPLC analýza léčivých přípravků je komplexní postup zahrnující řadu dílčích kroků od vypracování rešerše, přes optimalizaci chromatografických podmínek a izolačního postupu sledovaných analytů k validaci vyvinuté metody. Jednotlivé kroky jsou detailněji rozebrány v kapitolách - 3.1, 3.2, 3.6, 3.7 a 3.8.

V průběhu postgraduálního studia byly vyvinuty, validovány a v praxi používány HPLC metody pro analýzu léčivých přípravků: Indometacin gel, Terbinafin krém, Kalcium Pantotenát mast, Estrogel gel, Amastol neo a Heparin gel.

Dále byla vypracována UPLC metoda pro stanovení vitamínu A a E v biologickém materiálu. Během zahraniční studijní stáže bylo pracováno na HPLC a HPLC-MS analýze Erythromycinu a jeho esterů.

4.1 Indomethacin gel

Cílem práce bylo vyvinout HPLC metodu pro současné stanovení účinné látky indometacinu a jeho dvou rozkladných produktů - 5-methoxy-2-methylindolyloctové kyseliny a 4-chlorbenzoové kyseliny v topickém léčivém přípravku Indomethacin gel.

Indometacin patří do skupiny nesteroidních antiflogistik, má antipyretické, antiflogistické a analgetické účinky, které jsou způsobeny tlumením syntézy prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu. Přípravek se používá k léčbě degenerativních onemocnění kloubů, zánětů šlach, šlachových pouzder a okolních tkání a k tlumení posttraumatických a pooperačních otoků a zánětů [68].

K separaci byla použita kolona Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm; 3,5 μ m, Agilent Technologies) a mobilní fáze acetonitril – kyselina fosforečná 0,2 % 50:50 (v/v) o průtoku 0,6 ml/min. Analyty byly detekovány v UV oblasti při 237 nm. Pro kvantitativní hodnocení byla zvolena metoda vnitřního standardu a jako vnitřní standard byl vybrán ketoprofen.

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství gelu odpovídající 25 mg indometacinu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu ketoprofenu v methanolu (IS) o koncentraci $c = 1$ mg/100 ml a směs byla umístěna po dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

Byla provedena kompletní validace celé metody. Všechny testované parametry splňovaly požadovaná kritéria. Vyvinutá metoda se používá pro stabilitní studie uvedeného topického léčivého přípravku. Podrobněji je práce popsána v příloze 5.2.

4.2 Terbinafin krém

Hlavní sledovanou látkou v krému byl terbinafin. Terbinafin je allylamin se širokým spektrem antimykotické účinnosti u kožních mykóz vyvolaných dermatofyty. V nízkých koncentracích je terbinafin fungicidní proti dermatofytům a plísním. Účinek terbinafinu proti kvasinkám je v závislosti na druhu kvasinky fungicidní nebo fungistatický. V topických léčivých přípravcích se terbinafin používá k léčbě kožních mykóz. Dále se používá při léčbě pityriasis versicolor [68].

Kromě terbinafinu se v přípravku stanovoval obsah jeho rozkladných produktů: β -terbinafin, Z-terbinafin a 4-methylterbinafin. Byla hodnocena i nečistota pocházející z výchozích surovin syntézy: 1-methylaminomethylnaftalen.

K HPLC analýze byla použita chromatografická kolona NUCLEOSIL 100-5-CN (250 x 4,6 mm; 5 μ m, Bischoff Chromatography) a mobilní fáze o složení tetrahydrofuran-acetonitril-citrátový pufr pH 4,50 10:20:70 (v/v/v) a průtoku 0,8 ml/min. Detekce byla provedena při vlnové délce 226 nm. Pro kvantitativní hodnocení byla zvolena metoda vnitřního standardu a jako vnitřní standard byl vybrán propylparaben.

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství krému odpovídající 5,0 mg terbinafinu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu propylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci $c = 25 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ a 50 μ l 85% kyseliny fosforečné a směs byla umístěna po dobu 15 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 6000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplerm přímo na kolonu.

Metoda byla kompletně validována. Všechny testované parametry splňovaly požadovaná kritéria. Vyvinutá metoda se používá pro stabilitní studie topického léčivého přípravku Terbinafin krém. Podrobněji je práce popsána v příloze 5.3.

4.3 Calcium Pantotenát mast

Calcium Pantotenát mast se používá k podpoření obnovy poškozené pokožky. Urychluje hojení drobných nehnisavých poranění jako jsou odřeniny, praskliny na pokožce, popáleniny. Je vhodným přípravkem k promaštění pokožky, vylupování stroupků a k podpoře úplné regenerace kůže v závěrečné fázi planých neštovic [67].

V přípravku byla hodnocena účinná látka pantotenan vápenatý a dvě konzervační přísady methylparaben a propylparaben. Pro stanovení byla použita metoda vnitřního standardu, jako vnitřní standard byl použit ketoprofen. K analýze byla použita kolona Hypersil ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ m, Hypersil UK) a mobilní fáze o složení methanol – kyselina fosforečná pH 2,5, 65:35 (v/v) a průtoku 0,7 ml/min. Detekce byla provedena při vlnové délce 214 nm.

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství masti odpovídající 25 mg pantotenanu vápenatého (asi 0,5 g), byly přidány 2,00 ml chloroformu a zkumavka byla umístěna na vodní lázeň zahřátou na 75°C po dobu 20 minut. Bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu ketoprofenu ve směsi methanolu a tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 3,1 80:20 (v/v) (IS) o koncentraci $c = 5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ a směs byla umístěna po dobu 20 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 6000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr a dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

Byla provedena kompletní validace celé metody. Všechny testované parametry splňovaly požadovaná kritéria. Vyvinutá metoda se používá pro stabilitní studie topického léčivého přípravku Calcium pantotenát mast. Podrobněji je práce popsána v příloze 5.4.

4.4 Estrogel gel

V hormonálním léčivém přípravku Estrogel gel byla hodnocena hlavní účinná látka estradiol a dále spektrum jejích známých nečistot, které jsou uvedeny v Drug Master File dokumentaci. Hodnocené nečistoty byly: estron, $\Delta^{9(11)}$ – estron, $\Delta^{9(11)}$ – estradiol, hemidydrát 17α -estradiolu, 17α -ethinylestradiol, 3-methoxy- 17β -estradiol a 17β -estradiol-17-acetát. $\Delta^{9(11)}$ – estron je výchozí látkou a $\Delta^{9(11)}$ – estradiol je meziproduktem při syntéze estradiolu.

Nejlepších výsledků separace bylo dosaženo s kolonou Zorbax SB-CN (150 x 4,6 mm; 5 μ m, Agilent Technologies). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-kyselina fosforečná 0,085% - tetrahydrofuran v poměru 27:63:10 (v/v/v) o průtoku 1 ml/min. UV detekce byla provedena při 225 nm. Pro kvantifikaci byla využita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit flurbiprofen.

Za výše uvedených podmínek byl estradiol separován od všech svých nečistot. Izokratickým režimem se nepodařilo oddělit nečistoty estrone a $\Delta^{9(11)}$ – estron. Obě nečistoty mají shodný retenční čas a jsou vyhodnocovány jako suma dvou komponent.

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství gelu odpovídající 0,3 mg estradiolu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu flurbiprofenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci $c = 0,5$ mg/100 ml a směs byla umístěna po dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

Metoda byla kompletně zvalidovaná a všechny parametry splňují požadavky autorit. Podrobnější informace o metodě jsou uvedeny v příloze 5.5.

4.5 Amastol neo

Cílem práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu pro současné stanovení účinné látky chlorhexidin diglukonátu a jejího degradačního produktu p-chloranilinu v masti Amastol neo určené pro veterinární použití. Chlorhexidin působí proti široké škále gramnegativních a grampozitivních vegetativních bakterií, kvasinkám a dermatofytickým plísním [69].

Pro HPLC analýzu byla použita kolona Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm; 3,5 μ m, Agilent Technologies). Optimální mobilní fází pro separaci byla směs acetonitrilu a roztoku 0,08 M fosforečnanu sodného s obsahem 0,5 % triethylaminu (pH vodné fáze bylo nastaveno na hodnotu pH 3,0 kyselinou fosforečnou 85%) v poměru 35:65 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min, detekce byla provedena při 239 nm. Ke kvantitativnímu hodnocení byla použita metoda vnitřního standardu, jako vnitřní standard byl použit ethylparaben.

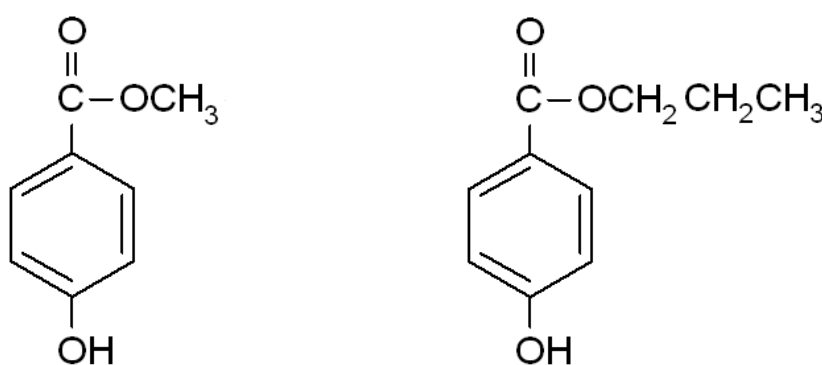
Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství masti odpovídající 2,55 mg chlorhexidin diglukonátu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku vnitřního standardu (ethylparaben, $c = 4$ mg/100 ml) ve směsi

acetonitrilu a 1% roztoku kyseliny mravenčí (v poměru 80:20 v/v) a zkumavka byla po uzavření skleněnou zátkou umístěna na vodní lázeň zahřátou na 80°C po dobu 20 minut. Poté byla směs umístěna po dobu 20 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 6000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes skládaný filtr a dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

Metoda byla kompletně zvalidovaná. Všechny testované parametry splňovaly požadovaná kritéria. Vyvinutá metoda se používá pro stabilitní studie topického léčivého přípravku Amastol neo. Podrobněji je metoda popsána v příloze 5.6.

4.6 Heparin gel

Cílem práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu pro současné stanovení konzervačních přísad methylparabenu a propylparabenu (Obr. 13) v topickém farmaceutickém přípravku Heparin gel. Účinnou látkou v gelu je sodná sůl heparinu, obsah heparinu byl sledován pomocí jiné metody. Heparin gel se používá jako dermatologikum a venofarmakum, jako podpůrná léčba při otocích po tupých zraněních a nárazech, při zhmožděninách a výronech krve, při zánětech povrchových žil [68].



Obr. 13: Methylparaben

Propylparaben.

Chemikálie

Methylparaben, Sigma-Aldrich GmbH, Německo

Propylparaben, Sigma-Aldrich GmbH, Německo

Ethylparaben, Fluka Chemie GmbH, Německo

Acetonitril, Supragradient, Biotech, Scharlau Chemie, Německo

Methanol, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, Německo

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Kyselina fosforečná 85% p.a., Merck

Chromatografické podmínky:

Na pracovišti katedry analytické chemie byla již vyvinuta řada chromatografických metod pro analýzu parabenů v různých léčivých přípravcích. Methylparaben a propylparaben se používají v léčivých přípravcích oba zároveň, protože jejich efekt je synergický [70]. Při vývoji této metody se vycházelo z metody pro stanovení parabenů v přípravku Heparin mast [71]. Pro analýzu gelu byla použita

jako mobilní fáze směs acetonitril - voda 45:55 (v/v). Z důvodu interference s balastními látkami v mast'ovém základu však bylo nutné složení mobilní fáze modifikovat. Změnou pH vodné složky mobilní fáze do kyselé oblasti, použitím zředěné kyseliny fosforečné, došlo ke zlepšení separace.

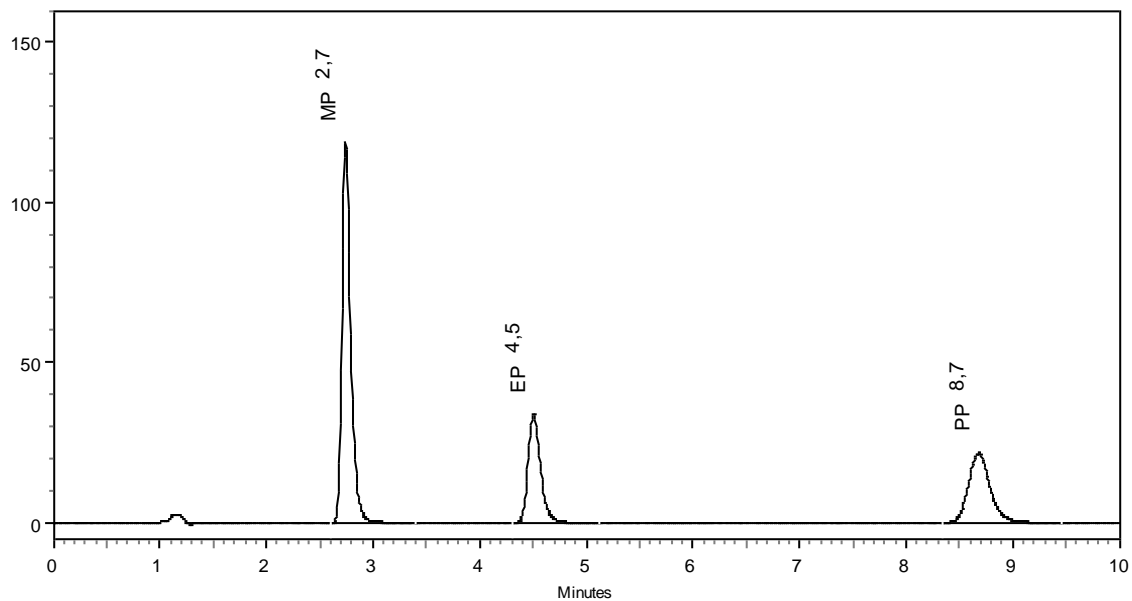
Jako vnitřní standard byl zvolen ethylparaben.

Izolační postup:

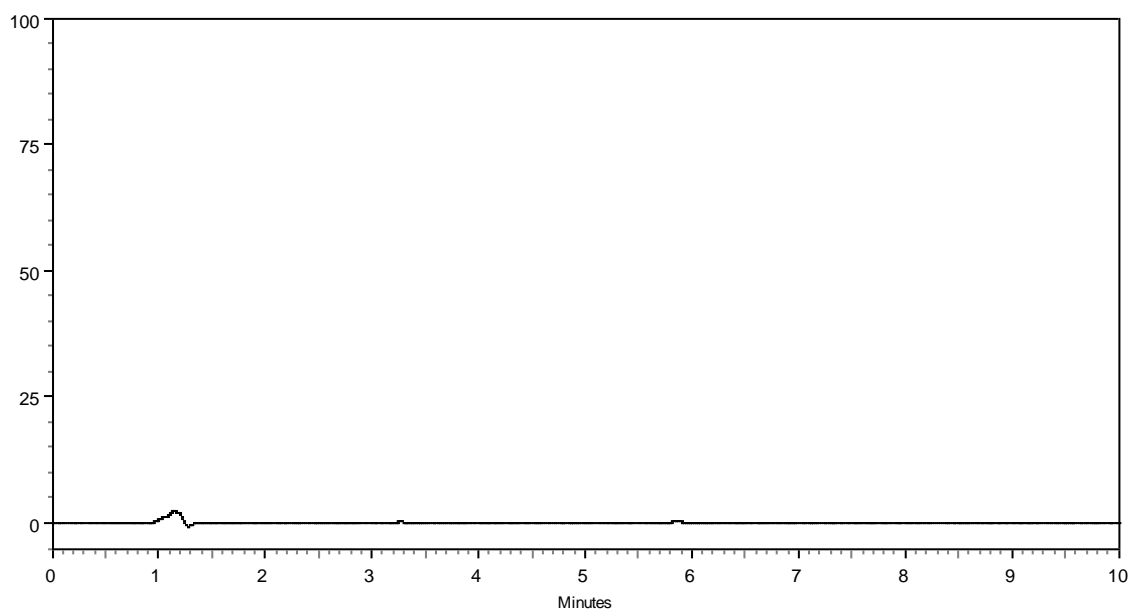
Příprava vzorku pro stanovení obsahu konzervačních přísad byla založena na metodice používané na katedře analytické chemie. Postup zahrnuje umístění vzorku s roztokem vnitřního standardu ve vhodném rozpouštědle do ultrazvukové lázně a následnou centrifugaci. Byly testovány optimální časy pro oba kroky izolace. Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství gelu odpovídající 0,5 mg methylparabenu a 0,25 mg propylparabenu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu ethylparabenu v methanolu o koncentraci $c = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ a směs byla umístěna po dobu 15 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 minut při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplerem přímo na kolonu. Účinnost uvedeného izolačního postupu byla testována ve validaci zjištěním validační charakteristiky správnost. Při zjišťování správnosti se postupuje tak, že k placebo léčivého přípravku (léčivý přípravek bez sledovaných látek) je přidáván roztok standardů a je sledována výtěžnost daného izolačního postupu.

Konečné chromatografické podmínky:

Sestava Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP.
Kolona: SUPELCO Discovery® C18 (125 x 4 mm, 5 μ m), Sigma Aldrich
Dávkování: 5 μ l
Mobilní fáze: acetonitril: 0,085% kyselina fosforečná 30:70 (v/v)
Průtok: $F_m = 1,1 \text{ ml}/\text{min}$
Izokratický režim
Teplota: 25°C
Detekce: 257 nm



Obr. 14: Chromatogram standardních látek s přidavkem vnitřního standardu.



Obr. 15: Chromatogram placeba.

Metoda byla kompletně zvalidována podle požadavků viz kapitola 3.7. Všechny validační parametry splňovaly požadovaná kritéria (výsledky validace viz. Tab. 9.)

Validace	parametr	methylparaben	propylparaben	Požadavek
SST				
Opakovatelnost ^a				
- retenční čas	RSD (%)	0,37	0,31	<1%
- plocha píku	RSD (%)	0,23	0,23	<1%
Počet teoretických pater ^a	N	5081	9161	N>2000
Rozlišení ^a	R _{ij}	1,39	1,20	R _{ij} >1,5
Asymetrie píku ^a	T	1,97	4,16	T<2
Validace metody				
Přesnost ^b	RSD (%)	0,50	3,29	x<5%
Linearita ^c	Korelační koeficient	0,999975	0,99937	x>0,9990
Správnost ^b	výtěžnost - %	101,08	100,41	x=100±5%
	-RSD(%)	0,06	0,51	x<5%

^a n=6

^b n=6, každý vzorek analyzován třikrát

^c n=6, každá koncentrace analyzována třikrát, rozmezí koncentrací 0,01-0,05 mg/ml methylparaben
3,75.10⁻³ – 0,02 mg/ml propylparaben

Tab. 9: Výsledky validace.

Součástí validace bylo také hodnocení robustnosti metody. Byly testovány mobilní fáze v různých poměrech složek (acetonitril – kyselina fosforečná 0,085% v poměrech 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 40:60) a jejich vliv na plochu píků a retenční časy. Relativní plocha píků vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 100,00 % až 100,25 % pro methylparaben a 98,31 % až 100,36 % pro propylparaben a proto v uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze neovlivňují stanovení methylparabenu a propylparabenu. V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze acetonitril – kyselina fosforečná 0,085 % (v/v) = 30:70.

Dále byl v rámci robustnosti sledován parametr krátkodobé stability (72 hodin) připraveného roztoku standardů v methanolu. Roztok byl uchováván za snížené teploty (4°C) a za laboratorních podmínek (~ 25°C). Vzorky byly analyzovány v čase 24, 48 a 72 hodin. Požadavek na stabilitu – změna obsahu sledovaných látek menší než 1 % byl splněn a roztok methylparabenu a propylparabenu v methanolu je možné používat při uchovávání za snížené nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

Stanovení obsahu methylparabenu a propylparabenu v gelu

Připraví se roztoky standardů v methanolu s obsahem 1 mg/100 ml ethylparabenu (IS), 2,5 mg/100 ml methylparabenu a 1,25 mg/100 ml propylparabenu ze 2 samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát. Provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku připraveného kompletním postupem uvedeným v podkapitole příprava vzorku. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.

Výpočet obsahu methylparabenu a propylparabenu (%) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 20}{A_S / A_{IS} \cdot m}$$

c_i	=	obsah stanovené složky v %
A_V, A_S	=	plocha píku vzorku, standardu
A_{IS}	=	plocha píku vnitřního standardu ethylparabenu
m_V, m_S	=	navážka vzorku, standardu v g
F	=	faktor korekce na obsah referenční látky

Vyvinutá metoda se používá pro účely stabilitní studie přípravku Heparin gel. Přípravek je vyhovující požadavkům autorit a specifikaci, pokud je obsah konzervačních přísad vyšší než 80% (viz kap.3.1).

4.7 UPLC analýza vitamínu A a E

Vitaminy A (retinol) a E (alfa-tokoferol) patří mezi antioxidační látky schopné významně oslabit toxický efekt volných kyslíkových radikálů a tím přispět k celkové ochraně organismu [72]. Monitorování hladin retinolu a alfa-tokoferolu v lidském séru je používáno pro hodnocení oxidačního stresu.

Cílem této práce byla optimalizace a vývoj UPLC metody pro stanovení vitaminů retinolu a alfa-tokoferolu v biologickém materiálu (krevním séru) a porovnání výsledků analýzy UPLC metody s metodou HPLC využívající k analýze monolitickou kolonu. Pro kvantitativní hodnocení se používala metoda vnějšího standardu.

Chemikálie:

Retinol, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Alpha-tocopherol a gama-tocopherol - Tocopherol set, Merk, Praha Česká republika

Methanol, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Hexan, chromasolv for HPLC, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Ethanol, chromasolv for HPLC, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

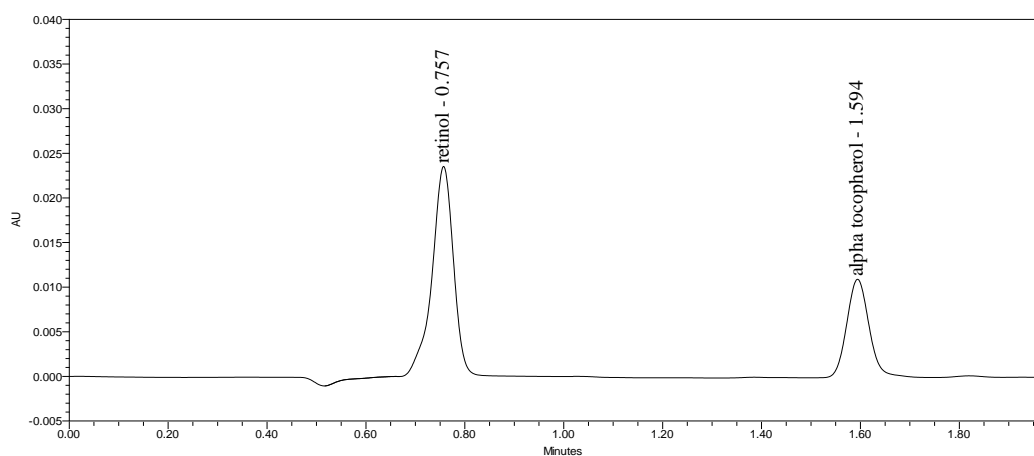
Příprava vzorku:

Pro přípravu vzorku byla použita metoda popsaná pro hodnocení hladiny vitaminů A a E v séru pracovníky Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice v Hradci Králové [73].

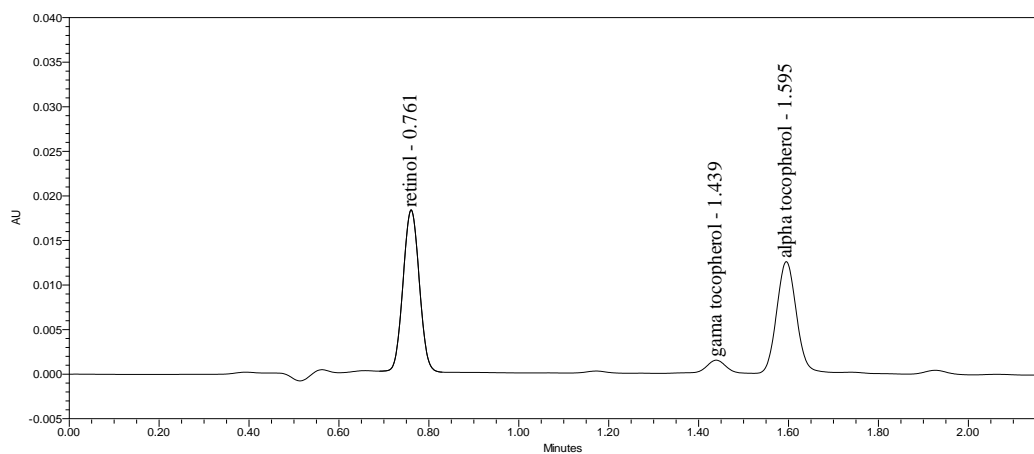
Do zábrusové zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml séra, přidáno 0,5 ml etanolu denaturovaného methanolem. Vzorek byl protřepán a nechán 5 minut deproteinovat. Poté bylo přidáno 2,5 ml n-hexanu a 5 minut se intenzivně třepalo na třepáče. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 3500 otáček za minutu a 0°C, poté byly z horní hexanové vrstvy odebrány 2,0 ml supernatantu. Vzorek byl vysušen pod proudem dusíku a odparky byly rozpuštěny v 0,4 ml methanolu, vzorek byl zfiltrován (filtr 0,2 µm) a analyzován pomocí UPLC.

Chromatografické podmínky:

Sestava Waters Acquity UPLC, Waters
Kolona: Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm)
Dávkování: 5 μl
Mobilní fáze: methanol
Průtok: $F_m = 0,48 \text{ ml/min}$
Izokratický režim
Teplota: 20°C
Detekce: 325 nm retinol, 295 nm alfa-tokoferol



Obr. 16: Chromatogram: Analýza roztoku standardu - retinol 2,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, alfa-tokoferol 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$.



Obr. 17: Chromatogram: Analýza biologického vzorku (lidského séra) s obsahem retinolu, alfa-tokoferolu a gama-tokoferolu.

	Vitamin A (retinol)	Vitamin E (α - tokoferol)
SST		
Opakovatelnost – retenční čas (R.S.D.%) ^a	0,1	0,2
Opakovatelnost - plocha (R.S.D.%) ^a	0,5	0,6
Počet teoretických pater ^a	2064	6466
Rozlišení ^a	1,99	9,47
Asymetrie ^a	1,03	1,06
Validace		
Přesnost (R.S.D.%) ^b	3,78	4,61
Kalibrační rozmezí ($\mu\text{mol l}^{-1}$) ^c	0,25-10,00	0,5-50,00
Korelační koeficient	0,9997	0,9997
LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0,019	0,05
LOQ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0,06	0,15

^a n = 6, roztok standardů retinol 2,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, tokoferol 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$

^b n = 6, analyzované vzorky séra

^c n=6, každá koncentrace analyzována třikrát, rozmezí koncentrací 0,25-10,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ retinol
0, 5-50,00 $\mu\text{mol l}^{-1}$ α -tokoferol

Tab. 10: Výsledky validace.

Závěr:

Byla vyvinuta a zvalidována UPLC metoda pro současné stanovení vitamínu A a E v biologickém materiálu.

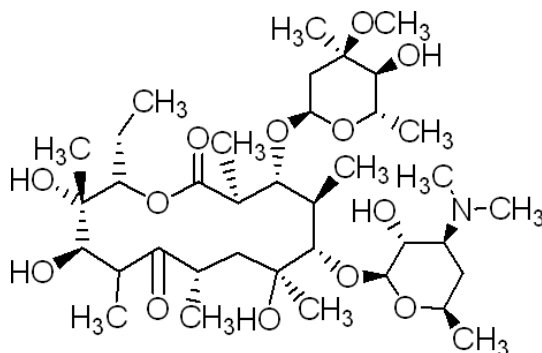
Výhodou UPLC metody pro současné stanovení vitamínu A a E v lidském séru oproti HPLC metodám využívajícím běžné C18 kolony [73] je zejména rychlost analýzy a nízká spotřeba rozpouštědel. Zajímavější výsledky přináší porovnání UPLC metody a HPLC metodiky s využitím monolitického typu kolon. Hodnoty validačních parametrů a hodnoty parametrů SST jsou porovnatelné. Celková doba analýzy je téměř shodná, UPLC ale přináší možnost analýzy s nízkým průtokem mobilní fáze a tak nižší spotřebou mobilní fáze a snížením ceny jedné analýzy.

4.8 Erythromycin

Erythromycin (Obr. 18) patří do skupiny makrolidových antibiotik, je produkován kmenem *Saccaropolyspora*. Má zásadité pH a proto snadno reaguje s kyselinami za vzniku solí. Bylo prokázáno, že erythromycin se váže na 50 S ribozomální podjednotku citlivých bakterií a inhibuje tak proteosyntézu. Erythromycin je obvykle účinný proti grampozitivním i gramnegativním mikroorganismům. Je indikován k léčbě pacientů, kterým není možné lék podávat perorálně nebo kde závažnost infekce vyžaduje rychlé dosažení vysokých hladin erythromycinu v séru. Po přiměřené době by měla být intravenózní léčba nahrazena perorální. Erythromycin se používá k léčbě infekcí horních cest dýchacích, ORL infekcí, faryngitidy a infekcí dolních cest dýchacích (pneumonií) mírné a střední závažnosti. Na základě klinických výsledků je erythromycin doporučen jako antibiotikum první volby na léčbu legionářské choroby.

V terapii se používá erythromycin i jeho estery. Farmakokinetické vlastnosti erythromycinu a jeho esterů závisí na konkrétní lékové formě. Erythromycin v perorálních formách je obvykle báze erythromycinu, erythromycin-estolát, ethylsukcinát, laktobionát nebo stearát. Tekuté perorální formy obsahují erythromycin-ethylsukcinát nebo erythromycin-estolát. Parenterální formy obsahují erythromycin laktobionát a erythromycin glucoheptát [74].

Erythromycin je směsí makrolidových antibiotik. Hlavní složkou je erythromycin A. Celkový obsah erythromycinu A, B a C by se měl pohybovat v rozmezí 93,0 – 102%. Obsah erythromycinu B i C je nejvýše 5% pro každou látku [10].



Obr. 18: Erythromycin.

4.8.1 HPLC analýza erythromycin-estolátu

Erythromycin-estolát je laurylsulfát erythromycinu. Cílem práce bylo vyvinout izokratickou HPLC metodu pro stanovení erythromycin-estolátu a vybraných nečistot požadovaných spolupracující firmou. Největším úskalím byla počáteční absence standardů analyzovaných látek na pracovišti.

Stanovované rozkladné produkty: erythromycin A enol ether propionat (EAEEP), anhydroerythromycin A propionat (AEAP), pseudoerythromycin A enol ether propionat (PSEA) a erythromycin B propionat (EBP).

Sledované příbuzné látky, které mohou vznikat během syntézy: erythromycin A (výchozí látka syntézy), erythromycin B a erythromycin C, které mohou vzniknout během fermentace.

Nejprve byla provedena literární rešerše. Bylo nalezeno několik HPLC metod zabývajících se analýzou erythromycinu [75][76][77], popřípadě erythromycin-estolátu a jejich nečistot [78][79][80]. Hodnota pH vodné složky mobilní fáze se u většiny prací pohybuje v rozmezí pH 7,5 – 9. Některé metody využívají ke stanovení erythromycinu iontově výměnnou chromatografií [81][82].

HPLC metoda pro stanovení erythromycin-estolátu a jeho příbuzných látek je uvedena v Americkém lékopise [11].

Žádná z uvedených metod se nezabývala současnou analýzou erythromycin-estolátu a jeho příbuzných látek zahrnujících i erythromycin a jeho některé vybrané příbuzné látky.

Chemikálie:

Erythromycin estolat	Ercros
Erythromycin A enol ether propionat	Ercros
Anhydroerythromycin A propionat	Ercros
Pseudoerythromycin A enol ether propionat	Ercros
Erythromycin B propionat	Ercros
Erythromycin A, CRS	
Erythromycin B, CRS	
Erythromycin C, CRS	
Acetonitril HPLC Gradient Grade	Fischer Scientific
Hydrogengosforečnan draselný	Fluka
Methanol Lichrosolv	Merck
Hydroxid sodný	Fluka

Kyselina fosforečná 85% Merck
Tetrabutylammonium hydrogensulfát Fluka
Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Přístrojové vybavení:

HPLC sestava:

Agilent 1100 Series Agilent Technologies
Pumpa: G1312A
Degaser: G1379A
DAD: G1315B
Autosampler: G1313A

Příprava vzorku:

5,8 mg erythromycin-estolátu bylo rozpouštěno v 1 ml směsi voda-acetonitril 40:60 (v/v). Vzorek byl filtrován (filtr 0,22 μm) a dávkován na kolonu. Erythromycin se velmi rychle rozkládá a v roztoku není stabilní. Každý den byl připravován vzorek čerstvý, zároveň byly analyzovány starší vzorky a sledovány vznikající rozkladné produkty, které byly patrné na chromatogramu již druhý den.

Chromatografie:

V prvním kroku byla vyzkoušena metoda iontově výměnné chromatografie vyvinutá pouze pro analýzu EAE zadávající firmou [83].

Chromatografické podmínky:

Kolona: Nucleosil 100-5 C18 AB (250 x 4mm, 5 μm , Macherey-Nagel)

Mobilní fáze: roztok A : acetonitril – 40:60 (v/v)

Roztok A: 25,0 ml pufru A a 25,0 ml pufru B bylo doplněno vodou do 250,0 ml.

Pufř A: 1,5 g hydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí ve vodě, pH hodnota se upraví kyselinou fosforečnou 85% na pH 6,5, objem se doplní do 50,0 ml vodou.

Pufř B: 6,4 g tetrabutylammonium hydrogensulfátu se rozpustí ve vodě, pH hodnota se upraví pomocí 1M hydroxidu sodného na pH 6,5, objem se doplní do 50,0 ml vodou.

Průtok: 1,2 ml/min

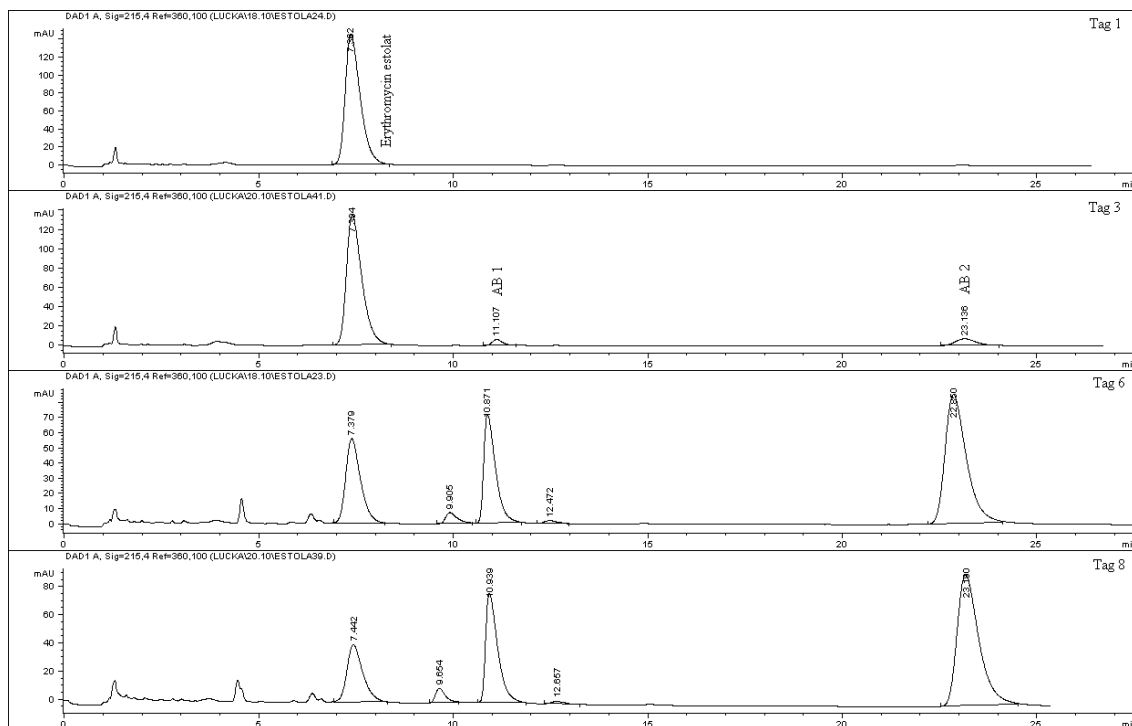
Detekce: 215 nm

Dávkování: 20 μl

Teplota: 25°C

Za výše uvedených chromatografických podmínek nebylo dosaženo dokonalé separace. Čas jedné analýzy byl 70 minut, a také proto bylo nutné chromatografické podmínky upravit.

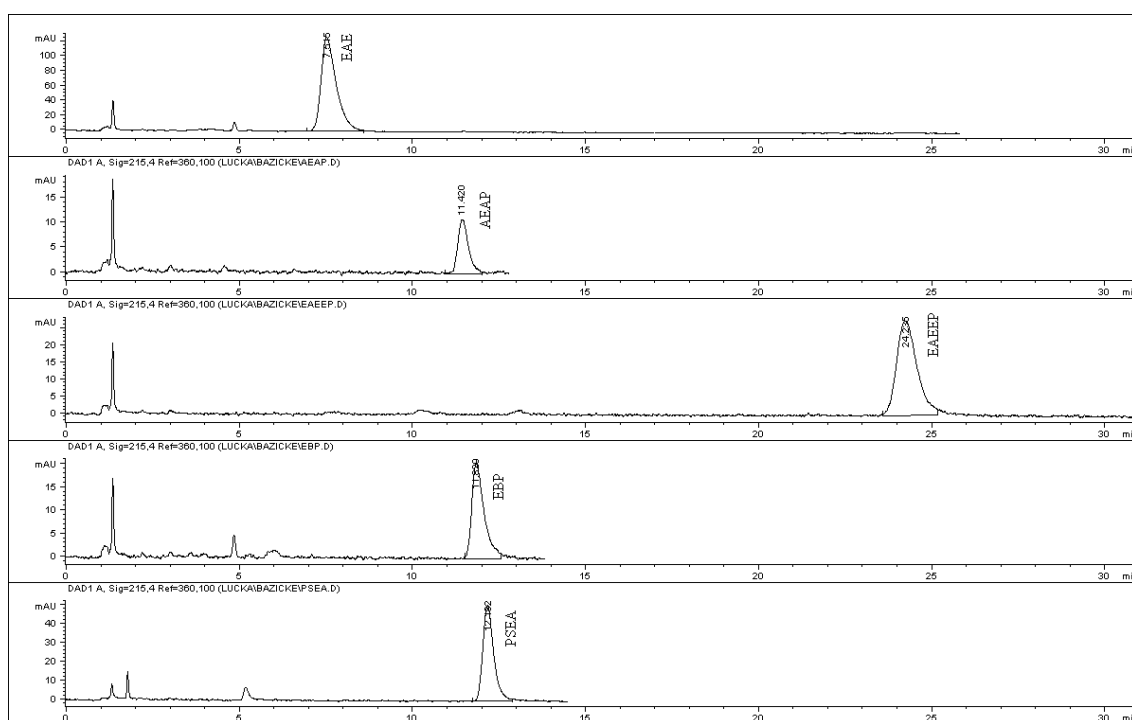
V dalším kroku tedy vyzkoušena HPLC metoda bez přídavku iontoměniče. Bylo zjištěno, že přídavek tetrabutylammonium hydrogensulfátu neměl vliv na výsledný chromatogram, a proto se od jeho použití upustilo. Dále byl testován vliv pH hodnoty vodné složky mobilní fáze na separaci, byla testována mobilní fáze obsahující 32 mM hydrogenfosforečnan draselný o pH v rozmezí hodnot 3-8. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 8 vodné složky mobilní fáze.



Obr. 19: Chromatogram: analýza erythromycin-estolátu, mobilní fáze 32 mM K_2HPO_4 pH 8 - ACN 40:60 (v/v), průtok 1,2 ml/min, UV detekce 215 nm. Roztok vzorku analyzován v den přípravy, dále po 48, 120 a 168 hodinách.

Za uvedených podmínek byla účinná látka erythromycin-estolát oddělena od některých svých rokladných produktů (Obr. 19). Podle dostupné literatury vzniká rozkladem erythromycin-estolátu v zásaditém prostředí pseudoerythromycin A enol ether propionát a v kyselém prostředí dochází k rozkladu erythromycin-estolátu za vzniku erythromycin A enol ether propionátu a anhydroerythromycin A propionátu [74].

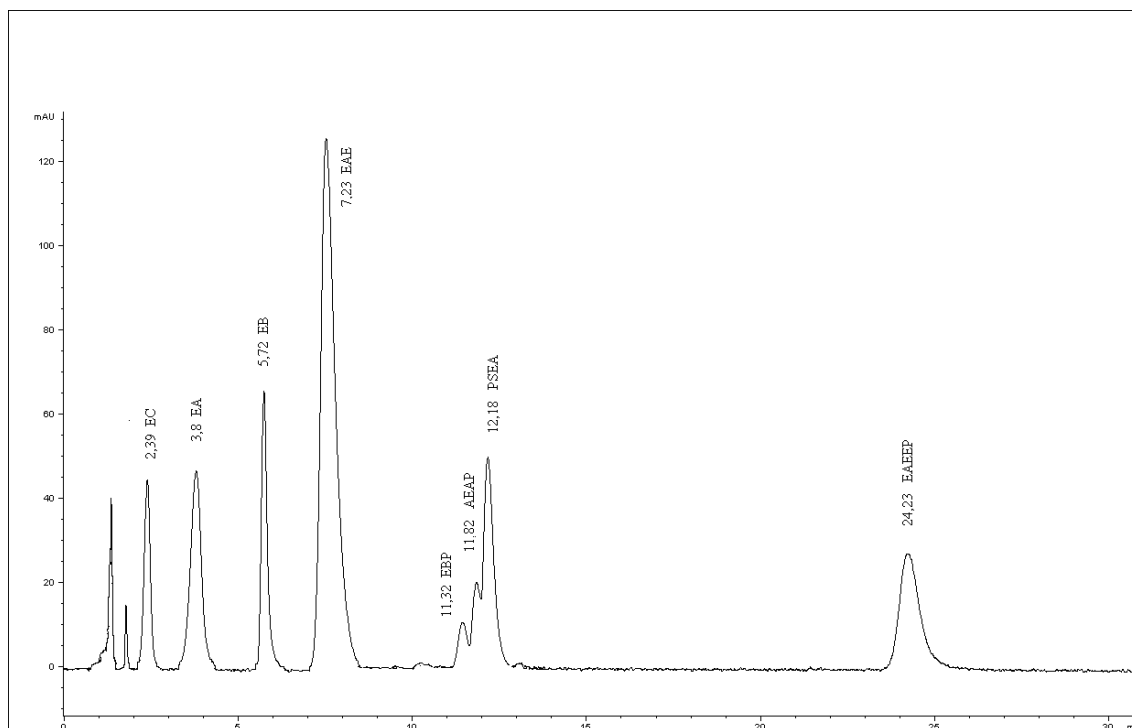
Totožnost předpokládaných rozkladných produktů a vedlejšího produktu ze syntézy (EBP) byla nakonec potvrzena analýzou získaných standardů zapůjčených ze spolupracující laboratoře. Koncentrace jednotlivých standardních látek (PSEA, AEAP, EAEEP a EBP) pro analýzu byla 3,0 mg/ml ve směsi voda: acetonitril 40:60 (v/v). Na (Obr. 20) jsou znázorněny chromatogramy roztoků standardů sledovaných látek.



Erythromycin estolat	EAE
Erythromycin A enol ether propionat	EAEEP
Anhydroerythromycin A propionat	AEAP
Pseudoerythromycin A enol ether propionat	PSEA
Erythromycin B propionat	EBP

Obr. 20: Chromatogram: analýza erythromycin-estolátu a standardů nečistot, mobilní fáze 32 mM K_2HPO_4 pH 8: ACN 40:60 (v/v), průtok 1,2 ml/min, UV detekce 215nm.

Za uvedených podmínek došlo také k separaci erythromycinu A, B i C od účinné látky erythromycin-estolátu, jak je dokumentováno na obrázku Obr. 21. Koncentrace erythromycinu A, B a C je 3 mg/ml ve směsi voda: acetonitril 40: 60 (v/v).



Obr. 21: Chromatogram: analýza roztoku standardů účinné látky EAE a sledovaných rozkladných produktů a příbuzných látek, mobilní fáze 32 mM K_2HPO_4 pH 8: ACN 40:60 (v/v), průtok 1,2 ml/min, UV detekce 215 nm.

Zavěr:

Byla vyvinutá metoda pro současné stanovení účinné látky erythromycin-estolátu a jeho některých rozkladných produktů - EAEEP, AEAP a PEAEAP a vybraných substancí, které mohou vznikat během syntézy erythromycin-estolátu – erythromycin A, B, C a erythromycin B propionát. Ve vývoji metody bude pokračováno i v budoucnu, kdy je nutné optimalizovat podmínky pro úplnou separaci rozkladných produktů a metodu validovat.

4.8.2 HPLC/MS analýza erythromycin-laktobionátu

Erythromycin-laktobionát je směsí laktobionátů makrolidových antibiotik. Součet obsahu erythromycin-laktobionátu A, B a C je 93-100,5% [10].

Při MS analýze a snímání kladných iontů je sledován pouze erythromycin. Hlavní složkou je erythromycin A (EA), v závislosti na podmínkách fermentace a průběhu čistícího postupu, mohou být ve vzorcích přítomny malá množství některých příbuzných látek: erythromycin B (EB), C (EC), D (ED), E (EE), F (EF), N – demethylethromycin A (NdMeEA) a erythromycin A N-oxid (EAEO).

Rozkladné produkty, vznikající v kyselém prostředí jsou anhydroerythromycin A (AEA) a erythromycin A enol ether (EAEN), v bazickém prostředí vzniká pseudoerythromycin A enol ether (PsEAEN) [84][75].

Cílem práce bylo použít vyvinutou HPLC/MS/MS metodu [85] k zjištění výskytu jednotlivých nečistot v komerčně vyráběném přípravku Erythromycin® Abbott GmbH.

Bylo analyzováno celkem 50 vzorků. Kompletní analýza každého vzorku trvala 6 hodin.

LC/MS sestava:

Agilent 1100 Series, Agilent Technologies

Pumpa	G1312A
Degaser	G1379A
DAD	G1315B
ALS Autosampler	G1329A
LC/MSD Trap SL	G2445D

LC/MS systém:

Kolona:	Hydro RP18 (150 x 4,6 mm, 4 μ m), Phenomenex
Mobilní fáze:	5 mM octan amonný, 0,05% kyselina mravenčí (A), ACN/MeOH (80:20 v/v) / 0,05 % kyselina mravenčí (B)
Gradientová eluce:	0,5 min 55% B 0,5-7,5 min 45 % B 7,5 – 23 min 45-70 % B
Průtok:	0,6 ml/min
Dávkování:	25 μ l

Teplota:	25°C
Detekce:	LC/MSD Trap SL iontová past, ionizace elektrosprejem
Interface:	jako nebulizér a sušící plyn byl použit dusík
Tlak:	45,00 psi
Průtok:	10 l/min
Teplota:	350 °C

Záznam kladných iontů

Agilent LC/MS ChemStation (verze 4.1., MSD Trap Kontrol 5, Data Analysis 2.0)

Chemikálie:

Octan amonný	Fluka
Acetonitril HPLC Gradient Grade	Fischer Scientific
Kyselina mravenčí	Fluka
Methanol Lichrosolv	Merck
Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)	
Erythromycin® Abbott GmbH	

Příprava vzorku:

Komerčně vyrobený vzorek erythromycinu (75 µg/ml) se rozpustí v 1 ml směsi acetonitril-methanol 80:20 (v/v) a 0,005M octanu amonném v poměru 55:45. Vzorek se zfiltruje a analyzuje.

Pro kvantifikaci erythromycinu a jeho příbuzných látek byla použita již vyvinutá metoda HPLC/ESI-MS/MS. Uvedená metoda ESI je založena na částečné separaci vzorků na chromatografické koloně a hmotnostní detekci v selektivním modu – sledování produktu rozpadu iontu (multiple reaction monitoring, MRM). Takový způsob detekce umožňuje sledovat signál několika charakteristických fragmentací současně. Byly hodnoceny ionty mateřské a dceřiné s použitím standardů EA (2,25 µg/ml), EB a EC (3,75 µg/ml).

Fragmentace: prekurzorový iont → produktový iont - EB 718 → 524, EC 720 → 576, ED 704 → 560, EE 748 → 574, EF 750 → 592, EAEO 750 → 592, NdMeEA 720 → 562, AEA 716 → 540 a EAEN a PsEAEN 716 → 558.

Při interpretaci spekter se vycházelo provedených studií zabývajících se MS analýzou erythromycinu a jeho analogů [86][87][88].

Erythromycin A (m/z 734) - postupná ztráta dvou molekul vody vede k iontu m/z 716 a 698 s poměrně nízkou intenzitou. Po odštěpení neutrální molekuly L-kladinosy vzniká produktový ion m/z 558, stejná ztráta z iontů m/z 716 a m/z 698 dávají vznik fragmentům m/z 540 a 522. Ion m/z 576 vzniká ztrátou neutrálního fragmentu 158 Da od mateřského iontu.

Erythromycin B (m/z 718) – v MS/MS spektru je zřejmý iont m/z 542, představující ztrátu L-kladinosy a molekuly vody. Ztráta kladinosy představuje iont m/z 560, iont m/z 524 odpovídá ztrátě dvou molekul vody a cukru.

Erythromycin C (m/z 720) – ionty m/z 702 a 684 představují ztráty dvou molekul vody, ztráta L-mykarosy z mateřského iontu a iontu m/z 702 dává dceřiné ionty s hodnotou m/z 576 a 558, následnou ztrátu vody představují ionty m/z 540 a 522.

Erythromycin D (m/z 704) – v MS/MS je intenzivní iont m/z 560 představující ztrátu molekuly vody a mycarosy, další ztráta molekul vody představuje iont m/z 524.

Erythromycin E (m/z 748) – v MS/MS spektru je intenzivní iont m/z 574 odpovídající ztrátě kladinosy a kyslíkového atomu z glykosidické vazby.

Erythromycin F (m/z 750) – intenzivní produktový iont o m/z 574 představuje ztrátu dvou molekul vody a L-kladinosy.

Anhydroerythromycin A (m/z 716) – v MS/MS spektru ionty m/z 558 a 540 představující ztrátu 158 Da z prekurzoru a iontu vzniklého ztrátou vody.

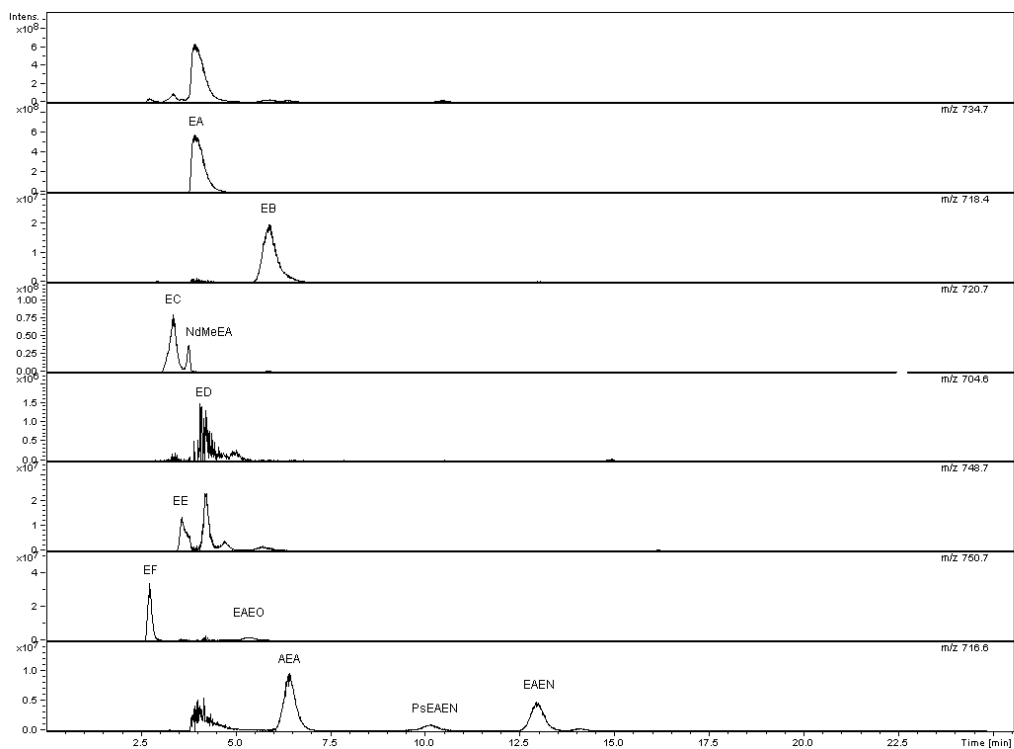
Erythromycin A enol ether (m/z 716) – ztráta 158 Da znamená intenzivní iont m/z 558.

N – demethyleerythromycin A (m/z 720) – ionty m/z představují ztráty molekul vody, intenzivní dceřinný iont m/z 562 vzniká ztrátou dihydropyranového derivátu L-kladinosy.

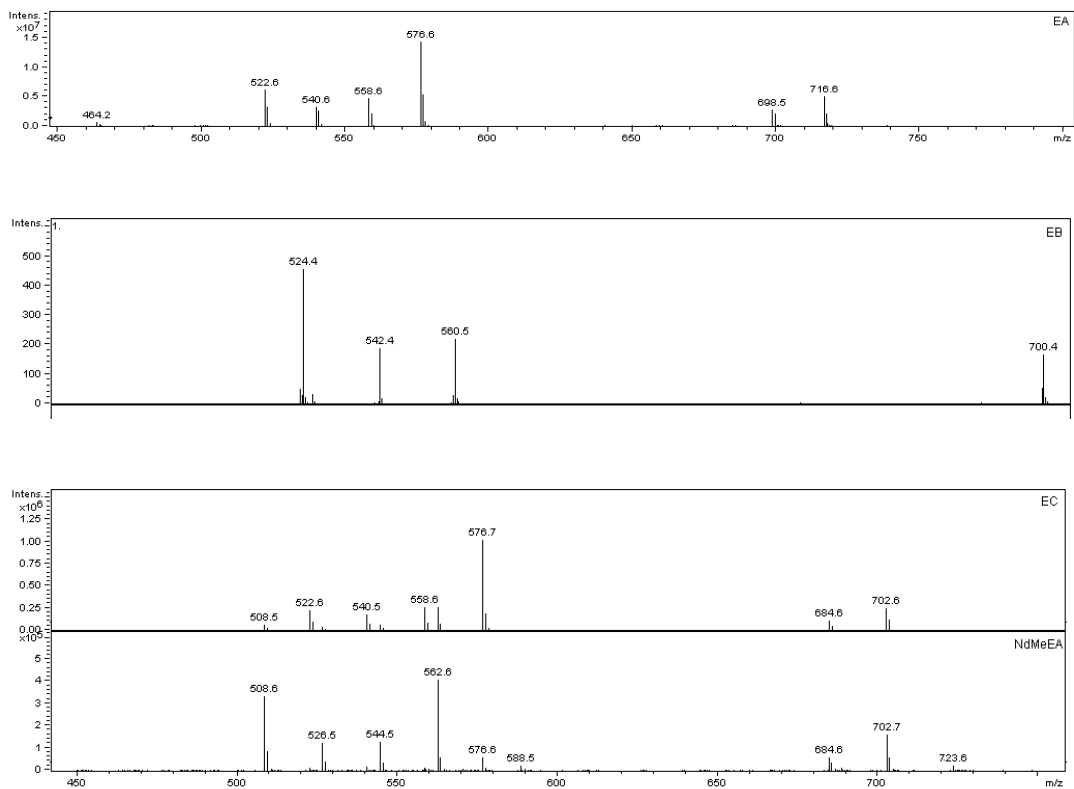
Erythromycin A N-oxid (m/z 750) – iont m/z 592 vzniká ztrátou L-kladinosy a následnou ztrátou vody.

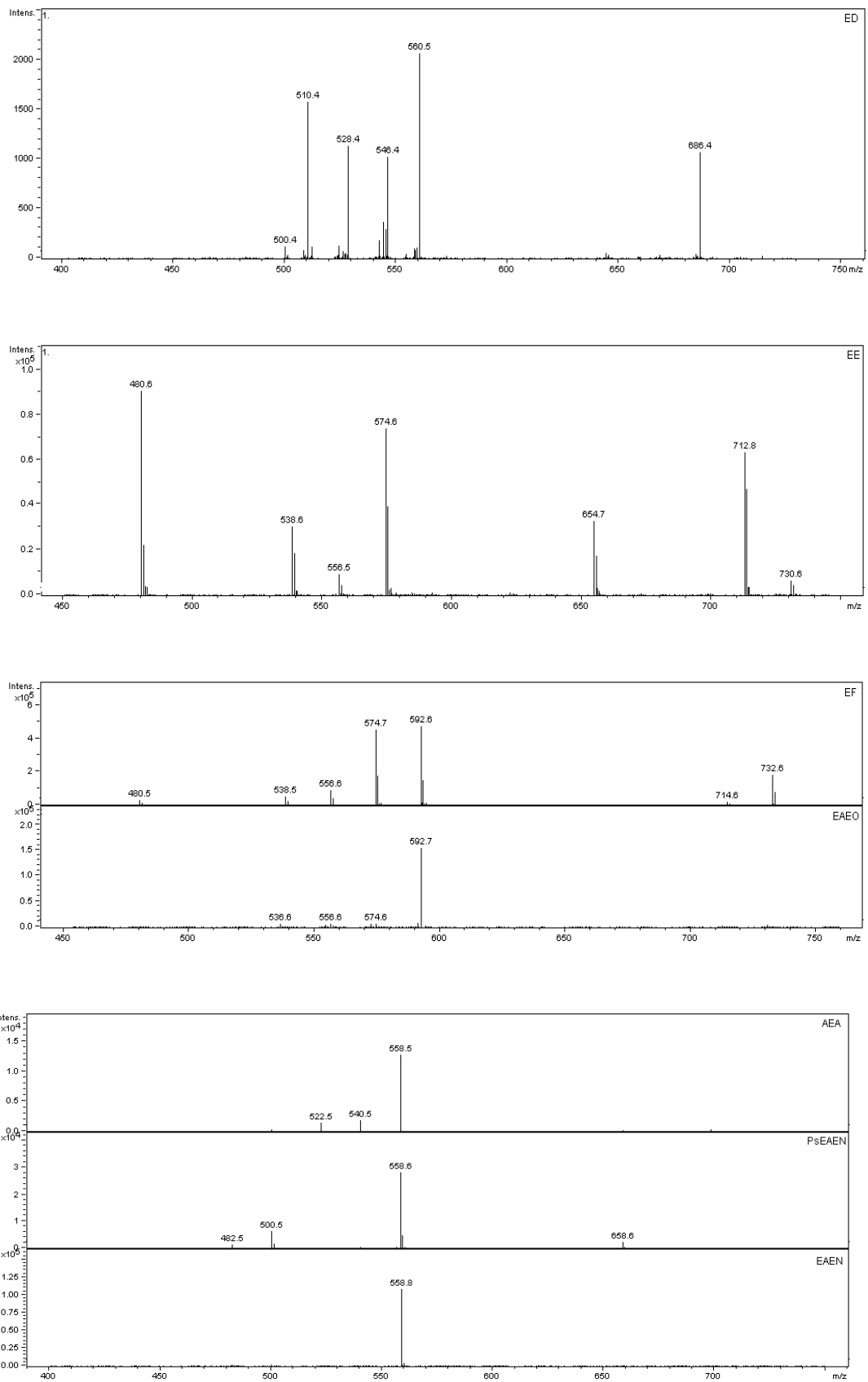
Pseudoerythromycin A enol ether (m/z 716) – ztráta 158 Da, iont m/z 558.

Na obrázcích - Obr. 22 a Obr. 23 jsou znázorněny MS záznamy analýzy.



Obr. 22: HPLC/ESI-MS záznam vzorku Erythromycin® Abbott GmbH, detektor iontová past, záznam kladných iontů.





Obr. 23: HPLC/MS/MS analýza sledovaných látek.

Závěr:

Bylo vyhodnoceno 50 vzorků, obsah žádné nečistoty nepřesahoval množství 0,05%. Tato práce je ukázkou využití MS detekce při získání profilu nečistot v případě nedostupnosti ověřených standardů stanovovaných látek a tedy jejich identifikace na základě MS/MS analýzy.

5 PŘÍLOHY

5.1 Přehled publikovaných prací

Publikované články:

L. Nováková, L. Matysová, L. Havlíková and P. Solich

Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel

J. Pharm. Biomed. Anal. Vol 37(5), 2005, 899-905 (*IF 1,889*)

L. Matysová, P. Solich, P. Marek, L. Havlíková, L. Nováková and J. Šícha

Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method

Talanta Vol 68 (3), 2006, 713-720 (*IF 2,391*)

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich

HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream

J. Pharm. Biomed. Anal. Vol 41(2), 2006, 671-675 (*IF 1,889*)

L. Havlíková, L. Nováková, L. Matysová, P. Solich

HPLC Determination of Estradiol and its Degradation Products

J. Chromatogr. A Vol 119 (1-2), 2006, 216-223 (*IF 3,096*)

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, R. Hájková, P. Solich

HPLC Determination of Chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment

J. Pharm. Biomed. Anal. – zasláno k publikaci

Postery:

L. Havlíková, L. Matysová, P. Solich

Development and Validation of HPLC method for determination of Indomethacin and its two degradation products in topical gel

PBA 2004, 2 – 6 may 2004, Florence, Italy (Abstract Book str. 185)

L. Matysová, L. Havlíková, L. Nováková, P. Solich

Vývoj a validace metod pro analýzu topických léčivých přípravků pomocí metody RP-HPLC

IX. sjezd ČFS 13.-15.5. 2004, Zlín (Sborník P-7, str. 41)

L. Matysová, L. Havlíková, J. Nováčková, S. Rech, P. Solich

Problematika HPLC analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích.

XXXIII. Syntéza a analýza 2004, Nitra, Slovensko (Sborník, str. 248)

L. Nováková, L. Matysová, L. Havlíková, P. Solich

A Comparison of Performance of Various Novel Analytical Columns with Classical C18 stationary phases

ISC 04, October 4 – 8 2004, Paris, France (Book of Abstract, str. 60)

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich

Development of HPLC method for determination of degradation products of pharmaceuticals in gels

Joint Meeting 6 –9 October 2004, Regensburg, Germany (Book of Abstract, PC52, str. 109)

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich

HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream

29th International Symposium on High Performance Liquid Phase separations and

Related Techniques, 26-30 June 2005, Stockholm, Sweden (Poster P12:20, str. 408)

L. Nováková, L. Havlíková, L. Matysová, P. Solich
Determination of Estradiol and its Degradation Products in Topical Gel
29th International Symposium on High Performance Liquid Phase separations and
Related Techniques, 26-30 June 2005, Stockholm, Sweden (Poster P 12:13)

I. Citová, L. Havlíková, R. Sladkovský, P. Solich
Moderní trendy v analýze polyfenolických látek chromatografickými metodami
Syntéza a analýza léčiv, 12.- 14.9.2005, Brno (Sborník P7, str. 45)

L. Matysová, L. Havlíková, A. Homolová, P. Solich, J. Šícha
Stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu metodou RP-HPLC
Syntéza a analýza léčiv, 12.- 14.9.2005, Brno (Sborník P55, str. 93)

L. Havlíková, L. Urbánek, L. Nováková, D. Solichová, I. Citová, P. Solich
Comparison of UPLC and HPLC for simultaneous analysis of vitamin A and vitamin E
26th International Symposium of Chromatography, 21.-25. August 2006, Copenhagen,
Denmark (Poster PX05)

L. Havlíková, L. Matysová, R. Hájková, P. Solich
Stanovení chlorhexidin glukonátu v masti metodou HPLC
35. Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. září 2006 (Sborník P-20, str. 90)

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich
Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení pantothenanu vápenatého, methylparaben
a propylparaben v topickém léčivém přípravku
35. Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. září 2006 (Sborník P-39, str.109)

5.2 Příloha 1:

L. Nováková, L. Matysová, L. Havlíková and P. Solich

Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol 37(5), 2005, 899-905

5.3 Příloha 2:

L. Matysová, P. Solich, P. Marek, L. Havlíková, L. Nováková and J. Šícha

Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method

Talanta, Vol 68 (3), 2006, 713-720

5.4 Příloha 3:

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich

HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol 41(2), 2006, 671-675

5.5 Příloha 4:

L. Havlíková, L. Nováková, L. Matysová, P. Solich

HPLC Determination of Estradiol and its Degradation Products

Journal of Chromatography A – Vol 119 (1-2), 2006, 216-223

5.6 Příloha 5:

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, R. Hájková, P. Solich

HPLC Determination of Chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis – zasláno k publikaci

HPLC Determination of Chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, R. Hájková, P. Solich *

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

* Corresponding author: Tel. +420495067294, fax +420495518718

E-mail address: petr.solich@faf.cuni.cz (P. Solich)

Keywords: HPLC, chlorhexidine, ointment

Abstract

A novel fast isocratic reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of chlorhexidine and its degradation product p-chloroaniline was developed. Zorbax SB Phenyl column (75 x 4.6 mm, 3.5 μm) was used for the separation. Mobile phase composed of acetonitrile and buffer solution of 0.08 M sodium phosphate monobasic containing 5 ml of triethylamine (0.5 %) and adjust with 85 % phosphoric acid to pH 3.0 in ratio 35:65 (v/v) pumped isocratically at flow rate 0.6 ml.min⁻¹ was used. UV detection was performed at 239 nm, the total analysis time was about 10 minutes.

The method is suitable for practical routine analysis of topical ointment in the quality control laboratory.

Introduction

Chlorhexidine gluconate, is an aqueous solution of chlorhexidine gluconate, chemically 2,4,11,13-Tetraazatetradecanediiimide, N, N[~]-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconate [1].

Chlorhexidine is the most popular antiseptic of biguanides. It has potent antimicrobial activity against most gram-positive and some gram-negative bacteria but not against spores. In human use is Chlorhexidine applied to prevent and treat the redness, swelling, and bleeding gums associated with gingivitis [2]. In veterinary medicine, chlorhexidine is used as a general purpose disinfectant for cleansing wounds, skin, instrument, and equipment [3]. Because of its antiseptic properties and low potential for systemic or dermal toxicity, chlorhexidine has been incorporated into shampoos, ointments, skin and wound cleansers, teat dips, surgical scrubs, etc. [4].

High performance liquid chromatography has been widely used for the determination of chlorhexidine in formulations. The basic HPLC method for determination of chlorhexidine and its degradation product p-chloroaniline is described in USP 29. Gradient of acetonitrile and buffer solution (contains monobasic sodium phosphate, triethylamine, pH adjusted with phosphoric acid to pH 3) was used for the chromatography. Detection was at 239 nm and the flow-rate was about 1.5 ml min [1].

Recently, there has been found a number of reports dealing with determination of chlorhexidine by liquid chromatography using ion-pair reversed-phase HPLC [5]-[12]. An isocratic reversed-phase liquid chromatographic method was developed for determination of five active substances, including chlorhexidine, in an ointment using Zorbax RX-C 8 (4.6 x 150 mm, 5 μ m) column and a mobile phase containing sodium dodecyl sulfate and 2-propanol [13]. The hydrolytic pathway of chlorhexidine was investigated. HPLC methods with gradient mode were used for the assay of chlorhexidine and its known degradation products [14] [15]. HPLC methods for assay of chlorhexidine and p-chloroaniline using gradient elution and acetate buffer [16] or ammonia solution [17] as a part of the mobile phase were developed. HPLC methods for determination of chlorhexidine in urine [18], in human serum [18] [20], in saliva [8][9][21], in ophthalmic solution [22], in ointment [23] or in suspension [24] were published. Chlorhexidine was determined together with other antimicrobial agents used in cosmetics using ion interaction RP-HPLC [25]. Other methods reported in the literature used LC-ESI-MS for the determination of chlorhexidine [26][27].

None of these methods were developed and validated for the determination of chlorhexidine and its degradation product in topical ointment using HPLC isocratic mode without adding ion-pair reagent. The isocratic mode is favourable for routine quality control laboratory. From stability testing point of view this approach supplied more reproducible results and it is less time consuming because no reequilibration is needed in comparison with the utilization of gradient elution.

The aim of this work is to develop novel isocratic high-performance liquid chromatography method for the separation of chlorhexidine gluconas and its degradation product p-chloroaniline in ointment for veterinary use.

Experimental

Chemicals and reagents

Working standards of chlorhexidine gluconas 20% solution, p-chloroaniline, and ethylparaben were used for the purpose of this study. Chlorhexidine gluconas 20% solution active substance was provided by Herbacos (Pardubice, Czech Republic). P-chloroaniline was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The reference standard of ethylparaben (internal standard) was bought from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).

Acetonitrile Chromasolv for HPLC gradient grade, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, triethylamine, and formic acid were provided by Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Phosphoric acid 85% p.a. was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade water was prepared by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA) and it met all European Pharmacopoeia requirements.

Chromatographic system

A Shimadzu LC-2010 C system (Shimadzu, Kyoto, Japan) with built-in UV-vis detector was used to perform all the analyses. Chromatographic software Class VP 6.3 was used for data collection and processing.

Supelco Discovery C18 column (250 x 4.0 mm, 5 μ m) was bought from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). LiChroCART PUROSPHER RP 18 column (125 x 4 mm, 5 μ m) was purchased from Waters Corp. (Milford, Ireland). Zorbax SB Phenyl column (75 x 4.6 mm, 3.5 μ m) was obtained from Agilent Technologies (Prague, Czech Republic).

Reference standard preparation

Reference standard solution for chlorhexidine analysis was prepared in 100.0 ml volumetric flask by dissolving of 63.75 mg of chlorhexidine gluconas 20% solution and 0.5 mg of degradation product p-chloroaniline in a mixture of acetonitrile and formic acid 1% 20:80 (v/v). Thereafter, 4.0 ml of internal standard ethylparaben stock solution (10.0 mg/ 10.0 ml of ethylparaben working standard) were added and the flask was topped up to the volume with a mixture of acetonitrile and formic acid 1% 20:80 (v/v).

HPLC

Zorbax SB Phenyl column (75 x 4.6 mm, 3.5 μm) was used for the separation. Mobile phase composed of acetonitrile and buffer solution in ratio 35:65 (v/v) pumped isocratically at flow rate 0.6 ml.min⁻¹ was used. Buffer solution was prepared using of 0.08 M sodium phosphate monobasic containing 5 ml of triethylamine (0.5 %) and adjusted with 85 % phosphoric acid to pH 3.0. Detection wavelength 239 nm was chosen for the chromatography according to absorption spectra of separated components.

Results and discussion

Chromatography

The method development was carried out according to the pharmacopoeial method USP 29. The isocratic elution and mobile phase composed of acetonitrile and buffer solution pH 3.0 (70:30 v/v) was tested for the analysis. Supelco DISCOVERY C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm) was used for the analysis. The method gave peak of chlorhexidine in 2 minutes, the it was not convenient because of high peak tailing. Mobile phase composed of acetonitrile and buffer solution pH 3.0 in different volume ratios was tested. LiChroCART PUROSPHER RP 18 (125 x 4 mm, 5 μm) was tested for the analysis. P-chloroaniline was not separated from chlorhexidine. The second problem was peak tailing of chlorhexidine.

A column with different packing material, Zorbax SB Phenyl column and mobile phases consisting of acetonitrile and phosphate buffer pH value from 2.5 to 5.0 in different volume ratios were also tested. To suppress the tailing of chlorhexidine peak, triethylamine was added into the mobile phase. The column produced the best

chromatography when the pH 3.0 buffer solution (buffer solution prepared as mention above) was used in the mobile phase.

Finally, chromatography with a standard reference solution (Fig. 1) as well as with a real sample (after isolation procedure) was performed using mobile phase of acetonitrile and buffer solution 35:65 (v/v) as mobile phase at flow rate 0.6 ml.min⁻¹. The analysis time of standard solution at those conditions was about 6 minutes. It was necessary to prolong the analysis time of a real sample to 10 minutes because of placebo elution peak in minute 9.

The method using internal standard was used for the purposes of this study. Methyl-, ethyl-, and propylparaben were tested as internal standards. Ethylparaben was successfully separated from other compounds in solution and has been used as internal standard.

Determination of chlorhexidine in topical ointment

The novel method developed in our study was used for Amastol neo ointment stability testing analysis. The concentration of chlorhexidine in reference standard solutions 127.5 mg.l⁻¹ corresponded to concentrations in a real sample of topical preparation.

The isolation procedure was based on extraction with organic solvent. Methanol and acetonitrile were tested as extraction media. No satisfactory results related to the recovery were achieved. Mixtures of acetonitrile with phosphate buffer (in pH range from 2.5 to 6.0) or with phosphoric acid in various volume ratios were tested. Lower pH values gave better results. The influence of elevated (water bath 40-80°C) or reduced temperature (-20°C) and optimal time of sonication and centrifugation (10-30 minutes) were examined. The phosphoric acid (strong inorganic acid) was not suitable for the analysis, and therefore a 1% solution of formic acid was tested. Finally, a mixture of acetonitrile and formic acid 1% 20:80 (v/v) was used as extraction medium.

0.5 g of the ointment was accurately weighted and transferred into a centrifuge flask. 20.00 ml of working solutions of internal standard ethylparaben were added. Isolation procedure included 20 minutes in hot water bath at 80 °C, followed by 20 minutes of sonication and centrifugation for 15 minutes at 6000 rpm. The supernatant was filtered through a flute filter and injected into the chromatographic system.

The above-described isolation procedure met the requirements of recovery in range of 95-105% for tested compounds. The chromatogram shown in Fig. 2 illustrates the separation of compounds tested after isolation from a pharmaceutical preparation. In placebo background there were not detected a coeluting peaks. This was verified during the method validation.

Method validation

The method was validated according to ICH guideline recommendation Q2 (R1) [28], and guidelines valid in our laboratory. Method validation covers System Suitability Test (repeatability, number of theoretical plates, resolution, and asymmetry) and the determination of validation parameters including accuracy, precision, selectivity, linearity and short-term stability. The method validation results are summarized in Table 1. All tested parameters met the requirements of regulative authorities.

Conclusions

The aim of this work was to develop a fast stability indicating HPLC method for determination of chlorhexidine and its degradation product p-chloroaniline in veterinary ointment. The significant advantages of the method are the fast (components are separated in 5.50 minutes) and simultaneous determination of substances by using the isocratic reversed phase HPLC without ion-pair reagent as a part of the mobile phase.

The isocratic mode is favourable for routine quality control laboratory. This approach can give more reproducible results and moreover it is less time consuming because no reequilibration of the HPLC system is needed in comparison with the use of more complicated gradient elution.

The novel method was successfully applied for long-term stability tests of topical ointment Amastol neo HBF in the quality control laboratory.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Research Project MSMT 0021620822.

References

- [1]. USP 29–NF 24 United States Pharmacopoeial Convention Inc., 2006
- [2]. <http://www.uhe.com/chlorhex.htm>, April 2006
- [3]. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/010796en.pdf>, April 2006
- [4]. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/191804.htm>, April 2006
- [5]. A. Richard, M. Elbaz, G. Andermann, J. Chromatogr. 298 (1984) 356-359
- [6]. C. Yue, J. Poff, M.E. Cortés, R.D. Sinisterra, C.B. Faris, P. Hildgen, R. Langer, V.P. Shastri, Biomaterials 25 (2004) 3743-3750
- [7]. N.J. Medlicott, I.G. Tucker, M.J. Rathbone, D.W. Holborow and D.S. Jones, Int. J. Pharm. 143 (1996) 25-35
- [8]. T. Pesonen, J. Holmalahti, J. Pohjola, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 665 (1995) 222-225
- [9]. Y.W.F. Lam, D.C.N. Chan, S.Y. Rodriguez, J.H. Lintakoon, T.H. Lam, J. Chromatogr.: Biomed. Appl. 612 (1993) 166-171
- [10]. M. Bauer, C. Degude, L. Mailhe, J. Chromatogr. 315 (1984) 457-464
- [11]. B. Wyhowski-Bukanski, M.O. Masse, Int. J. Cosmet. Sci. 6 (1984) 283-291
- [12]. L. Gagliari et al., J. Chromatogr. 348 (1985) 321-326
- [13]. S. Izumoto, Y. Machida, N. Hiroyuki, K. Nakamura, H. Nakai and T. Sato, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1457-1466
- [14]. Y. Ha, A.P. Cheung, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 1327-1334
- [15]. W.H. Doub et al., J AOAC Int. 79 (1996) 636-9
- [16]. W.K. Gavlick, J. Chromatogr. A 623 (1992) 375-380
- [17]. H. Below, N. Lehan, A. Kamer, Microchim. Acta 146 (2004) 129-135
- [18]. L.R. Brougham, H. Cheng, K.A. Pitman, J. Chromatogr. B. 383 (1986) 365-37
- [19]. P. Wainwright, M. Cooke, Analyst 111 (1986) 1343-1344

- [20]. K.Kudo, N.Ikeda, A.Kiyoshima, Y.Hino, N.Nishida, N.Inoue, *J.Anal.Toxicol.* 26 (2002) 119-122
- [21]. N.J.Medlicott, D.G.Ferry, I.G.Tucker, M.J.Rathborne, D.W.Holborow, D.S.Jones, *J.Liq.Chromatogr.*, 17 (1994) 1605-1620
- [22]. A.P.Cheung, R.Mavar, C.Carlson, WK.Chiang, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 9 (1991) 41-45
- [23]. X.F. Ji, K.Y.Yu, W.Zhang, *Yaowu-Fenxi-Zazhi*, 17 (1996) 363-365
- [24]. Y.M.Xu, G.Y.Wong, *J. Liq.Chromatogr.Relat.Technol.* 22 (1999) 2071-2091
- [25]. E.Marengo, V.Gianotti, S.Angioi, M.C.Gennaro, *J.Chromatogr.A*, 1029 (2004) 57-65
- [26]. F.M. Musteata, J. Pawliszyn, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 37 (2005) 1015-1024
- [27]. K. Usui, T. Hishinuma, H. Yamaguchi, N. Tachiiri, J. Goto, *J.Chromatogr.B* 831 (2006) 105-109
- [28]. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>, April 2006

Tables

Table1: Method validation results

Parameter		Clorhexidine	p-chloroaniline	Criteria
SST				
Repeatability – retention time ^a	R.S.D (%)	0.37	0.07	X < 1%
Repeatability – area ^a	R.S.D (%)	0.07	0.33	X < 1%
Theoretical plates ^b		4002	7109	N > 2000
Resolution ^b		7.16	9.99	R _{ij} > 1.5
Asymmetry ^b		1.81	1.18	T < 2
Validation				
Precision ^c	R.S.D.(%)	1.72	1.87	X < 5%
Linearity ^d	Correlation coefficient	0.99964	0.99901	R > 0,9990
	Intercept	-0.0180±0.024	0.0066±0.003	
	Slope	0.1749±0.002	0.4855±0.002	
	Recovery (%)	99.72	100.38	X = 100± 5%
Accuracy ^c	R.S.D (%)	2.72	1.53	X < 5%
	LOD (mg.ml ⁻¹)	-	6,65.10 ⁻⁵	
LOQ (mg.ml ⁻¹)		-	2,22.10 ⁻⁴	
Selectivity		No interference	No interference	

^a made in six replicates

^b made in six replicates

^c six samples injected three times each

^d linearity range 5.12 10⁻²-17.85 10⁻² mg.ml⁻¹ chlorhexidine, three replicates

^d linearity range 5.10⁻⁴-6.10⁻³ mg.ml⁻¹ p-chloroaniline, three replicates

Figures

Fig.1 Chromatogram: Chromatogram at 239 nm, analysis of compounds in standard solution – chlorhexidine gluconas (active substance), p-chloroaniline (degradation product) and ethylparaben (IS).

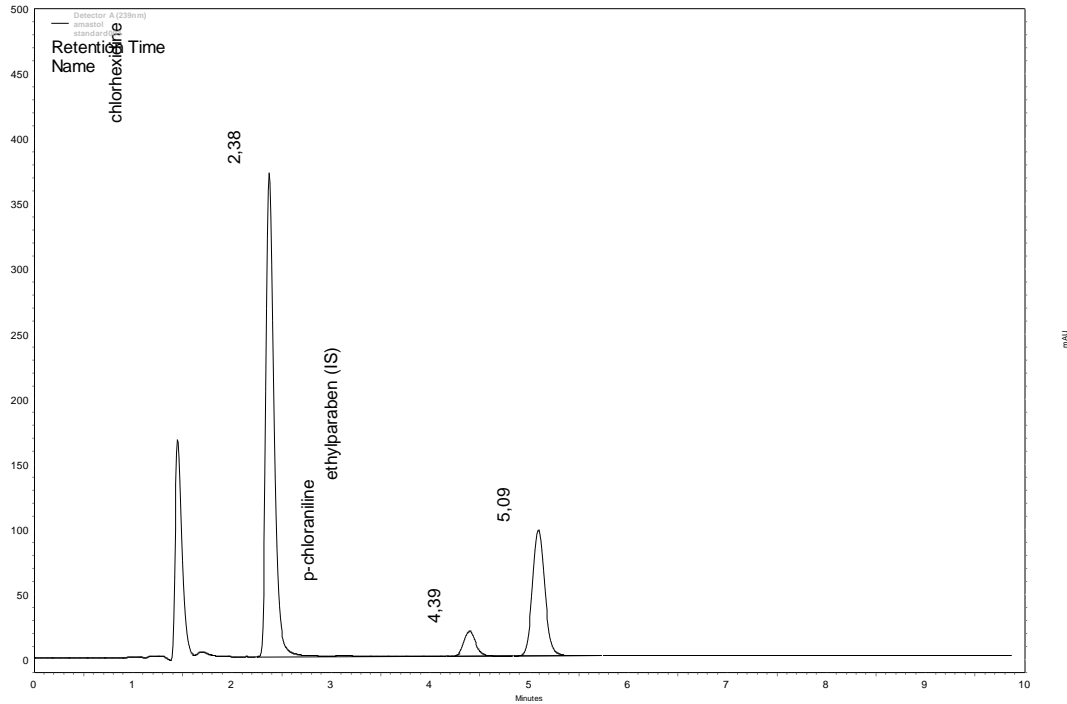
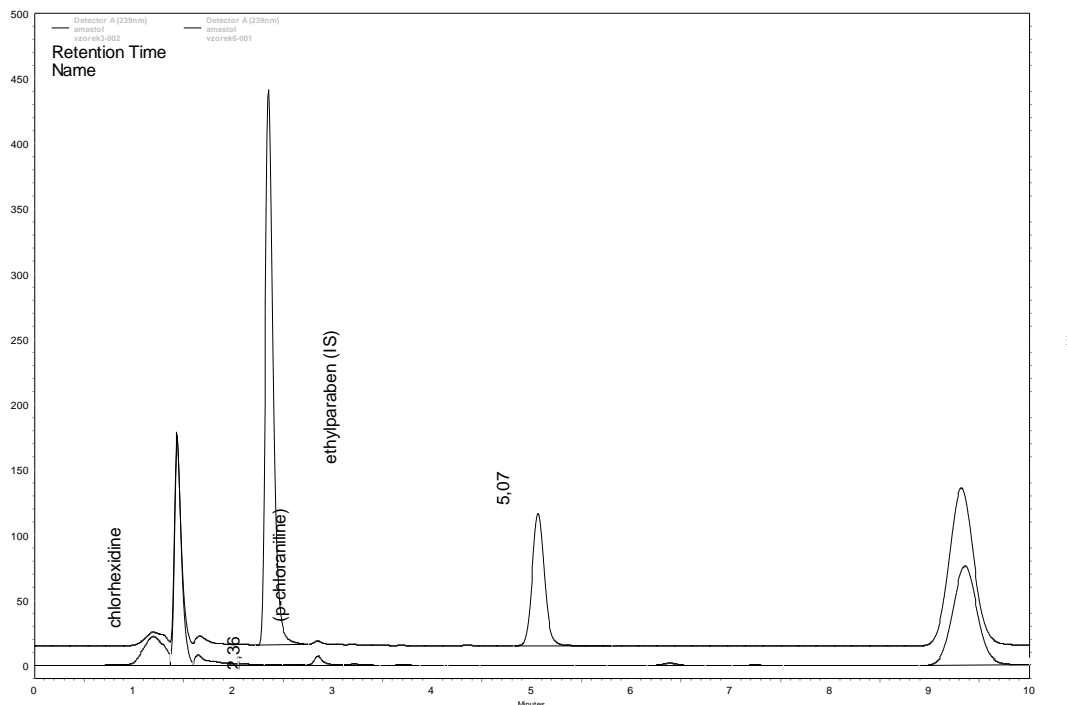


Fig.2 Chromatogram: Chromatogram at 239 nm, analysis of topical pharmaceutical preparation containing chlorhexidine gluconas, and placebo chromatogram to demonstrate method selectivity.



5.7 Příloha 6:

Postery a abstrakty Mgr. Lucie Havlíkové publikované na domácích a zahraničních konferencích v letech 2004-2006.

Práce jsou uspořádány chronologicky

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF INDOMETHACIN AND ITS TWO DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL GEL

L. Nováková^a, L. Matysová^a, L. Havlíková^{a,b}, P. Solich^{a,b}

^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bThe Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Keywords: indomethacin, HPLC, pharmaceuticals, degradation products

Indomethacin - chemically 1-(4-chlorobenzoyl)- 5- methoxy-2-methylindolyl acetic acid - is a nonsteroidal antiinflammatory drug with antipyretic, antiflogistic and analgetic effect. By decomposition it forms two degradation products: 4-chloro-benzoic acid and 5-methoxy-2-methylindolyl acetic acid. They have to be monitored together with an active substance both during manufacturing process and storage of pharmaceuticals with aim to control the quality (undesirable impurities or level of degradation products) and quantity (active substance assay) of the pharmaceutical product.

European pharmacopoeia (Ph. Eur. 4) describes titration method for determination of indomethacin, which is not very convenient for practical use. This method is not suitable for stability studies and quality control during manufacturing process, because there are many samples to be controlled, often in replicates. Usually high performance liquid chromatography is the method-of-choice enabling to determine active substance and its degradation products during one-step procedure simultaneously.

A new method for determination of indomethacin and its two degradation products using HPLC with UV detection at 237 nm was developed. The separation of all compounds was performed at C18 stationary phase. Different types of analytical columns and various mobile phase compositions were tested. Because of the extraction procedure is used for compounds isolation, internal standard method was used. The method was validated (SST parameters and validation parameters including method precision, accuracy, linearity, selectivity and robustness were set up) and successfully applied for the practical analysis of topical pharmaceutical preparations containing indomethacin.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Grant Agency of the MSMT of the Czech Republic – FRVS No. 970/2004 and by Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education.



DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF INDOMETHACIN AND ITS TWO DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL GEL

Lucie Nováková^a, Lucie Havlíková^{a,b}, Ludmila Matysová^a, Petr Solich^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, ^b The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
email: novakoval@faf.cuni.cz, havlikova@faf.cuni.cz, matysova@faf.cuni.cz, solich@faf.cuni.cz

Introduction

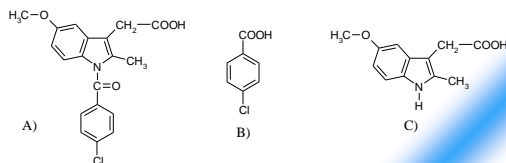
Indomethacin is a non-steroidal antiinflammatory (NSAID), analgetic and antipyretic drug. Its effect is based on inhibition of cyclo-oxygenase (COX). It is used in man, eg. for the relief of symptoms of rheumatoid arthritis. In veterinary medicine, it is effective in treatment of inflammatory processes related to infectious disease. The drug is usually administered orally. It can also be administered intravenously or as a suppository and topical gel. Chemically it is 1 - (4 - chlorbenzoyl) - 5 - methoxy - 2 - methylindoleacetic acid. By decomposition it forms two degradation products: 4-chloro-benzoic acid and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid. They have to be monitored together with an active substance both during manufacturing process and storage of pharmaceuticals with aim to control the quality (undesirable impurities or level of degradation products) and quantity (active substance assay) of the pharmaceutical product.

The aim of this work

In our study we have developed an analytical method for determination and quantitation of indomethacin in topical gel, which is used for treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice. This active substance was determined together with its two degradation products 4-chlorobenzoic acid and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid.

Experimental

Substances examined:



Active substance indomethacin (a), degradation products 4-chlorobenzoic acid (b), and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid (c) in Indomethacin gel

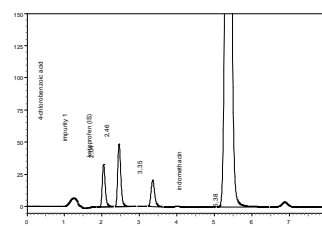
Chromatography

instrumentation: Shimadzu LC-2010 C system with UV detection
data processing: chromatographic software Class VP 5
analytical column: Zorbax SB-Phenyl (75 x 4.6, 3.5 μm)
mobile phase: acetonitrile, 0.2 % phosphoric acid (50:50 v/v)
flow rate: 0,6 ml/min
column oven temperature: 25 °C
injection volume: 5 μl
internal standard for quantitation: ketoprofen
detection: 237 nm

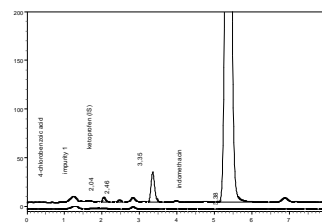
Sample preparation

0.5 g of topical gel accurately weighed was transferred into 50.0 ml centrifuge tube
20.0 ml of internal standard solution in acetonitrile was added (1 mg/ml)
sonication for 10 minutes
centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm

Results and discussion



Chromatogram of separation of compounds in standard solution



Chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical formulation Indomethacin gel together with placebo chromatogram

Method validation

	Indomethacin	4-chlorobenzoic acid	5-methoxy-2-methylindoleacetic acid	Limits
SSY				
theoretical plates*	7655	4090	3103	N > 1500
Asymmetry*	1.06	1.15	1.24	T < 1.5
Resolution*	5.59	2.70	3.11	R _s > 1.5
repeatability- σ_r *	0.34	0.23	0.18	R.S.D. < 1%
repeatability-A*	0.18	0.05	0.45	R.S.D. < 1%
Validation				
Precision [% RSD]	1.39	3.25	3.10	R.S.D. < 5%
Linearity (correlation coefficient)	0.9999 [§]	0.9999 [§]	0.9999 [§]	R > 0.9990
Accuracy [% RSD]	0.70	0.62	1.13	R.S.D. < 5%
Accuracy [% recovery]	99.53	98.27	96.22	100±5%
selectivity	no interference	no interference	no interference	-
LOD (mg/ml)	-	5.69·10 ⁻⁵	2.25·10 ⁻⁵	-
LOQ (mg/ml)	-	1.90·10 ⁻⁴	7.5·10 ⁻⁴	-

*made in three replicates
*made in six replicates
*six samples injected three times each
*at 20, 50, 80, 100, 120, 150 % levels, three replicates
*at 0.1 - 5.0 % range of active substance concentration

Conclusions

A novel analytical method for determination and quantification of indomethacin and its degradation products using internal standard for quantification was developed. Separation was performed by HPLC with UV detection at 237 nm. All compounds were well separated with sufficient resolution, good reproducibility and peak asymmetry at relatively short time. Total analysis time was less than 8 minutes. Validation of this method was accomplished.

Aknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Grant Agency of the MSMT of the Czech republic - FRVS No. 970/2004, the Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education and the technical support of Agilent Technologies.

VÝVOJ A VALIDACE NOVÝCH METOD PRO ANALÝZU TOPICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ POMOCÍ METODY RP-HPLC

L.Matysová¹, L.Havlíková^{1,2}, L.Nováková¹, P.Solich^{1,2},

¹Katedra analytické chemie, ²Výzkumné centrum LN00B125,
Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Česká republika
Email: matysova@faf.cuni.cz

Na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové se provádí v rámci spolupráce s farmaceutickou praxí vývoj nových metod pro stanovení obsahu léčivých látek, konzervancí a nečistot v topických léčivých přípravcích. Využívá se metodiky HPLC, která je pro tuto analýzu vhodná, neboť jako separační metoda umožňuje kvantitativní hodnocení a identifikaci složek směsi v jednom kroku s vysokou selektivitou a v relativně krátkém čase. Zároveň pro její vysokou citlivost lze sledovat hladiny jak účinných látek, tak i nečistot ve farmaceutických přípravcích, což je velmi důležité při zjišťování kvality léčivých přípravků a testování homogenity výrobního procesu v rámci stabilitních studií. V dostupné ať už lékopisné nebo jiné odborné literatuře minimum informací o HPLC metodách, které provádí současně stanovení účinné látky, nečistot i konzervancí v léčivém přípravku v jednom kroku.

V rámci vývoje jsou zároveň prováděny kompletní validace nových metod, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKLu i ostatní platné normy.

Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnověji vyvinutých a validovaných metod, včetně uvedení chromatografických podmínek a parametrů validace.

Konkrétně se jedná o účinné látky: terbinafin, indometacin a estradiol.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT, Výzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LN00B125.



Vývoj a validace nových metod pro analýzu topických léčivých přípravků pomocí metody RP-HPLC

L.Matysová¹, L.Havlíková^{1,2}, L.Nováková¹, P.Solich^{1,2},

¹Katedra analytické chemie, ²Výzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Úvod

Na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové se provádí v rámci spolupráce s farmaceutickou praxí vývoj nových metod pro stanovení obsahu léčivých látek, konzervancii a nečistot v topických léčivých přípravcích. Využívá se metody HPLC, která je pro tuto analýzu vhodná, neboť jako separační metoda umožňuje kvantitativní hodnocení a identifikaci složek směsí v jednom kroku s vysokou selektivitou a v relativně krátkém čase. Zároveň pro její vysokou citlivost lze sledovat hladiny jak účinných látek, tak i nečistot ve farmaceutických přípravcích, což je velmi důležité při zjišťování kvality léčivých přípravků a testování homogenity výrobního procesu v rámci stabilitních studií. Konkrétně se jedná o účinné látky: terbinafin, indometacin a estradiol.

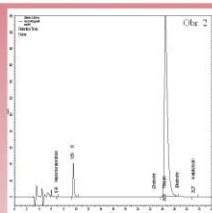
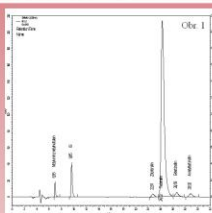
Cíl práce

V dostupné až už lékopisné nebo jiné odborné literatuře je minimum informací o HPLC metodách, které provádí současně stanovení účinné látky, nečistot i konzervancii v léčivém přípravku v jednom kroku. Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnověji vyvinutých a validovaných metod, včetně uvedení chromatografických podmínek a parametrů validace.

Terbinafin

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C; Shimadzu corp., JAP.
 Kolona: VPLLEOSIL 100-5CN (Bioshield Chromatography), 250 x 4,6 mm, 5 μm
 Dávkování: 2 μl
 Detekce: UV 226 nm
 Mobilní fáze: Tetrahydrofuran-acetonitril-citratový pufr pH 4.50 = 10:20:70 (v/v/v)
 Průtok: 0,8 ml/min
 Teplota: 25 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram standardů: terbinafin, defniovane nečistoty a propylparaben (1.s.) – obr. 1
 Chromatogram křemu s obsahem terbinafinu a přidávkem vnitřního standardu propylparabenu – obr. 2
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.1

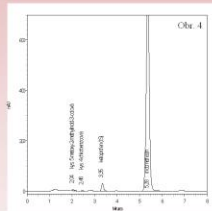
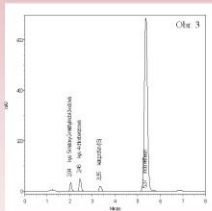


Tab.č.1	parametr	terbinafin	MANN	Z-terbinafin	β-terbinafin	4-methyl-terbinafin	požadavek
SST	t _R (min)	24,27	6,94	22,71	26,55	28,71	
	W _{0,05}	0,50	0,14	0,41	0,51	0,55	
	N	12 309	12 394	16 249	16 274	15 245	N=1500
	R _d	1,89	9,33	25,22	2,73	2,53	R _d ≥1,5
	T	1,70	1,37	1,40	1,27	1,48	T=2
Přesnost	RSD (%)	2,71	3,66	1,31	4,81	4,02	s<5%
	Linearity ^a RSD (%)	0,99976	0,9986	0,99973	0,9983	0,99925	s<0,990
Správnost	výžijnost (%)	97,07	98,58	99,27	100,29	99,71	s=100±5%
	-RSD (%)	1,41	1,35	0,92	1,45	1,77	s<2%

Indometacin

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C; Shimadzu corp., JAP.
 Kolona: Zorbax® SB-Phenyl, Agilent Technologies, 75 x 4,6mm, 3,5 μm
 Dávkování: 5 μl
 Detekce: UV 237 nm
 Mobilní fáze: Acetonitril – kyselina fosforečná 0,2 % (v/v) = 50:50
 Průtok: 0,6 ml/min
 Teplota: 25 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram standardů: 5-methoxy-2-methylindol-3-ocetová kyselina, 4-chlorbenzová kyselina a indometacin s vnitřním standardem ketoprofenem – obr. 3
 Chromatogram gela s obsahem indometacinu a přidávkem vnitřního standardu ketoprofenu – obr. 4
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.2

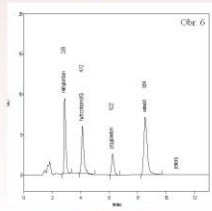
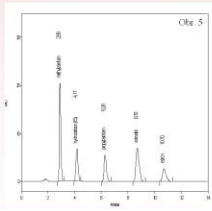


Tab.č.2	parametr	indometacin	5-methoxy-2-methylindol-3-ocetová kyselina	4-chlorbenzová kyselina	požadavek
SST	t _R (min)	5,38	2,04	2,46	
	W _{0,05}	0,14	0,08	0,09	
	N	7665	3103	4060	N=1500
	R _d	5,59	2,70	5,33	R _d ≥1,5
	T	1,06	1,23	1,14	T=2
Přesnost	RSD (%)	3,39	3,1	3,25	s<5%
	Linearity ^a RSD (%)	0,999964	0,999981	0,999991	s<0,990
Správnost	výžijnost (%)	98,25	98,22	98,27	s=100±5%
	-RSD (%)	0,70	1,13	0,62	s<2%

Estradiol

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C; Shimadzu corp., JAP.
 Kolona: SUTELCO Discovery C18 (Sigma-Aldrich), 250 x 3,0 mm, 5 μm
 Dávkování: 5 μl
 Detekce: UV 225 nm
 Mobilní fáze: Acetonitril-methanol-voda = 23:24:53
 Průtok: 0,9 ml/min
 Teplota: 40 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram standardů: estradiol, methylparaben, propylparaben a eston s vnitřním standardem hydrokortizonem – obr. 5
 Chromatogram gela s obsahem estradiolu a přidávkem vnitřního standardu hydrokortizonu – obr. 6
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.3



Tab. č.3	parametr	estradiol	methylparaben	propylparaben	eston	požadavek
SST	t _R (min)	8,70	2,89	6,28	10,69	
	W _{0,05}	0,20	0,13	0,20	0,29	
	N	6015	2772	5488	7430	N=1500
	R _d	6,12	4,99	6,86	4,24	R _d ≥1,5
	T	1,23	1,30	1,28	1,34	T=2
Přesnost	RSD (%)	0,39	0,43	1,15	2,24	s<5%
	Linearity ^a RSD (%)	0,99987	0,99998	0,99995	0,99981	s<0,990
Správnost	výžijnost (%)	97,19	99,20	98,51	97,65	s=100±5%
	-RSD (%)	0,14	0,72	1,20	0,16	s<2%

Závěr

V rámci vývoje provádíme na našem pracovišti kromě vývoje zároveň kompletní validace nových metod, které respektují moderní lékopis, doporučení SUKLU i ostatní platné normy. Validované metody se využívají pro analýzy při určování homogenity výrobního procesu a provádění stabilitních studií léčivých přípravků, obsahujících uvedené látky.

Provedené validace dokazují, že metody jsou dostatečně reprodukovatelné, citlivé a zároveň selektivní pro dané topické léčivé přípravky.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory MSMI, Výzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LN00B125.

t_R – retenční čas
 W – šířka pily (podle výšky max)
 N – počet píků na vlně
 R_d – rozlišení mezi (definovaný píky a bezpečnostní píky)
 T – počet píků
 P – počet píků
 + – příloha č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

Problematika HPLC analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích.

L. MATYSOVÁ^a, L.HAVLÍKOVÁ^a, J.NOVÁČKOVÁ^a, S.RECH^b, P. SOLICH^{a,c}

^a Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

^b Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Pharmazeutische Fakultät, Poppelsdorf, Germany

^c Výzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Parabeny se používají jako konzervační přísady ve velkém množství topických léčivých přípravků. Jsou málo toxické a jejich antimikrobiální účinnost není závislá na pH. V léčivých přípravcích se používají často ve směsi methylparaben a propylparaben.[1]

Metodika HPLC je pro analýzu parabenů v topických léčivých přípravcích vhodná, neboť jako separační metoda umožňuje identifikaci složek a kvantitativní hodnocení směsi v jednom kroku, takže je možné stanovit oba parabeny během jedné analýzy. Metoda HPLC je vhodná i v těch případech, kdy se vlastní účinné látky v mastech, gelech a suspenzích stanovují jinými analytickými metodami a je třeba stanovit pouze obsah parabenů.

V rámci kontrolní laboratoře na Katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové jsou zároveň prováděny kompletní validace vyvinutých HPLC metod, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKLu i ostatní platné normy. Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnověji vyvinutých a validovaných metod pro stanovení parabenů pomocí HPLC, včetně uvedení chromatografických podmínek, procesu izolace stanovovaných látek z léčivých přípravků a parametrů validace.

Literatura: 1. Mikroverze AISLP 2004.2 pro MS Windows

Problematika byla řešena za podpory grantu MSM 111600001 a Výzkumného centra LN00B125.



Problematika analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích

L. MATYSOVÁ^a, L. HAVLÍKOVÁ^{ac}, J. NOVÁČKOVÁ^a, S. RECH^b, P. SOLICH^{ac}

^aKatedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

^bRheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Pharmazeutische Fakultät, Poppelsdorf, Germany

^cVýzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Úvod

Parabeny se používají jako konzervační přísady ve velkém množství topických léčivých přípravků. Jsou málo toxické a jejich antimikrobiální účinnost není závislá na pH. V léčivých přípravcích se používají často ve směsi methylparaben a propylparaben.

Nejvhodnější metodikou pro analýzu parabenů v topických léčivých přípravcích je HPLC, neboť jako separační metoda umožňuje identifikaci složek a kvantitativní hodnocení směsi v jednom kroku, takže je možné stanovit oba parabeny během jedné analýzy. Metoda HPLC je vhodná i v těch případech, kdy se vlastní účinné látky v mastech, gelech a suspenzích stanovují jinými analytickými metodami a je třeba stanovit pouze obsah parabenů.

Cíl práce

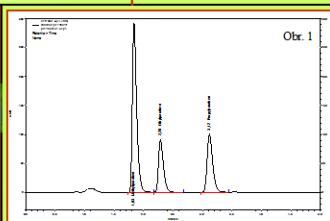
V rámci Kontrolní laboratoře na Katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové jsou prováděny kompletní validace vyvinutých HPLC metod, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKLU i ostatní platné normy.

Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnověji vyvinutých a validovaných metod pro stanovení parabenů pomocí HPLC, včetně uvedení chromatografických podmínek, procesu izolace stanovovaných látek z léčivých přípravků a parametrů validace.

Heparin mast

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP
 Kolona: SUPELCO Discovery C 18 (Sigma-Aldrich), 125 x 4 mm, 5 µm
 Dávkování: 10 µl
 Detekce: UV 252 nm
 Mobilní fáze: Acetonitril—voda = 45 : 55 (v/v)
 Průtok: 1,0 ml/min
 Teplota: 25 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram přípravku s přidáním vnitřního standardu ethylparabenu – obr.1
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.1



Tab.č.1	parametr	MP	PP	požadavek
SST	t _R (min)	1,83	3,10	
	w _{0,05}	0,08	0,10	
	N	2849	4929	N>1500
	R _{ij}	3,05	4,98	R _{ij} >1,5
	T	1,57	1,34	T<2
Přesnost	RSD (%)	2,97	2,38	x<5%
Linearity (n=6)	RSD (%)	0,99929	0,99985	x>0,9990
Správnost	výtěžnost - (%)	98,56	98,52	x=100±5%
	-RSD (%)	0,52	0,77	x<2%

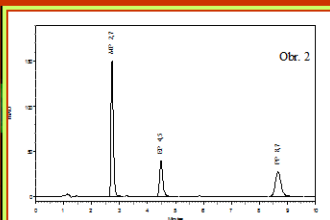
Proces izolace parabenů z masti:

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství krému odpovídající 0,5 mg methylparabenu a 0,25 mg propylparabenu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu ethylparabenu v methanolu o koncentraci c = 1 mg/100 ml a směs byla umístěna po dobu 15 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplrem přímo na kolonu.

Heparin gel

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP
 Kolona: SUPELCO Discovery C 18 (Sigma-Aldrich), 125 x 4 mm, 5 µm
 Dávkování: 5 µl
 Detekce: UV 257 nm
 Mobilní fáze: Acetonitril-H₂PO₄ 0,085% = 30 : 70 (v/v)
 Průtok: 1,1 ml/min
 Teplota: 25 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram přípravku s přidáním vnitřního standardu ethylparabenu – obr.2
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.2



Tab.č.2	parametr	MP	PP	požadavek
SST	t _R (min)	2,74	8,69	
	w _{0,05}	0,09	0,21	
	N	5081	9161	N>1500
	R _{ij}	4,16	1,97	R _{ij} >1,5
	T	1,39	1,20	T<2
Přesnost	RSD (%)	0,25	0,37	x<5%
Linearity (n=6)	RSD (%)	0,999975	0,99937	x>0,9990
Správnost	výtěžnost - (%)	101,07	100,41	x=100±5%
	-RSD (%)	0,06	0,56	x<2%

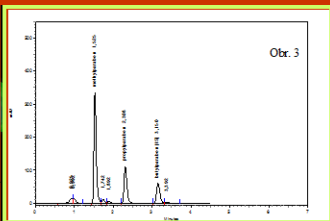
Proces izolace parabenů z gelu:

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství gelu odpovídající 0,5 mg methylparabenu a 0,25 mg propylparabenu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu ethylparabenu ve směsi acetonitrilu a fosfatového pufru o pH 3,0 (30:70) (IS) o koncentraci c = 1 mg/100 ml a směs byla umístěna po dobu 15 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplrem přímo na kolonu.

Lipolotio krém

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP
 Kolona: SUPELCO Discovery C 18 (Sigma-Aldrich), 125 x 4 mm, 5 µm
 Dávkování: 10 µl
 Detekce: UV 252 nm
 Mobilní fáze: Acetonitril - voda = 50 : 50 (v/v)
 Průtok: 1,1 ml/min
 Teplota: 25 °C
 Izokratický režim
 Chromatogram přípravku s přidáním vnitřního standardu butylparabenu – obr.3
 Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.3



Tab.č.3	parametr	MP	PP	požadavek
SST	t _R (min)	1,78	2,67	
	w _{0,05}	0,07	0,08	
	N	2953	4781	N>1500
	R _{ij}	3,33	1,90	R _{ij} >1,5
	T	1,62	1,30	T<2
Přesnost	RSD (%)	1,38	1,18	x<5%
Linearity (n=6)	RSD (%)	0,999912	0,999996	x>0,9990
Správnost	výtěžnost - (%)	98,22	95,71	x=100±5%
	-RSD (%)	0,28	0,66	x<2%

Proces izolace parabenů z krému:

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství krému odpovídající 0,5 mg methylparabenu a 0,25 mg propylparabenu (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu butylparabenu ve směsi acetonitrilu a fosfatového pufru o pH 3,0 (30:70) (IS) o koncentraci c = 1 mg/100 ml a směs byla umístěna po dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr a dávkován autosamplrem přímo na kolonu.

Závěr

V rámci vývoje provádíme na našem pracovišti kromě vývoje zároveň kompletní validace nových metod pro stanovení parabenů v topických léčivých přípravcích, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKLU i ostatní platné normy. Validované metody se využívají pro analýzy při určování homogenity výrobního procesu a provádění stabilitních studií léčivých přípravků, obsahujících tyto látky.

Provedené validace dokazují, že metody jsou dostatečně reprodukovatelné, citlivé a zároveň selektivní pro rutinní analýzu uvedených léčivých přípravků.

Uveděno k tabulkám č. 1 až 3
 t_R retenční čas
 w_{0,05} šířka piku v polovině výšky (min)
 N počet píků na metr
 R_{ij} rozlišení mezi sledovanými a předcházejícím píkem
 T asymetrie píku
 + šířka v základě 3 násobky
 * při koncentracích 60, 80, 100, 120, 160, 200%
 † 6 samostatných navážek 3 námitky
 MP, PP methylparaben, propylparaben

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LN00B125.

A COMPARISON OF PERFORMANCE OF VARIOUS NOVEL ANALYTICAL COLUMNS WITH CLASSICAL C18 STATIONARY PHASES

Lucie Nováková^a, L. Matysová^a, L. Havlíková^{a,b}, P. Solich^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, ^b The Research Centre LN00B125,
Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

During last decade, a lot of laboratories are dealing with new types of stationary phases or with improved octadecylsilica stationary phases frequently used in HPLC method development and validation. These are eg. monolithic columns (made by Merck), Extra Density Bonded C18 and Stable Bond C18 (produced by Agilent). Such columns are available in shorter lengths comparing to conventional dimensions. This enables shortening analysis time while the separation efficiency remains unaffected.

Recently published method for determination of estradiol (active substance), mehlparaben, propylparaben (preservatives) and estrone (degradation product) is performed on conventional C18 (250 x 3.0 mm, 5.0 μm) analytical column using mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and water (23:24:53 v/v/v) at flow-rate 0.9 ml/min. UV detection at 225 nm was used for detection and quantitation of analytes. The total analysis time was about 11 minutes. Analytical run had to be performed at 40 °C to get sufficient compounds resolution and to decrease column back-pressure.

We have tested these analytical conditions using new improved types of analytical columns. They included: Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm) and Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm). They differ with their particle size, column length and ODS type as well. Higher flow-rates (up to about 2.5 ml/min) could be applied regardless to back-pressure. The analysis could be performed even at ambient temperature. Analytical run was shortened to 3.5 min with the same or better retention characteristics. System suitability data for all columns will be presented, showing the advantages of these columns in pharmaceutical analysis.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education, project MSMT No. 111600001, the Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education and the technical support of Agilent Technologies.



A COMPARISON OF PERFORMANCE OF VARIOUS NOVEL ANALYTICAL COLUMNS WITH CLASSICAL C18 STATIONARY PHASES

Lucie Nováková^a, Ludmila Matyssová^a, Lucie Havlíková^{a,b}, Petr Solich^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, ^b The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Introduction

Speed of analysis has become of great importance in many application areas of HPLC. Especially on a field of pharmaceutical, toxicological and clinical analysis, where is important to increase throughput and reduce analysis costs. The simplest made how to shorten analytical run is column length shortening. However, that is risky, because complex mixture of compounds does not have to be separated well enough. Therefore it is necessary to increase column efficiency by reducing particle size, resulting in increasing of absorption surface of stationary phase. This way the analysis could be performed during a shorter time with the same separation efficiency.

The aim of this work

The aim of this work is to compare a performance and retention data of different analytical columns containing octadecylsilica as a stationary phase. The comparison will be made using the method developed for pharmaceutical formulation Estrogel – examined substances are neutral compounds. We tested these analytical columns: Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm) and Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm).

Experimental

Chromatography

instrumentation: Shimadzu LC-2010 C system with UV detection at 225 nm
 data processing: chromatographic software Class VP 5
 analytical column: Discovery™ C18 (250 x 3.0 mm ID, 5 μm)
 Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm)
 Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm)
 mobile phase: acetonitrile, methanol, water (23:24:53 v/v/v)
 flow rates: 0.9 ml/min–1.2 ml/min–2.5 ml/min
 column oven temperature: 40 °C (25 °C)
 injection volume: 5 μl
 internal standard for quantitation: hydrocortisone

Results and discussion

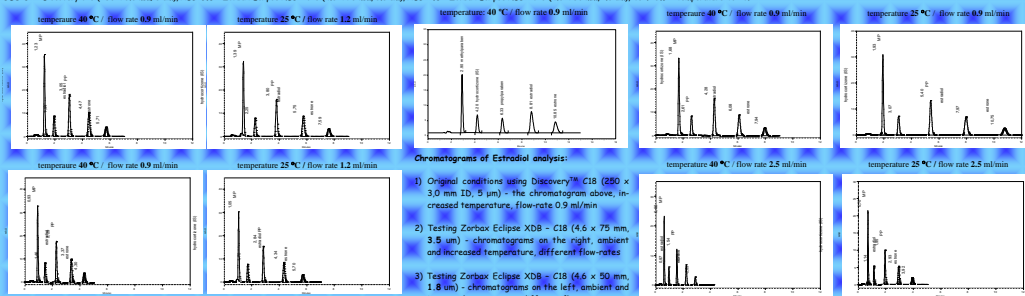
	methylparaben					hydrocortisone (IS)					propylparaben					estradiol					estrone				
	t _r	N	H	R _s	T	t _r	N	H	R _s	T	t _r	N	H	R _s	T	t _r	N	H	R _s	T	t _r	N	H	R _s	T
Obs 5 40°/0.9	2.87	3077	6154	4.41	1.23	4.07	3013	6026	5.03	1.23	6.04	6000	12000	7.94	1.30	8.35	6381	12762	6.32	1.31	10.30	7756	15512	4.40	1.27
XDB 3.5 40°/0.9	1.69	1918	25673	4.37	1.11	2.61	2514	33520	5.08	1.28	4.28	5969	79567	7.77	1.04	6.09	6748	89880	7.00	1.02	7.94	8207	109427	5.71	1.04
XDB 3.5 40°/2.5	0.62	736	9813	2.78	1.29	0.97	1211	16147	3.44	1.28	1.54	2995	39933	5.14	1.11	2.23	3895	51933	4.83	1.06	2.89	4964	66187	4.33	1.02
XDB 3.5 25°/0.9	1.93	2106	28080	6.75	1.05	3.07	2667	35560	5.63	1.28	5.40	6622	88293	9.28	1.10	7.97	7179	95720	8.01	1.03	10.76	8622	114960	6.63	1.10
XDB 3.5 25°/2.5	0.70	1089	14920	2.37	1.19	1.14	1664	22187	4.38	1.28	1.95	3887	51827	6.79	1.05	2.93	4449	59320	6.95	1.10	3.92	5476	73013	5.10	1.03
XDB 1.8 40°/0.9	1.23	1196	23920	1.99	1.19	1.94	1706	34120	4.26	1.28	3.05	4037	80740	5.88	1.09	4.47	5011	100280	6.37	1.01	5.71	6087	121740	4.56	1.05
XDB 1.8 40°/1.2	0.93	1037	20740	3.62	1.13	1.46	1552	31040	4.07	1.20	2.29	3854	77080	4.23	1.13	3.37	4999	99980	5.71	1.10	4.31	6407	128140	3.76	1.07
XDB 1.8 25°/0.9	1.39	1361	27220	0.93	1.19	2.25	1863	37260	4.77	1.28	3.80	4959	99180	7.30	1.04	3.80	4959	99180	7.30	1.04	7.59	7668	153360	5.75	1.05
XDB 1.8 25°/1.2	1.05	1193	23860	0.90	1.07	1.70	1769	35380	4.63	1.28	2.84	4689	93780	6.96	1.15	4.34	6039	120780	7.67	1.15	5.70	7613	152260	5.65	1.13

t_r – retention time [min], N – theoretical plate number, H – height equivalent of theoretical plate, R_s – peak resolution, T – peak asymmetry

Obs 5 – Discovery C18 (250 x 3.0 mm, 5 μm), XDB 3.5 – Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm), XDB 1.8 – Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm), 40°/0.9 – temperature 40 °C

Table of system suitability data for all tested analytical columns.

Comparison of Estrogel analysis was made at ambient and increased temperature using different flow-rates. The chromatographic conditions for Estrogel analysis are described above. Under these conditions all tested compounds (estradiol, methylparaben, propylparaben, hydrocortisone (IS) and estrone) were separated well. System suitability parameters (Table) meet all necessary criteria. Analytical run took about 11-12 minutes, the typical back-pressure was about 24 MPa. That is quite a high for series of routine analyses. For these reason is better to use high-throughput columns, which allows using of higher flow-rates, while the separation of compounds in unaffected and the analytical run is even shortened.



Conclusions

A comparison of conventional C18 analytical column Discovery C18 (250 x 3.0 mm, 5.0 μm) and novel types of C18 columns Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm) and Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm) was made.

The data presented in this article show explicit advantages of these new types of analytical columns comparing to conventional C18 columns. These advantages are particularly a significant reduction of analysis time that means reduction in solvent consumption. The SST data including peak asymmetry and peak resolution are improved as well.

Aknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education, project MSMT No. 111600001, the Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education and the technical support of Agilent Technologies.

DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF PHARMACEUTICALS IN GELS

Matysová L.¹, Havlíková L.^{1,2}, Nováková L.¹, Solich P.^{1,2}

¹Department of Analytical Chemistry, ²The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic
Email: matysova@faf.cuni.cz

To assure the high quality and safety of pharmaceutical products it is of a high importance to monitor the levels not only of the active substance but also of its impurities and degradation products, either during manufacturing process and storage. It is necessary to carry out a stability-indicating method, which is able to determine active substance and its impurities and/or degradation products (present at extremely low levels) preferably during one step analysis at a relatively short time, with high selectivity and sensitivity. High performance liquid chromatography (HPLC) is due to its information profitability and separation efficacy commonly used for this purpose.

The object of this work is to introduce newly developed and validated HPLC methods for the determination of pharmaceuticals and their degradation products in topical gels. Chromatographic conditions and validation parameters will be described for all methods (System Suitability Test parameters, validation parameters including precision, linearity, selectivity, accuracy, LOD and LOQ). The currently studied and developed methods are for substances: estradiol, indometacin and ketoprofen. All methods are successfully used in practical analysis of topical pharmaceutical preparations made for commercial use.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education, project MSMT No. 111600001 and the Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education.



DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF PHARMACEUTICALS IN GELS

L.Havlíková^{1,2}, L.Matysová¹, L.Nováková¹, P.Solich^{1,2},
¹Department of Analytical Chemistry, ²The Research Centre LN00B125,
 Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Introduction

For the assessment of quality and safety of pharmaceutical products it is important to monitor the levels not only of the active substance but also of its impurities and degradation products, either during manufacturing process and storage. It is necessary to carry out a stability-indicating method, which is able to determine active substance and its impurities and/or degradation products (present at extremely low levels) preferably during one step analysis at a relatively short time, with high selectivity and sensitivity. High performance liquid chromatography (HPLC) is due to its information profitability and separation efficacy commonly used for this purpose.

The aim of this work

There is a lack of information in available pharmaceutical literature about stability-indicating HPLC methods for determination of active substance, its degradation products and preservatives in one-step analysis. The aim of this work is to introduce newly developed and validated HPLC methods for the determination of pharmaceuticals and their degradation products in topical gels. The currently studied substances were: estradiol, indomethacin and ketoprofen.

Experimental

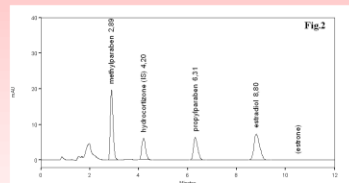
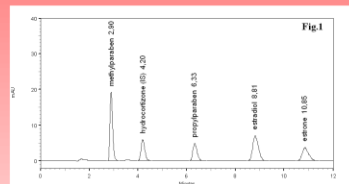
Estradiol

Chromatography
 instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP
 analytical column: Discovery C18 (Sigma-Aldrich), 250 x 3.0 mm ID, 5 µm
 mobile phase: acetonitrile-methanol-water (23:24:53 v/v/v)
 injection volume: 5 µl detection: UV 235 nm
 flow rate: 0.9 ml/min column oven temperature: 40 °C
 internal standard for quantitation: hydrocortisone

Fig.1 - chromatogram of separation of compounds in standard solution of estradiol, its degradation product estrone and two preservatives methylparaben and propylparaben

Fig.2 - chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical topical preparation Estrogel-gel

Sample preparation
 0.5g of topical gel accurately weighed was transferred into 50 ml centrifuge tube 20.0 ml solution of internal standard in acetonitrile was added (1 mg/ml) sonication for 10 minutes centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm supernatant was injected directly into the analytical column



Method Validation

Parameter	estradiol	methylparaben	propylparaben	estrone	Limits
SST					
repeatability-retention time	0.09	0.00	0.18	0.10	R.S.D.<1%
repeatability-area	0.14	0.19	0.00	0.10	R.S.D.<1%
theoretical plates	6015	2772	5438	7430	N>1500
resolution	6.12	4.99	6.86	4.24	R _s >1.5
asymmetry	1.25	1.30	1.28	1.34	T<2.0
Validation					
precision ^a - RSD (%)	0.39	0.43	1.15	2.24	R.S.D.<5%
linearity ^b (correlation coefficient)	0.99987	0.99998	0.99995	0.99981	R<0.9990
accuracy ^c - recovery (%)	97.19	99.20	98.51	97.65	x=100±5%
accuracy ^c - RSD (%)	0.14	0.72	1.20	0.16	R.S.D.<5%
LOD (mg/l)	-	-	-	0.0012	-
LOQ (mg/l)	-	-	-	0.040	-

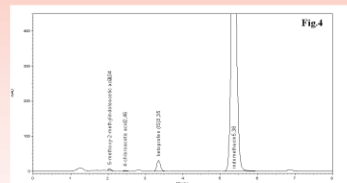
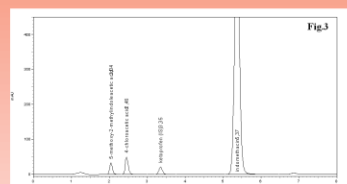
Indomethacin

Chromatography
 instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP
 analytical column: Zorbax SB-Phenil 75 x 4.6, 3.5 µm
 mobile phase: acetonitrile-0.2% phosphoric acid (50:50 v/v)
 injection volume: 5 µl detection: UV 237 nm
 flow rate: 0.6 ml/min column oven temperature: 25 °C
 internal standard for quantitation: ketoprofen

Fig.3 - chromatogram of separation of compounds in standard solution of indomethacin, its degradation products 4-chloroacetic acid and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid

Fig.4 - chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical topical preparation Indometacin-gel

Sample preparation
 0.5g of topical gel accurately weighed was transferred into 50 ml centrifuge tube 20.0 ml solution of internal standard in acetonitrile was added (1 mg/ml) sonication for 10 minutes centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm supernatant was injected directly into the analytical column



Method Validation

Parameter	indomethacin	5-methoxy-2-methylindoleacetic acid	4-chloroacetic acid	Limits
SST				
repeatability-retention time	0.34	0.18	0.23	R.S.D.<1%
repeatability-area	0.18	0.45	0.66	R.S.D.<1%
theoretical plates	7665	3103	4000	N>1500
resolution	8.59	2.70	5.33	R _s >1.5
asymmetry	1.06	1.23	1.14	T<2
Validation				
precision ^a - RSD (%)	1.39	3.10	3.25	R.S.D.<5%
linearity ^b (correlation coefficient)	0.999964	0.999981	0.999991	R<0.9990
accuracy ^c - recovery (%)	99.53	96.22	98.27	x=100±5%
accuracy ^c - RSD (%)	0.70%	1.13	0.62	R.S.D.<5%
LOD (mg/ml)	-	0.225	0.0569	-
LOQ (mg/ml)	-	0.75	0.190	-

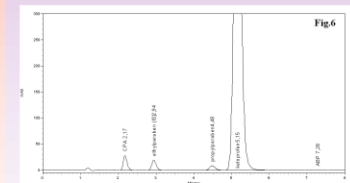
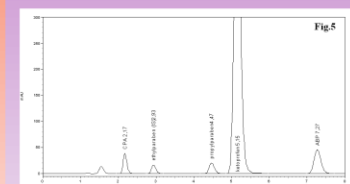
Ketoprofen

Chromatography
 instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP
 analytical column: Discovery C18 (Sigma-Aldrich), 250 x 3.0 mm ID, 5 µm
 mobile phase: acetonitrile-water-phosphate buffer pH 3.5 (40:58:2 v/v/v)
 injection volume: 10 µl detection: UV 233 nm
 flow rate: 1 ml/min column oven temperature: 25 °C
 internal standard for quantitation: ethylparaben

Fig.5 - chromatogram of separation of compounds in standard solution of ketoprofen, its degradation products 2-(3-carboxyphenyl)propionic acid (CPA) and 3-acetylbenzophenone (ABP) and two preservatives methylparaben and propylparaben

Fig.6 - chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical topical preparation Ketoprofen-gel

Sample preparation
 0.5g of topical gel accurately weighed was transferred into 50 ml centrifuge tube 20.0 ml solution of internal standard in acetonitrile was added (1 mg/ml) sonication for 10 minutes centrifugation for 15 minutes at 3000 rpm supernatant was injected directly into the analytical column



Method Validation

Parameter	ketoprofen	methylparaben	propylparaben	ABP	CPA	Limits
SST						
repeatability-retention time	0.27	0.33	0.24	0.24	0.46	R.S.D.<1%
repeatability-area	0.22	0.37	0.34	0.28	0.28	R.S.D.<1%
theoretical plates	5113	2295	5119	7718	913	N>1500
resolution	2.490	3.872	6.568	6.878	3.193	R _s >1.5
asymmetry	1.21	1.37	1.31	1.22	1.23	T<2
Validation						
precision ^a - RSD (%)	1.90	1.92	1.92	0.62	1.93	R.S.D.<5%
linearity ^b (correlation coefficient)	0.99940	0.99920	0.99965	0.99973	0.99980	R<0.9990
accuracy ^c - recovery (%)	103.14	104.59	102.63	103.22	103.3	x=100±5%
accuracy ^c - RSD (%)	0.40	0.31	1.06	0.49	0.47	R.S.D.<5%
LOD (mg/l)	-	-	-	0.014	0.040	-
LOQ (mg/l)	-	-	-	0.046	0.135	-

Conclusions

All of these methods were validated. The results meet all criteria of validation requirements recommended by ICH guidelines and pharmacopoeias. All methods were successfully used in practical analysis (stability studies and tests of homogeneity) of topical pharmaceutical preparations for commercial use.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education, project MSM1 No. 111600001 and the Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education.

HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream

L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

tel:+420495067391, fax:+420495518718, havlikova@faf.cuni.cz

The aim of this work is to introduce newly developed stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of calcium pantothenate and two preservatives methylparaben and propylparaben presented in the topical cream. Analysis of creams and gels requires the use of internal standard, mainly by reason of problems with recovery after sample preparation procedures.

Different analytical columns with various stationary phases were tested. The conventional octadecylsilica sorbent Supelco DiscoveryTM C18 (125 mm x 4.0 mm, 5 μ m) was not convenient for analytical separation because of elution of calcium pantothenate with the dead volume, similar results were received on Zorbax SB-CN (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). Optimal separation was achieved by using of Zorbax TSM (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) column. Finally, Hypersil ODS column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) was used for the analysis. The analysis time was 12 minutes, at flow rate of 0.7 ml.min⁻¹. Chromatography was performed with binary mobile phase composed of methanol and phosphoric acid pH 2.5 65:35 (v/v). The method was validated according to ICH guideline recommendations.

A fast, simple reversed-phase chromatographic method with spectrophotometric detection for the determination of active compound calcium pantothenate and two preservatives was developed for practical routine analysis (stability testing) of commercially produced topical pharmaceutical preparation.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MSM 0021620822 and Grant Agency of the MSMT of the Czech Republic - FRVS No. 939/2005.



HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream

L.Havlíková¹, L.Matysová¹, L.Nováková¹, P.Solich¹,

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Introduction

Calcium pantothenate is a calcium salt of pantothenic acid. Calcium pantothenate is besides other B vitamins used as a supplement to treat e.g. acne, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, wounds, and to support the immune system.

Calcium pantothenate is used in many cosmetic and pharmaceutical topical preparations for its skin emollient, regeneration and hair conditioning properties. It is suitable for dry skin or as a supplement in treatment of dermatitis, eczema, herpes simplex and herpes zoster diseases.

The aim of this work

The aim of this work is to introduce newly developed stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of calcium pantothenate and two preservatives methylparaben and propylparaben presented in the topical cream. Analysis of creams and gels requires the use of internal standard, mainly by reason of problems with recovery after sample preparation procedures.

Experimental

Different analytical columns with various stationary phases were tested. The octadecylsilica sorbent Supelco Discovery™ C18 (125 mm x 4.0 mm, 5 μm) was not convenient for analytical separation because of elution of calcium pantothenate with the dead volume, similar results were received on Zorbax SB-CN (150 mm x 4.6 mm, 5 μm).

Finally, Hypersil ODS column (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) was used for the analysis. The analysis time was 12 minutes, at flow rate of 0.7 ml.min⁻¹. Chromatography was performed with binary mobile phase composed of methanol and phosphoric acid pH 2.5 65:35 (v/v).

The method was validated according to ICH guideline recommendations.

Chromatography

instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP.
 analytical column: Hypersil ODS column (Hypersil, UK), 250 x 4.6 mm ID, 5 μm
 mobile phase: methanol and phosphoric acid pH 2.5 (65:35 v/v)
 injection volume: 2 μl
 flow rate: 0.7 ml.min⁻¹
 detection: UV 214 nm
 column oven temperature: 25 °C
 internal standard for quantitation: ketoprofen

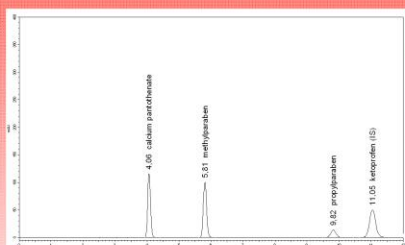


Fig. 1 Chromatogram of separation of compounds in standard solution

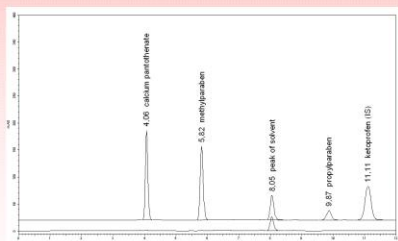


Fig. 2 Chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical preparation Calcium pantothenicum

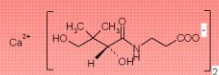


Fig. 3 Active substance Calcium pantothenate

Sample preparation

0.5g of topical cream accurately weighed was transferred into 50 ml centrifuge tube
 2.0 ml of chloroform were added and the mixture was placed in a hot water bath at 75 °C for 20 minutes
 20.0 ml of internal standard solution in a mixture of methanol phosphate buffer pH 3.1 80:20 (v/v) was added (5 mg/ml)
 sonication for 20 minutes^a centrifugation for 15 minutes at 6000 rpm
 supernatant was filtered through the 0.45 μm filter and injected directly into the analytical column

Method Validation

Parameter	Calcium pantothenate	Methylparaben	Propylparaben	Criteria
SST				
Repeatability – retention time ^a	R.S.D.(%) 4.06	5.81	9.82	X < 1%
Repeatability – area ^a	R.S.D.(%) 681.006	727.493	152.800	X < 1%
Theoretical plates ^b	10042	14860	17068	N > 1500
Resolution ^b	9.94	10.07	16.15	R _s > 1.5
Asymmetry ^b	1.14	0.95	1.06	T < 2
Validation				
Precision ^c	R.S.D.(%) 3.36	1.65	1.60	X < 5%
Linearity ^d	Correlation coefficient 0.99981	0.99987	0.99985	R > 0.9990
Accuracy ^e	Recovery (%) 100.25	100.69	101.92	X = 100 ± 5%
	R.S.D.(%) 0.65	0.74	0.47	X < 5%
Selectivity	No interference	No interference	No interference	

^a made in six replicates
^e six samples injected three times each

^b made in three replicates
^d at 40, 60, 80, 10, 120, 140% levels, three replicates

Conclusions

A fast, simple reversed-phase chromatographic method with spectrophotometric detection for the determination of active compound calcium pantothenate and two preservatives was developed for practical routine analysis (stability testing) of commercially produced topical pharmaceutical preparation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MSM 0021620822 and Grant Agency of the MSM of the Czech Republic - FRIS No. 939/2005

Determination of Estradiol and its Degradation Products in Topical Gel

L. Nováková, L. Havlíková, L. Matysová, P. Solich

Analytical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Charles University,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

tel:+420495067391, fax:+420495518718, novakoval@faf.cuni.cz

Estradiol is a steroid hormone naturally occurring in human body. Lack of this compound causes various diseases in older women. Therefore, different pharmaceutical formulations, especially tablets, transdermal plasters and topical gels containing estradiol were developed and successfully used in clinical practice. Quality control of pharmaceutical preparation prescribes to determine not only active substance to confirm its quantity in the preparation, but also the determination of its degradation products to get information about the stability profile.

During manufacturing process and stability testing, seven possible degradation products of estradiol could occur: estradiol-17-methyl ester, estradiol-17-acetate, estradiol-17-hemihydrate, estrone, Δ 9/11-estrone, Δ 9/11-estradiol and ethinylestradiol. There are no information about separation of estradiol and all its possible degradation products neither in pharmacopoeias nor in scientific journals.

In our study a novel analytical method using HPLC with UV detection for compound separation, identification and quantitation was developed. Various stationary phases were tested and the results of different columns were compared. Optimal HPLC conditions for determination of estradiol and its degradation products will be reported.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the MSM 0021620822, Zentiva a. s. and Grant Agency of the MSMT of the Czech Republic - FRVS No. 1239/2005.



Determination of Estradiol and its Degradation Products in Topical Gel

Lucie Nováková, Lucie Havlíková, Ludmila Matysová, Petr Solich

Department of Analytical Chemistry,
Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové, Czech Republic

29th International Symposium on
High Performance Liquid Phase
Separations and Related Techniques
HPLC 2005
STOCKHOLM
26 - 30 June 2005 Stockholm - SWEDEN

Introduction

Estradiol, chemically 1,3,5(10)-estratrien-3, 17 β -diol is the most potent estrogen of a group of endogenous estrogen steroids which includes estrone and estriol. Estradiol is responsible for the growth of breast and reproductive epithelia, maturation of long bones, and development of secondary sexual characteristics. Estradiol and its semi-synthetic esters are primarily used as menopausal hormones. Estradiol may also be used as replacement therapy for female hypogonadism or primary ovarian failure.

The only degradation product to be monitored together with estradiol according to pharmacopoeial regulations is estrone (chemically 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one). Further known degradation products of estradiol considered in our study are estradiol hemihydrate (chemically 17a estradiol hemihydrate), ethynylestradiol (chemically 17a-ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol), estradiol 3-methyl ether (chemically 17 β hydroxy-3-methoxyestra-1,3,5(10)-triene), estradiol 17-acetate (chemically 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol 17-acetate), D⁹⁽¹¹⁾-estrone (1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one), and D⁹⁽¹¹⁾-estradiol (1,3,5(10),9(11)-estratetraen-3,17 β -diol). Considered intermediates of estradiol are D⁹⁽¹¹⁾-estrone, and D⁹⁽¹¹⁾-estradiol. The aim of this work was to develop a stability indicating HPLC method for determination of estradiol and all above stated impurities.

The aim of this work

Substances examined:

	R1	R2	R
β -estradiol	-OH	-OH	
estrone	=O	-OH	
ethynylestradiol	-OH	-OH, -C \equiv C	
estradiol 17-acetate	-OH	-O-CO-CH ₃	
α -estradiol-hemihydrate	-OH	-OH / * 0.5 H ₂ O	
estradiol-3-methylether	-OCH ₃	-OH	
D ⁹⁽¹¹⁾ estrone			-OH
D ⁹⁽¹¹⁾ estradiol			=O

Experimental

Chromatography

instrumentation: Shimadzu LC-2010 C system with UV detection
data processing: chromatographic software Class VP 6.3
analytical column: Zorbax SB-CN (150 x 4.6, 5 μ m)
mobile phase: ACN, phosphoric acid 0.085%, THF (27:63:10 v/v/v)
flow rate: 1.0 ml/min
column oven temperature: 25 $^{\circ}$ C
injection volume: 5 μ l
internal standard for quantitation: flurbiprofen
detection: 225 nm

Sample Preparation

0.5 g of gel was accurately weighted (corresponding to 0.3 mg of the active substance estradiol) and transferred into a centrifuge tube, 20.00 ml of working solutions of internal standard flurbiprofen were added. The mixture in centrifuge tube was sonicated for 10 minutes; afterwards, it was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant was injected directly into the chromatographic system.

The above-described procedure meets the requirements of recovery in the range of 95-105% for all tested compounds.

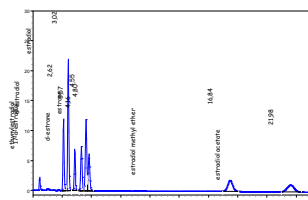
Method validation

Parameter	SST	repeatability t_p	repeatability A	theoretical plates	resolution	asymmetry
Δ -estradiol		0.00	0.36	8038	-	1.15
estradiol		0.00	0.74	8803	2.18	1.06
estrone+ Δ estrone		0.04	0.33	7262	1.97	1.03
ethynylestradiol		0.00	0.36	9173	2.40	1.06
estradiol-Me-ether		0.00	0.23	10686	5.25	1.03
estradiol acetate		0.02	0.65	10875	5.61	1.03
estradiol		0.00	0.24	8630	1.66	1.02

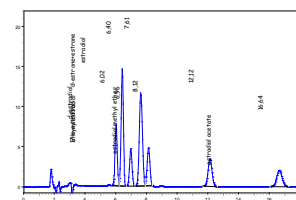
Validation substance	Parameter	precision [RSD %]	linearity [C.O.V.]	accuracy [% rec.]	accuracy [RSD%]	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
Δ -estradiol		0.63	0.99924	99.60	1.94	1.29x10 ⁻⁵	4.30x10 ⁻⁵
17a estradiol		0.79	0.99917	100.56	1.24	1.98x10 ⁻⁵	6.59x10 ⁻⁵
estrone+ Δ estrone		0.48	0.99918	99.18	1.15	1.03x10 ⁻⁵	3.43x10 ⁻⁵
ethynylestradiol		0.62	0.99902	100.58	0.78	2.37x10 ⁻⁵	7.89x10 ⁻⁵
estradiol-Me-ether		0.57	0.99912	101.98	0.30	1.41x10 ⁻⁵	4.70x10 ⁻⁵
estradiol acetate		0.99	0.99943	102.19	0.73	1.14x10 ⁻⁴	3.81x10 ⁻⁴
estradiol		0.17	0.99903	100.69	1.47	-	-

Six standard solution replicates were measured for each SST parameter.
Six samples in three replicates were measured for each validation parameter establishment. Linearity was tested at 40, 60, 80, 100, 120 and 140 % levels.

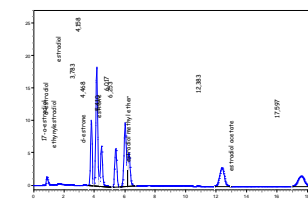
Results and discussion



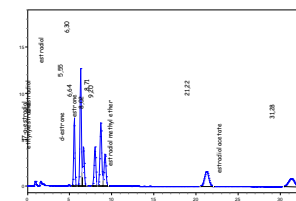
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB C18, 1.8 μ m, mobile phase consisted of: acetonitrile, 0.085 % phosphoric acid (40:60)



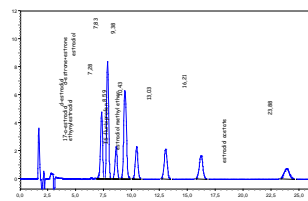
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB CN, mobile phase consisted of: acetonitrile, tetrahydrofuran, phosphoric acid 0.085% (30:10:60)



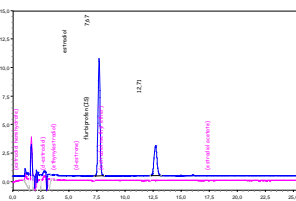
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB Phenyl, mobile phase consisted of: acetonitrile, 0.085 % phosphoric acid (40:60)



Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB Phenyl, mobile phase consisted of: acetonitrile, methanol, 0.085 % phosphoric acid (30:10:60)



Chromatogram of compounds separation in standard solution using analytical column Zorbax SB CN (validated conditions), estrone and d-estrone determined together



Chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical formulation Estrogel gel together with placebo chromatogram, impurities were not observed

Conclusions

A stability indicating HPLC method for simultaneous determination of estradiol and its seven degradation product (D⁹⁽¹¹⁾-estradiol, 17a estradiol, estrone, D⁹⁽¹¹⁾-estrone, ethynylestradiol, estradiol 3-methyl ether, and estradiol 17-acetate) was developed. Zorbax SB CN column was used for analysis. The total analysis time was 26 minutes.

Estrone and D⁹⁽¹¹⁾-estrone were not perfectly separated. The two degradation products estrone and D⁹⁽¹¹⁾-estrone were determined as a sum of two components. This approach provides more reproducible results and the importance of this result is from stability testing point of view better than not reproducible results in determination of these two substances separately.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Zentiva a. s, Grant Agency of the MSMT of the Czech Republic - FRVS No. 1239/2005 and also to MSM 0021620822.

MODERNÍ TRENDY V ANALÝZE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK CHROMATOGRAFICKÝMI METODAMI

CITOVÁ IVANA, HAVLÍKOVÁ LUCIE, SLADKOVSKÝ RADEK, SOLICH PETR

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, HEYROVSKÉHO 1203, 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

Polyfenolické látky představují významnou skupinu přírodních sloučenin obsažených prakticky ve všech zdrojích rostlinného původu. Spolu s karotenoidy se řadí mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty a hrají významnou roli v prevenci závažných onemocnění jako je rakovina, kardiovaskulární choroby či zánětlivé procesy. Jejich účinek spočívá ve schopnosti zhaset volné kyslíkové radikály, které vznikají v lidském organismu v důsledku oxidačního stresu.

Polyfenolické sloučeniny se dělí na dvě hlavní skupiny látek – flavonoidy a fenolické kyseliny, doprovázené ještě méně četnými stilbeny a lignany. Mezi hlavní zdroje polyfenolů patří ovoce a zelenina, nápoje (káva, čaj, víno) či léčivé rostliny, hojně využívané ve fytoterapii¹. Vzhledem k nespornému biologickému a farmaceutickému významu těchto látek je nezbytné vyvíjet nové metody jak pro extrakci polyfenolů z přírodních materiálů, tak i pro separaci a stanovení těchto látek ve sledované matrici.

Fenolické látky lze separovat prostřednictvím široké škály chromatografických metod, z nichž konvenční metody, jako jsou tenkovrstvá (TLC) či sloupcová chromatografie (CC), jsou dnes vzhledem k jejich náročnějším požadavkům na množství hodnoceného analytu méně populární a jejich hlavní význam spočívá spíše v předseparaci hodnocených látek ze složitého vzorku. Plynová chromatografie (GC) představuje vysoce selektivní a citlivou analytickou metodu, avšak kvůli nedostatečné těkavosti fenolických sloučenin, a z toho vyplývající nezbytnosti jejich derivatizace, se nejčastěji používanou metodou pro hodnocení polyfenolických látek stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), s použitím C18 - reverzních fází jako sorbentu a UV-Vis či hmotnostně-spektrometrickou (MS) detekcí. Jako nejvhodnější mobilní fáze je většinou používán binární systém sestávající z okyselené vodné fáze a polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril).

Postup extrakce fenolických látek z přírodní matrice závisí na charakteru extrahovaných látek a může být proveden jak konvenční liquid-liquid technikou, tak alternativními způsoby (solid-phase (SPE), mikrovlnná (MAE) či superkritická fluidní (SFE) extrakce)^{2,3}.

Projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant GAUK č. 296/2005) a Výzkumnými záměry MŠMT, MSM 0021620822.

- 1 H. Taipero *et al.*, Biomed. Pharmacother. 56 (2002) 200-207
- 2 M. Waksmundzka-Hajnos, J.Chromatogr. B 717 (1998) 93-118
- 3 R. Tsao *et al.*, J.Chromatogr. B 812 (2004) 85-99



MODERNÍ TRENDY V ANALÝZE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK CHROMATOGRÁFICKÝMI METODAMI (PŘEHLED)

Citová Ivana, Havlíková Lucie, Sladkovský Radek, Solich Petr

Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; Email: ivana.citova@faf.cuni.cz

1. Polyfenolické látky

Polyfenolické látky představují významnou skupinu přírodních sloučenin obsažených prakticky ve všech zdrojích rostlinného původu. Spolu s karotenoidy se řadí mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty a hrají významnou roli v prevenci závažných onemocnění jako je rakovina, kardiovaskulární choroby či zánětlivé procesy. Jejich účinek spočívá ve schopnosti zhášet volné kyslíkové radikály, které vznikají v lidském organismu v důsledku oxidačního stresu¹.

2. Rozdělení a výskyt polyfenolických látek

Rozdělení	Příklad	Výskyt
Flavonoidy	Anthocyany Isoflavony Flavanoly Flavony Flavanony Flavanony	jahody, třešně, červ. víno sója, sojové výrobky hrušky, červené víno, čaj celer, olivy, paprika citrusové plody olivy, cibule, brusinky
Fenolické kyseliny	Deriváty kyseliny hydroxy-benzoové	maliny, jahody, grep
	Deriváty kyseliny hydroxy-skořicové	káva, ovoce, džusy
Stilbeny		víno
Lignany	enterodiol	lněné semínko

Polyfenolické sloučeniny se dělí na dvě hlavní skupiny látek – flavonoidy a fenolické kyseliny, doprovázené ještě méně četnými stilbeny a lignany¹. V současnosti je známo již více než 5000 polyfenolických sloučenin, z nichž přes 2000 látek tvoří flavonoidy². Mezi hlavní zdroje polyfenolů patří ovoce a zelenina, nápoje (káva, čaj, víno) či léčivé rostliny, hojně využívané ve fytoterapii^{1,3}.

3. Analýza polyfenolických látek chromatografickými metodami

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

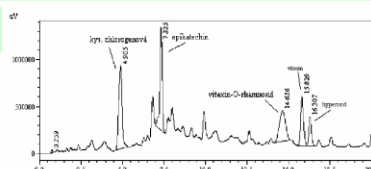
- Nejpopulárnější a nejvíce používaná metoda
- Využití zejména k hodnocení obsahu polyfenolů v potravinách a rostlinném materiálu
- HPLC podmínky:**
- Detekce - DAD (Diode-array), MS
- Stacionární fáze - téměř výlučně reverzní C18 fáze
- Mobilní fáze - binární systém - okyselená vodná fáze a polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril)²

Nekonvenční HPLC metody

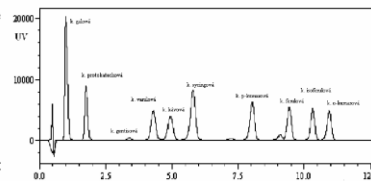
- NP HPLC** - separace na normální stacionární fázi, vhodné k analýze procyanidinů
- Gelová permeační chromatografie (GPC)** - procyanidiny
- Iontově-výměnná chromatografie (IEC)** - anthocyany
- Vysokorychlostní protiproudá chromatografie (HSCCC)** - moderní metoda, založená na rozdělení analytu mezi dvě kapalné fáze; využití k analýze flavonoidů v přír. materiálu
- Superkritická fluidní chromatografie (SFC)** - oproti HPLC nízká spotřeba rozpouštědel²

Literatura:

- H. Taipero *et al.*, Biomed. Pharmacother. 56 (2002) 200-207
- R. Tsao *et al.*, J.Chromatogr. B 812 (2004) 85-99
- A. King, G. Young, J. Am. Diet. Assoc. 99 (1999) 213-218
- M. Waksmundzka-Hajnos, J.Chromatogr. B 717 (1998) 93-118



Chromatografický záznam HPLC analýzy extraktu listů hlohu jednozemenného (*Crataegus monogyna*) na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6x75mm, 3,5µm
Podmínky: MF - A: MeOH/0,085% H₃PO₄ (15:85); B:100% MeOH
0-2 min 100% A, 2-18 min 70% A, průtok 1ml/min



Chromatografický záznam HPLC analýzy standardů fenolických kyselin na koloně Synergi Fusion-RP 4x75mm, 3,0µm
Podmínky: MF - A: MeOH/0,085% H₃PO₄ (15:85); B:100% MeOH
0-4 min 15% B, 4-20 min 50% B, průtok 1ml/min

Poděkování: Projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant GAUK č. 296/2005) a Výzkumnými zábery MŠMT, MSM 0021620822.

Plynná chromatografie (GC)

- Výhodou plynové chromatografie je vysoká citlivost a rozlišení, nevýhodou jsou vysoké nároky na čistotu vzorku a nutná derivatizace fenolických sloučenin vzhledem k jejich nedostatečné těkavosti

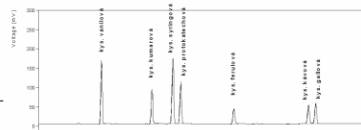
Derivatizace:

- silylační techniky** - podmínka nevodného prostředí
- čínidla** - TMS (*N*-trimethylsilyldiethylamin), BSTFA (bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamid)

- nesilylační techniky** - alkylace methyljodidem, methanolem v prostředí bortrifluoridu či alkychloroformátů (methyl- a ethylchloroformát)

GC podmínky:

- Detekce - nejčastěji MS (hmotnostně-spektrometrická), FID (plamenově-ionizační) či ECD (elektronového zachytu)
- Kolony - kapilární kolony s nepolární stacionární fází (př. 5%bifenyl/95%dimethylpolysiloxan)^{2,4}



Chromatografický záznam GC analýzy standardů fenolických kyselin po derivatizaci methylchloroformátem ve vodném médiu na koloně Ecquity-5 0.32mm IDx30m, 1,0µm d_f; MF - N₂; průtok 3,5ml/min, IN) 240°C, DET 280°C, COL 100°C - 2 min, 10°C/min do 200°C, 5°C/min do 280°C

STANOVENÍ DIKLOFENAKU SODNÉHO A JEHO DEGRADAČNÍHO PRODUKTU METODOU RP-HPLC

MATYSOVÁ LUDMILA^a, HAVLÍKOVÁ LUCIE^a, HOMOLOVÁ ALŽBĚTA^a, SOLICH PETR^a, ŠÍCHA JAN^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: ludmila.matysova@faf.cuni.cz

^b Bochemia Group, Herbacos-bofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 02, Pardubice

Cílem práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení obsahu diklofenaku sodného (obr.1) a jeho degradačního produktu v topickém léčivém přípravku. Diklofenak sodný je antiflogistikum ze skupiny derivátů kyseliny fenyloctové, tzv. fenaků. Patří mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva. Topicky aplikovaný diklofenak velmi dobře proniká přes kůži do hlubších vrstev epidermis a účinné koncentrace dosahuje v průběhu cca 20 minut.^[1]

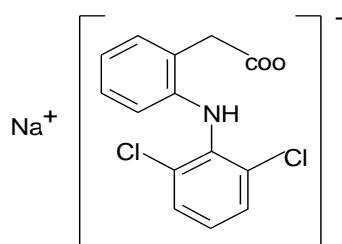
Sodná sůl diklofenaku se nejčastěji rozkládá za vzniku degradačního produktu s chemickým názvem 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (obr. 2).^[2]

Cílem práce bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodiku stanovení diklofenaku sodného při zachování vysoké přesnosti a spolehlivosti metody. Zároveň bylo třeba metodu kompletně validovat podle platných norem, vzhledem k jejímu dalšímu předpokládanému použití v rutinní kontrole léčivého přípravku (gelu).

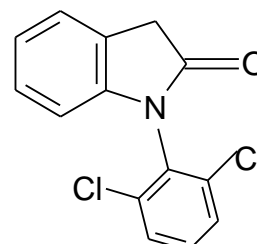
Byla vypracována metoda vnitřního standardu, kterým byl zvolen flurbiprofen. Pro analýzu byla využita kolona SUPELCO Discovery C18, 125x4 mm, velikost částic 5 μm. Optimální mobilní fázi byla směs methanolu a kyseliny fosforečné o pH 2,5 v poměru 65:35 (v/v) a průtoku 1,0 ml/min., s UV detekcí při 254 nm. Dávkovaný objem byl 10 μl, teplota při analýze byla 25°C.

Kompletní validace, vycházející z požadavků jak SUKL, tak Guidelines ICH (International Conference on Harmonisation Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) a Amerického lékopisu, 26. vydání. Všechny parametry plně vyhovovaly daným požadavkům, vyvinutá metoda je již používána v analýze uvedeného léčivého přípravku a to jak při sledování jeho stability, tak při výstupních kontrolách a kontrolách homogenity nově vyrobených šarží přípravku.

Obr.1 Diklofenak sodný



Obr.2 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on



[1] Mikro verze AISLP 2005.2 pro MS Windows

[2] Český lékopis 2002 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd., Praha 2003, s. 2259

Problematika byla řešena za podpory projektu MSM 0021620822.



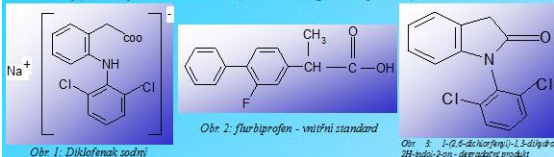
Stanovení diklofenaku sodného a jeho degradčního produktu metodou RP-HPLC

Ludmila Matysová^a, Lucie Havlíková^a, Alžběta Homolová^a, Renata Hájková^a, Jan Šícha^b

^aKatedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
^bHerbacos-bofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice

Úvod

Diklofenak sodný je antilgistikum ze skupiny derivátů kyseliny fenylctové, tzv. fenaků. Patří mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva. Topicky aplikovaný diklofenak velmi dobře proniká přes kůži do hlubších vrstev epidermis a účinné koncentrace dosahuje v průběhu cca 20 minut. Používá se ve formě mastí, gelů a emulzí pro léčbu projevů revmatismu měkkých tkání a kloubových pouzder, lokálních projevů zánětlivých a degenerativních revmatických onemocnění.^[1] Sodná sůl diklofenaku se nejčastěji rozkládá za vzniku degradčního produktu s chemickým názvem 1-(2,6-dichlorofenyl)-1,3-dihydro-2H-imidol-2-on (obr. 3, dále degradční produkt).^[2]



Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu s UV detekcí pro stanovení obsahu diklofenaku sodného (obr.1) a jeho degradčního produktu (obr. 3) v topickém léčivém přípravku—gelu.

Optimální chromatografické podmínky

Kapalinový chromatograf:

Sestava: Shimadzu LC-2010, Shimadzu corp., Japonsko
 Kolona: LiChroCART Purospher RP-18e, 125 x 4 mm, 5 µm, Merck, Německo
 Předkolona: LiChroCART Purospher RP-18e, 4 x 4 mm, 5 µm, Merck, Německo
 Dávkování: 10 µl
 Detekce: UV 254 nm
 Mobilní fáze: Methanol-roztok kyseliny fosforečné o pH 2,5 (65:35; v/v)
 Průtok MF: 1,0 ml/min
 Teplota: 25°C
 Vyhodnocení: chromatografická stanice Class VP, verze 6.12, Shimadzu, Japonsko
 Vnitřní standard: flurbiprofen

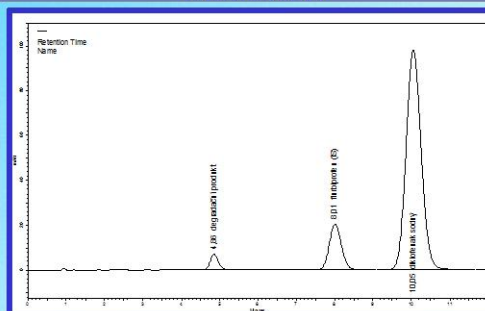
Záver

Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro HPLC stanovení diklofenaku sodného a jeho degradčního produktu s využitím metody vnitřního standardu, kterým byl jako nejvhodnější zvolen flurbiprofen.

Uvedená metoda byla také úspěšně zvalidována a z výsledků validace je patrné, že ji je možno využít v další praxi pro rutinní analýzy farmaceutického gelu, obsahujícího diklofenak sodný jako účinnou látku.

Vypracovaná metoda byla aplikována pro stanovení obsahu diklofenaku sodného a jeho degradčního produktu v gelu použité pro analýzu v rámci stabilizace studie uvedeného přípravku. Výsledky potvrzují výbornou reprodukovatelnost, přesnost a správnost vyvinuté metody.

Chromatogram



Vybrané validací parametry

Parametr	Opakovatelnost (RSD ^a)	Přesnost (RSD ^b)	Správnost (Výtěžnost)	Linearita pro n=6 ^c (korelační koeficient)	Stabilita (S _T ^d)	
Diklofenak sodný	0,07%	0,61%	99,71%	0,04%	0,999964	0,39%
Degradční produkt	0,22%	1,38%	99,94%	0,18%	0,99953	0,43%
Limit	< 1%	< 5 %	100 ± 5 %	< 5 %	> 0,9990	1 %

^a 6 nástříků

^b 6x vzorek samostatně připraven, pro každou návažku 2 nástříky

^c při koncentraci 40, 60, 80, 100, 120, 140 % (100% = 25,23 mg/100 ml)

^d faktor stability po 72 hodinách

Nejnižší detekovatelná koncentrace degradčního produktu 1-(2,6-dichlorofenyl)-2-imidolinonu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je 0,00006 mg.l⁻¹, kvantitativní limit (LOQ) před stavuje koncentrace 0,00021 mg.l⁻¹

Literatura

^[1] Mikro verze AISLP 2005.2 pro MS Windows

^[2] Český lékopis 2002 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd., Praha 2003, s. 2259

Podekování

Problematika byla řešena za podpory projektu MSM10021620822.

Comparison of UPLC and HPLC for simultaneous analysis of vitamin A and vitamin E

L.Havlíková¹, L.Urbánek^{1,2}, L.Nováková¹, D.Solichová², I.Citová¹, P.Solich¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

lucie.havlikova@faf.cuni.cz

The aim of this work is to introduce new UPLC method for the determination of vitamin A (retinol) and vitamin E (α -tocopherol) in comparison with a recently developed HPLC method performed on monolithic column.

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) is a relatively new technique giving the ability to work efficiently with higher speed, sensitivity and resolution. Special analytical columns packed with 1.7 μm small particles are used for UPLC system.

The UPLC analysis was carried out on a Waters Acquity UPLC System, using Acquity UPLC™ BEH C₁₈ column (50 x 2.1 mm, 1.7 μm). The analysis time was about 1 minute, at flow rate about 0.5 ml.min⁻¹. The HPLC analysis was performed on a HPLC set Perkin Elmer LC 240, using monolithic column Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm). The analysis time was about 2 minutes, at flow rate of 2.5 ml.min⁻¹.

The comparison of the method selectivity, analysis time, and consumption of the mobile phase are presented and discussed.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Grant Agency of Charles University, GAUK No. 296/2005, grant MZO 00179906 and Zentiva a.s. Praha, Czech Republic.



Comparison of UPLC and HPLC for simultaneous analysis of vitamin A and vitamin E

L. Havlíková¹, L. Urbánek^{1,2}, L. Nováková¹, D. Solichová², I. Čitová¹, P. Solich¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Introduction

UPLC is a relatively new technique giving the ability to work efficiently with higher speed, sensitivity and resolution. The UPLC system is connected with specially designed Acquity UPLC columns containing X-Terra sorbent of second generation. Columns packed with 1.7 μm small particles are used for UPLC. The hybrid material utilizes bridged ethylsiloxane/silica hybrid (BEH) structure, and this technology ensures the column stability under the high pressure and through wider pH range. The main advantage is a significant reduction of analysis time, which means also reduction in solvent consumption [1].

Monolithic columns used for HPLC are made by sol gel technology, which enables formation of highly porous material, containing macropores and mesopores in its structure. The large pores are responsible for a low flow resistance and therefore allow the application of high eluent flow-rates and column back-pressure is still low, while the small pores ensure surface area for separation efficiency. Monolithic LC columns are a useful means of increasing the separation efficiency per unit time which can be achieved by increasing mobile phase flow [2].

Chromatography

Chromatography UPLC

Instrumentation: Waters Acquity UPLC
 Column: Acquity UPLCTM BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μm)
 Flow rate: 0.48 ml min⁻¹
 Mobile phase: methanol
 Detection: UV 325 nm retinol, 295 nm alpha-tocopherol
 Analysis time: 2.0 min
 Retention time retinol 0.76 min
 Retention time alpha tocopherol 1.59 min

Chromatography HPLC

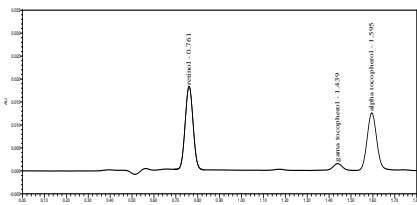
Instrumentation: Perkin Elmer HPLC set
 Column: Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4.6 mm)
 Flow rate: 2.5 ml min⁻¹
 Mobile phase: methanol
 Detection: UV 325 nm retinol, 295 nm alpha-tocopherol
 Analysis time: 1.8 min
 Retention time retinol 0.8 min
 Retention time alpha-tocopherol 1.4 min

The aim of this work

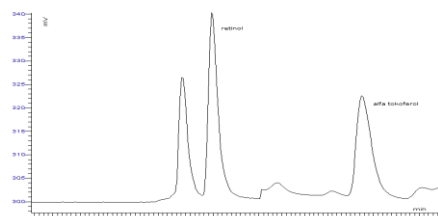
The aim of this work is to introduce new UPLC method for the determination of vitamin A (retinol) and vitamin E (alpha-tocopherol) in human serum in comparison with a recently developed HPLC method performed on monolithic column.

Comparison of analysis results

Comparison of analysis results - 1000 analyses		
	UPLC	HPLC
Analysis time (hours)	33.3	30
Consumption of mobile phase (ml)	960	4500
		4.7x
Price of methanol 1l (EUR)	5.86	5.86
Price of methanol for 1000 analyses (EUR)	5.70	26.37
Price of methanol waste disposal 1l (EUR)	0.34	0.34
Methanol waste disposal 1000 analyses (EUR)	0.32	1.53
Price (EUR)	6.02	27.9
		4.6x



UPLC analysis, chromatogram of patient serum containing retinol and alpha-tocopherol



HPLC analysis using monolithic column, chromatogram of patient serum containing retinol and alpha-tocopherol

Sample preparation

The human serum was deproteinized by cool ethanol denatured with 5% methanol (0.5 ml, 5 min, 4°C). Then 2.5 ml of n-hexane were added to this mixture and extracted for 5 min by a vortex apparatus. After centrifugation (1600 x g, 10 min 0°C), the aliquot (2.0 ml) of the clean extract was dissolved in 0.4 ml methanol and analysed by HPLC/UPLC external standard calibration [3].

Method Validation

SST	Vitamin A (retinol)		Vitamin E (alpha-tocopherol)	
	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC
Repeatability – retention time ^a (R.S.D.%)	0.1	0.05	0.2	0.06
Repeatability – area ^a (R.S.D.%)	0.5	0.69	0.6	1.11
Theoretical plates ^a	2064	2161	6466	2846
HETP (μm) ^a	48.44	46.27	15.46	35.13
Resolution ^a	1.99	7.48	9.47	7.48
Asymmetry ^a	1.03	1.44	1.06	1.48
Validation				
Repeatability – area (R.S.D.%) ^b	3.78	5.58	4.61	5.93
Repeatability – retention time (R.S.D.%) ^b	0.06	0.1	0.12	0.37
Calibration range ($\mu\text{mol l}^{-1}$) ^c	0.25-10.00	0.25-10.00	0.5-50.00	0.5-50.00
Correlation coefficient	0.9997	0.9999	0.9997	0.9997
LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.019	0.02	0.05	0.1
LOQ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.06	0.07	0.15	0.3

^a Made in 6 replicates, standard solution retinol 2.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, alpha-tocopherol 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$

^b Made in 10 replicates, samples of patient serum with retinol and alpha-tocopherol

^c Linearity was measured at six concentration levels

Conclusions

The results of the HPLC using monolithic and UPLC method were compared. The SST data, validation parameters values, and analyses times were altogether comparable. In comparison to HPLC method performed on conventional C18 column [3] are the analyses times of UPLC and HPLC performed on monolithic column three times shorter.

UPLC system is designed in a special way to withstand high system back-pressure and to work with low mobile phase flow-rate in comparison to HPLC performed on monolithic column, where the back pressure is low.

The main advantage of UPLC method in comparison to HPLC was a significant reduction of flow rate, which meant reduction in solvent consumption and consequently analysis cost.

Reference

1. L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Talanta 68, 2006, 908-918
2. L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M. A. Koupparis and P. Solich, J. Chromatogr. B, Vol. 813 (1-2), 2004, 191-197
3. L. Urbánek, D. Solichová, B. Mejštář, J. Dvořák, I. Svobodová and P. Solich, Analytica Chimica Acta, Vol. 573-574, 2006, 267-272

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Grant Agency of Charles University, GAUK No. 296/2005, grant MZO 00179906 and Zentiva a.s. Praha, Czech Republic.

Stanovení chlorhexidin glukonátu v masti metodou HPLC

Havlíková Lucie¹, Matysová Ludmila¹, Hájková Renata¹, Petr Solich¹

¹Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové;
lucie.havlikova@faf.cuni.cz

Cílem práce bylo vyvinout a validovat novou a rychlou HPLC metodu pro stanovení účinné látky chlorhexidin glukonátu a degradačního produktu p-chloranilinu v masti. Chlorhexidin působí proti široké škále gramnegativních a grampozitivních vegetativních bakterií, kvasinkám a dermatofytickým plísním.

Pro HPLC analýzu byla použita kolona Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm, 3,5 μ m). Optimální mobilní fází pro separaci byla směs acetonitrilu a roztoku 0,08M fosforečnanu sodného s obsahem 0,5 % triethylaminu (pH vodné fáze bylo nastaveno na hodnotu pH 3,0 kyselinou fosforečnou 85%) v poměru 35:65 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min, detekce byla provedena při 239 nm. Ke kvantitativnímu hodnocení byla použita metoda vnitřního standardu, jako vnitřní standard byl použit ethylparaben.

K izolaci účinné látky z masťového základu byla použita směs acetonitrilu a 1% roztoku kyseliny mravenčí v poměru 80:20. Směs byla zahřívána 20 minut při teplotě 80°C na vodní lázni. Poté byla směs umístěna po dobu 20 minut do ultrazvukové lázně a následně centrifugována 15 minut při rychlosti 6000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes skládaný filtr a dávkován auto-samplerem přímo na kolonu.

Metoda byla kompletně zvalidovaná. Všechny testované parametry splňovaly požadovaná kritéria. Vyvinutá metoda se používá pro stabilitní studie topického léčivého přípravku určeného pro veterinární použití.

Problematika byla řešena za podpory Výzkumného záměru MSM 0021620822



Stanovení chlorhexidin glukonátu v masti metodou HPLC

Lucie Havlíková, Ludmila Matysová, Renata Hájková, Petr Solich
Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Česká republika, lucie.havlikova@faf.cuni.cz

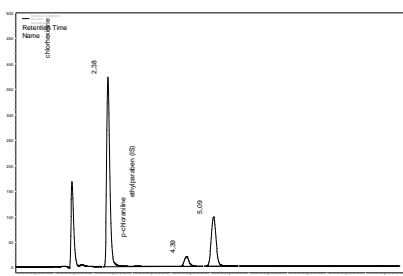
Úvod

Metoda HPLC se na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové využívá pro vývoj nových metod pro stanovení obsahu léčivých látek a nečistot v topických léčivých přípravcích. HPLC jako separační metoda umožňuje kvantitativní hodnocení a identifikaci složek směsi v jednom kroku s vysokou selektivitou a v relativně krátkém čase. Vyvinuté a validované metody se používají pro stabilitní studie topických léčivých přípravků.

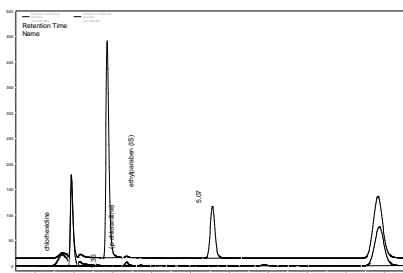
Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout a validovat novou a rychlou HPLC metodu pro stanovení účinné látky chlorhexidin glukonátu a degradačního produktu p-chloranilinu v masti. Chlorhexidin působí proti široké škále gramnegativních a grampozitivních vegetativních bakterií, kvasinkám a dermatofytickým plísním.

Experimentální část



Chromatogram standardů: chlorhexidin, p-chloranilin a vnitřní standard ethylparaben



Chromatogram masti s obsahem chlorhexidinu a přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu

Chromatografické podmínky:

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP.
Kolona: Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm, 3,5 µm)
Dávkování: 5 µl
Detekce: UV 239 nm
Mobilní fáze: směs acetonitrilu a roztoku 0,08M fosforečnanu sodného s obsahem 0,5 % triethylaminu (pH vodné fáze bylo nastaveno na hodnotu pH 3,0 kyselou fosforečnou 85%) v poměru 35:65 (v/v)
Průtok: 0,6 ml/min
Teplota: 25 °C
Vnitřní standard: ethylparaben
Izokratický režim

Příprava vzorku:

- = naváženo přesně asi 0,5 g masti do centrifugační zkumavky
- = přidáno 20,00 ml roztoku vnitřního standardu ethylparabenu ve směsi acetonitrilu a 1% roztoku kyseliny mravenčí v poměru 80:20
- = zahřívání na vodní lázni 80°C 20 minut → ultrazvuková lázeň 20 min
- = centrifugace 15 minut při rychlosti 6000 otáček/min
- = supernatant filtrován přes skládaný filtr a dávčován na kolonu

Validace metody

Parametr		Chlorhexidin	p-chloroanilin	Límit
SST				
Opakovatelnost-retenciční čas ^a	R.S.D (%)	0,37	0,07	X < 1%
Opakovatelnost-plochu ^a	R.S.D (%)	0,07	0,33	X < 1%
Počet teoretických pater ^a		4002	7109	N > 2000
Rozlišení ^a		7,16	9,99	R _s > 1,5
Asymetrie ^a		1,81	1,18	T < 2
Validace				
Přesnost ^b	R.S.D.(%)	1,72	1,87	X < 5%
Linearita ^b	Korelační koeficient	0,99964	0,99901	R > 0,99990
Správnost	Výtěžnost	99,72	100,38	X = 100± 5%
	R.S.D (%)	2,72	1,53	X < 5%
LOD (mg.ml ⁻¹)		-	6,65.10 ⁻⁵	
LOQ (mg.ml ⁻¹)		-	2,22.10 ⁻⁴	
Selektivita		Žádná interference	Žádná interference	

^an=6 ^b6 vzorků, každý nasřídán 3x ^cchlorhexidin - koncentrační rozmezí 5.12.10⁻⁵-17.85.10⁻² mg.ml⁻¹
^dp-chloranilin - koncentrační rozmezí 5.10⁻⁴-6.10⁻² mg.ml⁻¹

Závěr

Byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro současné stanovení účinné látky chlorhexidin glukonátu a její nečistoty p-chloranilinu v topickém léčivém přípravku Amastol neo. Metoda byla zvalidována a používá se pro stabilitní studie uvedené masti k veterinárnímu užití.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 0021620822

VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ PANTOTHENANU VÁPENATÉHO, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU V TOPICKÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

HAVLÍKOVÁ LUCIE, MATYSOVÁ LUDMILA, NOVÁKOVÁ LUCIE, SOLICH PETR

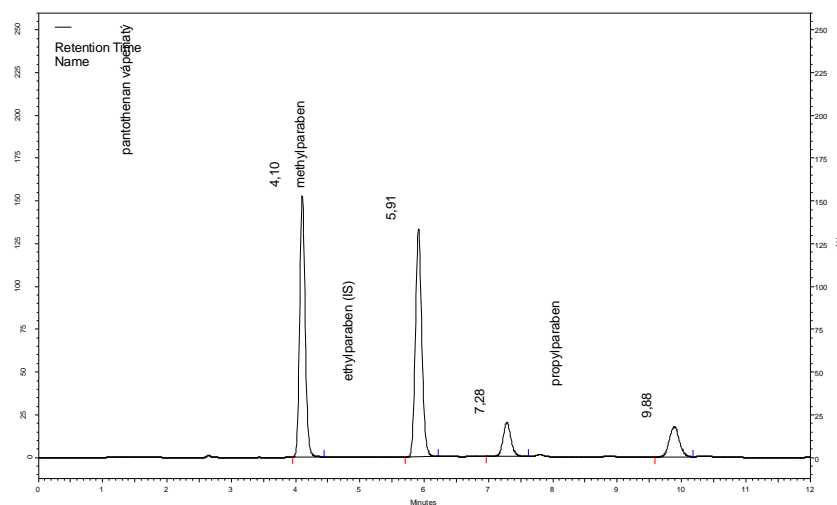
katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ludmila.matysova @faf.cuni.cz

Cílem práce bylo vyvinout novou RP-HPLC metodu pro současné stanovení pantothenanu vápenatého jako účinné látky a methylparabenu a propylparabenu jako konzervancí, obsažených v masti. Analýza topických léčivých přípravků předpokládá použití metody vnitřního standardu, hlavně z důvodu složité procedury přípravy vzorku k HPLC analýze.

Během vývoje a optimalizace metody byly testovány analytické kolony s různými stacionárními fázemi. Po otestování jak běžných oktadecylsilikagelových, tak jiných, různě modifikovaných stacionárních fází byla pro separaci shledána jako nejvhodnější kolona Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm). Délka analýzy je 12 minut při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Mobilní fáze je tvořena směsí methanolu a roztoku kyseliny fosforečné (pH 2,5) v poměru 65:35 (v/v). Vyvinutá metoda byla kompletně validována podle platných směrnic (ICH, SÚKL).

Výsledkem práce je rychlá RP-HPLC metoda s UV spektrofotometrickou detekcí (214 nm) pro stanovení obsahových látek přípravku Calcium pantothenát mast, která bude použita pro rutinní analýzy přípravku v rámci stabilitní studie. Výsledky validace potvrzují přesnost a správnost metody.

Obrázek: Chromatogram směsi standardů (pantothenan vápenatý, methylparaben a propylparaben s vnitřním standardem ethylparabenem).



6 SHRNU TÍ

Předložená disertační práce se zabývá tematikou možností využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro sledování obsahu účinných látek, nečistot a rozkladných produktů ve farmaceutických přípravcích.

V teoretické části je rozebrána problematika stability léčivých látek a farmaceutických přípravků. Poměrně velký prostor je věnován hodnocení nečistot v léčivých látkách a přípravcích. V dalších kapitolách je ve zkratce popsána metoda HPLC, charakteristiky chromatografického procesu a postup při optimalizaci chromatografické metody. Dále jsou uvedeny jednotlivé parametry validace a SST a postup při izolaci sledovaných analytů. Stručně je popsána metoda spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a část teoretického úvodu je věnována UPLC.

Praktická část je zaměřena z velké části na vývoj a validaci chromatografických metod pro stanovení účinných látek, nečistot a případně konzervačních přísad v topických farmaceutických přípravcích. Bylo vyvinuto a validováno šest originálních metodik, které jsou používané v kontrole kvality v akreditovaných laboratořích hodnotících stabilitu léčivých přípravků.

Pro přípravek s protizánětlivým účinkem Indomethacin gel byla vyvinuta metoda sledující hlavní účinnou látku indomethacin a rozkladné produkty 5-methoxy-2-methylindolyloctovou kyselinu a 4-chlorbenzoovou kyselinu (příloha 5.2). U topického přípravku s antimykotickou aktivitou, Terbinafin krém, byla vypracována metoda pro sledování hladiny účinné látky terbinafin hydrochloridu a sledování výskytu rozkladných produktů – β -terbinafin, Z-terbinafin a 4-methylterbinafin a nečistoty 1-methylaminomethylnaftalen (příloha 5.3). V přípravku Calcium Pantotenát mast byla hodnocena účinná látka pantotenan vápenatý a dvě konzervační přísady methylparaben a propylparaben (příloha 5.4). V hormonálním léčivém přípravku Estrogel gel byla hodnocena hlavní účinná látka estradiol a dále spektrum sedmi nečistot: estron, $\Delta^{9(11)}$ – estron, $\Delta^{9(11)}$ – estradiol, hemidydrát 17α -estradiolu, 17α -ethinylestradiol, 3-methoxy- 17β -estradiol a 17β -estradiol-17-acetát (příloha 5.5). V přípravku Amastol neo určeném pro veterinární použití byla sledována hlavní účinná látka chlorhexidin diglukonát a její degradační produkt p-chloranilin (příloha 5.6). Účinnou látkou v přípravku Heparin gel je sodná sůl heparinu, její obsah je sledován pomocí jiné

metody a v přípravku jsou stanovovány metodou HPLC konzervační přísady methyl- a propylparaben.

Pro zlepšení separační účinnosti byly použity moderní stacionární fáze. Použití kolony s navázanou kyano- skupinou pomohlo při separaci rozkladných produktů terbinafinu a estradiolu. Stacionární fáze s navázanou fenylovou fází byla nejvhodnější u přípravků Indomethacin gel a Amastol neo. Pro přípravky Heparin gel a Calcium Pantotenát mast byly použity konvenční ODS stacionární fáze.

Všechny uvedené metody jsou vyvinuty a optimalizovány tak, aby mohly být použity v kontrolně-analytických laboratořích. Ve všech metodách je pro kvantitativní hodnocení použit vnitřní standard. U přípravků Indomethacin gel, Estrogel gel a Heparin gel nebyla izolace sledovaných analytů z masťového základu problematická. Komplikovanější byla izolace analytů u přípravků Calcium Pantotenát mast, Terbinafin krém a Amastol neo. Pro účinnou kvantitativní extrakci musely být použity binární směsi rozpouštědel (Calcium Pantotenát, Amastol neo), byla upravena hodnota pH (Terbinafin krém) nebo použita zvýšená teplota (Calcium Pantotenát, Amastol neo). Všechny uvedené metody jsou kompletně validovány a sledované parametry odpovídají požadavkům autorit.

Dále byla vypracována UPLC metoda pro současné stanovení vitamínů A a E v biologickém materiálu. UPLC umožňuje zkrácení analýzy se současným zachováním vysoké separační účinnosti. Při porovnání UPLC metody pro stanovení vitamínů A a E s klasickou HPLC přináší UPLC ušetření času (zkrácení času analýzy z šesti na dvě minuty) a i chemikálií pro provedení jednotlivých analýz (pro toto porovnání byla využita spolupráce s pracovníky Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice v Hradci Králové a jejich publikované práce - L.Urbánek, D.Solichová, B.Melichar, J.Dvořák, I.Svobodová, P.Solich, *Anal. Chim. Acta*, 573 (2006), 267). Zajímavé bylo také porovnání výsledků analýzy UPLC s výsledky práce provedené na HPLC s využitím monolitické kolony. UPLC je metoda pracující za vysokého tlaku (až 15.000 psi) a nízkými průtoky mobilní fáze, zatímco pro monolitické kolony je typický nízký pracovní tlak a vysoké průtoky mobilní fáze. Obě metody přinášejí analýzu trvající méně než dvě minuty a hodnoty validačních parametrů a parametrů SST jsou téměř shodné. UPLC přináší pouze možnost snížení spotřeby mobilní fáze (UPLC průtok 0,48 ml min⁻¹ oproti HPLC s průtokem 2,5 ml min⁻¹). Při porovnání nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Poslední úsek experimentální části je věnován stanovení esterů erythromycinu v léčivých přípravcích metodou HPLC a HPLC/MS. Tato tematika byla vypracována ve spolupráci s univerzitou ve Würzburgu, Německo. Velkou výhodou HPLC/MS je možnost identifikace analyzovaných nečistot a vznikajících rozkladných produktů.

7 SUMMARY

“Problems of Stability Testing of the Active Substances and Pharmaceutical Preparations Using HPLC”

The presented thesis deals with using of high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical active substance, its degradation products, and impurities in pharmaceutical preparations.

The theoretical part describes in a more detailed way the topic stability and impurity testing in pharmaceutical preparations. The HPLC theory, method optimization, isolation procedures, method validation, HPLC/MS, and UPLC are characterized briefly in separate chapters.

The practical part of the thesis focuses mainly on the development and validation of new chromatographic methods for simultaneous determination of active substances, impurities, and preservatives in topical pharmaceutical preparations. Six original methods, which are used for the quality control and stability testing of pharmaceuticals, were developed and validated.

The active substance indomethacin and two degradation products (5-methoxy-2-methylindoleacetic acid and 4-chlorobenzoic acid) were monitored in antiflogistic topical preparation Indomethacin gel (see attachment 5.2). For antimycotically active topical preparation Terbinafin cream, method for determination of the active substance terbinafine hydrochloride, degradation products β -terbinafine, 4-methylterbinafine, Z-terbinafine, and impurity 1-methylaminomethylnaphtalene was developed (attachments 5.3). In the Calcium pantothenate ointment the active substance calcium pantothenate and two preservatives were determined (attachment 5.4). An HPLC method for the determination of the active substance estradiol and its seven known impurities ($\Delta^{9(11)}$ -estradiol, 17α estradiol, estrone, $\Delta^{9(11)}$ -estrone, ethynylestradiol, estradiol 3-methyl ether, and estradiol 17-acetate) in hormonally active preparation Estrogel gel (attachment 5.5) was developed. The active substance chlorhexidine gluconate and its degradation product p-chloraniline were monitored in Amastol neo, a topical preparation for veterinary use (attachment 5.6). Two preservatives, methyl- and propylparaben, were quantified in the topical preparation Heparin gel.

Modern stationary phases were used for the chromatography because of the improvement of the separation parameters. A cyanomodified stationary phase enabled

the separation of degradation products of terbinafin and estradiol. The phenyl modified stationary phase was used for Indomethacin gel and Amastol neo ointment. Conventional ODS stationary phases were used during the method development for Heparin gel and Calcium pantothenate ointment.

All of these presented methods are developed and optimized in order to be used in drug-control laboratory. The methods were developed by using appropriate internal standard. The isolation procedures for Indomethacin gel, Estrogel gel, and Heparin gel were not difficult to be developed. The isolation of analytes from Calcium Pantotenát ointment, Terbinafin cream, and Amastol neo was more complicated. Binary extraction mixtures (Calcium Pantotenát, Amastol neo), pH modification (Terbinafin cream) or increasing temperature (Calcium Pantotenát, Amastol neo) were necessary for the quantitative isolation. All presented methods were completely validated; all tested validation and SST parameters meet the requirements of authorities.

A new UPLC method for the simultaneous determination of vitamine A and E was developed. UPLC enables fast analysis with high separation efficiency. The UPLC method was compared with a classical HPLC method performed on the ODS column (cooperation with the Department of Metabolic Care and Gerontology, Teaching Hospital, L.Urbánek, D.Solichová, B.Melichar, J.Dvořák, I.Svobodová, P.Solich, *Anal. Chim. Acta*, 573 (2006), 267). The UPLC analysis is three times faster and the peak shape is better than in the HPLC method. The comparison with the HPLC method performed on the monolithic column is more interesting. While UPLC works under high pressure (15.000 psi) and the flow-rate is low, low working pressure and high flow-rate are typical for the monolithic columns. Both of these methods enable fast analyses (less than two minutes); the values of the validation and SST parameters do not differ a lot. The biggest advantage of using the UPLC method is the decrease of the consumption of the mobile phase (UPLC flow-rate 0.48ml min^{-1} in contrast to HPLC flow-rate 2.5 ml min^{-1}). A statistically significant difference was not demonstrated.

The last part of the thesis deals with the analysis of esters of erythromycin in pharmaceuticals using HPLC and HPLC/MS. The great advantage of using the HPLC/MS method is the possibility of identifying impurities and degradation products resulting from the active substance.

8 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá současným stavem v problematice stability léčivých přípravků a vývojem metod pro její sledování. Zajištění bezpečnosti a kvality léčivých přípravků se v poslední době věnuje veliká pozornost a proto je velmi důležité, aby pomocí vhodně zvolené analytické metody bylo možno doložit výsledky hodnocení čistoty, obsahu účinných látek a zejména stability léčivého přípravku.

V současné době se neustále mění předpisy a zpřísnují se nároky na výrobu a kontrolu kvality farmaceutických přípravků. Moderní instrumentace v kontrolních laboratořích však umožňuje - s pomocí nových analytických metod jako jsou například moderní HPLC s novými typy stacionárních fází, HPLC/MS a nejnověji UPLC - dostatečně rychle odpovídat na požadavky státních lékových autorit.

Je potřeba vyvíjet nové metody, které zasáhnou více nečistot. Směr vývoje měnicích se požadavků na kontrolu kvality je možné ukázat na hormonálním přípravku Estrogel gel. V roce 2003 byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení estradiolu (účinná látka) a jejího rozkladného produktu estronu [9]. O dva roky později však SÚKL ve svých požadavcích uvedl dalších šest nečistot, jejichž hladiny je potřeba sledovat. Byla vyvinuta nová HPLC metoda (příloha 5.5), která je prakticky používána v kontrolně-analytické laboratoři k hodnocení stability přípravku. V období testování 36 měsíců nepřesáhl obsah žádné ze sledovaných nečistot hodnotu 0,05% vztaženo na hlavní účinnou látku estradiol. Jestli má význam stanovovat ve vzorku rozkladné produkty a nečistoty vyskytující se v minimálním množství, u kterých není ani přesně zjištěn jejich potenciální toxický účinek, je spíše otázkou do diskuse.

V prezentované disertační práci bylo využito výhod HPLC k vypracování několika nových metod pro analýzu topických léčivých přípravků (Indomethacin gel, Terbinafin krém, Calcium Pantotenát mast, Estrogel gel, Amastol neo, Heparin gel). Vypracované metody byly kompletně validovány a splňují všechny požadavky evropských lékových autorit. Lze je s výhodou použít v analytických laboratořích pro hodnocení kvality léčivých přípravků. Přispívají tak k zajištění a zvýšení kontroly bezpečnosti a kvality léčivých přípravků.

K výhodám HPLC patří univerzálnost, relativní jednoduchost, citlivost stanovení na základě použitého detektoru, získání kvalitativní a kvantitativní informace o analytech během jednoho kroku, automatizace a snadná reprodukovatelnost. Je to

metoda separační, která umožňuje analýzu komplikovaných směsí látek, obsahujících analyty i v různých koncentračních rozmezech. Této vlastnosti HPLC se využívá právě v kontrolně-analytických laboratořích při hodnocení léčivých látek a přípravků, kdy je možné sledovat vedle hlavní účinné látky (zastoupena v relativně velkém množství) i její rozkladné produkty a případné další nečistoty, které jsou zastoupeny v minimálním množství.

Nové možnosti použití kapalinové chromatografie se objevují ve využití techniky UPLC. UPLC využívá speciální kolony obsahující sub-2-mikronové částice a přístroj se speciálním designem, který je přizpůsobený vysokým pracovním tlakům. Tento systém umožňuje zkrácení času a zvýšení citlivosti analýzy. Lze se domnívat, že pokud se technika UPLC osvědčí, stane pro kontrolně-analytické laboratoře velkých farmaceutických firem nesporně velmi atraktivní metodou.

Využití spojení HPLC/MS v analýze nečistot je věnována kapitola 4.8.2. Díky MS detektoru je často možné identifikovat nečistoty a rozkladné produkty účinné látky, které se vyskytují v minimálním množství a které mohou vznikat v průběhu testování stability léčivých přípravků. Kombinace HPLC/MS bude v blízké budoucnosti nacházet – vzhledem ke svým nesporným výhodám - v oblasti sledování stability léčiv stále většího uplatnění.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1]. International Conference on Harmonization (ICH): Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products, US FDA Federal Register, Vol. 68, February 2003, p. 65717.
- [2]. International Conference on Harmonization (ICH): Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, US FDA Federal Register, Vol. 62, May 1997, p. 27115.
- [3]. International Conference on Harmonization (ICH): Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms, US FDA Federal Register, Vol. 62, May 1997, p. 25634.
- [4]. Věstník SÚKL 8/2005, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, REG-83-Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, 2005.
- [5]. Věstník SÚKL 1/1996, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, REG-21- Část II. Chemická, farmaceutická a biologická dokumentace, 1996.
- [6]. Kurz industriální farmacie, Zentiva a.s., přednáška Ivana Jirásková, Stabilitní testování účinných látek a lékových přípravků, 2006.
- [7]. M.Chalabala et al., Technologie léků, druhé vydání, Galén, Česká Republika, 2001.
- [8]. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/012202en.pdf>, 08/2006.
- [9]. L. Nováková, P. Solich, L. Matysová and J. Šícha, Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004)781.
- [10]. Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a.s. 2005.
- [11]. United States Pharmacopoeia 29, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2006.
- [12]. European Pharmacopoeia 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2004, Chromatographic Separation Techniques.
- [13]. International Conference on Harmonization (ICH): Q3A(R1): Impurities in New Drug Substances, US FDA Federal Register, Vol. 68, February 2003, p. 6924.
- [14]. International Conference on Harmonization (ICH): Q3B(R2): Impurities in New Drug Products, US FDA Federal Register, Vol. 68, Novembre 2003, p. 64628.

- [15]. International Conference on Harmonization (ICH): Q3C(R3): Impurities: Guideline for Residual Solvents, US FDA Federal Register, Vol. 62, Decembre 1997, p. 67377.
- [16]. R.N.Rao, V.Nagaraju, J.Pharm.Biomed.Anal. 33 (2003) 335.
- [17]. S.Görög, J.Pharm.Biomed.Anal. 36 (2005) 931.
- [18]. S.Görög, Identification and Determination of Impurities in Drugs, Progress in Pharmaceutical and biomedical Analysis, Vol. 4, Elsevier Science B.V., the Netherlands, 2000.
- [19]. S.Ahuja, K.M.Alsante, Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Separation Science and Technology, Vol. 5, Academic Press, USA, 2003.
- [20]. <http://www.fda.gov/Cder/guidance/6423dftrev1.htm>, 08/2006.
- [21]. International Conference on Harmonization (ICH): Q6A- Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug substances And New Drug Products: Chemical Substances, US FDA Federal Register, Vol. 65, Decembre 2000, p. 83041.
- [22]. L.Havlíková, L.Matysová, R.Hájková, M.Pospíšilová, P.Solich, Validace metody pro stanovení nečistot v přípravku Estrogel HBF, Hradec Králové, 2005.
- [23]. Věstník SÚKL 10/2004, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, REG-79- Základní dokument o léčivé látce (Active Substance Master File), 2004.
- [24]. Kurz industriální farmacie, Zentiva a.s., přednáška Dana Petříková, EDMF, 2006.
- [25]. <http://www.fda.gov/cder/dmf/>, 08/2006.
- [26]. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/022702en.pdf>, 08/2006.
- [27]. http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-2/B/ctd_06-2004.pdf, 08/2006.
- [28]. http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/ (Z. Kazachevich, H. McNair, Textbook on High Performance Liquid Chromatography), 08/2006.
- [29]. J.Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002.
- [30]. J.Klimeš a kol., Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha, 2002.
- [31]. R.Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2005.
- [32]. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJALB.htm>, 08/2006.
- [33]. J.Churáček a kol., Analytická separace látek, SNTL, Praha, 1990.
- [34]. <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, 08/2006.

- [35]. Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a.s. 2005, Kapalinová chromatografie (2.2.29.), 161.
- [36]. M. Douša, Základy separačních metod se zaměřením na HPLC, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2002.
- [37]. L. Nováková, Disertační práce, Hradec Králové, 2005.
- [38]. <http://sweb.cz/HPLC/>, 08/2006.
- [39]. Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a.s., 2005, Chromatografické separační metody (2.2.49.), 177.
- [40]. Agilent Zorbax Column Selection Guide for Analytical HPLC, Agilent Technologies, 2004.
- [41]. X-Terra columns Applications Notebook, Waters Corporation, 1999.
- [42]. Acquity UPLC columns, 720001140EN, Waters Corporation, Milford, USA, 2005.
- [43]. Chromolith columns – Application note, Merck, 2002.
- [44]. D. Šatínský, Disertační práce, Hradec Králové, 2003.
- [45]. <http://www.chromolith.com/servlet/PB/menu/1209750/index.html>, 08/2006.
- [46]. Supelco Bulletin 932, Discovery Zr: Metod Development Guidelines, Sigma-Aldrich 2002.
- [47]. Supelco Bulletin 931, Discovery Zr: High pH and High Temperature HPLC, Sigma-Aldrich 2002.
- [48]. <http://www.chromatography-online.org/HPLC/UV-Detectors/rs21.html>, 08/2006.
- [49]. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Rouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, Thomson Brooks/Cole, USA, 2004.
- [50]. Z. Holzberger, J. Churáček a kol., Analytická chemie, SNTL, Praha, 1987.
- [51]. J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klingenberg, J. Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 272.
- [52]. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, John Wiley and Sons, 1997.
- [53]. Supelco Bulletin 836D, HPLC Troubleshooting Guide, Sigma-Aldrich, 1999.
- [54]. Věstník SÚKL 1/1994, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv, Validace Analytických Metod, 1993.

- [55]. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> - International Conference on Harmonization (ICH): Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [56]. M. Holík, Validace analytických metod, Postup při práci a příprava protokolu se zaměřením na HPLC a TLC, příručka, 1994.
- [57]. S. Mitra, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Chemical analysis Vol 162, John Wiley and Sons, USA, 2003.
- [58]. J. A. Adamovics, Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997.
- [59]. http://mail.upce.cz/~holcapek/teaching_CZ.htm - PDF reprinty přednášek předmětu Hmotnostní spektrometrie v organické analýze, 08/2006.
- [60]. J.H.Gross, Mass Spektrometry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- [61]. Agilent 1100 Series LC/MSD Trap Operation Manual, Agilent Technologies
- [62]. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html>, 08/2006.
- [63]. Ultra Performance LC™ by design, 2004. Waters Corporation, USA, 720000880EN LL&LW-UL.
- [64]. L.Nováková, L.Matysová, P.Solich, Talanta, 68 (2006) 908.
- [65]. Acquity Ultra Performance LC, 2004, Waters Corporation, USA, 720000820EN AG UL.
- [66]. <http://www.thermo.com/com/cda/article/general/0,,1329,00.html?ca=accela>, 09/2006.
- [67]. <http://www.hbf.cz/products.base.php?parent=75&follow=1,24,75&show=129&auth=2286cf053a7bd4ecdf203d13a0e913dc>, 08/2006.
- [68]. Mikro-verze AISLP, verze 2006.2.
- [69]. C. Bonacorsi, M.S.G. Raddi and I.Z. Carlos, Braz J Med Biol Res, 37 (2004), 207.
- [70]. D.M.Kreuz, A.L.Howard, D.Ip, J.Pharm.Biomed.Anal 19 (1999) 725.
- [71]. L.Matysová, P.Solich, M.Pospíšilová, Validace metody pro stanovení methylparabenu a propylparabenu v přípravku Heparin mast, Hradec Králové, 2004.
- [72]. D. Dreher and A.F. Junod, Eur. J. Cancer 32A (1996) 30.
- [73]. L.Urbánek, D.Solichová, B.Melichar, J.Dvořák, I.Svobodová, P.Solich, Anal. Chim. Acta, 573 (2006) 267.
- [74]. <http://www.practicus.cz/2003/practicus03-01.pdf>, 08/2006.

- [75]. Kiyoshi Tsuji and John F. Goetz, K.Tsuji, J.F.Goetz, J Chromatogr. 147 (1978) 359.
- [76]. J. Paesen, P. Claeys, E. Rošte, J. Hoogmartens, J.Chromatogr.A, 630 (1993) 117.
- [77]. H. K. Chepkwony, I. Vanderriest, J. M. Nguyo, E. Roets, J. Hoogmartens, J.Chromatogr. A, 870 (2000) 227.
- [78]. C.Stubs, I.Kanfer, J.Chromatogr., 427 (1988) 93.
- [79]. C.Stubs, I.Kanfer, Int J Pharm, 63 (1990) 113.
- [80]. D.Croteau, F.Vallee, M.G.Bergeron, M.LeBel, J Chromatogr. A, 419 (1987) 205.
- [81]. R.Busson, E.Roets, J.Hoogmartens, J.Pharm.Biomed.Anal 10 (1992) 851.
- [82]. O. Kibwage, E. Roets, J. Hoogmartens, H. Vanderhaeghe, J. Chromatogr. 330(1985) 275.
- [83]. Prüfvorschrift InfectoMycin 200 Saft, Labor für Pharma- und Umweltanalytik, 1997.
- [84]. E Haghedooren et al., J.Pharm.Biomed.Anal. 41 (2006) 165.
- [85]. A.Deubel, F.Sörbel, U.Holzgrabe, Determination of Erythromycin and Related Substances in Commercial Samples and Tablets with Liquid Chromatography/mass Spectrometry, zasláno k publikaci.
- [86]. D.A.Volmer,J.P.M.Hui, Rapid.Comm. Mass.Spectrom, 12 (1998) 123.
- [87]. P.J.Gates, G.C.Kearney, R.Jones, P.F.Leadley, J.Stauton, Rapid.Comm. Mass.Spectrom, 13 (1999) 242.
- [88]. S.K.Chitneni, C.Govaerts, E.Adams, A.Schepdael, J.Hoogmartens, J.Chromatogr. A, 1056 (2004) 111.