

SHRNUTÍ

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 používány 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 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). 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 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). V přípravku Calcium Pantotenát mast byla hodnocena účinná látka pantotenan vápenatý a dvě konzervační přísady methylparaben a propylparaben (příloha **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). 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 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). V přípravku Amastol neo určeném pro veterinární použití byla sledována hlavní účinná látka chlorhexidin diglukonát a její degradační produkt p-chloranilin (příloha **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). 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 $0,48 \text{ ml min}^{-1}$ oproti HPLC s průtokem $2,5 \text{ ml min}^{-1}$). 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 vypracovávána ve spolupráci s

univerzitou ve Würzburgu, Německo. Velkou výhodou HPLC/MS je možnost identifikace analyzovaných nečistot a vznikajících rozkladných produktů.