

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**VÝVOJ A VALIDACE HPLC METOD  
PRO ANALÝZU LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**2006**

**PHARMDR. LUDMILA MATYSOVÁ**

## PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Solichovi CSc. za odborné vedení, pomoc a podporu po dobu mého doktorského studia.

Dále bych chtěla velmi poděkovat Ing. Renatě Hájkové a RNDr. Daliboru Šatínskému PhD., jejichž znalosti a praktické zkušenosti v oblasti HPLC mi velice pomohly v mé práci. Poděkování patří též PharmDr. Haně Sklenářové PhD., která mi svými radami a zkušenostmi během celého doktorského studia usnadňovala moji práci.

Děkuji mým kolegyním PharmDr. Lucii Novákové PhD. a Mgr. Lucii Havlíkové za spolupráci na mnoha společných projektech.

Upřímně také děkuji všem kolegům na katedře analytické chemie za vstřícnost, pochopení a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Velké poděkování patří také mé rodině za jejich morální podporu, trpělivost a pochopení během celého mého postgraduálního studia.

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

Ludmila Matysová

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	-	acetonitril
AOAC	-	Adur Outdoor Activities Centre
CAD	-	Charged Aerosol Detector
DAD	-	Diode Array Detektor
DMF	-	Drug Master File
ELSD	-	Evaporative Light Scattering Detektor
FDA	-	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GC	-	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	-	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
ID	-	vnitřní průměr (Internal Diameter)
ICH	-	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IS	-	vnitřní standard (Internal Standard)
IUPAC	-	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	-	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LLE	-	extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	-	detekční limit (Limit of Detection)
LOQ	-	kvantitativní limit (Limit of Quantitation)
LP	-	léčivý přípravek
MeOH	-	methanol
MF	-	mobilní fáze
MP	-	methylparaben
MS	-	hmotnostní spektroskopie (Mass Spectrometry)
NMR	-	nukleární magnetická rezonance
ODS	-	oktadecylsilikagel (OctaDecylSilica)
PP	-	propylparaben
RP-HPLC	-	HPLC na reverzní fázi
RSD	-	relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
RV	-	relativní vlhkost

SFE	-	superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SOP	-	standardní operační postup
SPE	-	extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction)
SST	-	test vhodnosti systému (System Suitability Test)
SÚKL	-	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SVP	-	Správná výrobní praxe
TLC	-	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
UPLC	-	ultra-účinná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
USP	-	Americký lékopis (United States Pharmacopoeia)
UV	-	ultrafialová oblast (Ultra Violet)

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. CÍL PRÁCE .....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1. Chromatografické metody .....	10
3.1.1. Teoretické principy chromatografie .....	10
3.1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	11
3.1.3. Instrumentace v HPLC .....	13
3.1.4. Stacionární fáze v HPLC .....	19
3.1.5. Mobilní fáze v HPLC .....	22
3.1.6. Základní chromatografická data .....	23
3.1.6.1. Retenční data .....	23
3.1.6.2. Chromatografická data .....	24
3.1.6.3. Separační data .....	27
3.2. Vývoj nové chromatografické metody .....	28
3.2.1. Volba analytické kolony – stacionární fáze .....	30
3.2.2. Volba mobilní fáze .....	35
3.2.3. Volba průtoku mobilní fáze .....	41
3.2.4. Volba vlnové délky detekce .....	41
3.2.5. Volba objemu nástřiku .....	42
3.2.6. Volba teploty analýzy .....	43
3.3. Analýza léčivých přípravků .....	44
3.3.1. Příprava vzorků léčivých přípravků k analýze .....	44
3.3.2. Stabilita léčiv a léčivých přípravků .....	50
3.3.3. Nečistoty v léčivech a léčivých přípravcích .....	54
3.4. Validace analytické metody .....	60
3.4.1. Test vhodnosti systému .....	63
3.4.2. Validační parametry .....	65
3.4.2.1. Přesnost .....	65
3.4.2.2. Správnost .....	66
3.4.2.3. Linearita .....	67
3.4.2.4. Detekční limit .....	68

3.4.2.5.	<i>Kvantitativní limit</i>	69
3.4.2.6.	<i>Selektivita</i>	69
3.4.2.7.	<i>Robustnost</i>	70
3.4.3.	Validační zpráva (protokol)	72
4.	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	74
4.1.	Triamcinolon krém	76
4.2.	Ketoprofen gel	77
4.3.	Estrogel gel	78
4.4.	Indometacin gel	79
4.5.	Terbinafin krém	80
4.6.	Calcium pantothenát mast	81
4.7.	Lipolotio krém I.	82
4.8.	Lipolotio krém II.	88
4.9.	Aphlox pasta	93
4.10.	Porovnávání nových typů HPLC kolon	99
4.10.1.	Monolitické kolony	99
4.10.2.	Analytické Acquity kolony v UPLC systému	100
5.	<b>PŘÍLOHY</b>	101
5.1.	Přehled publikovaných prací	102
5.2.	Příloha I	107
5.3.	Příloha II	112
5.4.	Příloha III	118
5.5.	Příloha IV	126
5.6.	Příloha V	134
5.7.	Příloha VI	143
5.8.	Příloha VII	149
5.9.	Příloha VIII	158
5.10.	Příloha IX	166
5.11.	Příloha X	178
6.	<b>SHRNUTÍ</b>	229
7.	<b>SUMMARY</b>	232
8.	<b>ZÁVĚR</b>	235
9.	<b>SEZNAM LITERATURY</b>	237

# 1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je velmi často využívanou metodou v analytickém hodnocení léčiv. Je to především proto, že jako separační metoda umožňuje současně jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení složek směsi, s vysokou selektivitou a citlivostí během relativně krátkého času a s relativně malým množstvím analyzované směsi.

Léčivé přípravky jsou ve velké většině směsi účinných a/nebo pomocných látek, proto jsou separační metody tak vhodné pro jejich analýzu. Další, velmi důležitou oblastí v analýze léčivých přípravků je v rámci sledování jejich stability monitorování hladin degradačních produktů obsahových látek. Zde se opět jeví jako velice výhodné použití HPLC.

Nově vyvinuté analytické metody používané pro hodnocení a monitorování kvality léčiv musí být především přesné a správné, což musí být experimentálně ověřeno a doloženo, a tento proces se nazývá validace analytické metody. Smyslem validace je dokázat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem je demonstrovat podmínky, za kterých je metoda použitelná a zajistit její spolehlivost i při opakovaném použití.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zpřehlednit a ucelit přístup k validacím nově vyvinutých analytických metod, používaných při sledování kvality léčiv a léčivých přípravků. Protože legislativou validací se zabývá několik státních autorit jak v České republice, tak ve světě, bylo mojí snahou jejich požadavky obsáhnout, zhodnotit jejich rozdílné přístupy a pokusit se zpřehlednit tento proces.

Hlavním experimentálním úkolem bylo na několika léčivých přípravcích ukázat vývoj analytických metod i jejich kompletní validace tak, aby byly ihned použitelné v rutinní analýze daných léčivých přípravků, a to jak při výstupních kontrolách, tak při sledování jejich stability při zachování principů Správné výrobní praxe. Zároveň jsem se snažila nespouštět ze zřetele samozřejmý vývoj v instrumentaci HPLC a nové trendy zahrnovat do vývoje nových kontrolních metod.



### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

### 3.1.1. TEORETICKÉ PRINCIPY CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační metoda, která se stále více využívá v oblastech kvalitativní i kvantitativní analýzy. Moderní chromatografické metody (HPLC, GC) se stále více uplatňují i v oblasti kontroly léčiv.

Podstatou chromatografie je selektivní distribuce složek směsi vzorku mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou, tzv. mobilní fází, která látky unáší a je hybnou silou v chromatografickém procesu, a druhou nepohyblivou, tzv. stacionární fází. Mezi těmito fázemi a dělenými látkami dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů, založených na různých fyzikálně-chemických interakcích. Tyto interakce mají rozdílnou kvantitu, tj. velikost vzájemně působících sil, i kvalitu, tj. povahu interakcí. Vlastní dělení látek závisí na retenci, tedy zadržovací síle stacionární fáze [1,2].

**Chromatografické metody se dělí podle několika hledisek:**

*1. Dle povahy interakcí, podílejících se na distribučním procesu*

- adsorpční – dělení na základě adsorpce molekul analytu na povrch tuhé stacionární fáze
- rozdělovací – dělení na základě rozdílné rozpustnosti molekul analytu ve dvou nemísitelných kapalinách
- iontově-výměnná – dělení na základě rozdílné adsorpce iontů analytu na povrch iontového měniče
- gelová (na molekulových sítích) – dělení látek na základě jejich velikosti a tvaru molekul

*2. Dle skupenství použité mobilní fáze*

- kapalinová
- plynová

*3. Dle použité techniky*

- sloupcová (kolonová)
- papírová
- na tenké vrstvě

V dnešní době je nejvýznamnější a nejčastěji používanou separační analytickou metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High performance liquid chromatography). V analýze těkavých látek má velký význam plynová chromatografie (GC – Gas chromatography). V toxikologickém screeningu a při stanovení nečistot má velký význam též kapalinová chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin layer chromatography) [1-3].

### **3.1.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE**

Principem této metody je dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází, procházející kolonou za vysokého tlaku. Využívá se všech separačních mechanismů uvedených výše a díky těmto interakcím lze nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení různých směsí látek.

Při dělení směsí se používají dva druhy eluce. Neliší-li se příliš eluční parametry látek, použije se izokratická eluce jednou mobilní fází, jejíž složení je během celé analýzy konstantní. Jestliže se látky svými elučními parametry odlišují, využívá se tzv. gradientová eluce, při které se složení mobilní fáze plynule mění. Vytváří se tak gradient koncentrace nebo gradient pH.

Po nástřiku směsi látek na kolonu je tato unášena mobilní fází, opakovaně se ustanovuje rovnováha mezi stacionární a mobilní fází a díky náplni kolony dochází k separaci látek ze směsi. Rozdělené látky prochází detektorovou celou, kde se identifikuje jejich přítomnost a na chromatografickém záznamu je jako odezva na signál detektoru zakreslen pík.

Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas. Pro kvantifikaci látek slouží buď výška píku nebo plocha píku pod křivkou. Kvantifikace látek se provádí několika způsoby:

**Metoda vnějšího standardu:** Nastříkne se standard o známé koncentraci a registruje se jeho chromatogram. Jako vnější standard se používá standard stanovované látky (CRS, CRL), u směsí standard jedné ze stanovovaných látek. Za stejných podmínek se nastříkne roztok vzorku, jehož koncentraci stanovujeme. Kvantifikace se

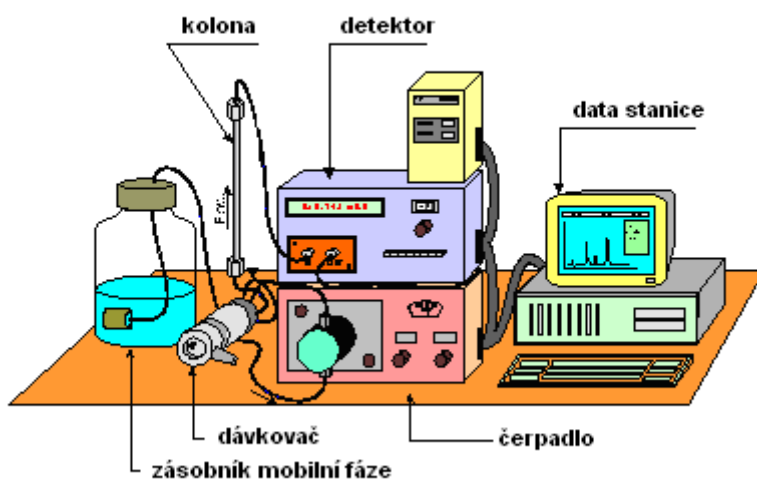
potom provádí porovnáním ploch píků vzorku a vnějšího standardu [2]. Lze také použít několik definovaných koncentrací vnějšího standardu a kvantifikaci provést metodou lineární regrese po sestrojení kalibrační křivky [7].

**Metoda vnitřního standardu:** Vnitřní standard je na rozdíl od výše uvedené metody látka odlišného složení než analyt, musí však být eluován v blízkosti píku látky, jež má být stanovena a musí být v rámci podmínek analýzy chemicky inertní. Tato metoda je časově méně náročná a hlavně přesnější než metoda vnějšího standardu. Prakticky se stanovení provádí tak, že se ke stanovované látce přidá roztok vnitřního standardu a provede se se směsí celý proces přípravy vzorku, včetně extrakce, filtrace a dalších. Kvantifikace se potom provádí vypočítáním poměru ploch píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro porovnávací roztok [6].

**Metoda normalizace:** Obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech se vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků na chromatogramu, nepočítaje v to plochy píků rozpouštědel, přidaných činidel a píků, které jsou v limitu zanedbatelnosti píků [6]. Tato metoda se většinou používá k odhadování relativních množství nečistot a degradačních produktů v substancích i léčivých přípravcích [7].

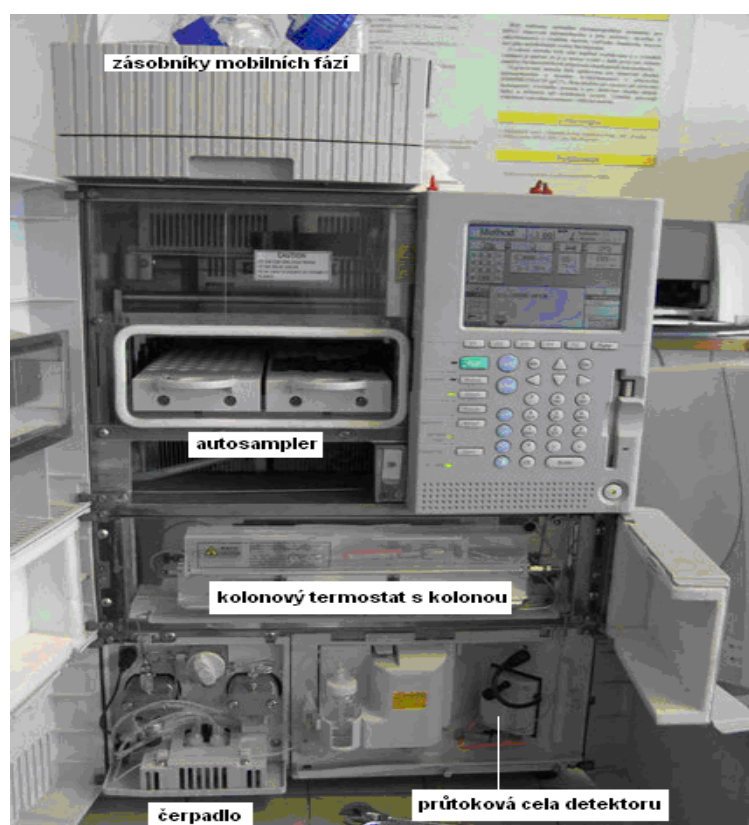
### 3.1.3. INSTRUMENTACE V HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují průchod mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, jejich detekci a vyhodnocení výsledků analýzy. Jednotlivé součásti tedy jsou: vysokotlaké čerpadlo, dávkovač, chromatografická kolona představující stacionární fázi, detektor a systém pro sběr a vyhodnocování dat.



**Obrázek 1: Schéma HPLC přístroje**

System může obsahovat i další přídavná zařízení, jako je termostat, degasser, přídavné filtry, případně více za sebou připojených detektorů. Sestava je buď stavebnicového typu, kdy jsou jednotlivé součásti odděleny, dají se přestavovat, případně spojovat s přídavnými zařízeními nebo jsou kompaktní, kdy je uspořádání jednotlivých součástí fixní.



**Obrázek 2: Reálný pohled na komerčně dostupný HPLC systém.(Fixní uspořádání, nahoře uzavřený, dole otevřený, kde je možno vidět jednotlivé součásti systému)**

## **Součásti HPLC:**

### **a) Zásobníky mobilních fází**

Zásobníky mobilních fází jsou nejčastěji skleněné nádoby se speciálními uzávěry. Jsou spojeny se vstupem čerpadla tetlonovými hadičkami s takzvaným in-line filtry. Pro odstranění vzduchu se používá buď působení vakua s následným probubláváním rozpouštědla heliem, stále častěji se používají systémy se zabudovanými degassery [3].

### **b) Čerpadla**

Pumpa v HPLC je jednou z nejdůležitějších součástí systému, která musí zaručit kontinuální konstantní průtok mobilní fáze dávkovačem, kolonou a detektorem.

Základní dělení HPLC pump je:

1. čerpadla s konstantním tlakem
2. čerpadla s konstantním průtokem

*Požadavky na moderní HPLC čerpadlo jsou:*

- rozsah průtokové rychlosti 0,01 až 10 ml/min
- rozsah tlaků 1 až 60 MPa
- tlaková pulsace méně než 1 % pro normální a RP-HPLC, méně než 0,2 % pro gelovou chromatografii

*Gradientová eluce – míchání mobilních fází*

Většina moderních HPLC systémů má schopnost míchat kapaliny v různých poměrech za současné kontroly počítačem. Tato možnost vysoce urychluje proces výběru optimální eluční směsi potřebné při izokratické eluci a je zároveň nezbytně nutná při programování složení mobilní fáze v rámci gradientové eluce. Metody míchání jsou dvě – vysokotlaké a nízkotlaké.

### **c) Dávkovací systémy**

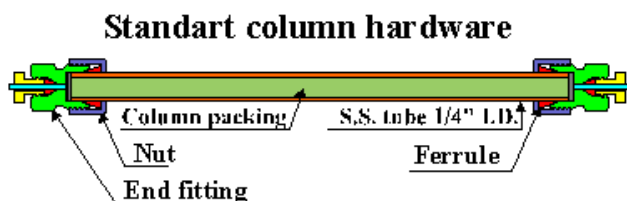
Dávkovací systémy pro systémy v kapalinové chromatografii by měly poskytovat možnost nastříkovat kapalně vzorky v širokém rozsahu objemů při vysoké reprodukovatelnosti, pod vysokým tlakem, s minimálním přínosem k rozšiřování zón analytů a s minimálními poruchami průtoku. V současné chromatografii je asi nejrozšířenějším principem dávkovacího systému *injekční ventil*. Pomocí něho je možné dávkovat roztok analytu bez významného přerušování průtoku mobilní fáze.

Dávkování s použitím ventilu je rychlé, reprodukovatelné a hlavně je možno využít širokou variabilitu dávkovaného objemu. Tyto systémy pracují za vysokého tlaku (cca 50 MPa) s chybou menší než 0,2%. Nevýhodou je nutnost výměny ventilu při změně dávkovaného objemu.

V komerčně dostupných HPLC systémech rutinně používaných ve farmaceutické analýze jsou častým druhem dávkování tzv. automatické dávkovače (autosamplery). Jsou vhodné zejména u systémů řízených automatickými data stanicemi a umožňují zároveň analýzu velkých sad vzorků bez soustavného dozoru analytika.

#### d) Chromatografická kolona

V chromatografické koloně je naplněna stacionární fáze. Tyto kolony jsou nejčastěji vyrobeny z nerezavějící oceli, vzhledem k její rezistenci vůči korozi a relativní cenové dostupnosti. Průměr kolon bývá nejčastěji v rozmezí 2,6 až 3 mm nebo 4,6 až 5 mm, preparativní kolony mají průměr širší. Délka kolony je velice variabilní, pohybuje se od 250 mm do 20 až 30 mm u tzv. „krátkých“ kolon. Na obrázku 3 je vidět schéma běžné HPLC kolony, obrázek 4 ukazuje reálný pohled na HPLC kolony v několika různých délkách a průměrech.



Obrázek 3: Běžná HPLC kolona





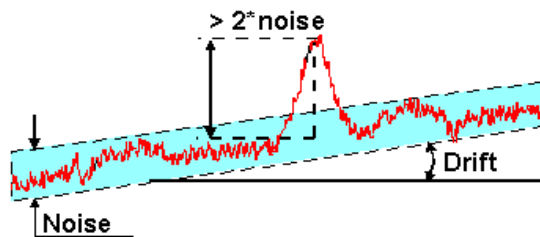
**Obrázek 4: HPLC kolony**

**e) Detektory**

Detektory vybavené průtokovou celou byly největším zlomem ve vývoji moderní kapalinové chromatografie. Současné LC detektory mají daleko dynamičtější rozsah a vysokou citlivost, umožňující analýzu stopových koncentrací analytů. Citlivost použitého detektoru limituje citlivost celého HPLC systému.

*Požadavky na moderní detektor:*

- nízký drift a hladina šumu (tzn. co nejnižší odchylka základní linie od horizontální linie a krátkodobé odchylky od rovné linie, viz obrázek 5)
- vysoká citlivost (nejdůležitější vlastnost detektoru, je to schopnost rozlišení malých rozdílů v koncentraci analytů)
- rychlá odezva
- široký lineární rozsah
- nízký mrtvý objem (minimální rozšiřování zón analytu)
- tvar cely, eliminující mísení separovaných pásů
- nízká citlivost na změny druhu rozpouštědla, průtoku a teploty
- jednoduchost a spolehlivost obsluhy
- nastavitelnost (tzn. možnost být vhodný pro různé druhy analyzovaných látek)
- nedestruktivnost



Obrázek 5: Šum a drift [8]

Typy nejčastěji používaných detektorů v HPLC:

1. Spektrofotometrické detektory – nejčastěji používané, založeny na měření absorbance elektromagnetického záření určité vlnové délky v eluentu v detekční cele. Citlivost v rozmezí  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml

Nejčastější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou – 254 nebo 280 nm
  - UV detektor s proměnnou vlnovou délkou
  - scanning UV detektor – snímá absorpční spektrum v maximu píku analytu
  - diode array detektor (DAD) – snímá absorpční spektrum, hodnotí při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí
2. Fluorimetrické detektory – v případě, že analyt vykazuje fluorescenci, méně univerzální než UV, ale citlivější ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml)
  3. Elektrochemické detektory – využívají dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda-eluent. Podle veličiny se rozdělují na voltmetrický, amperometrický, konduktometrický, potenciometrický a polarografický. Citlivost  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml
  4. Refraktometrické detektory – měří rozdíl indexu lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem, vytékajícím z kolony. Univerzální, ale málo citlivé detektory ( $10^{-6}$  g/ml), nutnost termostatování

5. Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií – po výstupu z kolony se odstraní mobilní fáze a molekuly analytu jsou v plynném stavu ionizovány, následně separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamenáno hmotnostní spektrum. Velice citlivé detektory, selektivní, užívané při identifikaci látek, ale finančně velice náročné
6. Další typy detektorů – konduktometrický, kapacitní, infračervený, Evaporative Light Scattering detektor (ELSD), Charged Aerosol Detector (CAD), detektory s nukleární magnetickou rezonancí (NMR), radiochemické nebo polarimetrické detektory apod [1]

#### **f) Zařízení pro sběr a zpracování dat**

Moderní systémy pro sběr dat pomáhají při analýze signálu vycházejícího z detektoru. Mohou zároveň uchovávat data pro další zpracování a archivaci dat v elektronické podobě. Hlavním cílem je ale zvýšení správnosti a přesnosti analýzy při minimalizaci zásahu analytika. Systémy s mikroprocesory jsou vybaveny schopností ovládat chod HPLC systému, tzn. že kontrolují jak zapnutí a vypnutí systému, dávkování vzorku, průtok a složení mobilní fáze včetně profilu gradientu, teploty, parametrů detektoru atd [8].

### **3.1.4. STACIONÁRNÍ FÁZE V HPLC**

Stacionární fáze v HPLC (tzv. adsorbenty) jsou materiály, které po naplnění do chromatografické kolony zadržují analyty a tím vytvářejí separaci. Obecně HPLC systém sestává ze dvou fází – kapalinové (mobilní) a pevné (stacionární). Ve velké většině HPLC aplikací je pevná stacionární fáze nepropustná pro molekuly analytu. Pouze její povrch se podílí na zadržovacím chromatografickém procesu. Dominantním typem HPLC adsorbentů je silikagel [8].

Rozhodující vliv na účinnost separace má kvalita sorbentu, zejména velikost a stejnoměrnost částic, dále pak tvar, porozita a struktura částic. Silikagel, používaný pro většinu HPLC aplikací je chemicky modifikovaný, o velikosti částic 3 – 10  $\mu\text{m}$ , rozšiřující se je používání částic menších než 2  $\mu\text{m}$  (sub two microns) [9]. V praktické

aplikaci převažuje použití nepolárních, tzv. reverzních fází, které reprezentuje nejrozšířenější oktadecylsilikagel (označovaný jako C18 nebo ODS). Ze středně polárních fází se nejvíce používá kyano nebo amino modifikace silikagelu.

Typy chemických modifikací silikagelu jsou uvedeny v tabulce 1.

Modifikující skupina	Chemický vzorec	Modifikující skupina	Chemický vzorec
dokosyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>21</sub> CH <sub>3</sub>	amino	- NH <sub>2</sub>
oktadecyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>	aminopropyl	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
oktyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	alkylamino	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub>
hexyl	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	nitro	- NO <sub>2</sub>
dimethyl	- Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	kyano	- C≡N
trimethyl	- Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	alkylkyano	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C≡N
cyklohexyl	- C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	propylkyano	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C≡N
fenyl	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	oxypropylkyano	- OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C≡N
difenyl	- (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	diol	- CH(OH)-CH <sub>2</sub> OH
dimethylamino	- N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	fluoralkyl	- (CF <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CF <sub>3</sub>

**Tabulka 1: Chemicky vázané stacionární fáze[10]**

Snahou o překonání nízké stability a pH limitací silikagelu vznikají hybridní materiály, které jsou založeny na bázi polymerizovaného methylsilikonu. Hlavním principem této technologie je syntéza organického/anorganického hybridu, což je materiál obsahující jak anorganické (např. silikagel), tak organické (např. organosiloxany) elementy, a proto poskytuje výhody obou těchto materiálů. Výsledkem je sorbent s minimálně o 1/3 nižším obsahem volných silanolových skupin. Komerčně se tyto materiály vyskytují pod označení X-Terra [5].

Dalším materiálem používaným pro výrobu sorbentů je oxid hlinitý a poměrně novým trendem jsou sorbenty na bázi oxidu zirkoničitého. Oxid zirkoničitý se vyznačuje chemickou stabilitou prakticky v celém rozsahu pH, oproti klasickým materiálům na bázi silikagelu, které jsou stabilní jen v rozmezí pH od 2 do 8. Tato vlastnost spolu s vysokou teplotní stabilitou dává těmto sorbentům možnost široké variability chromatografických podmínek a tím větší prostor při volbě podmínek v rámci optimalizace metody [11].

Nelze zapomenout na tzv. monolitické kolony, které obsahují nejnovější typy velmi porézních monolitních sorbentů a jsou určeny zejména pro rychlé chromatografické analýzy díky velmi nízkému zpětnému tlaku. Jsou to v podstatě vysoce porézní monolitické tyčky silikagelu. Struktura pórů obsahuje makropóry o velikosti 2  $\mu\text{m}$  tvořící hustou síť prostupnou mobilní fází, takže je možné zvýšit průtok a zrychlit tak separaci bez nežádoucího vzrůstu zpětného tlaku. Ve struktuře jsou dále obsaženy mezopóry s velmi malou velikostí (cca 13 nm) a velkou povrchovou plochou, kde dochází k adsorpci molekul analyzované látky [12,13]. V rámci použití monolitických kolon dochází k výraznému snížení času analýzy při relativním zachování separační účinnosti.

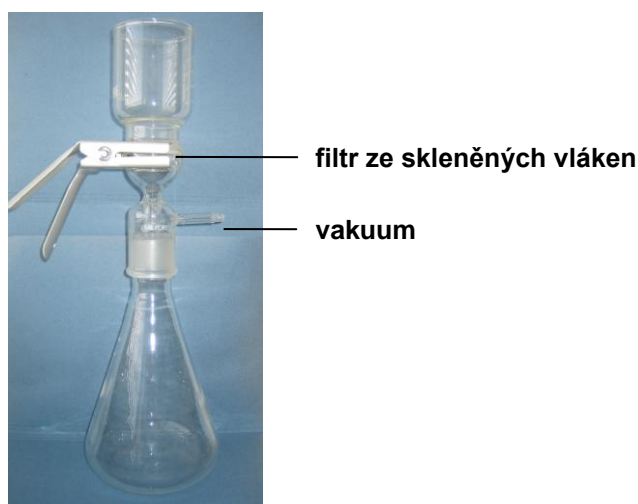
Materiály na bázi silikagelu jsou charakteristické výbornou separační účinností, ale mají omezený rozsah pH. Polymerní materiály naopak vykazují stabilitu v širokém rozmezí pH, ale mezi jejich negativní vlastnosti patří naopak nízká separační účinnost a nízká míra rozlišení. Unikátní technologie Gemini Twin firmy Phenomenex spojuje pozitivní vlastnosti obou typů materiálů pro chromatografické kolony. V poslední době se výrobci silikagelu zaměřují na vylepšení jeho vlastností. Proto byla tzv. „naroubováním“ vytvořena silika-organická vrstva, která dává vznik novému typu částice. Tímto výrobním procesem není ovlivněn vnitřní základ silikagelu. Částice zůstává mechanicky odolná a rigidní jako silikagel, a tak stále poskytuje vynikající účinnost, zatímco silika-organická „skořápka“ chrání částici proti chemickým vlivům [15].

### 3.1.5. MOBILNÍ FÁZE V HPLC

Typ a složení mobilní fáze v HPLC je jedna z vlastností, která ovlivňuje separační děj.

*Požadavky kladené na mobilní fázi v kapalinové chromatografii:*

- čistota – používání rozpouštědel o vysoké čistotě (for HPLC, gradient grade), filtrace MF před použitím v HPLC systému pomocí zařízení k filtrování mobilních fází s filtrem ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (obrázek 6).
- musí být kompatibilní s detektorem
- vzorek musí být v mobilní fázi rozpustný
- nízká viskozita
- musí být chemicky inertní
- přijatelná cena



**Obrázek 6: Zařízení k filtrování mobilních fází**

### 3.1.6. ZÁKLADNÍ CHROMATOGRAFICKÁ DATA

#### 3.1.6.1. RETENČNÍ DATA

##### Retenční čas a retenční objem

Měření retence v eluční chromatografii může být vyjádřeno retenčním časem ( $t_R$ ) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. 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 nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

$v$  – průtokovou rychlost mobilní fáze

##### Hmotnostní distribuční poměr (známý jako kapacitní faktor $k'$ nebo retenční faktor $k$ )

Hmotnostní distribuční poměr ( $D_m$ ) je definován jako:

$$D_m = \frac{mn_s}{mn_m} = K_C \frac{V_S}{V_m}$$

v němž značí:

$mn_s$  – množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

$mn_m$  – množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

$K_C$  – rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta)

$V_S$  – objem stacionární fáze

$V_m$  – objem mobilní fáze

### Distribuční koeficient

Eluční charakteristika látky na určité koloně ve vylučovací chromatografii může být dána distribučním koeficientem ( $K_0$ ), který se vypočítá ze vzorce:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

v němž značí:

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

$t_0$  – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

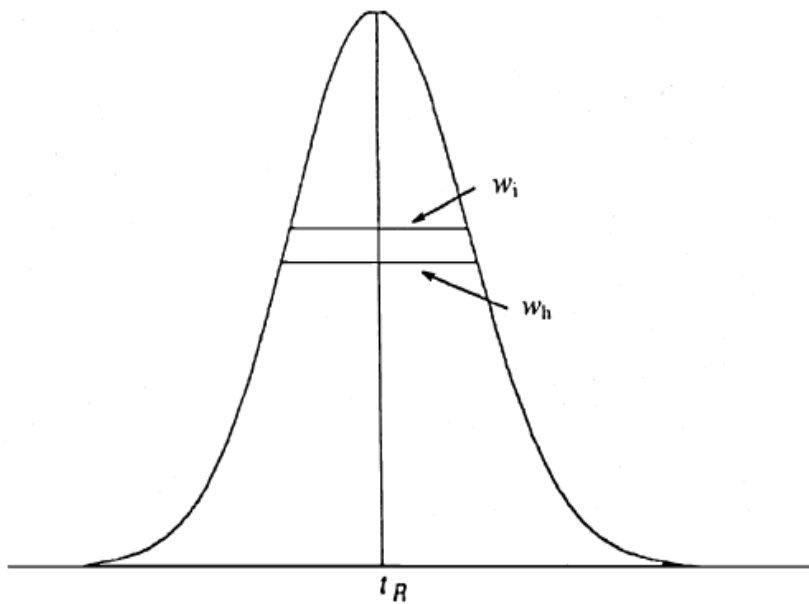
$t_t$  – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího složce, která může volně pronikat do všech pórů stacionární fáze

#### **3.1.6.2. 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 (obrázek 7) platí vzorec:

$$w_h = 1,18w_i$$





**Obrázek 7: Gaussovský pík**

**Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater**

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ) z dat získaných v závislosti na technice za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických.

Použije se následující vzorec, v němž hodnoty  $t_R$  a  $w_h$  musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

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

v němž značí:

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

$w_h$  – šířku píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

### Faktor symetrie

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) (nebo faktor chvostování píku) (obrázek 8) se vypočítá ze vzorce:

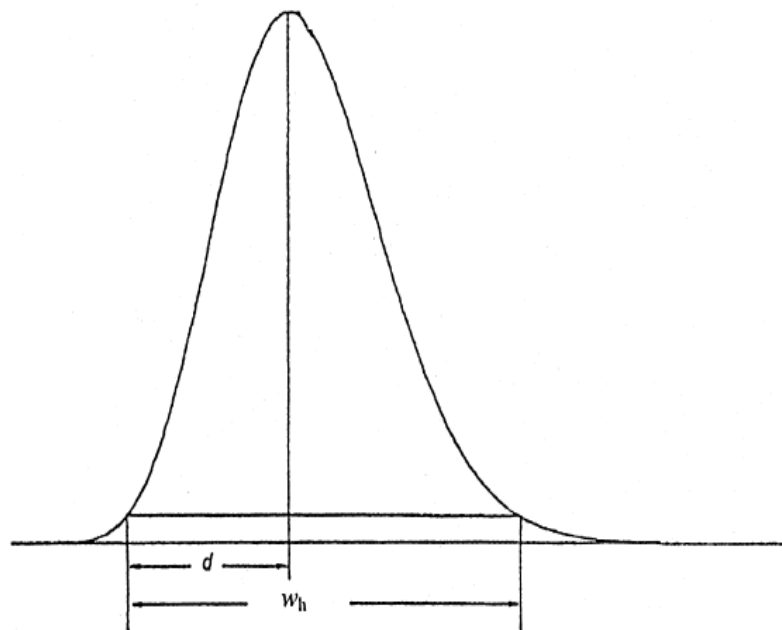
$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

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

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí ideální symetrii píku.



**Obrázek 8: Faktor symetrie píku**

### 3.1.6.3. SEPARAČNÍ DATA

#### Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ , někdy  $R_{ij}$ ) mezi dvěma sousedními píky, může být vypočteno ze vzorce:

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

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

v němž značí:

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

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

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Tato hodnota je také minimální možné rozlišení, které lékopisy akceptují pro splnění požadavků SST. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být tento vzorec pro výpočet vhodný.

#### Poměr výšky píku k sedlu

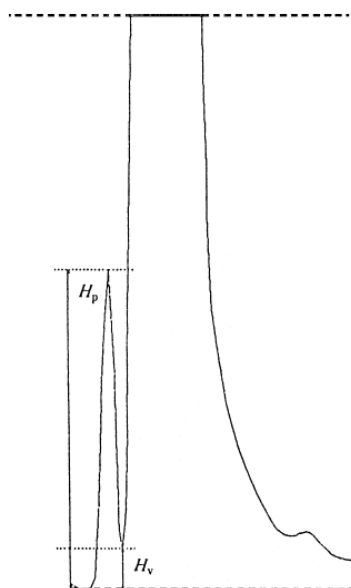
Jestliže není zcela oddělena nečistota od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému ve zkouškách na příbuzné látky poměr výšky píku k sedlu ( $p/v$ ) (obrázek 9).

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

v němž značí:

$H_p$  – výšku píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií

$H_v$  – výšku nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií [6]

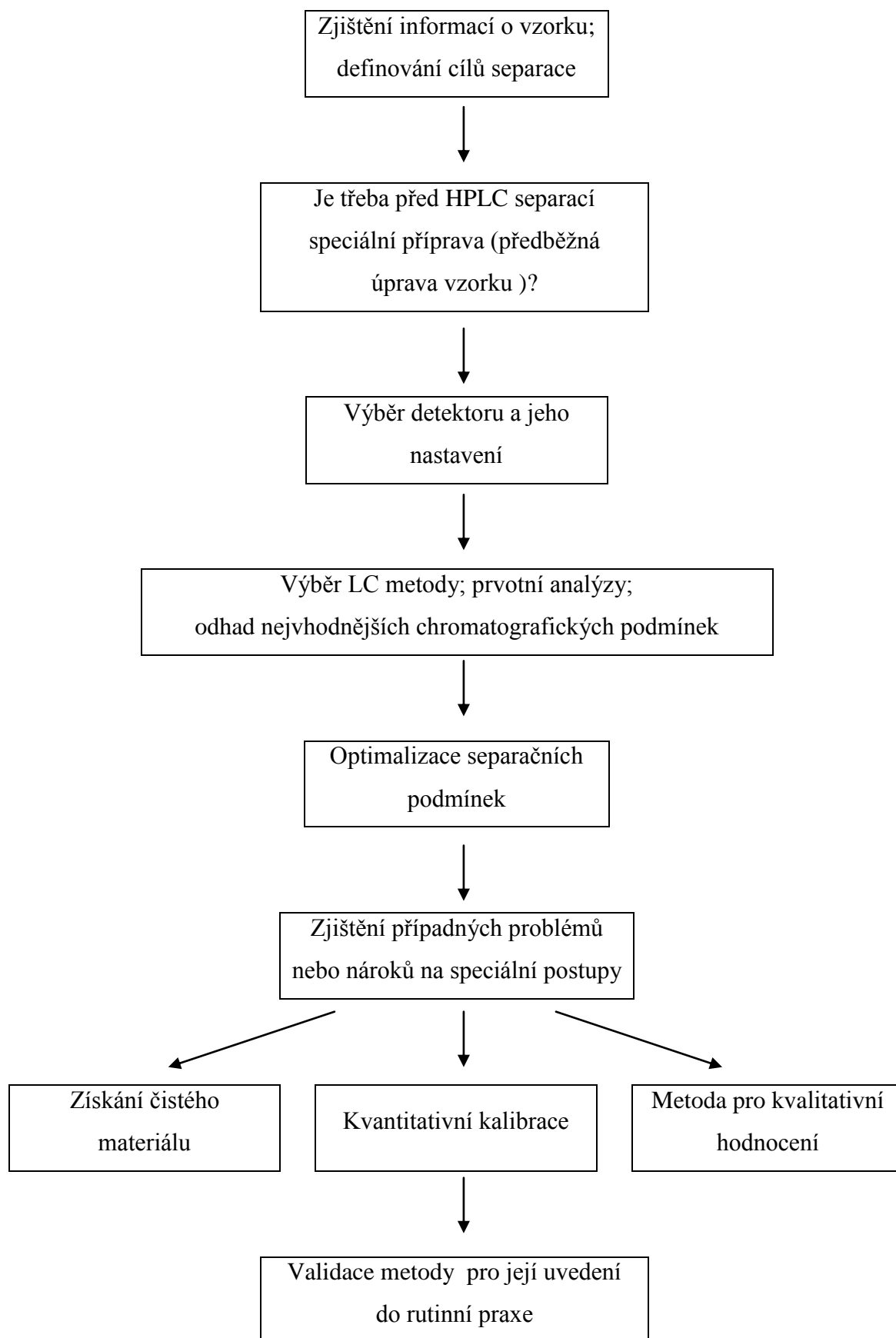


**Obrázek 9: Poměr výšky píku k sedlu**

### **3.2. VÝVOJ NOVÉ HPLC METODY<sup>(1)</sup>**

Vývoj každé nové HPLC metody musí být založen na znalostech chromatografického procesu a probíhá v několika postupných krocích, jak je znázorněno na obrázku 10. Proces zahrnující celý vývoj metody a její validaci se nazývá optimalizace. Optimalizace je tedy volba chromatografických podmínek tak, aby látky ve směsi byly dokonale separovány a citlivě detekovány v co nejkratším čase, při splnění všech požadavků SST a jejich validace. Optimalizace je převážně experimentální proces. Optimalizaci metody vždy předchází literární rešerše a uspořádání výchozích poznatků o sledovaných analytech a metodách již v minulosti použitých pro jejich hodnocení. Moderní optimalizace HPLC metody lze provádět také s použitím optimalizačních programů, jaké nabízí např. firma Waters v podobě softwaru AMDS (Automated Method development software).

(1) Tato kapitola byla zpracována, kromě uvedených odkazů, ze zdroje [8,16,17]



**Obrázek 10: Jednotlivé kroky při vývoji HPLC metody**

### 3.2.1. VOLBA ANALYTICKÉ KOLONY – STACIONÁRNÍ FÁZE

Analytickou kolonu pro HPLC analýzu je třeba volit s ohledem na požadavky analýzy. Podmínky analýzy je nutné optimalizovat jako kompromis s ohledem na čas analýzy, požadované rozlišení a zatížení chromatografické kolony. Je-li požadováno vysoké rozlišení, doba analýzy se obvykle prodlouží a kolonu nelze zatěžovat dávkováním velkého objemu vzorku. Je-li nutné provést analýzu v co nejkratší době, bude dosaženo horšího rozlišení a kolonu rovněž nelze zatěžovat dávkováním velkého objemu vzorku. Je-li potřebné analyzovat velké objemy vzorků, doba analýzy se prodlouží a rozlišení bude dosahovat nižších hodnot.

Nové trendy v HPLC však poněkud mění uvedená pravidla. Snahou je totiž miniaturizace vybavení, úspora materiálu a samozřejmě času, což v kapalinové chromatografii znamená urychlení a zkrácení analýzy se současným zachováním separačních účinností, rozlišení, citlivosti metody, snížení spotřeby mobilní fáze, prodloužení životnosti analytických kolon a umožnění jejich použití pro co nejselektivnější nebo naopak pro co nejuniverzálnější aplikace.

Tyto požadavky se snaží splnit některé nové typy stacionárních fází. Některé typy nových stacionárních fází byly již zmíněny v kapitole 3.1.4. (monolitický silikagel, sorbenty na bázi oxidu zirkoničitého atd.). Dalším typem jsou kolony na bázi tzv. „sub-2-micronové“ technologie. Jsou navrženy speciálně pro velmi rychlé analýzy s vysokým rozlišením. Právě proto, že velikost částic je takto malá, účinnost analytické kolony velmi stoupá. Je tedy možné provádět komplexní separaci na kratších kolonách nebo snadný přenos analýzy z dlouhé kolony na kratší se stejnými výsledky. Tuto technologii prozatím prakticky komerčně zrealizovaly dvě firmy, firma Agilent (Zorbax C18 Eclipse XDB a SB - C18, s vysokou odolností v rozmezí 1 – 9 pH) a firma Waters (Waters Acquity UPLC BEH C18, C8, Shield a Fenyl stacionární fáze, rozmezí pH od 1 do 12).

Protože sub-2-micronová technologie je v kapalinové chromatografii poměrně novým trendem, byly popsány jen některé aplikace samotného výrobce využívající spojení HPLC a těchto analytických kolon. Pomocí Zorbax Agilent s 1,8  $\mu\text{m}$  částicemi byla analyzována některá antibiotika. Jedna z aplikací byla zaměřena na testování

standardních směsí obsahujících zástupce kyselých, bazických i neutrálních látek [18-22].

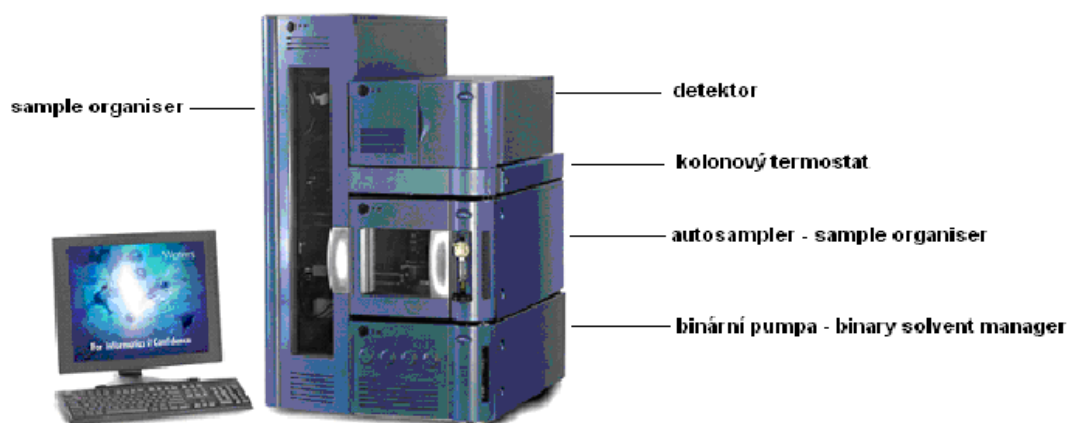
HILIC chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) je alternativou RP-HPLC sloužící pro analýzu malých polárních molekul, které jsou při RP-HPLC buď slabě zadržovány, nebo eluují s mrtvým retenčním objemem. V HILIC je stacionární fáze polární, nejčastěji obsahuje hydroxyl-ethyl nebo amino- skupiny a mobilní fáze je z velké části organické rozpouštědlo. Voda přítomná v mobilní fázi vytváří stagnantní vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a přitom umožňuje rozdělování mezi mobilní fázi a vodnou vrstvou. K eluci dochází zvýšením polarity elučního rozpouštědla, tedy obsahu vody. Separace látek je dosaženo mechanismem rozdělování společně s elektrostatickými interakcemi.

Dalším z nových trendů v kapalinové chromatografii je UPLC – Ultra performance liquid chromatography. Toto provedení HPLC umožňuje urychlení analýzy a získání co nejužších symetrických píků. Jsou zde minimalizovány systémové objemy, je použita nízkoobjemová detekční cela, je zvýšena rychlost sběru dat, aby bylo k dispozici dostatečné množství bodů potřebné k zaznamenání chromatografického píku, a dále jsou použity speciální kapilární spoje [25].

Nově vyvinutý přístroj pro LC analýzu Acquity UPLC pracující navíc pod ultra-vysokým tlakem je příkladem systému, který splňuje tyto požadavky. Stejně jako obvyklé HPLC je složen ze čtyř hlavních modulů, viz obrázek 11. Z hlediska použití ultra-vysokého tlaku a značného urychlení analýzy (tím pádem i sběru dat apod.) byly do konstrukce systému vneseny změny, které optimalizují účinnost systému.

Přenos metod mezi HPLC a UPLC je velmi jednoduchý, protože v UPLC jsou zachovány stejné mechanismy separace a chromatografické principy jako v HPLC, přičemž dojde ke zlepšení citlivosti i rozlišení a také k urychlení analýzy. Při přenosu metody je tedy obvykle nutné pouze snížit průtokovou rychlost, zvýšit rychlost sběru dat a snížit objem vzorku dávkovaný na chromatografickou kolonu.

UPLC je velmi 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 [26].



**Obrázek 11: UPLC analytický systém firmy Waters složený ze čtyř modulů [27].**

Rozměry kolony (délka **L** a vnitřní průměr **d**) 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). Účinnost analytické kolony vzrůstá se zmenšujícím se průměrem částic. Je však třeba mít na paměti nárůst zpětného tlaku na koloně.

Výběr stacionární fáze a typu chromatografie závisí na povaze vzorku (fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost). Příklad schématu výběru stacionární fáze navrhuje firma Agilent (viz tabulka 2) [28].



Molekulová hmotnost	Rozpustnost	Polarita (dle rozpustnosti)	Typ chromatografie
< 2000	organické rozpouštědlo	hexan	NP chromatografie, čistá silika
			NP chromatografie, chemicky vázané fáze
		methanol methanol/voda acetonitril acetonitril/voda	RP chromatografie, chemicky vázané fáze
			gelově permeační chromatografie (malé molekuly)
		tetrahydrofuran	gelově permeační chromatografie (velké molekuly)
	voda	neiontové látky	RP chromatografie, chemicky vázané fáze
		iontové látky	RP chromatografie, chemicky vázané fáze, použití kontroly ionizace
			RP chromatografie, chemicky vázané fáze, iontpárové činidlo
			RP chromatografie, čistá silika
			iontovýměnná chromatografie
> 2000	organické rozpouštědlo	gelově permeační chromatografie	
	voda	gelová filtrace	
		iontovýměnná chromatografie, materiál s velkými póry	
		RP chromatografie, materiál s velkými póry	

**Tabulka 2: Schéma výběru stacionární fáze**

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 pufr, je nutné před ekvilibrací propláchnout kolonu touto mobilní fází, asi 10 kolonovými objemy vody. V případě směsi voda - methanol v poměru 1:1 postačují asi 3 kolonové objemy. Následně se kolona promývá 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 ml/min do 1 ml/min při přírůstku asi 0,1 ml/min. Délka ekvilibrace kolony závisí na používané mobilní fázi 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.

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 pufrem
- 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 (navrhované podmínky pro uchovávání viz tabulka 3).
- 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!

<b>Kolona</b>	<b>Mobilní fáze</b>
Silica	Hexan/acetonitril
C <sub>8</sub> ,C <sub>18</sub>	Acetonitril/voda (methanol/voda)
NH <sub>2</sub>	Dichlormethan/methanol
CN (normální fáze)	Hexan
CN (reverzní fáze)	Acetonitril/síran amonný (0,05 mol/l)
Phenyl	Acetonitril/voda

**Tabulka 3: Typy kolon a jejich uchovávání**

### 3.2.2. VOLBA MOBILNÍ FÁZE

Složení mobilní fáze má vliv na: účinnost kolony; kapacitní poměr; retenční poměr; rozlišení; dobu analýzy a citlivost.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla  $c$  v mobilní fázi na kapacitní poměry chromatografovaných látek  $k$  vystihuje empirická rovnice  $k = k_a 10^{-m_c}$ , která v logaritmickeém tvaru  $\log k = \log k_a - m_c$  je lineární a kde  $k_a$  a  $m$  jsou konstanty nezávislé na koncentraci organického rozpouštědla ( $k_a$  je kapacitní poměr v čisté vodě jako mobilní fázi, získaný extrapolací experimentálních údajů).

Vyjdeme-li z předchozí rovnice, pak pro retenční poměr  $r_{1,2}$  (selektivitu) dostaneme:

$$r_{1,2} = \frac{k_{a2}}{k_{a1}} 10^{(m_1 - m_2)}$$

Z rovnice je zřejmé, že při stejných hodnotách  $m_1$  a  $m_2$  pro obě separované látky nezávisí selektivita na složení mobilní fáze a změnou složení mobilní fáze se selektivita neovlivní.

Eluotropická řada rozpouštědel	
<b>pentan</b>	
hexan	
cyklohexan	
ethylether	
chloroform	
dioxan	
tetrahydrofuran	
ethylacetát	
acetonitril	
isopropylalkohol	
ethanol	
methanol	
ethylenglykol	
<b>voda</b>	▼

**Tabulka 4:** Eluotropická řada vybraných rozpouštědel pro kapalinovou chromatografii. Polarita rozpouštědel roste ve směru šipky [29].

- **Příprava mobilní fáze**

Problémy, které vznikají v chromatografickém systému, jsou často způsobeny špatnou přípravou a použitím mobilní fáze. Může dojít k zavzdušnění hlavy chromatografické pumpy, vzduchové bublinky se mohou dostat do cely detektoru, kyslík přítomný v mobilní fázi může snížit citlivost fluorimetrické detekce, může dojít k zanesení in-line filtrů, frit nebo kapilár vlivem nečistot přítomných v mobilní fázi a nebo ke snížení přesnosti a reprodukovatelnosti nástřiku vzorku. Tyto komplikace se projeví zvýšeným zpětným tlakem na analytické koloně, zvýšeným šumem základní linie, kolísáním retenčních časů, případně nevyhovujícím tvarem chromatografického píku.

Příprava mobilní fáze by se měla řídit těmito doporučeními:

Pro přípravu mobilní fáze je nutné vždy používat rozpouštědla pokud možno co nejvyšší čistoty - HPLC grade. Toto platí i pro všechna aditiva (kyseliny, soli, baze) přidávaná do mobilní fáze.

Doporučuje se všechny připravené mobilní fáze filtrovat přes filtr 0,45  $\mu\text{m}$  nebo menší. Toto je kritické zejména při použití mobilních fází obsahujících soli a pufrů. Je třeba se ujistit, zda použitý filtr je kompatibilní s danou mobilní fází. Pro filtraci vodných roztoků se používají celulozové 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 (vodivost menší než 0,5  $\mu\text{S}$ ). Kvalita vody je kritická zejména při použití gradientové eluce. Použitím mobilní fáze o malé eluční síle se nečistoty obsažené ve vodě zadržují na chromatografické koloně a se zvyšující se eluční silou mobilní fáze při gradientové eluci dochází k jejich vytěsnění z kolony. Zcela nevhodné je použití pouze deionizované vody, protože obsahuje organické nečistoty, které mohou pozměnit účinnost kolony. Došlo by také k mikrobiologickému růstu na koloně.

Není vhodné uchovávat vodu resp. mobilní fáze v plastových nádobách (polypropylen, polyethylen). Mohlo by tak dojít k uvolňování látek použitých při výrobě plastu a ke kontaminaci vody resp. mobilní fáze. Při uchovávání vody nebo mobilní fáze ve skleněných nádobách je nutné mít na paměti, že dochází k adsorpci

všech aditiv použitých při přípravě mobilní fáze na skleněný povrch, a to různou rychlostí. Dochází také k mikrobiologickému růstu a k uvolňování silikátů ze skla. Ty potom mají nepříznivý vliv na některé aplikace. Je vhodné ověřit si nádoby a zásobní lahve, zda při použití mobilní fáze nedochází k výše uvedeným jevům.

Pro přípravu a uchovávání mobilní fáze je vhodné používat stejné zásobní lahve. Před přípravou a uchováváním je vždy třeba nádobu vypláchnout mobilní fází. Není doporučeno používat k vymývání těchto nádob detergentů, které se adsorbují na povrch nádoby a mohou být vymývány mobilní fází. To by pak mohlo vést k driftu na základní linii, zejména při gradientové eluci. V případě použití detergentů k vymytí zásobních lahví je nutné lahve poté vymýt vodou čistoty HPLC, následně methanolem a vysušit do sucha.

Zásobníky mobilní fáze mají vždy být umístěny výše, než vstup do chromatografické pumpy. K ověření správného umístění zásobníku mobilní fáze se otevře vypouštěcí ventil a mobilní fáze musí samovolně vytékat.

#### Mobilní fáze obsahující pufr

Při přípravě mobilní fáze jsou často používána aditiva, která slouží k úpravě pH nebo iontové síly mobilní fáze. Pro přípravu pufrovaných mobilních fází je třeba pracovat v oblasti pK daného pufru. Obvykle se pH vodné složky mobilní fáze upravuje na hodnotu o dvě jednotky nižší než je pK<sub>a</sub> kyselého analytu, resp. o dvě jednotky vyšší než je pK<sub>a</sub> bazického analytu. Je tak dosaženo nejvyšší pufrovací kapacity. Pufrovací kapacita kvantitativně vyjadřuje, jak se změní pH pufru při přidavku malého množství kyseliny nebo baze.

pH mobilní fáze (respektive její vodné složky) se měří a upravuje ještě před přidavkem organického rozpouštědla, protože kyselost v organických rozpouštědlech se výrazně liší od pH vodných rozpouštědel nebo jejich směsí. Pro autoprotolytickou konstantu vody platí rovnice  $K_{H_2O} = [H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-14}$ . Pro autoprotolytickou konstantu methanolu však platí  $K_{MeOH} = [H^+] \cdot [CH_3O^-] = 10^{-16,6}$ . To znamená, že v MeOH je prostředí neutrální pro koncentraci  $[H^+] = [CH_3O^-] = 10^{-8,3}$  (nebo pH 8,3). Ve směsném rozpouštědle methanol – voda pak autoprotolytická konstanta leží mezi  $10^{-14}$  až  $10^{-16,6}$ , protože vedle sebe vystupují anionty  $H^+$ ,  $CH_3O^-$  a  $OH^-$ . Methoxidový aniont má vyšší nukleofilitu oproti  $OH^-$  a proto pufrы připravené v prostředí methanol – voda mají rozdílné vlastnosti proti čistě vodným pufrům, viz tabulka 5.

Pro změnu pH pufrů v nevodných prostředích můžeme odvodit obecná pravidla. Pro slabé kyseliny (kyselina octová,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )  $\text{pK}_a$  stoupá, pro slabé zásady ( $\text{NH}_4^+$ ) naopak  $\text{pK}_a$  klesá. 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.

Kyselina	$\text{pK}_a$ (voda)	$\text{pK}_a$ (methanol+voda; 50:50)
kyselina fosforečná $\text{pK}_1$	2,11	3,21
kyselina fosforečná $\text{pK}_2$	7,19	8,24
kyselina octová	4,77	5,54
amoniak	9,24	8,76

**Tabulka 5:  $\text{pK}_a$  pufrů ve vodě a ve směsi rozpouštědel methanol-voda (50:50).**

Existuje několik způsobů přípravy pufovaných mobilních fází

Prvním ze způsobů je dosažení vypočtené koncentrace a pH pufru pouhým smícháním požadovaného množství kyseliny a baze a doplněním vodou na definovaný objem (např. roztok hydroxidu sodného a kyseliny octové). Chyba pH takto připraveného pufru se pohybuje kolem 0,1 jednotky pH, protože není počítáno s aktivitními koeficienty.

Druhým způsobem je připravení přesné koncentrace kyseliny (resp. baze) a přidání menšího množství baze (resp. kyseliny) než odpovídá požadovanému (vypočtenému) množství. pH takto připraveného pufru se pak upravuje pod pH metrem bází (nebo kyselinou) na požadované pH pufru.

Třetí způsob přípravy pufovaných mobilních fází se příliš obecně nedoporučuje a používá se pouze v případech, kdy velmi malá změna pH má vliv na retenci solutu. Tento způsob upřednostňuje úpravu pH mobilní fáze až po smísení s organickou složkou mobilní fáze.

Výhodou prvního způsobu je rychlá příprava mobilní fáze, druhý způsob je vhodný pro přípravu mobilních fází s přesně definovaným pH mobilní fáze.

- **Odvzdušnění (degassing) mobilní fáze**

Odplynění mobilní fáze je velmi důležitý krok při její přípravě, protože může odstranit mnoho problémů vznikajících při chromatografické analýze. Odvzdušnění mobilní fáze přináší výhody v podobě reprodukovatelných retenčních časů, stabilního průtoku mobilní fáze, nízkého šumu základní linie a vysoké citlivosti u mnoha typů chromatografických detektorů.

K odvzdušnění mobilní fáze se používají tyto metody, které se mohou vzájemně kombinovat:

- probublávání mobilní fáze heliem (sparging)
- ultrazvuková lázeň (sonifikace)
- in-line vakuový degasser
- vakuová filtrace
- ohřev mobilní fáze (u velmi těkavých rozpouštědel je však tento způsob nepoužitelný)
- Probulbávání mobilní fáze heliem (sparging)

Při probublávání rozpouštědla heliem dochází k vytěsnění méně rozpustných plynů v mobilní fázi plynem rozpustnějším (heliem). Probulbání rozpouštědla heliem jej uchovává v ekvilibrovaném stavu, který se pak může udržovat již jen malým proudem helia nebo uchováváním „pod heliem,“ kdy nedochází k opětovnému rozpouštění atmosferických plynů, a současně se tak zamezuje mikrobiálnímu růstu. Použití této metody zpomaluje oxidaci rozpouštědel, která snadno přecházejí na peroxidové formy (např. tetrahydrofuran).

V případě použití odplynění heliem dochází k rozpouštění plynu v mobilní fázi, přičemž množství rozpuštěného plynu závisí na chemické afinitě plynu k danému rozpouštědлу, teplotě a tlaku. Helium se rozpouští snadněji v nepolárních rozpouštědlech než v polárních, větší rozpustnost tedy bude v rozpouštědlech používaných pro normální fázi.

Vliv teploty je složitější. Je-li rozpouštěcí teplo exotermické, rozpustnost plynu se snižuje se zvyšující se teplotou (helium ve vodě). Je-li rozpouštěcí teplo endotermické, rozpustnost plynu se zvyšuje se zvyšující se teplotou (helium v benzenu).

Vliv tlaku je jednoduchý. Rozpustnost plynu v rozpouštědle stoupá se stoupajícím parciálním tlakem plynu (Henryho zákon, na tomto principu je založen vakuový degasser).

- Vakuová filtrace a sonifikace

Vakuová filtrace snižuje tlak na povrchu rozpouštědla. Bohužel, samotné vakuum je příliš slabé a nedochází k dokonalému odplynění rozpouštědla. Může se kombinovat se sonifikací za použití ultrazvukové lázně, kdy dochází k rozptýlení submikro-bublinek plynu, které se shlukují v rozpouštědle.

Hlavní výhodou vakuové filtrace při použití 0,45  $\mu\text{m}$  filtru je i dokonalé zbavení mobilní fáze mechanických nečistot. Tento krok by neměl chybět při každé přípravě mobilní fáze.

- Vakuový degasser

In-line vakuový degasser je založen na principu Henryho zákona, který říká, že molární zlomek plynu rozpuštěného v kapalině je úměrný parciálnímu tlaku tohoto plynu v plynné fázi nad kapalinou. Vakuový degasser je více či méně efektivní v závislosti na době, po kterou na rozpouštědlo působí snížený tlak.

Na účinnost vakuového degasseru působí dva faktory, a to průtok mobilní fáze (se zvyšujícím se průtokem klesá účinnost) a plocha povrchu odplyňovací komory (délka PTFE membrány, přes kterou probíhá odvzdušnění mobilní fáze). Tato délka je konstantní, jejím zvětšením se zvyšuje i účinnost degasseru. Vakuový degasser může měnit složení binárních solventů. Odvzdušnění je rychlejší a ekonomičtější ve srovnání s odplyněním heliem. Nedochází k rozpouštění plynu v mobilní fázi.

Při odvzdušňování mobilní fáze se nejčastěji kombinuje použití vakuové filtrace a ultrazvukové lázně, vakuové filtrace a probublání heliem. Většina nových moderních HPLC přístrojů však má včleněný vakuový degasser jako integrovanou součást systému.

Pro zamezení vstupu mechanických nečistot do chromatografického systému je nutné použití in-line filtru mobilní fáze (kovový, teflonový). Výběr filtru závisí na typu a použití mobilní fáze nebo činidel vstupujících do chromatografického systému. Při použití oxidačně-redukčních látek jako činidel derivatizačních reakcí je žádoucí použití teflonových filtrů. Jedině tak je možné vyhnout se případným redoxním reakcím, které



by mohly probíhat interakcí s kovovým filtrem. Použitý filtr by měl vždy být mechanicky nezávadný a čistý, aby nedocházelo k nereprodukovatelnému průtoku mobilní fáze chromatografickou pumpou.

### **3.2.3. VOLBA PRŮTOKU MOBILNÍ FÁZE<sup>(2)</sup>**

Oblast maximální účinnosti chromatografické separace se se zmenšováním částic posouvá k vyšším lineárním průtokům a je tak dosaženo rychlejší separace při optimální účinnosti. Pro rychlost a účinnost separace je tedy klíčová velikost částic chromatografického sorbentu.

Tlak na koloně je přímo úměrný průtoku a nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti sorbentu. Tlak při optimálním průtoku je nepřímo úměrný třetí mocnině velikosti sorbetu. Z praktického hlediska se průtoková rychlost optimalizuje tak, aby doba analýzy byla co nejkratší při zachování všech požadavků na separaci, účinnost a selektivitu systému, viz také kap. 3.3. Samozřejmě záleží také na průměru analytické kolony, na tlakových omezeních systému a analytické kolony.

Při optimálním průtoku použitým na 50 mm dlouhé analytické koloně naplněné sub-2-micronovými částicemi dojde k nárůstu zpětného tlaku až na 66,1 MPa, což běžné HPLC přístroje ani analytické kolony pracující obvykle do 40 MPa neakceptují. Řešením v takovém případě je použití UPLC systému, který je spojen s kolonami naplněnými tlaku odolnými sorbenty a je speciálně konstruován pro vysokotlaké, rychlé a ultra-účinné analýzy, kap.3.2.1. Z hlediska prodloužení životnosti analytické kolony se pro běžné rutinní analýzy nedoporučuje použití průtokových rychlostí, které vyvolávají zvýšení zpětného tlaku na koloně v oblasti maximálních tlakových limitů.

### **3.2.4. VOLBA VLNOVÉ DÉLKY DETEKCE<sup>(3)</sup>**

Výběr vlnové délky vychází ze znalosti UV spekter jednotlivých sledovaných komponent vzorku. Jsou-li dostupné standardy analytů, je vhodné změřit jejich UV spektra v příslušných rozpouštědlech před započítáním optimalizace HPLC podmínek. Alternativou může být změření UV spekter pomocí DAD detektoru během vývoje metody.

(2) Tato kapitola byla zpracována ze zdroje [30]

(3) Tato kapitola byla vypracována ze zdroje [7]

Vlnová délka vybraná pro detekci musí být kompromis různých absorbancí sledovaných analytů přítomných v různých koncentračních rozmezech (např. při farmaceutické analýze je dobré zohlednit nízká množství nečistot vzhledem k vysokým množstvím účinných látek a posunout vlnovou délku detekce směrem k absorpčnímu maximu nečistot) a také akceptovatelné propustnosti mobilní fáze. Mobilní fáze musí dostatečně propouštět vybranou vlnovou délku - musí být vzaty v úvahu „UV cut-off“ hodnoty rozpouštědel. V některých případech je nutné zvolit detekci tak, aby docházelo k co nejnižší absorbanci interferujících látek.

### 3.2.5. VOLBA OBJEMU NÁSTŘIKU<sup>(4)</sup>

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 (tedy o 10 %). Kapacita pro každý vzorek závisí na mnoha faktorech – typ analytické kolony, složení mobilní fáze, složení samotného vzorku, způsob detekce atd.

Pro široké spektrum dávkovaných vzorků (např. méně než 10-25 µl na 0,4-0,5 mm ID koloně) nemá množství vzorku vliv na retenci, separační účinnost a rozlišení jednotlivých píků. Dojde-li však ke zmenšení délky nebo průměru kolony, je třeba snížit také dávkované množství vzorku proporcionálně k objemu kolony. Stejně tak je třeba snížit dávkované množství vzorku při použití kolony s větší účinností. Náhodné či úmyslné dávkování vzorku mimo potřebné limity vede k nepředvídatelným změnám v separaci, které jsou popisovány jako přetížení analytické kolony – „overload“.

Existují dva způsoby přetížení kolony, tzv. „Volume overload“, tedy objemové přetížení, kdy je na kolonu dávkován větší objem, než je kolona schopna separovat a „Mass overload“, nebo-li přetížení hmotou, kdy je na kolonu dávkována větší koncentrace látky, než je kolona schopna účinně separovat.

(4) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [7,16]

### 3.2.6. VOLBA TEPLoty ANALÝZY<sup>(5)</sup>

Při optimalizaci podmínek v LC se teplota jako parametr používá méně, než například v GC. 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. Optimální teplota pro chromatografickou analýzu se dá odvodit buď experimentálně porovnáním účinností procesu při jednotlivých teplotách nebo poněkud sofistikovanějším přístupem. Teplota při chromatografické analýze má vliv na termodynamický a kinetický aspekt chromatografického procesu.

Zvýšením teploty roste účinnost chromatografické kolony, klesá viskozita mobilní fáze a zvyšují se difúzní koeficienty.

(5) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [5,7,16]

### 3.3. ANALÝZA LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

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 většinou izolaci jednotlivých složek z léčivého přípravku (pokud nejde o přímé stanovení), identifikaci a kvantifikaci účinných látek a konzervancí, ale také hodnocení nečistot (podle lékopisu zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení obsahu u účinné látky). U léčivých látek i přípravků se tedy hodnotí identita látek, čistota, obsah účinné látky a dále stabilita, bezpečnost a účinnost. Výhodou kapalinové chromatografie je možnost hodnocení kvality i kvantitě všech sledovaných látek ve směsi během jedné analýzy. Pomocí jedné analytické metody využívající standardy lze identifikovat i kvantifikovat jak účinné látky tak nečistoty či další přítomné látky. Mezi nečistoty patří hlavně dva typy látek – nečistoty pocházející z výrobního procesu (v literatuře „Impurities“) a degradační produkty vznikající rozkladem účinných látek (v literatuře „Degradation Products“).

Metody hodnocení farmaceutických přípravků dále zahrnují zkoušky homogenity léčivých přípravků, zkoušky disoluce u tabletových lékových forem a také zkoušky liberace u topických lékových forem. Výsledná kontrola léčivého přípravku je jednou z nejdůležitějších kroků ve farmaceutické kontrole léčiv. Velká většina předpisů Správné výrobní praxe (SVP) náleží právě k předpisům kontroly kvality a testování účinné látky nebo výsledného léčivého přípravku.

Před zavedením analytické metody pro hodnocení farmaceutických přípravků musí být samozřejmě ověřeny parametry vhodnosti systému (SST) a provedena její validace (kapitola 3.4.).

#### 3.3.1. PŘÍPRAVA VZORKŮ LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ K ANALÝZE<sup>(6)</sup>

##### ○ Metoda přímého nástřiku

Tato metoda může být používána jen pro tekuté lékové formy, které se po jednoduchém naředění dávkují přímo na analytickou kolonu.

(6) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [10, 39-40]

Těkavé nečistoty v rozpouštědlech pro výrobu lékových forem se analyzují přímo plynovou chromatografií, zbytková rozpouštědla v lékových formách i substancích pak head-space plynovou chromatografií.

○ **Extrakce z pevné lékové formy do kapaliny**

Velmi často je třeba izolovat účinnou látku z pevných lékových forem jako jsou tablety. Izolace může být provedena relativně jednoduchým postupem zahrnujícím výběr rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, která poskytuje ideální rozpustnost pro stanovovaný analyt a minimální rozpustnost pro interferující látky.

V některých aplikacích se také využívá superkritická fluidní extrakce pomocí oxidu uhličitého - bude uvedeno dále. Limitací tohoto postupu je špatná rozpustnost polárních látek jako třeba antibiotik v superkritické kapalině.

V tabulce 6 jsou uvedeny lékové formy a postupy přípravy vzorků z nich

Léková forma	Způsob přípravy vzorku
<b>Tablety</b>	- rozmělnění (rozemletí) - extrakce kapalným rozpouštědlem - filtrace/centrifugace
<b>Topické přípravky</b>	- vytěsňování analytů z absorpčních míst v základu pomocí kyselin/bází/pufřů - zvýšená teplota - odstranění mechanických částic (filtry ze skleněných vláken/polymerní membrány) - extrakce

**Tabulka 6: Jednotlivé lékové formy a způsoby přípravy vzorků k analýze:**

○ **Extrakce organickými rozpouštědly – LLE**

Nejjednodušším způsobem provedení této izolace je protřepání daného podílu vodného roztoku s odpovídajícím objemem nemísitelného organického rozpouštědla. Extrakce se nazývá extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce organickými rozpouštědly, liquid-liquid extraction, LLE. Tento postup je užitečný zejména pokud je

analyt rozpustný v jedné vrstvě a interferující látky v druhé. Bohužel, takový případ nastává málokdy a proto se pro ovlivnění rozpustnosti využívá úpravy fyzikálních a chemických vlastností. Jedním z přístupů je přidavek chloridu sodného do vodného rozpouštědla, aby vznikl nasycený roztok.

Výhodou LLE extrakční metody je její jednoduchost a nenáročnost na provedení a také na složité přístrojové vybavení. Lze ji využít jak pro separaci většího množství látek, tak pro stopové koncentrace. Princip extrakce spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny podle rozdělovací konstanty ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}}$$

$[A]_{\text{org}}$  = koncentrace látky v málo polárním (organickém) rozpouštědle

$[A]_{\text{aq}}$  = koncentrace látky ve vodné fázi

Organické kyseliny a baze existují ve vodném roztoku v rovnovážných směsích neutrální a iontové formy. Neutrální a iontová forma však nemají stejný rozdělovací koeficient, extrahované množství bude tedy záviset na acidobazické rovnováze. Pro účinnou extrakci je třeba, aby analyt byl alespoň z 95% v extrahovatelné formě jako volná baze nebo volná kyselina. Ve většině případů je třeba upravit pH vzorku na hodnotu o dvě jednotky nižší než je pKa kyselé látky nebo na hodnotu od dvě jednotky vyšší než je pKa bazické látky.

Při vývoji liquid-liquid extrakčního postupu se vychází z fyzikálně chemických vlastností rozpouštědla. Volí se pH vodné fáze, vliv poměru nemísitelných fází, způsob a doba extrakce.

### Zvýšení výtěžnosti extrakce

Pro léčivé látky o velmi nízké koncentraci ve vzorku a zároveň obsahující četné interferující látky jednoduchá extrakce nestačí. Jedním ze způsobů řešení tohoto problému je zpětná extrakce z organického do vodného rozpouštědla.

Další překážkou extrakcí do kapalného rozpouštědla je nedostatečná účinnost extrakce, která je běžná zejména u iontových nebo amfoterních látek. Pro zvýšení výtěžnosti a selektivity se proto používá iont-párová extrakce. Je to technika založená na vzniku asociovaných komplexů iontu vzorku a protiiontu opačného náboje. Iontové

páry vytvořené mezi velkými organickými anionty a kationty jsou často rozpustné v málo polárních organických rozpouštědlech.

Problémem snižujícím výtěžnost extrakce může být také formování emulzi během procedury. Emulze vznikne snadno jsou-li smíchána dvě rozpouštědla podobné hustoty a je-li extrakční rozpouštědlo slabě bazické. Pro oddělení takto segregovaných fází se používá dělicí nálevka.

- **Extrakce na pevnou fázi – SPE**

K předčištění vzorku před analýzou se často využívá extrakčních kolonek naplněných pevným sorbentem. Taková metoda se nazývá extrakce na pevnou fázi (liquid solid extraction, solid phase extraction, SPE). Materiály používané k plnění SPE kolonek jsou obdobné materiálům používaným pro plnění HPLC kolon, ale velikost částic je v tomto případě větší (40 - 80  $\mu\text{m}$ ). Kolonky mívají průměr 10 mm a různé délky.

Mezi hlavní výhody SPE patří vysoká výtěžnost látek, jednoduché, šetrné a elegantní zakoncentrování analytů, čistota extraktu, časová nenáročnost, možnost automatizace a snížení spotřeby rozpouštědel a tím i ekonomické náročnosti. SPE je tedy velmi vhodnou metodou pro předčištění a zakoncentrování vzorku před HPLC analýzou.

### **1. Optimalizace extrakčního postupu**

Stejně jako u kapalinové chromatografie musí být postup extrakce na pevné fázi volen pečlivě. Retence analytu závisí na koncentraci vzorku, eluční síle rozpouštědla a charakteru sorbentu naplněného do extrakční kolonky. Prvním krokem je výběr vhodného sorbentu tak, aby retence analytu byla co největší. Dále musí být vybráno rozpouštědlo vhodné pro eluci sledovaného analytu tak, aby bylo kompatibilní s celou chromatografickou procedurou. Třetím krokem je otestování čisté matrice, aby byly určeny případně přítomné interferující látky. Nakonec se provede izolace známého množství sledovaného analytu z matrice a určí se výtěžnost metody (% recovery).

## **2. Způsoby provedení extrakce na pevnou fázi:**

Prvním způsobem je výběr rozpouštědla pro vzorek tak, aby sledované analyty zůstaly zadrženy na sorbentu extrakční kolony, zatímco látky, které by mohly interferovat, jsou vymyty ven. Sledované látky jsou pak eluovány malým množstvím rozpouštědla, které tyto analyty vymyje z kolony. Uvedený postup je velice užitečný, zejména je-li analyt přítomen ve velmi nízké koncentraci, protože během extrakce na pevnou fázi dochází k jeho zkoncentrování.

Alternativním postupem je zachycení interferujících látek na extrakční kolonce a eluce sledovaného analytu.

### **○ 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, 7,3MPa). Protože CO<sub>2</sub> má nízkou polaritu, rozpustnost se ovlivňuje změnou polarity pomocí přídavku modifikátorů. Rozpustnost stoupá, jestliže parametr rozpustnosti sledované látky a superkritické kapaliny se k sobě blíží.

Celé uspořádání je náročnější na technické provedení, vzhledem k vyšším tlakům v nadkritickém stavu. Vlastní extrakce probíhá v „pouzdrě“ (cartridge) vybaveném restriktorem. V některých aplikacích může být v extrakčním pouzdře rovněž sorbent. S výhodou se používá kombinace SFE–SPE.

### **○ Způsoby izolace léčivých látek z jednotlivých lékových forem**

#### **1. Tablety a další pevné lékové formy**

Pevné perorální lékové formy jako např. tablety se nejprve rozmělní. Při tomto postupu může dojít k fyzikální segregaci účinné látky od ostatních komponent. Takovému problému se předchází buď přímým rozpuštěním celé lékové formy v příslušném rozpouštědle, přesátím upráškované formy přes síto, opětovným mělněním nebo rozmělněním v přítomnosti organického rozpouštědla a jeho následným odpařením.



U enterosolventních tablet by rozmělnění pomocí třenky a tloučku mohlo vést ke špatným výsledkům, proto se matrice přesévá přes síto a znovu mělní na stejnoměrně velké částice. Obal tablety se také může odstranit působením organického rozpouštědla. Nejpřesnější výsledky dává přímé rozpuštění tablety v příslušném rozpouštědle, je-li rozpustnost látek i celé tablety dokonalá.

## **2. Krémy a masti**

Úprava vzorku komplexních lékových forem jako jsou krémy nebo masti může někdy být jednoduché rozpuštění krému/masti v organické mobilní fázi nebo jiném vhodném rozpouštědle.

Pokud takový postup nepostačí, je nutné zahřívat krém nebo mast s methanolem nebo acetonitrilem až do rozpuštění (asi 60 °C). Poté je třeba směs řádně protřepat a v některých případech zchladit v ledové lázni, dokud zase neztuhne, případně následnou centrifugací oddělit masťový základ od roztoku analytu. Některé postupy využívají liquid-liquid extrakce.

## **3. Gely**

Pro gelové lékové formy se používá např. rozpuštění ve zředěné kyselině chlorovodíkové nebo dispergování do acetonitrilu případně liquid-liquid extrakce směsí chloroform-pufr.

## **4. Lotia**

Příprava vzorků je podobná jako u mastí a krémů. Pro ředění se často používají aceton a směsi chloroformu s methanolem.

## **5. Injekce**

Injekční přípravky se obvykle připravují pouhým zředěním mobilní fází nebo jiným vhodným rozpouštědlem a poté se nastříkují přímo na chromatografickou kolonu.

## **6. Aerosoly**

Aerosoly jsou obvykle baleny do nádob s dávkovači. Standardně se k hodnocení používá celý obsah balení. Izolace se provede převedením do ethanolu a zředí nebo se zahřívá až do odpaření ostatních látek. Poté se rozpustí ve vhodném rozpouštědle.

## **7. Čípky**

Čípky se před analýzou rozpouští v dělicí nálevce s kyselinou chlorovodíkovou a chloroformem. Po rozpuštění se chloroformová vrstva odloží a vodná vrstva se podrobí chromatografické analýze.

## **8. Sirupy**

Obvykle postačí zředění vodou nebo rozpouštědly mísitelnými s vodou jako je např. methanol. Někdy je třeba upravit pH a provést extrakci do organického rozpouštědla.

## **9. Suspenze**

Příprava vzorku spočívá ve zředění případně v LLE směsí vody a nemísitelného rozpouštědla.

## **10. Fytoterapeutické přípravky**

Léčivé rostliny se používají buď samotné nebo v lékových formách, jako jsou infúze, tinktury, extrakty a jiné galenické přípravky. Nejběžnějším postupem izolace je LLE, SPE, nevratná adsorpce nebo precipitace nežádoucích komponent a acidobazické extrakce.

## **11. Transdermální preparáty**

Obvykle se odstraní ochranná vrstva a poté se účinná látka extrahuje organickým rozpouštědlem při vyšší teplotě po určitou dobu. Používá se také LLE.

### **3.3.2. STABILITA LÉČIV A LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ<sup>(7)</sup>**

Důležitým aspektem z hlediska farmaceutické analýzy je stabilita léčivého přípravku. Při zavádění každé nové léčivé látky/léčivého přípravku do praxe musí být založena stabilitní studie. Proto ICH zavedla směrnice (guidelines) pro testování stability nových léčivých látek a přípravků Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products [33], Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products [34] a Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms[35]. Dalším

(7) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [33-36]

důležitým dokumentem, obsahujícím požadavky na stabilitu léčiv je REG-83- Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, vydaný ve Věstníku SÚKL [36]. Dokument REG-83 v mnohém z výše uvedených směrnic ICH vychází a odkazuje se na ně. Všechny tyto směrnice nastiňují provedení stabilitních testů tak jak vyžaduje Registrační dokumentace.

Léčivá látka je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání 25°C/60% RV po dobu 2 let a za podmínek uchovávání 40°C/75% RV po dobu 6 měsíců. Stabilita je vlastnost léčiva (léčivého přípravku) po určitou danou dobu zachovávat stejné jakostní znaky jako v čase výroby.

V žádosti o registraci účinné látky nebo její lékové formy, tedy léčivého přípravku, je třeba uvést informaci o dokončené zrychlené stabilitní studii (6 měsíců) a založení dlouhodobé stabilitní studie (36 měsíců) – viz níže.

Významná změna stability účinné látky nastává, neodpovídá-li látka specifikacím. U léčivého přípravku je za významnou změnu považována 5% odchylka obsahu účinné látky, překročení pH limitů, špatné výsledky disolučních testů nebo fyzikálních zkoušek.

#### Stabilita léčivých přípravků:

Sleduje se hladina léčivé látky v léčivém přípravku a hladiny nečistot a degradačních produktů (více v kapitole 3.3.4.).

Zkoušky postihují změny, které snižují jakost, bezpečnost a účinnost léčivého přípravku. Stabilitní studie má hodnotit fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické vlastnosti sledované léčivé látky/léčivého přípravku. V tabulce 7 jsou uvedeny parametry, sledované při stabilitních testech: zkoušky musí být provedeny za použití validovaných a stabilitu indikujících kontrolních metod. Sledují se dvě až tři šarže daného léčivého přípravku ve stejných obalech a se stejným uzávěrem, jaké jsou navrženy pro skladování a pro trh, to znamená např. masti a další topické LP se uchovávají v tubách, tablety a dělené LP v blistrech apod.

<b>VZHLED</b>	<b>barva (tablety, masti), homogenita (masti), čírost roztoku</b>
<b>FYZIKÁLNÍ ZKOUŠKY</b>	<b>rozpadavost, pevnost, vlhkost (tablety), hustota (roztoky), pH (masti), viskozita (roztoky, masti)</b>
<b>OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK</b>	<b>min. 90% deklarovaného množství</b>
<b>OBSAH KONZERVAČNÍCH LÁTEK</b>	<b>min. 80% deklarovaného množství</b>
<b>ROZKLADNÉ PRODUKTY</b>	<b>sleduje se, zda obsah nepřesáhne daný limit</b>
<b>MIKROBIÁLNÍ NEZÁVADNOST</b>	<b>při dlouhodobých stabilitách v ročních intervalech</b>

**Tabulka 7: Parametry sledované při stabilitních testech léčivých přípravků**

Zrychlená stabilitní studie poskytuje orientační údaje o stabilitě léčiva. Skladování se liší podle lékové formy daného přípravku. Pro tablety, dražé, tobolky, pasty, krémy, masti nebo gely se používá expozice vlhkým teplem, a to dvěma způsoby:

1.  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relativní vlhkost  $75\% \pm 5\%$ , uchovávání 6 měsíců a zkoušení v časech 0, 3 a 6 měsíců
2.  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relativní vlhkost  $60\% \pm 5\%$ , uchovávání 12 měsíců a zkoušení v časech 0, 3, 6, 9 a 12 měsíců

Pro tekuté léčivé přípravky, jako jsou injekce, infuze, kapky a roztoky, kde vlhkost při skladování nemá na stabilitu vliv, skladuje se při  $30^{\circ}\text{C}$  nebo při  $45^{\circ}\text{C}$  zase buď 6 nebo 12 měsíců se stejnou frekvencí zkoušení.

Dlouhodobá stabilitní studie je uchovávání léčivého přípravku při běžných (předpokládaných) skladovacích podmínkách, nejčastěji při pokojové teplotě ( $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RV}$ ). Pro přípravky s doporučeným uchováváním například za snížené teploty ( $15^{\circ}\text{C}$ ) nebo v chladu ( $5^{\circ}\text{C}$ ) se stabilitní testy samozřejmě provádí za těchto podmínek. Vyhodnocování se obvykle provádí každé 3 měsíce v prvním roce, každých 6 měsíců v druhém roce a jednou ročně v dalších letech. Dlouhodobé stabilitní testy pokrývají celou dobu použitelnosti LP.

Prakticky se stabilitní testy provádějí uchováváním sledovaných látek/léčivých přípravků v klimatizačních boxech nebo v klimatizačních skříních, kde je požadovaná teplota a vlhkost zajištěna a zároveň monitorována za použití výpočetní techniky.

### Stresové (zátěžové) zkoušky

Zátěžové zkoušky léčivé látky mohou pomoci identifikovat pravděpodobné rozkladné produkty, což může následně pomoci stanovit mechanismus degradace a vnitřní stabilitu molekuly, a mají ověřit, že použité analytické metody jsou stabilitu indikující.

Pro léčivou látku mohou být použity tyto postupy:

- a) pokud je léčivá látka popsána v monografii uznávaného lékopisu (Evropský lékopis nebo lékopisy členských států EU) a zcela splňuje její požadavky, nejsou požadovány žádné údaje o rozkladných produktech, pokud jsou tyto uvedeny v odstavci „Zkoušky na čistotu“ a/nebo v odstavci „Nečistoty“ příslušné monografie
- b) pro léčivou látku nepopsanou v monografii uznávaného lékopisu mohou být použity dva postupy:
  - předpokládaný mechanismus degradace může být doložen údaji publikovanými ve vědecké literatuře
  - jestliže ve vědecké literatuře, včetně oficiálních lékopisů, nejsou dostupné žádné údaje, je třeba provést zátěžové zkoušky.

Zátěžové zkoušky je možné provádět s jednou šarží léčivé látky. Mají zahrnovat vliv teploty (přírůstky po 10°C - např. 50°C, 60°C atd. - oproti teplotě, při níž je prováděna zrychlená stabilitní studie), vliv vlhkosti (např. 75 % RV nebo více), je-li to vhodné, vliv vzdušného kyslíku (oxidace), vliv světla (fotolýza) na léčivou látku. Zkoušky také mají hodnotit stabilitu léčivé látky v roztoku nebo v suspenzi (hydrolýza) v rámci širokého rozmezí hodnot pH. Nedílnou součástí zátěžových zkoušek mají být zkoušky fotostability. Standardní podmínky pro zkoušky fotostability jsou popsány v pokynu ICH Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products [34]. Sledování rozkladných produktů během zátěžových zkoušek je užitečné pro stanovení mechanismu degradace a pro vývoj a validaci vhodných analytických metod. Nemusí

však být nutné uvádět ve specifikaci ty rozkladné produkty, pro něž bylo prokázáno, že nevznikají za podmínek dlouhodobé ani zrychlené studie.

Jako doklad o provedených stabilitních zkouškách je součástí registrační dokumentace protokol o stabilitě. Protokol obsahuje:

- název přípravku, výrobce
- sílu a lékovou formu přípravku
- čísla a velikosti zkoušených šarží, datum a místo výroby
- složení zkoušených šarží
- výrobce léčivé látky
- popis vnitřního obalu

Uvedou se limity pro jednotlivé zkoušky platné během doby použitelnosti a metody, jakými byly zkoušky prováděny. Může být uveden odkaz na metodu popsanou v jiné části dokumentace (včetně validace metody). V případě, že jde o metodu tímto způsobem nepopsanou, vyžaduje se přesný popis a validace metody.

Výsledky jsou shrnuty přehledně do tabulek pro každou šarži, kde jsou uvedeny počáteční hodnoty, výsledky dosažené během stabilitní studie a limity jednotlivých zkoušek. Na základě vyhodnocení mají být určeny podmínky pro uchovávání, druh vnitřního obalu a doba použitelnosti.

### **3.3.3. NEČISTOTY V LÉČIVECH A LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH<sup>(8)</sup>**

Hodnocení nečistot ve farmaceutických přípravcích se řídí ICH směrnicemi Q3A(R): Impurities in New Drug Substances (Revised Guideline)[37], Q3B(R): Impurities in New Drug Products (Revised Guideline)[38], Q3C: Impurities: Guideline for Residual Solvents [39] a Q3C(M): Impurities: Guideline for Residual Solvents (Maintenance) [40]. ICH směrnice tedy slouží jako výchozí podklady při přípravě registrační dokumentace v ohledu přítomnosti nečistot v nové léčivé substanci/léčivém přípravku, jejich kvalifikace a kvantitativního hodnocení.

Nečistotami v léčivé látce se zabývá především výrobce léčiva, který při jeho prodeji opatří produkt takzvaným Drug Master File (DMF), kde je nejen detailně daná

(8) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [37-41]

látka popsána, ale kde jsou také uvedeny nečistoty a degradační produkty, jejichž hladina by se měla během stability sledovat.

Je-li účinek nově vyvinuté léčivé látky identifikován a potvrzen, je látka zavedena do výroby v menším měřítku. Každá šarže 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.

Kromě limitů pro obsah účinné látky jsou stanoveny také limity pro jednotlivé nečistoty a pro celkovou sumu nečistot příbuzných účinné látce. 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.

Směrnice - Q3A [37] definuje nečistoty v nové léčivé substanci a probírá jejich přítomnost v léčivé látce z chemického hlediska a z hlediska bezpečnosti. Zahrnuje rozdělení nečistot a jejich identifikaci z chemického hlediska, vytváření protokolu o přítomnosti nečistot, pravidla uvádění nečistot ve specifikacích a také podmínky pro použité analytické metodiky.

Dále je zde uvedena kvalifikace nečistot, které nebyly přítomny v původních šaržích použitých pro testování bezpečnosti a klinické studie účinné látky a dále také kvalifikace nečistot, které byly v těchto šaržích přítomny v podstatně nižším množství.

Definice nečistoty podle ICH: Nečistota je jakákoliv složka nové léčivé substance, která není chemickou entitou definovanou jako nová léčivá substance. Profil nečistot pak zahrnuje definované i nedefinované nečistoty přítomné v nové léčivé substanci. Individuální nečistoty uvedené ve specifikaci se svým specifickým rozmezím tolerance se nazývají definované nečistoty, tyto mohou být buď známé (kdy byla provedena identifikace jejich struktury) nebo neznámé struktury (definované kvalitativní analytickou charakteristikou, jako je např. retenční čas). Nedefinované nečistoty naopak nemají vlastní specifické rozmezí tolerance jejich přítomnosti, jsou regulovány obecnými kritérii. Dále se sleduje obsah tzv. jakékoliv nedefinované nečistoty. Pokud její obsah přesáhne hodnotu danou specifikací, je třeba ji identifikovat.

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

- **Organické nečistoty**

Vznikají během výrobního procesu nebo/a při uchovávání léčivé substance. Mohou být známé nebo neznámé, těkavé nebo netěkavé. Patří sem výchozí materiál pro syntézu, vedlejší produkty, meziprodukty, rozkladné produkty a činidla, ligandy nebo katalyzátory.

- **Anorganické nečistoty**

Jsou většinou rezidua výrobního procesu. Bývají převážně známé a patří mezi ně činidla, ligandy, katalyzátory, těžké kovy nebo ostatní rezidua kovů, anorganické soli a ostatní materiály (jako jsou např. materiály filtrů nebo aktivní uhlí).

- **Rozpouštědla**

Anorganické nebo organické kapaliny používané jako média pro přípravu roztoků nebo suspenzí při syntéze nové léčivé substance. Protože jsou obvykle toxická, jejich výběr a adekvátní kontrola je přesně popsán ve třetí směrnici Q3C[39].

## **1. Nečistoty v léčivých látkách**

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 [41].

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. Kritéria tolerance by neměla být stanovena výše, než je doporučeno studií bezpečnosti účinné látky. V tabulce 8 je uvedeno, jak by měl vypadat popis nečistot ve specifikaci.

Organické nečistoty	- každá definovaná známá nečistota - každá definovaná neznámá nečistota - jakákoliv nedefinovaná nečistota (včetně kritéria tolerance) - celková suma nečistot
Zbytková rozpouštědla	
Anorganické nečistoty	

**Tabulka 8: Popis nečistot ve specifikaci**

Další podrobnosti, definice některých pojmů a stanovení identifikačního prahu (limit, nad kterým by měla být nečistota identifikována), kvalifikačního prahu (limit, nad kterým by měla být nečistota kvalifikována, což znamená stanovení biologické bezpečnosti nečistoty) a prahu uvedení ve zprávě jsou popsány v příslušné směrnici [37].

## 2. Nečistoty v léčivém přípravku

Nečistotami v novém léčivém přípravku se zabývá druhá směrnice ICH Q3B 38. Předmětem směrnice je poskytovat návod pro žadatele o registraci v oblasti stanovení obsahu a kvalifikace nečistot přítomných v nových léčivých přípravcích, které jsou vyrobeny z nových dosud neregistrovaných léčivých látek.

Obecně, nečistoty přítomné v nové léčivé substanci nemusí být znovu monitorovány nebo specifikovány v novém léčivém přípravku, pokud nejsou zároveň

degradačními produkty (dle další směrnice Q6A-Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria For New Drug Products: Chemical Substances [41]).

Součástí registrační dokumentace nového léčivého přípravku je validace analytické metody pro detekci a kvantifikaci rozkladných produktů, kde je prokázána vhodnost této metody podle příslušných předpisů (kapitola 3.4.). Důležitým parametrem je zejména selektivita jak pro definované tak pro nedefinované rozkladné produkty. Validace by měla zahrnovat i vzorky uchovávané při stresových podmínkách - světlo, teplo, kyselá/bazická hydrolýza a oxidace. Jsou-li v chromatogramu přípravku přítomny jiné píky než rozkladné produkty (např. účinná látka, nečistoty ze syntézy účinné látky, pomocné látky nebo nečistoty z nich pocházející), měly by být označeny a jejich původ popsán ve validační zprávě.

Specifikace nového léčivého přípravku musí obsahovat seznam rozkladných produktů, které lze očekávat během výroby a při skladování za doporučených podmínek. Pro charakteristiku degradačních produktů se použijí údaje ze stabilitních studií, znalosti degradačních mechanismů a údaje z dalších provedených laboratorních studií. Výběr rozkladných produktů pro Specifikaci nového léčivého přípravku by měl být založen na údajích o rozkladných produktech v léčivém přípravku vyrobených postupem, který se bude používat pro výrobu komerčních šarží. Platí zde stejná pravidla pro rozlišení definovaných a nedefinovaných nečistot jako u specifikací pro novou léčivou látku s tím rozdílem, že termín nečistota je nahrazen termínem degradační (rozkladný) produkt.

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 nesmí být nastaveno výše, než je kvalifikovaná hladina degradačního produktu.

Ve specifikaci nového léčivého přípravku by měly být uvedeny tyto degradační produkty:

1. každý definovaný známý degradační produkt
2. každý definovaný neznámý degradační produkt
3. jakýkoliv nedefinovaný degradační produkt a kritérium jeho tolerance
4. celkovou sumu přítomných degradačních produktů

Za kvalifikované hladiny degradačních produktů mohou být považovány hladiny degradačních produktů přítomných nalezené v novém léčivém přípravku, který byl testován na bezpečnost nebo/a podlehl klinickým studiím. Degradací produkty, které jsou zároveň významnými metabolity přítomnými v živočišných a/nebo v lidských klinických studiích jsou obecně považovány za kvalifikované.

### 3. Zbytková rozpouštědla

Problematiku zbytkových rozpouštědel řeší směrnice Q3C [39,40]. Jejich účelem je doporučit akceptovatelné množství pro zbytková rozpouštědla ve farmaceutickém přípravku z hlediska bezpečnosti pacienta. Směrnice doporučuje použití méně toxických rozpouštědel a definuje hladiny považované za toxikologicky akceptovatelné.

Zbytková rozpouštědla jsou definována jako těkavé organické látky, které se používají nebo vznikají při výrobě léčivé látky, pomocných látek nebo léčivého přípravku. Rozpouštědla nejsou kompletně odstranitelná praktickými výrobními technikami. Vhodný výběr rozpouštědla pro syntézu může zvýšit výtěžnost nebo ovlivnit charakteristiky jako je krystalická forma látky, čistota a rozpustnost. Proto rozpouštědlo může být i kritickým faktorem syntetického procesu.

Protože rozpouštědla nemají žádnou terapeutickou hodnotu, měla by být odstraněna až na minimum obsahu, který splňuje specifikaci produktu, SVP a případně další požadavky kvality. Léčivé přípravky by neměly obsahovat vyšší hladiny zbytkových rozpouštědel než doporučují bezpečnostní data.

Zbytková rozpouštědla jsou obvykle analyzována chromatografickými metodami, zejména GC. ČL 2005 uvádí v kapitole 2.4.24 – Totožnost a kontrola zbytkových rozpouštědel kontrolu totožnosti, limitních množství i kvantifikaci zbytkových rozpouštědel v léčivých látkách, pomocných látkách nebo v léčivých přípravcích. Jsou předepsány dvě metody plynové chromatografie se statickým head-space nástřikem. Kapitola 5.4. – Zbytková rozpouštědla je věnována rozpouštědlům z obecného hlediska. Tento článek vychází ze směrnic ICH [47,48].

### 3.4. VALIDACE ANALYTICKÉ METODY<sup>(9)</sup>

Analytické metody používané pro monitorování kvality léčiv musí být vhodné, přesné a spolehlivé. Vhodnost, přesnost a spolehlivost musí být experimentálně doložena a tento proces se nazývá validace analytické metody.

Validace analytické metody je série experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití. Cílem validace je vyšetřit praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný a zajistit, aby při opakovaném použití v jedné nebo různých laboratořích dávala metoda stále stejně spolehlivé výsledky.

Validace analytické chemie je oddělený akt. Obecně je postup vývoje takový, že se nejprve definují požadavky na zkušební metodu. Poté se vyvine metoda, najdou se optimální podmínky a třetím bodem postupu je validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel a že splňuje na začátku definované požadavky. Pravidla pro validaci metod ve farmacii se řídí platnými předpisy a doporučeními, zejména ICH směrnici (guideline) Q2(R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [43], předpisy americké FDA obecně zaměřenými na validaci chromatografických metod [44], platnými lékopisy ČL 2005 [6], Ph. Eur. 5 [45] a USP 29 [46], dále pak vnitřními normami a předpisy podléhajícími pravidlům režimu SVP, SLP nebo akreditace, jim příslušejícími SOP (standardní operační postup) a také požadavky SÚKL uveřejňovanými v časopise Věstník SÚKL.

V České Republice byly standardní požadavky na registrační dokumentaci zavedeny 1. 1. 1992 Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Pravidla validace analytické metody byla přesněji charakterizována později Věstníkem SÚKL 1/1994[42]. RNDr. J. Šabartová je autorkou statě týkající se požadavků definice jednotlivých validačních parametrů, jejichž základem jsou požadavky všech výše zmíněných institucí a kde jsou shrnuty standardní požadavky na registrační dokumentaci včetně dokladů o validaci analytické metody.

Jak z uvedeného vyplývá, existuje velké množství předpisů týkajících se problematiky validace a je třeba se v nich určitým způsobem orientovat. Mezi jednotlivými autoritami jsou určité odlišnosti např. co se týče parametrů vyžadovaných

(9) Tato kapitola byla vypracována ze zdrojů [6,42-57]

jako součást validace metody nebo platných limitů pro jednotlivé parametry. Je tedy důležité uvědomit si a přesně definovat, pro jaký účel bude metoda vypracována a jakou autoritou bude poté schvalována. Problematikou rozdílů a shod validačních požadavků některých zmíněných autorit (FDA, ICH a USP) se zabývá např. G. A. Shabir [47] ve své publikaci pojednávající o validaci HPLC metod ve farmaceutické analýze.

V tabulce 9 jsou shrnuta doporučení vybraných institucí, zabývajících se validačními procesy.

	ICH	SÚKL	USP
<b>Validační charakteristiky</b>			
<b>Správnost (Accuracy)</b>	+	+	+
<b>Přesnost (Precision)</b>			
- <b>Opakovatelnost (Repeatability)</b>	+	+	+
- <b>Intermediární přesnost (Intermediate Precision)</b>	-	-	-
- <b>Reprodukovatelnost (Reproducibility)</b>	-	-	-
<b>Selektivita (Selektivity)</b>	-	+	-
<b>Specifita (Specificity)</b>	+	-	+
<b>Limit detekce (Limit of Detection)</b>	+	+	+
<b>Limit kvantifikace (Limit of Quantitation)</b>	+	+	+
<b>Linearita (Linearity)</b>	+	+	+
<b>Rozsah (Range)</b>	+	-	+
<b>Robustnost (Robustness)</b>	+	+	-
<b>Ragidita (Ruggedness)</b>	-	-	-
<b>SST</b>	+	+	+

**Tabulka 9: Doporučení jednotlivých validačních parametrů vybranými autoritami**

Postup validace je různý v závislosti na validované proceduře. Ty jsou podle ICH rozděleny do čtyř hlavních skupin, které se liší doporučovými validačními parametry:

- Identifikační testy
- Kvantitativní stanovení nečistot
- Limitní zkoušky pro nečistoty
- Kvantitativní stanovení účinné látky v léčivé substanci případně v léčivém přípravku, stanovení vybrané složky v léčivém přípravku

V tabulce 10 jsou shrnuty typy analytických procedur a doporučení příslušných validačních parametrů, jak doporučuje ICH.

Typ analytické metody	Identifikační testy	Kvantitativní stanovení nečistot	Limitní zkoušky pro nečistoty	Kvantitativní stanovení účinné látky
<b>Validační charakteristiky</b>				
Správnost	-	+	-	+
Přesnost				
- Opakovatelnost	-	+	-	+
- Intermediární přesnost	-	+	-	+
Selektivita	+	+	+	+
Limit detekce	-	-	+	-
Limit kvantifikace	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Robustnost	-	+	-	+

**Tabulka 10: Typy analytických procedur a doporučení příslušných validačních parametrů**

Validaci analytické metody je nutné provést při zavádění jakékoliv nové analytické metody v laboratoři. Metoda musí být revalidována, došlo-li ke změně analytického postupu v rozmezí jiných, než je povoleno příslušnými lékopisy, případně SOP, zahrnují-li tuto informaci a je-li schválena relevantní autoritou. V případě analýzy farmaceutických přípravků je nutné metodu znovu validovat, došlo-li ke změně výrobního postupu, je-li možná přítomnost dalších nečistot dosud nepopsaných v „Drug Master File“ dokumentaci nebo byla-li změněna jakákoliv účinná nebo pomocná látka.

### **3.4.1. TEST VHODNOSTI SYSTÉMU (SYSTEM SUITABILITY TEST)**

Protože je nutné přesně definovat podmínky, za kterých se má metoda použít, musí být jednoznačně dány všechny podmínky, což u instrumentálních fyzikálně-chemických metod (a především chromatografických) není v podstatě možné. Proto musí být uvedena kritéria, která musí být splněna, aby bylo možné určitý analytický systém spolehlivě použít. Vytvořit tato kritéria je dalším cílem validačního procesu. Tato kritéria se všeobecně označují jako test způsobilosti analytického systému (System Suitability Test, SST).

U chromatografických metod je nutné použít takové podmínky, aby byla zajištěna účinnost a separační schopnost konkrétního chromatografického systému, i kdyby se tyto podmínky lišily od podmínek popsanych v postupu v určité toleranci. Proto se test způsobilosti, který je součástí chromatografické metody, provádí při každé změně chromatografického systému, před každou novou sérií měření nebo před použitím v jiné laboratoři.

V rámci SST se zjišťují parametry vhodnosti analytického systému jako celku (zahrnuto je přístrojové vybavení, elektronika, analytické operace i analyzovaný vzorek) ověřením odpovídajících chromatografických parametrů: opakovatelnost nástřiku, rozlišení píků, asymetrie píku (faktor symetrie píku), kapacitní faktor (charakteristika relativní retence), počet teoretických pater (charakteristika účinnosti systému). Pro hodnocení System Suitability Testu se používají roztoky standardních látek, obvykle o koncentraci blízké koncentracím očekávaným ve vzorku. Doporučené limity jednotlivých sledovaných veličin jsou znázorněny v tabulce 11. Některé autority vyžadují případně stanovení relativní retence vedle kapacitního faktoru.

SST parametr	Doporučený limit
počet teoretických pater	$N > 2000$
asymetrie píku/ faktor symetrie	$T = 0,8 - 1,5$
rozlišení píků	$R_{ij} > 1,5$
kapacitní faktor	$k > 2$
opakovatelnost- retenční čas	R.S.D. < 1% $\geq 5$ nástřiků
opakovatelnost-plocha píku	R.S.D. < 1% $\geq 5$ nástřiků

**Tabulka 11: Parametry Testu vhodnosti systému a jejich běžně doporučené limity.**

ČL 2005 uvádí pro jednotlivé separační metody rozsah, v němž mohou být různé parametry chromatografické zkoušky upraveny tak, aby byla splněna kritéria způsobilosti systému, aniž by při tom došlo k podstatnému pozměnění metody. V lékopisných metodách jsou začleněny testy způsobilosti systému, aby se zajistila separace požadovaná pro uspokojivé provedení zkoušky na čistotu nebo stanovení obsahu. Protože použité stacionární fáze jsou popsány obecně a komerčně je k dispozici celá řada takovýchto fází, lišících se navzájem chromatografickým chováním, může být upravení chromatografických podmínek nezbytné pro splnění předepsaných požadavků na způsobilost systému. U kritických parametrů je jejich úprava jasně stanovena tak, aby se zajistila způsobilost systému.

V kapalinové chromatografii jsou povoleny tyto úpravy systému [6]:

**Složení mobilní fáze:** Množství minoritní složky rozpouštědla se může upravit v rozmezí  $\pm 30$  relativních procent nebo  $\pm 2$  absolutní procenta, podle toho, která hodnota je větší. Žádnou další složku nelze měnit o více než 10 absolutních procent.

**pH vodné složky mobilní fáze:**  $\pm 0,2$  hodnoty pH, pokud není uvedeno jinak v lékopisném článku, nebo  $\pm 1,0$  hodnoty pH, když je zkoušená látka neutrální.

**Koncentrace solí** v tlumivém roztoku tvořícím součást mobilní fáze je  $\pm 10$  %.

**Vlnová délka detektoru:** Není dovoleno žádné upravování.

**Stacionární fáze:**

– délka kolony:  $\pm 70$  %;

– vnitřní průměr kolony:  $\pm 25$  %;



– *velikost částic*: zmenšení nejvýše o 50 %, zvětšení není dovoleno.

**Průtoková rychlost:**  $\pm 50$  %.

**Teplota:**  $\pm 10$  %, nejvýše 60 °C.

**Nastříkovaný objem** se může zmenšit za předpokladu, že detekce píků a opakovatelnost (plochy a retenčního času) stanovovaného píku (píků) je vyhovující.

**Gradientová eluce:** Konfigurace použitého zařízení může významně změnit rozlišení, retenční čas a relativní retence popsané v konkrétní metodě. To může být způsobeno zvětšeným mrtvým objemem, což je objem mezi začátkem kolony kolony a bodem, v němž dochází ke smíchání dvou složek mobilní fáze.

### 3.4.3. VALIDAČNÍ PARAMETRY

V následující kapitole je každý parametr validace definován a jsou uvedena hlediska (doporučení) jednotlivých autorit, zabývajících se validacemi. Protože USP ve validacích vychází z ICH směrnic, jsou popsána vždy hlediska SÚKLu a ICH.

#### 3.4.2.1. PŘESNOST (PRECISION)

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom homogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom homogenizovaném vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji. V tomto případě jde o přesnost při převodu metody z jedné laboratoře do druhé.

Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze šesti nezávislých analýz homogenizovaného vzorku, provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Jde o zjištění chyby celého analytického postupu, tedy jak instrumentální části, tak postupu přípravy vzorku. Nestačí proto jen například šestkrát nastříknout do chromatografu jeden roztok, ale je nutné připravit kompletním postupem šest roztoků vzorku.

*SÚKL* požaduje jen opakovatelnost metody, tedy přesnost metody při provedení jedním analytikem, na jednom přístroji, se stejnými činidly.

*ICH* zahrnuje do tohoto parametru nejen opakovatelnost, což je podle *ICH* ověření přesnosti metody za stejných podmínek, během krátké časové doby, ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem (zde se shoduje *ICH* se *SÚKLe*m). Měla by být určována na třech koncentračních hladinách pokrývajících specifikované rozmezí, tedy minimálně devět měření (tři nástřiky při jednotlivých koncentracích). Druhou možností je ověření přesnosti na úrovni 100% zkoušené koncentrace šesti opakovanými měřeními. Další součástí přesnosti dle *ICH* je intermediární přesnost (intermediate precision, intra-laboratorní přesnost), což je ověření přesnosti metody jiným analytikem, na jiném přístroji a v jiný den, ale ve stejné laboratoři. Reprodukovatelnost (reproducibility, inter-laboratorní přesnost) se testuje při standardizaci metody, počítá-li se s jejím přenosem mezi různými laboratořemi, například v případě zavádění lékopisných metod.

#### **3.4.2.2. SPRÁVNOST (ACCURACY)**

Správnost analytické metody je odchylka jejího výsledku od správné hodnoty. Správnost metody by měla být stanovena v celém jejím rozsahu.

Problémem je zjištění správné hodnoty. Používají se tři metody stanovení správnosti:

1. Správná hodnota se zjistí jinou, nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena;
2. Analyzuje se modelový vzorek, což je směs placebo LP s přidáním standardem o známém složení analytů;
3. Pokud není k dispozici placebo LP, analyzuje se vzorek s přídavkem standardní látky.

V případě kvantitativní analýzy nečistot by měla být správnost zhodnocena na vzorcích (léčivo nebo léčivý přípravek) spikovaných známým množstvím nečistot. Pokud není možno sehnat vzorky určitých nečistot nebo degradačních produktů, měly by být výsledky srovnány s jinými, dosaženými jinou nezávislou metodou. V případě, že nejsou jiné informace, může být nutné počítat množství nečistoty založené na

srovnání její odezvy k odezvě léčiva jako podíl odezev stejných množství nečistoty a léčiva (odezvový faktor).

Správnost se vyjadřuje jako procento výtěžnosti (R) obsahu přidaného známého množství analytu k placebo LP nebo vzorku nebo jako rozdíl mezi průměrným výsledkem měření a správnou hodnotou. Pokud se analyzuje modelový vzorek, přidává se standardní látka v množství menším i větším, než je deklarovaný obsah (např. 10%, 50% apod.). Zároveň se dokládá relativní směrodatná odchylka.

$$R = \frac{\text{nalezená hodnota} \times 100}{\text{skut.hodnota}}$$

**SÚKL** požaduje jen jednu hladinu, tedy stanovení minimálně šesti různých modelových vzorků s přibližně 100% obsahem stanovované látky.

**ICH** doporučuje provedení nejméně devíti stanovení minimálně tři koncentračních úrovní, pokrývajících rozsah metody (tzn. tři koncentrační úrovně a tři opakované analýzy každé koncentrace)

### **3.4.2.3. LINEARITA (LINEARITY)**

Linearita je schopnost analytické metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Dalším parametrem, uváděným v této souvislosti je rozsah. Je to interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky (včetně těchto hladin), v němž je látka stanovena s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace. Rozsah se běžně vyjadřuje ve stejných jednotkách, jako výsledky analýzy (nejčastěji %).

Závislost u každé metody nemusí být lineární, může být vyjádřena jinou matematickou funkcí, ale je nutné při každém použití metody vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky.

Linearita analytické metody se dokládá jednak graficky jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky, jednak matematicky pomocí výsledků lineární regrese. Uvádí se korelační koeficient, směrnice přímky, úsek na ose Y a chyby stanovení všech těchto hodnot. Korelační koeficient je mírou linearity, směrnice citlivosti a úsek na ose Y mírou vedlejších vlivů.

**SÚKL** požaduje potvrzení linearity v rozmezí 50% až 150% deklarovaného obsahu stanovované látky a stanovení minimálně pěti různých koncentrací standardní látky. Je považováno za dostačující potvrzení závislosti s roztoky standardní látky, protože rušivé vlivy, které by se projevily při použití roztoku vzorku, jsou postiženy jinými parametry validace (selektivita, správnost). Není požadováno stanovení parametru rozsah.

**ICH** doporučuje pro prokázání linearity metody stanovení minimálně pěti koncentračních hladin. Rozmezí kalibrační křivky ICH stanovuje rozdílně pro různé druhy stanovení. Pokud se stanovuje obsah léčivé látky v léčivém přípravku, doporučuje rozmezí 80% až 120% deklarovaného množství. V rámci stanovení obsahu nečistot se doporučuje rozmezí 50% až 120% limitní hodnoty pro obsah nečistoty v přípravku.

#### **3.4.2.4. DETEKČNÍ LIMIT (LIMIT OF DETECTION)**

Detekční limit je charakteristikou limitních testů v rámci stanovení nečistot. Při limitních testech se zjišťuje jen je-li látka nad nebo pod určitou hladinou. Detekční limit je nejnižší množství analytu, které je možno detekovat, ale nemusí se stanovovat. Detekční limit se vyjadřuje obvykle jako koncentrace (v miligramech na litr, % apod.).

Stanovení detekčního limitu závisí na tom, jestli jde o metodu neinstrumentální nebo instrumentální. U neinstrumentálních metod se hledá tento limit experimentálně. Analyzují se vzorky o známé koncentraci stanovované látky a určí se minimální koncentrace, kdy je možné ještě látku detekovat.

U instrumentálních metod se detekční limit zjišťuje na základě šumu pozadí systému. Jednou možností je stanovení směrodatné odchylky odezvy slepého vzorku (placeba LP), jejíž trojnásobek odpovídá detekčnímu limitu. Získaná hodnota se porovná s naměřeným signálem vzorku se známou nízkou koncentrací stanovované látky. Jiná metoda je založena na stanovení směrnice kalibrační přímky a směrodatné odchylky odezvy detektoru. Každý výsledek by měl být následně validován na dostatečném (reprezentativním) množství vzorků.

Obě sledované autority (SÚKL i ICH) se v doporučeních provádění a dokládání detekčního limitu shodují.

### **3.4.2.5. KVANTITATIVNÍ LIMIT (LIMIT OF QUANTITATION)**

Kvantitativní limit je důležitý při kvantitativním stanovení obsahu nečistot. Kvantitativní limit je nejnížší množství analytu, které je možno stanovit s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit se vyjadřuje obvykle jako koncentrace (v miligramech na litr, % apod.). Používá se například při stanovování obsahu nečistot v surovinách pro přípravu léčivých přípravků nebo při stabilitních testech léčivých přípravků, kdy se sledují hladiny degradačních produktů léčivých látek.

Stanovení kvantitativního limitu závisí na tom, jestli jde o metodu neinstrumentální nebo instrumentální. U neinstrumentálních metod se tento limit hledá experimentálně. Analyzují se vzorky o známé koncentraci stanovované látky a určí se minimální koncentrace, kdy je možné ještě látku stanovit s přijatelnou přesností a správností.

U instrumentálních metod se kvantifikační limit zjišťuje na základě šumu pozadí systému. Jednou možností je stanovení směrodatné odchylky odezvy slepého vzorku (placeba LP), jejíž desetinásobek odpovídá kvantitativnímu limitu. Získaná hodnota se porovná s naměřeným signálem vzorku se znám nízkou koncentrací stanovované látky. Jiná metoda je založena na stanovení směrnice kalibrační přímky a směrodatné odchylky odezvy detektoru. Každý výsledek by měl být následně validován na dostatečném (reprezentativním) množství vzorků.

Obě sledované autority (SÚKL i ICH) se v doporučeních provádění a dokládání kvantitativního limitu shodují.

### **3.4.2.6. SELEKTIVITA (SELECTIVITY)**

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek. Těmi mohou být další účinné složky u kombinovaných léčivých přípravků, pomocné látky v placebo, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla a další neznámé látky.

Je nutné doložit, že je metoda dostatečně selektivní pro dané použití. Metoda pro stanovení obsahu účinné látky nesmí být rušena výchozími látkami, vedlejšími produkty, pomocnými látkami, dalšími složkami přípravku nebo zbytkovými rozpouštědly. U metod pro stabilitní studie musí být doloženo oddělení degradačních

produktů. Naopak například metody pro disoluci nebo obsahovou stejnoměrnost nemusí být nutně selektivní. Je třeba hodnotit analýzu přípravku komplexně. Například rutinní metoda pro stanovení obsahu nemusí být nutně selektivní, je-li doplněna vhodnou další zkouškou na čistotu. Metoda pro stanovení obsahu účinné látky při výstupní kontrole nemusí být selektivní vzhledem k degradačním produktům, protože v tomto případě se nepředpokládá jejich přítomnost.

Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placeba léčivého přípravku nebo různými nečistotami. Jsou-li rozkladné produkty neznámé nebo nedostupné, je možno selektivitu prokázat jako výtěžnost standardního přídavku čisté látky k materiálu, obsahujícímu stálé množství jiných látek. Jinou možností je srovnání výsledků analýzy vzorku obsahujícího nečistoty s výsledky dalších zkoušek na čistotu.

**SÚKL** nepožaduje číselné doložení selektivity, ale je nutné přiložit například chromatogramy placeba léčivého přípravku, známých vedlejších a rozkladných produktů nebo chromatogramy vzorků po rozkladu teplem, světlem, kyselou/bazickou hydrolýzou, oxidací apod.

**ICH** (a zároveň USP) uvádějí parametr specifita (Specificity). Tento parametr je shodný jako selektivita, rozdíl je pouze v názvu. V USP je zároveň uvedeno, že uznávané autority (IUPAC, AOAC) dávají přednost termínu selektivita, přičemž termín specifita si rezervují pro metody, které jsou zcela specifické. Doporučení ICH pro dokládání selektivity (specifity) jsou v podstatě shodná s doporučeními SÚKLu s tím, že jsou upřesněna nutností označit řádně píky na dokládaných chromatogramech a uvádějí možnost stanovení čistoty píků (Peak purity) například pomocí diod array detektoru nebo hmotnostní spektrometrie.

#### **3.4.2.7. ROBUSTNOST (ROBUSTNESS)**

Robustnost je míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Je to vlastně reprodukovatelnost výsledků z parametru přesnost (definice SÚKLu).

Podle *ICH* je robustnost míra odolnosti metody vůči malým, ale úmyslným změnám parametrů metody. Robustnost poskytuje údaj o spolehlivosti metody při běžném užívání.

V komentáři tohoto parametru se *SÚKL* s *ICH* v podstatě shoduje, když uvádí, že robustnost je mírou schopnosti metody poskytovat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když pracovní postup zůstává zachován. Robustnost znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. Číselně je možno dokládat robustnost stanovením reprodukovatelnosti.

*SÚKL* nepožaduje číselné doložení, ale je velmi užitečné uvést v dokumentaci poznatky z vývoje metody, tj. upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky, například vliv pH vodné složky mobilní fáze, vliv teploty, stabilita vzorku v roztoku, vliv různých šarží činidel, u HPLC vliv změny kolony, rámeček změny eluentu apod.

Podobně nahlíží na dokládání a hodnocení robustnosti metody i *ICH*.

Americký lékopis uvádí jako další parametr validace „Ruggedness“, což se většinou překládá jako ragidita. V definici se uvádí, že ragidita je stupeň reprodukovatelnosti výsledků v analýze stejného vzorku při různých podmínkách, jako jsou rozdílné laboratoře, rozdílní analytici, rozdílné vybavení, různé šarže činidel, doba analýzy apod. Ragidita je měření reprodukovatelnosti výsledků při změnách podmínek očekávaných při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé nebo z analytika na analytika.

Porovnáním definice pro robustnost, jak ji uvádí *SÚKL* a definice pro ragiditu, jak ji uvádí *USP* lze dojít k závěru, že jsou tyto parametry v podstatě shodné. *USP* zároveň neuvádí ragiditu jako doporučovaný parametr validace, pouze ji v komentáři zmiňuje.

Nelze obecně požadovat konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů, záleží na použité metodě, jejím cíli i vzorku, jež je analyzován. Přijatelnost získaných hodnot validačních parametrů v konkrétním případě musí posoudit příslušný analytik. Nejsou nutné všechny parametry u každé metody, záleží na účelu použití metody. Budou se lišit pro metodu stanovení obsahu majoritní složky, tj. účinné látky nebo konzervancí, pro metodu stanovení nečistot nebo zkoušky lékové formy daného léčivého přípravku.

Ke každému případu se musí přistupovat rozumně, aby byla zaručena potřebná kvalita a přitom se nedělala zbytečná práce.

V tabulce 12 jsou shrnuty jednotky vyjádření jednotlivých validačních parametrů, včetně doporučených limitů.

Validační parametr	Jednotky/vyjádření	Doporučené Limity
přesnost (opakovatelnost)	[% RSD]	RSD < 5%
linearita	korelační koeficient	R > 0,9990
linearita	graficky rovnice přímky	-
správnost	[% RSD]	RSD < 5%
správnost	[% výtěžnost]	100±5%
selektivita	chromatogramy	žádná interference
LOD	[g ml <sup>-1</sup> ]	-
LOQ	[g ml <sup>-1</sup> ]	-
stabilita – laboratorní teplota	[% faktor stability] změny	1%
stabilita - 4°C	[% faktor stability] změny	1%

**Tabulka 12: Doporučované limity jednotlivých validačních parametrů**

### 3.4.3. VALIDAČNÍ ZPRÁVA (PROTOKOL)

Validační zpráva je záznam o validaci ve formě protokolu, který obsahuje všechny detaily o provedené validaci analytické metody. Úvodem musí obsahovat popis chemikálií, jejich původ a čistotu, popis instrumentálního vybavení a analytických podmínek metody (podmínky separace a detekce v případě kapalinové chromatografie), popis přípravy vzorku a výpočtů obsahů všech stanovovaných složek (včetně použitého vzorce či programu).

Další částí zprávy jsou podrobnosti vlastní validace. Musí být uveden Test způsobilosti systému zahrnující všechny sledované parametry včetně definice a způsobu výpočtu jednotlivých veličin. Výsledky by měly být uvedeny formou přehledných tabulek a konfrontovány s požadovanými limity. Parametry vlastní validace spolu s popisem přesného postupu u každé určované charakteristiky je rovněž vhodné znázornit formou tabulek zahrnujících všechny získané a vypočítané výsledky. U parametru linearita je samozřejmostí uvedení příslušné rovnice přímky a lineární závislosti znázorněné graficky. U parametru selektivita musí být doloženy chromatogramy standardního roztoku, placebo a vzorku zkoušeného přípravku



upravených předepsaným izolačním postupem. Všechny výpočty musí být opět přesně charakterizovány a vzorce uvedeny ve validační zprávě.

Na závěr validační zprávy je připojeno prohlášení o vhodnosti metody pro zamýšlený účel a tento účel je přesně charakterizován. Validace zpráva je kontrolována a schvalována všemi zodpovědnými osobami pro kontrolní laboratoř, je opatřena jejich podpisy, razítkem kontrolní laboratoře a je uchovávána jednak v papírové podobě a jednak v elektronické podobě ve formě validačních dat na CD-ROMu, zabezpečena proti následné manipulaci s daty [48].

#### Validační program pro statistické zpracování analytických dat

Validaci metody lze podle moderních trendů provést i s použitím speciálních softwarů. Validace program slouží ke statistickému prokázání spolehlivosti analytické metody včetně celého obslužného analytického systému, kdy proces získávání a zpracování experimentálních dat má významný vliv na konečný analytický výsledek.

Takový program stanovuje základní pravidla pro plánování a organizaci validace analytických dat a také pravidla pro uvádění a použití takto stanovených ukazatelů v praxi.

Validace program musí obsahovat nejméně tyto údaje: pracovní postup, validační parametry, podmínky revalidace systému, validační protokol, literatura (kritická rešerše a konzultace). Takovým programem je např. EffiValidation firmy EffiChem [49].

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **(KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM PRACÍM)**

V průběhu mého doktorského studia jsem vyvíjela (případně se podílela na vývoji) metodiky pro hodnocení účinných látek, nečistot a případně konzervancí s využitím metody HPLC v těchto léčivých přípravcích: Triamcinolon krém, Ketoprofen gel, Estrogel gel (v tomto případě byly publikovány dvě práce, protože se metoda rozšiřovala na základě požadavku SÚKLu o analýzu dalších nečistot), Indometacin gel, Terbinafin krém a Calcium pantothenát mast. Tyto metody byly validovány a prakticky aplikovány při analýze zmíněných léčivých přípravků. S touto tematikou bylo publikováno sedm prací v zahraničních odborných časopisech.

V rámci vývoje nových metod pro analýzu léčivých přípravků jsem se dále podílela na vývoji nových metod pro hodnocení dalších léčivých přípravků, které nebyly publikovány v odborných časopisech a které budou dále také komentovány. Jedná se o přípravky: Lipolotio krém (metodiky stanovení obsahu dvou druhů konzervačních látek v krému) a Aphlox pasta (stanovení obsahu kyseliny salicylové a methylsalicylatu).

Zároveň jsem spoluautorkou dvou odborných článků, týkajících se porovnávání komerčních a nových typů analytických kolon.

## 4.1. TRIAMCINOLON KRÉM

Nově vyvinutá a validovaná metoda RP-HPLC byla využita pro současné stanovení obsahu účinné látky triamcinolon acetonidu, konzervačních látek (methylparabenu a propylparabenu) a degradačního produktu triamcinolonu v léčivém přípravku Triamcinolon krém 0,1%. Jedná se o metodu vnitřního standardu, kterým byl zvolen hydrokortison.

Chromatografická separace byla provedena na komerčně dostupné koloně Supelco Discovery C18, mobilní fáze je směsí acetonitrilu a vody v poměru 40:60 (v/v). Čas analýzy je cca 9 minut při průtoku 0,6 ml/min a UV dekci při 240 nm. Vyvinutá metoda je využita při rutinní analýze (sledování stability, výstupní kontrola a testy homogenity výroby) topického léčivého přípravku Triamcinolon krém 0,1%. (Detaily viz Příloha I.)

## 4.2. KETOPROFEN GEL

V této práci byla vyvinuta rychlá RP-HPLC metoda s UV spektrofotometrickou detekcí. Metoda byla validována pro stanovení pěti složek, obsažených ve farmaceutickém gelu. Je vhodná pro současné stanovení účinné látky ketoprofenu, dvou konzervancí methylparabenu a propylparabenu a dvou rozkladných produktů ketoprofenu – 3-acetylbenzofenonu a kyseliny 2-(3-karboxyfenyl)propionové – v topickém gelu. Jako vnitřní standard byl použit ethylparaben.

Separace se provádí na koloně Supelco Discovery C18 (délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ), optimální mobilní fázi pro separaci uvedených složek gelu včetně vnitřního standardu tvoří acetonitril, voda a fosforečnanový pufr o pH 3,5, v poměru 40:58:2 (v/v/v). Při průtoku 1 ml/min je čas analýzy cca 10 minut. Detekce je prováděna v UV oblasti spektra při vlnové délce 233 nm.

Metoda je s úspěchem aplikována na rutinní analýzu (výstupní kontrola, stabilitní testy a testy homogenity výroby) zmíněných pěti složek farmaceutického přípravku Ketoprofen gel 2,5%. (Detaily viz Příloha II.)

### 4.3. ESTROGEL GEL

Dalším hodnoceným léčivým přípravkem byl hormonálně účinný Estrogel gel. Jako účinná látka je přítomen estradiol. Společně s ním byla za použití vnitřního standardu hydrokortizonu stanovována konzervancia methylparaben a propylparaben a také nečistota estron.

Separace byla provedena s využitím klasické C18 analytické kolony (250 x 4,6 mm, 5 µm) a ternární mobilní fáze acetonitril, methanol, voda (23:24:53 v/v/v) při průtoku 0,9 ml/min. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 225 nm, jako vhodný kompromis vycházející z naměřených UV spekter všech separovaných látek ve směsi. Z hlediska požadavků na separaci a vysokého nárůstu zpětného tlaku na koloně bylo nutné provádět analýzu při zvýšené teplotě (40 °C).

Analýza trvala asi 12 min a po optimalizaci izolačního postupu (jednoduchá extrakce do acetonitrilového roztoku vnitřního standardu, působení ultrazvuku a centrifugace) byla metoda úspěšně validována a prakticky aplikována pro hodnocení přípravku Estrogel gel HBF a monitorování jeho stabilitních studií. (Detaily viz příloha III.)

Na výše uvedenou metodu navazuje metoda nová, která byla vypracována na základě požadavku Státního ústavu pro kontrolu léčiv. Bylo nutné ve sledovaném léčivém přípravku stanovovat hladiny další šesti degradačních produktů.

Tato nově vyvinutá metoda stanovuje v jednom kroku obsah estradiolu a jeho sedmi degradačních produktů na analytické koloně Zorbax SB-CN (délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, velikost částic 5 µm) a mobilní fází o složení acetonitril, kyselina fosforečná 0,085% a tetrahydrofuran v poměru 27:63:10 (v/v/v). Průtok mobilní fáze je 1 ml/min, detekce v UV oblasti při 225 nm. Jako vnitřní standard je použit flurbiprofen. Metoda byla validována a je s úspěchem využívána při rutinní analýze přípravku Estrogel HBF v rámci sledování stability daného léčivého přípravku. (Detaily viz příloha VII.)

## 4.4. INDOMETACIN GEL

V protizánětlivém topickém gelu Indometacin gel byly hodnoceny účinná látka indometacin a dva jeho rozkladné produkty 5-methoxy-2-methylindolyloctová kyselina a 4-chlorbenzoová kyselina.

Pro separaci byla použita analytická kolona Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), protože zde bylo třeba odlišné selektivity v porovnání s C18 stacionární fází. Eluce byla provedena izokraticky mobilní fází acetonitril, 0,2 % kyselina fosforečná (50:50 v/v) při průtokové rychlosti 0,6 ml/min. Analyty byly detekovány v UV oblasti při 237 nm a při laboratorní teplotě. Jako vnitřní standard pro kvantifikaci byl vybrán ketoprofen.

Délka analýzy je 7 – 8 min a po optimalizaci izolačního postupu (extrakce do methanolického roztoku vnitřního standardu, působení ultrazvuku a centrifugaci) byla metoda úspěšně validována a prakticky aplikována pro hodnocení přípravku Indometacin gel HBF a hodnocení jeho stabilitní studie. (Detaily viz příloha IV.).

## 4.5. TERBINAFIN KRÉM

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení účinné látky terbinafinu, jeho nečistoty 1-methylaminomethylnaftalenu a třech degradačních produktů  $\beta$ -terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu. Byla použita metoda vnitřního standardu, kterým byl zvolen propylparaben. Separace byla provedena na analytické koloně Nucleosil-100-5-CN, mobilní fáze byla směsí tetrahydrofuranu, acetonitrilu a citrátového pufru o pH 4,5 v poměru 10:20:70 (v/v/v). Délka analýzy při průtoku 0,8 ml/min je asi 32 minut. UV detekce je prováděna při 226 nm. Metoda byla kompletně validována a je využívána v kontrolní laboratoři pro stanovení terbinafinu a jeho čtyř nečistot blízké struktury s dostatečnou selektivitou a správností v léčivém přípravku Terbinafin krém. (Detaily viz příloha V.)



## 4.6. CALCIUM PANTOTHENÁT MAST

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 sledována jako nejvhodnější kolona Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). 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 je použita pro rutinní analýzy přípravku v rámci stabilitní studie. Výsledky validace potvrzují reprodukovatelnost, přesnost a správnost metody. (Detaily viz příloha VI.)

## 4.7. LIPOLOTIO KRÉM I.

Byla vypracována a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení obsahu methylparabenu a propylparabenu v přípravku Lipolotio HBF, složení viz. příslušná norma PNHC1 056-03. Lipolotio je topický přípravek obsahující 2% močoviny pro zmírnění projevů a léčbu problematrické a suché pokožky. Parabeny (methylparaben a propylparaben) jsou přidávány pro konzervační účely.

### ○ Podmínky separace - kapalinová chromatografie

Separace parabenů nebyla z chromatografického hlediska složitým problémem. Kontrolní laboratoř katedry analytické chemie se problematikou stanovení konzervancí v léčivých přípravcích zabývá již několik let. Použití konvenční C18 analytické kolony bylo pro separaci dostačující.

Při vývoji metody pro Lipolotio byly zkoušeny mobilní fáze složené ze směsí ACN, MeOH a voda, jak binární tak ternární. K separaci parabenů docházelo téměř při všech chromatografických podmínkách, kromě extrémních koncentrací organické složky mobilní fáze. Mobilní fáze tedy byla vybrána hlavně v konfrontaci s připravovaným vzorkem placebo a reálného přípravku tak, aby nedocházelo k interferenci s látkami z matrice a aby analýza byla co nejkratší při splnění všech požadavků kladených na analýzu. Jako optimální byla vybrána mobilní fáze acetonitril a voda - 50 : 50 (v/v), izokratický režim při průtoku 1,1 ml/min. Průtoková rychlost byla volena tak, aby bylo dosaženo co nejkratšího času analýzy při zachování požadovaného rozlišení jak v roztoku standardních látek, tak při práci s reálným vzorkem.

Jako vnitřní standard byl vybrán butylparaben, z důvodu podobné struktury a předvídatelných chromatografických vlastností, a také díky podobnému chování při izolaci látek z reálných vzorků. Původně byl testován také ethylparaben, ale jeho použití nebylo možné z důvodu koeluce s látkami z matrice.

Pro detekci sledovaných látek v UV oblasti byla zvolena vlnová délka 252 nm (jako maximum absorpce parabenů), jak vyplynulo z proměření absorpčních spekter látek v používaných rozpouštědlech.

- **Výsledné chromatografické podmínky**

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., Kyoto, Japonsko

Kolona: SUPELCO Discovery C 18, (125 x 4 mm, 5 µm), Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Dávkování: 10 µl

Detekce: 252 nm

Mobilní fáze: acetonitril : voda - 50 : 50 (v/v), izokratický režim

Průtok: 1,1 ml/min

Teplota: 25 °C

Vyhodnocení: chromatografická stanice Class VP, verze 6.13, Shimadzu

- **Konečný postup 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 vnitřního standardu butylparabenu (c = 1 mg/100 ml) ve směsi acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH 3,0 (30:70, v/v). Směs byla umístěna do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut. Poté byla centrifugována 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr a dávkován autosamplermem na kolonu.

- **Stanovení obsahu methylparabenu a propylparabenu v krému**

Byly připraveny roztoky standardů ve směsi acetonitrilu a fosforečnanového pufru pH 3,0 (30:70, v/v) s obsahem 1 mg/100 ml butylparabenu-IS, 2,5 mg/100 ml methylparabenu a 1,25 mg/100 ml propylparabenu ze 2 samostatných navážek. Každý roztok byl změřen 3x.

Byly provedeny 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeného výše. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku byl proměřen třikrát. Výpočet obsahu methylparabenu a propylparabenu (%) byl proveden podle vzorce:

$$c = \frac{A_v / A_{IS} \times m_s \times F \times 100}{A_s / A_{IS} \times m_v \times Z}$$

c	=	obsah stanovené složky v %
$A_V, A_S$	=	plocha píku vzorku/ standardu
$A_{IS}$	=	plocha píku vnitřního standardu butylparabenu
$m_V, m_S$	=	navážka vzorku/ standardu v g
F	=	faktor korekce na obsah referenční látky
Z	=	faktor zředění ( $Z = 5$ )

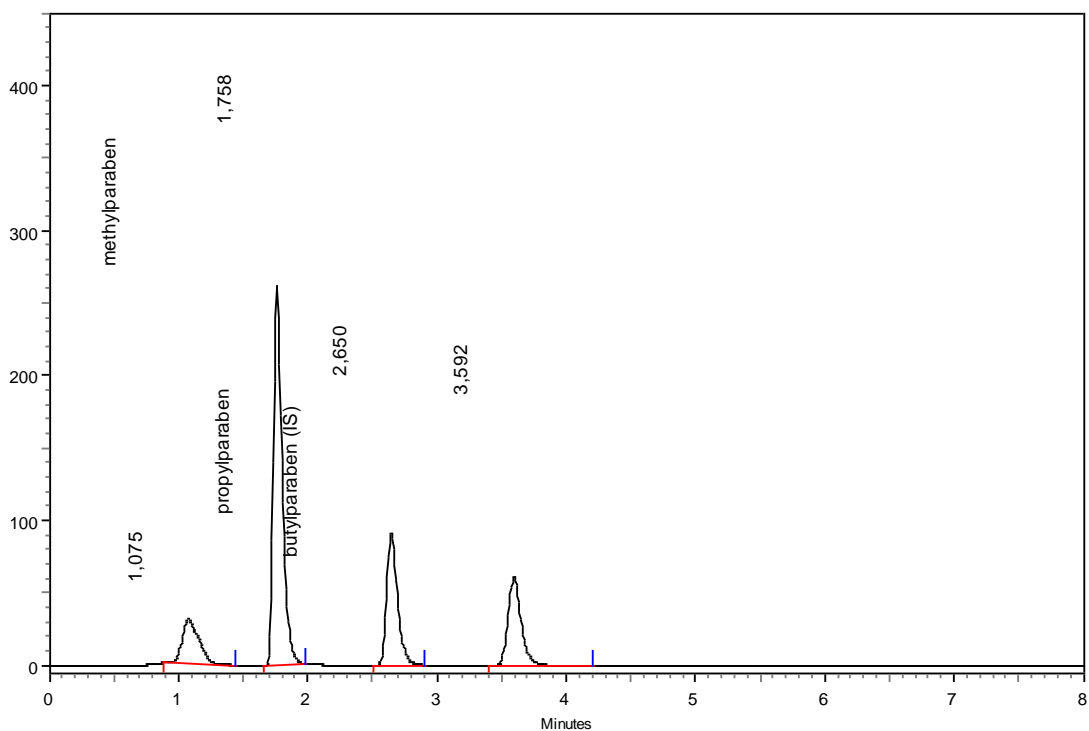
○ **Validace**

**1. Test vhodnosti chromatografického systému**

Ověření vhodnosti chromatografického systému bylo provedeno jednak vizuální kontrolou chromatografické separace z chromatogramu standardu – obrázek 12 a dále vyhodnocením parametrů SST – tabulka 13. Všechny výsledky splňovaly požadovaná kritéria.

SST	methylyparaben	propylparaben	Limity
počet teoretických pater <sup>a</sup>	2943	4781	$N > 2000$
faktor symetrie píku <sup>a</sup>	1,42	1,30	$A_s < 1,5$
rozlišení <sup>a</sup>	3,32	1,90	$R_{ij} > 1,5$
opakovatelnost- $t_r$ <sup>b</sup>	0,44	0,30	$RSD < 1\%$
opakovatelnost-A <sup>b</sup>	0,56	0,58	$RSD < 1\%$

**Tabulka 13: Parametry SST pro přípravek Lipoloto HBF (<sup>a</sup>měření prováděné třemi opakovanými nástřiky, <sup>b</sup>měření prováděné šesti opakovanými nástřiky).**



**Obrázek 12: Chromatogram standardů: methylparaben a propylparaben s vnitřním standardem butylparabenem**

## 2. Validace analytické metody

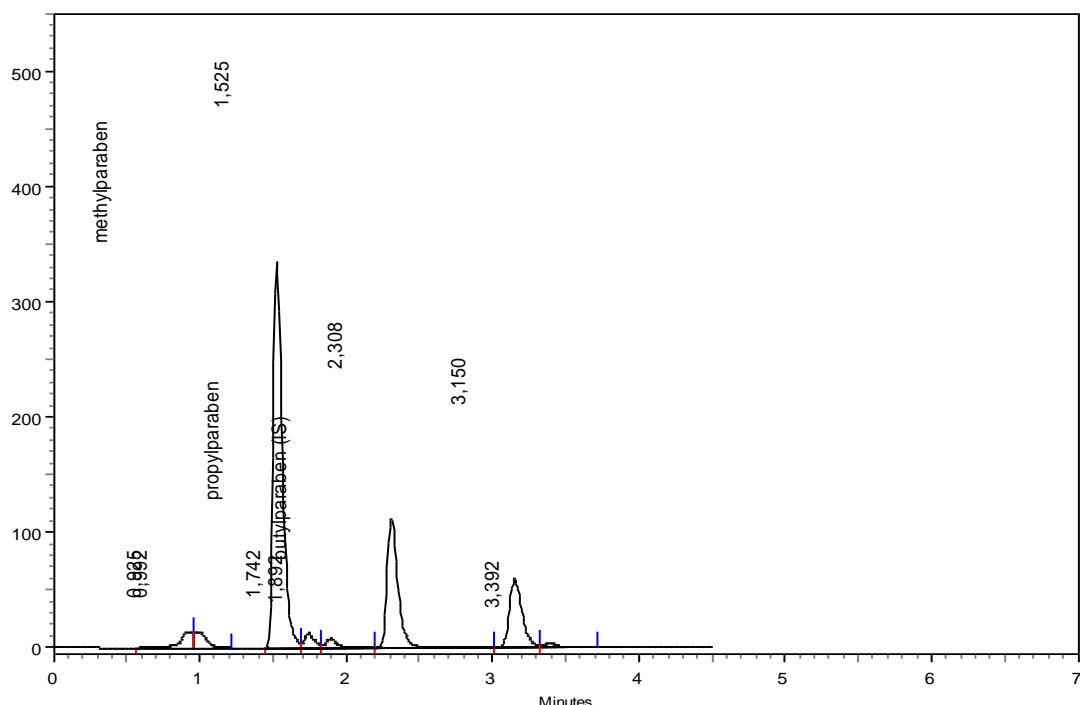
Validační parametry přesnost, správnost a linearita jsou uvedeny v tabulce 14. Jejich definice a jednotlivé požadavky jsou uvedeny v kapitole 3.4. Všechny sledované parametry splňovaly předepsané limity. Selektivita metody byla vyhodnocována porovnáním chromatogramu standardního roztoku – obrázek 12 a chromatogramů vzorku a placebo upravených předepsaným izolačním postupem – obrázky 13 a 14.

Byla testována krátkodobá stabilita roztoků parabenů ve směsi acetonitrilu a fosforečnanového pufru pH 3,0 (30:70, v/v). Jak z testování stability roztoku vyplývá, je třeba roztoky připravovat vždy čerstvé, v čas potřeby.

Validační parametr	methylparaben	propylparaben	Limity
správnost [% výtěžnosti, R]	98,22	95,71	R = 100 ± 5%
správnost [% RSD]	0,28	0,66	RSD < 5 %
přesnost [% RSD]	1,38	1,18	RSD < 5 %
linearita [R – korelační koeficient]	0,9999	0,9999	R > 0,9990
linearita – rovnice přímky	$y = 1,2488x + 0,003$	$Y = 1,0746x + 0,0045$	-
Selektivita	bez interference	bez interference	bez interference

**Tabulka 14: Validační parametry přípravku Lipolotio HBF**

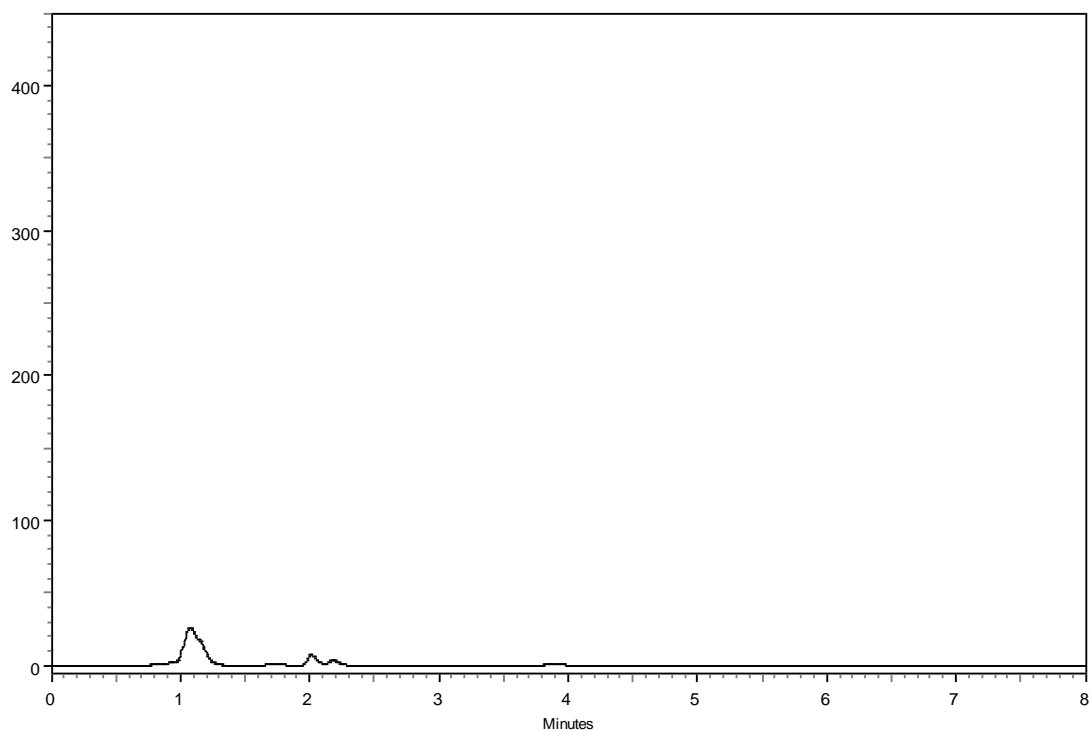
(Pro zjišťování validačních parametrů bylo vždy analyzováno šest vzorků ve třech opakováních. Linearita byla stanovena na šesti koncentračních hladinách v rozmezí od 40% do 200%)



**Obrázek 13: Chromatografický záznam reálné analýzy přípravku Lipolotio HBF**

Součástí validace bylo také hodnocení robustnosti metody. Byly testovány mobilní fáze v různých poměrech složek (ACN: voda v poměrech 60:40, 55:45, 50:50, 45:55 a 40:60, v/v) a jejich vliv na plochu píků a retenční časy. V celém testovacím rozmezí docházelo k dokonalé separaci látek, složení mobilní fáze ovlivňovalo hlavně délku analýzy, z tohoto hlediska byla doporučena mobilní fáze v poměru 50:50 (v/v). Vliv změny mobilní fáze na plochu píku byl maximálně do 1,54 % (mobilní fáze v

poměru 60:40, v/v). Pro oba extrémnější poměry (60:40 i 40 :60, v/v) byla tato změna více než 1%, proto bylo opět doporučeno použití mobilní fáze v poměru ACN: voda (50:50 v/v).

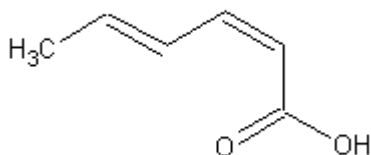


**Obrázek 14: Chromatografický záznam placeba přípravku Lipolotio HBF**

## 4.8. LIPOLOTIO KRÉM II.

Protože bylo změněno výrobní postup přípravku Lipolotio HBF, bylo zvýšeno množství účinné látky močoviny ze 2% na 4%, bylo třeba také upravit další složení přípravku. U původně vyráběného přípravku byly pozorovány problémy změny pH během stabilitní studie, proto bylo třeba stabilizovat pH přípravku (do 6,0) pomocí přídatku pufru. Pro tyto účely byl nejprve při výrobě použit citrátový pufr. Při aplikaci původní validované metody však parametry přesnosti a správnosti nedávaly odpovídající výsledky, proto bylo nakonec přistoupeno ke kompletní změně výrobního postupu a revalidaci metody.

Místo parabenů byla jako konzervační látka přidána kyselina sorbová (vzorec obrázek 15) a potřebného pH bylo dosaženo s použitím laktátového pufru.



Obrázek 15: Kyselina sorbová

### ○ Podmínky separace - kapalinová chromatografie

Při vývoji separační metody bylo využito informací z literární rešerše. V souladu s trendy v HPLC a těmito údaji byla primárně pro separaci použita analytická kolona Zorbax XDB C18 s 3,5  $\mu\text{m}$  částicemi pro zlepšení účinnosti a současně pro zkrácení doby analýzy díky své délce 75 mm. Tato kolona byla pro zamýšlenou analýzu shledána vhodnou.

Jako mobilní fáze byly testovány směsi kyseliny fosforečné o koncentraci 0,085 % s methanolem nebo s acetonitrilem jak vyplývalo z rešerše a z kyselé povahy sledované látky. Nejvhodnější se z hlediska selektivity i rychlosti analýzy ukázala mobilní fáze o složení: 0,085 % kyselina fosforečná a acetonitril v poměru 60:40 (v/v) při průtokové rychlosti 1,0 ml/min a izokratickém režimu, která byla také vybrána pro pozdější validaci metody.



Jako vnitřní standard byl zvolen propylparaben z důvodu pozitivních zkušeností s parabenem při extrakci z topických přípravků a jejich snadné a logické chromatografické separace. Jeho retenční čas neinterferoval se stanovovanou látkou ani s látkami z matrice jak tomu bylo např. u ethylparabenu.

Pro detekci byla na základě proměření spektra kyseliny sorbové v příslušných rozpouštědlech vybrána vlnová délka 253 nm. Při této vlnové délce byla zaznamenána dostatečná odezva i pro vnitřní standard propylparaben.

○ **Výsledné chromatografické podmínky:**

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., Kyoto, Japonsko

Kolona: Zorbax XDB C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm), Agilent Technologies, USA

Dávkování: 5 µl

Detekce: 253 nm

Mobilní fáze: kyselina fosforečná 0,085 % : acetonitril (60:40 v/v), izokratický režim

Průtok: 1,0 ml/min

Teplota: 25 °C

Vyhodnocení: chromatografická stanice Class VP, verze 6,13, Shimadzu

○ **Konečný postup izolace kyseliny sorbové z krému**

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství krému odpovídající 5 mg kyseliny sorbové (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu propylparabenu ( $c = 5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ) ve směsi kyseliny fosforečné 0,085% a tetrahydrofuranu (20:80, v/v). Směs byla umístěna na vodní lázeň o teplotě 70 °C na dobu 15 min. Poté byla 10 minut vystavena působení ultrazvukové lázně a následně byla centrifugována 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr a dávkován autosamplerem na kolonu.

- **Stanovení obsahu kyseliny sorbové v krému**

Byly připraveny roztoky standardů ve směsi kyseliny fosforečné 0,085% a tetrahydrofuranu (20:80, v/v) s obsahem 5,0 mg/100 ml propylparabenu (IS) a 5,0 mg/100 ml kyseliny sorbové ze 2 samostatných navážek. Každý roztok byl změřen třikrát.

Byly provedeny 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeného výše. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku byl proměřen vždy třikrát. Výpočet obsahu kyseliny sorbové (%) byl proveden podle vzorce uvedeného v kap. 4.7.

- **Validace**

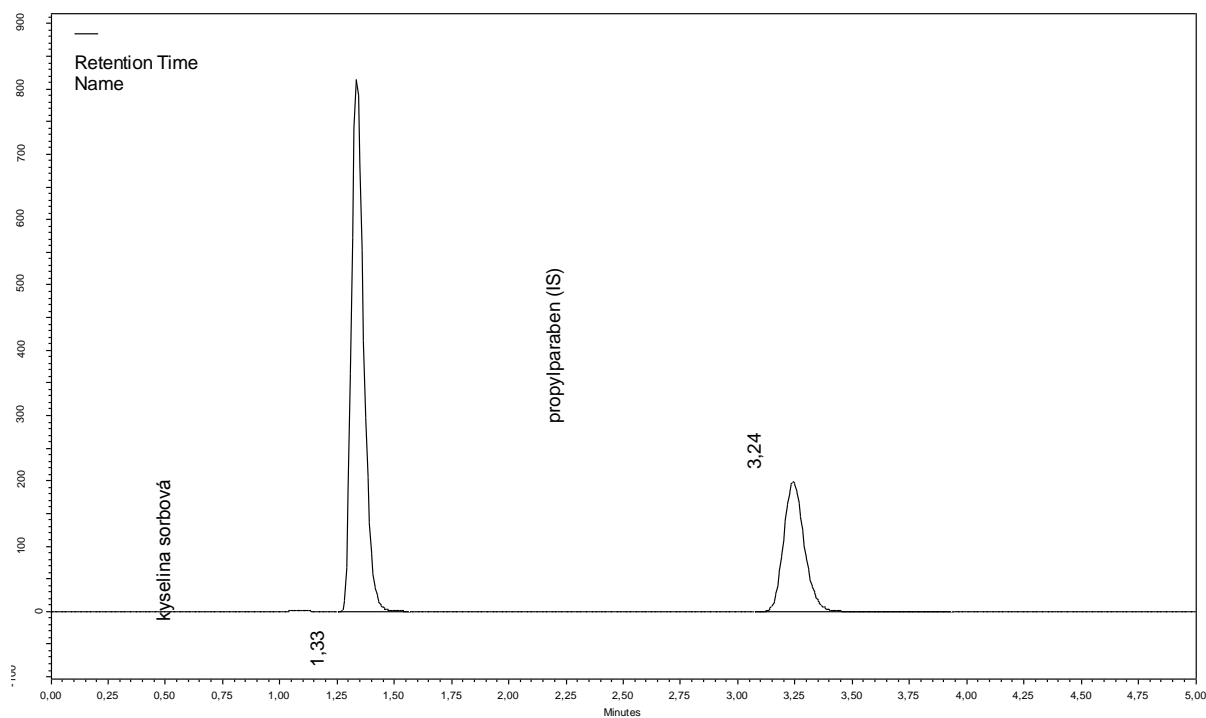
- 1. Test vhodnosti chromatografického systému**

Ověření vhodnosti chromatografického systému bylo provedeno jednak vizuální kontrolou chromatografické separace z chromatogramu standardního roztoku – obrázek 16 a dále vyhodnocením parametrů SST podle tabulky 15. Všechny výsledky splňovaly požadované limity.

SST	kyselina sorbová	Limity
počet teoretických pater <sup>a</sup>	2496	N > 2000
faktor symetrie píku <sup>a</sup>	1,40	As < 1,5
rozlišení <sup>a</sup>	-	Rij > 1,5
opakovatelnost-t <sub>r</sub> <sup>b</sup>	0,00	RSD < 1%
opakovatelnost-A <sup>b</sup>	0,08	RSD < 1%

**Tabulka 15: Parametry SST pro přípravek Lipoloto HBF 4%**

(<sup>a</sup>měření prováděné třemi opakovanými nástřiky, <sup>b</sup>měření prováděné šesti opakovanými nástřiky)



**Obrázek 16: Chromatogram standardů: kyselina sorbová s vnitřním standardem propylparabenem**

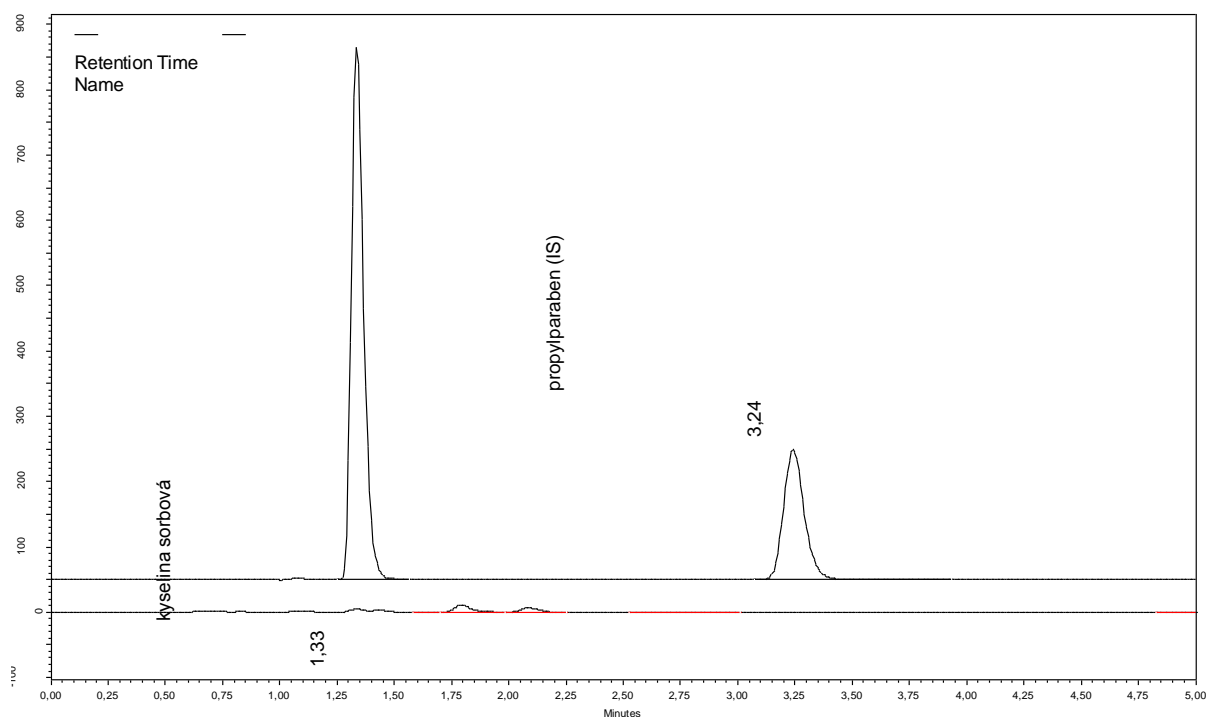
## 2. Validace analytické metody

Validační parametry byly stanoveny v souladu s požadavky ICH a SÚKL, jak je popsáno v kap. 3.4, výsledky jsou uvedeny v tabulce 16. Všechny stanovované parametry splňovaly požadované limity. Selektivita byla vyhodnocována s použitím chromatografických záznamů standardu – obrázek 16 a záznamu placebo a vzorku připravených předepsaným postupem – obrázek 17.

Validační parametr	Kyselina sorbová	Limity
správnost [% výtěžnosti, R]	100,92	R = 100 ± 5%
správnost [% RSD]	0,31	RSD < 5 %
přesnost [% RSD]	0,66	RSD < 5 %
linearita [R – korelační koeficient]	0,9990	R > 0,9990
linearita – rovnice přímky	$y = 2,302 x + 0,0105$	-
Selektivita	bez interference	bez interference

**Tabulka 16: Validační parametry přípravku Lipolotio HBF**

(Pro zjišťování validačních parametrů bylo vždy analyzováno šest vzorků ve třech opakováních. Linearita byla stanovena na šesti koncentračních hladinách v rozmezí od 40% do 150%).



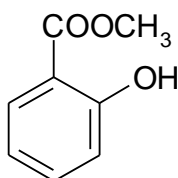
**Obrázek 17: Chromatografický záznam reálné analýzy přípravku Lipolotio HBF ve srovnání se záznamem placebo přípravku pro dokumentaci selektivity metody.**

Byla testována krátkodobá stabilita standardního roztoku kyseliny sorbové a propylparabenu ve směsi kyseliny fosforečné 0,085% a tetrahydrofuranu (20:80, v/v). Roztoky byly stabilní po celou dobu krátkodobé stabilitní studie, tedy 72 hodin.

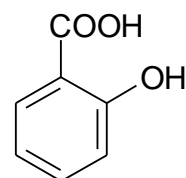
Součástí validace bylo také hodnocení robustnosti metody, byly testovány různé poměry mobilních fází (0,085% kyselina fosforečná : ACN v poměrech 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, v/v) a jejich vliv na plochu píků a retenční časy. V celém testovacím rozmezí docházelo k dokonalé separaci látek. Složení mobilní fáze ovlivňovalo hlavně délku analýzy, z tohoto hlediska byla doporučena mobilní fáze v poměru 60:40 (v/v). Vliv změny složení mobilní fáze na plochu píku byl maximálně do 3,37 % (mobilní fáze o poměru 50:50, v/v). Pro oba extrémnější poměry (70:30 i 50:50, v/v) byla tato změna plochy píku větší než 1%, proto je opět doporučeno použití mobilní fáze v poměru 0,085% kyselina fosforečná : ACN (60:40, v/v), aby kvantifikace látek byla co nejpřesnější a splňovala požadavky validace.

## 4.9. APHLOX PASTA

Aphlox pasta obsahuje jako účinné látky methylester kyseliny salicylové (methylsalicylat, vzorec obrázek 18) a kyselinu salicylovou (vzorec obrázek 19). Methylsalicylat má antirevmatické účinky na svaly a klouby a protože se dobře vstřebává kůží, používá se často v topických léčivých přípravcích. Kyselina salicylová má účinky antiseptické, konzervační a antimykotické a v topických léčivých přípravcích se užívá jako dermatologikum a keratolytikum



Obrázek: 18: Methylsalicylat



Obrázek 19: Kyselina salicylová

### ○ Podmínky separace - kapalinová chromatografie

Při vývoji separační metody bylo využito informací z literární rešerše. Jako stacionární fáze byla zvolena C18 běžná kolona, která byla shledána vhodnou.

Jako mobilní fáze byly testovány směsi methanolu a vody s přidavkem kyseliny octové. Nejvhodnější se ukázala směs methanolu, vody a kyseliny octové v poměru 50:50:1 (v/v/v), protože při vyšším poměru vody v mobilní fázi byla analýza zbytečně pomalá. Průtok mobilní fáze byl zvolen 1,5 ml/min v izokratickém režimu.

Jako vnitřní standard byl zvolen propylparaben z důvodu pozitivních zkušeností s parabenem při extrakci z topických přípravků, což bylo vzhledem k konzistenci pasty poměrně důležité hledisko. Jeho retenční čas neinterferoval se stanovovanými látkami ani s látkami z matrice jak tomu bylo u např. dalších parabenů nebo jiných látek (např. kyselina benzoová, flurbiprofen, benzoan sodný apod.).

Pro detekci byla vybrána vlnová délka 240 nm jako vhodný kompromis absorpčních maxim testovaných látek. Při této vlnové délce byla zaznamenána dostatečná odezva i pro vnitřní standard propylparaben.

○ **Výsledné chromatografické podmínky:**

Kapalinový chromatograf:

*Čerpadlo:* LCP 4100, ECOM Praha

*Autosampler:* Waters 717 plus

*UV detektor:* Waters 486

*Kolona:* LiChroCART Purospher RP-18e, kondicionovaná mobilní fází; délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm, velikost částic 5 µm (Merck); předkolona LiChroCART Purospher RP-18e, délka 4 mm, vnitřní průměr 4 mm, velikost částic 5 µm (Merck)

Dávkování: 20 µl

Detekce: 240 nm

Mobilní fáze: Methanol-voda-kyselina octová = 50 : 50 : 1; průtok:  $F_m=1,5$  ml/min; před použitím se odplyní pomocí hélia

Izokratický režim

Teplota: laboratorní

Vyhodnocení: chromatografická stanice CSW společnosti DataApex

Ultrazvuková lázeň: Bandelin SONOREX RK52, Berlín, SRN

Centrifuga: Wirówka MPV-6, Mechanika Preczyjna, Warszawa, Polsko

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SRN

○ **Konečný postup izolace kyseliny salicylové a methylsalicylatu z pasty**

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství pasty odpovídající 1,09 mg kyseliny salicylové a 0,22 mg methylsalicylatu, (asi 0,5 g pasty), přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu propylparabenu 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 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl dávkován autosamplérem na kolonu.

○ **Stanovení obsahu kyseliny salicylové a methylsalicylatu v pastě**

Byly připraveny roztoky standardů v methanolu s obsahem 5,44 mg/100 ml kyseliny salicylové a 1,09 mg/100 ml methylsalicylatu ze 2 samostatných navážek. Každý roztok byl změřen třikrát.

Byly provedeny 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeném v kap. 1.3. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku byl změřen třikrát. Výpočet obsahu kyseliny salicylové a methylsalicylatu (%) byl proveden podle vzorce v kapitole 4.7.

○ **Validace**

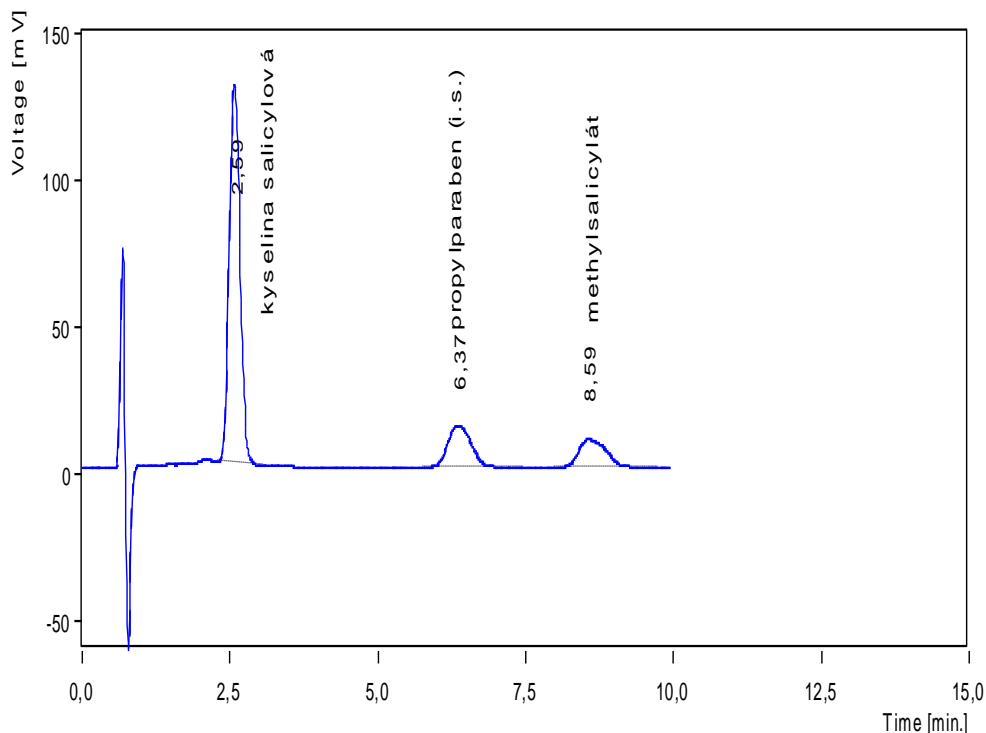
**1. Test vhodnosti chromatografického systému**

Ověření vhodnosti chromatografického systému bylo provedeno jednak vizuální kontrolou chromatografické separace z chromatogramu standardního roztoku – obrázek 20 a dále vyhodnocením parametrů SST podle tabulky 17. Všechny výsledky splňovaly požadované limity.

SST	Kyselina salicylová	Methylsalicylat	Limity
počet teoretických pater <sup>a</sup>	8565	14907	N > 2000
faktor symetrie píku <sup>a</sup>	1,09	1,28	As < 1,5
rozlišení <sup>a</sup>	-	9,67	R <sub>ij</sub> > 1,5
opakovatelnost-t <sub>r</sub> <sup>b</sup>	0,46	0,29	RSD < 1%
opakovatelnost-A <sup>b</sup>	0,31	0,34	RSD < 1%

**Tabulka 17: Parametry SST pro přípravek Aphlox pasta**

(<sup>a</sup>měření prováděné třemi opakovanými nástřiky, <sup>b</sup>měření prováděné šesti opakovanými nástřiky)



**Obrázek 20: Chromatogram standardů: kyselina salicylová a methylsalicylát s vnitřním standardem propylparabenem.**

## 2. Validace analytické metody

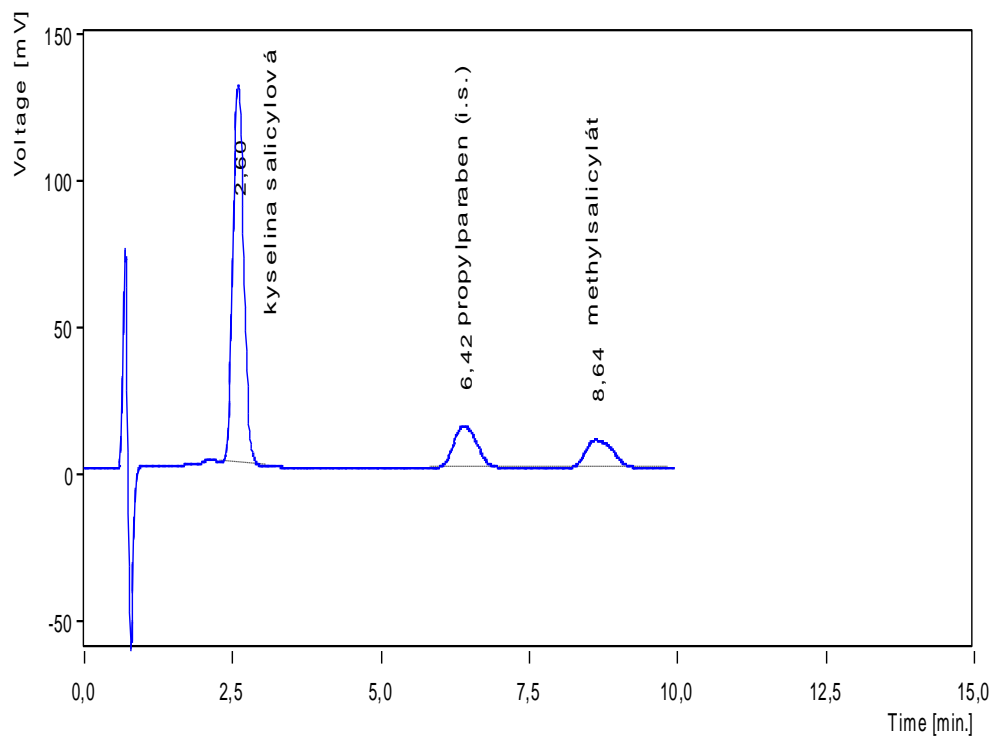
Validační parametry byly stanoveny v souladu s požadavky ICH a SÚKL, jak je popsáno v kap. 3.4, výsledky jsou uvedeny v tabulce 18. Všechny stanovované parametry splňovaly požadované limity. Selektivita byla vyhodnocována s použitím chromatografických záznamů standardu – obrázek 20 a záznamu placebo – obrázek 21 a vzorku – obrázek 22, připravených předepsaným postupem.

Validační parametr	Kyselina salicylová	Methylsalicylát	Limity
správnost [% výtěžnosti, R]	98,27	98,84	R = 100 ± 5%
správnost [% RSD]	0,68	0,85	RSD < 5 %
přesnost [% RSD]	0,52	1,42	RSD < 5 %
linearita [R – korelační koeficient]	y = 0,8226 x + 0,135	y = 0,995 x + 0,019	R > 0,9990
linearita – rovnice přímky	0,99979	0,99972	-
Selektivita	bez interference	bez interference	bez interference

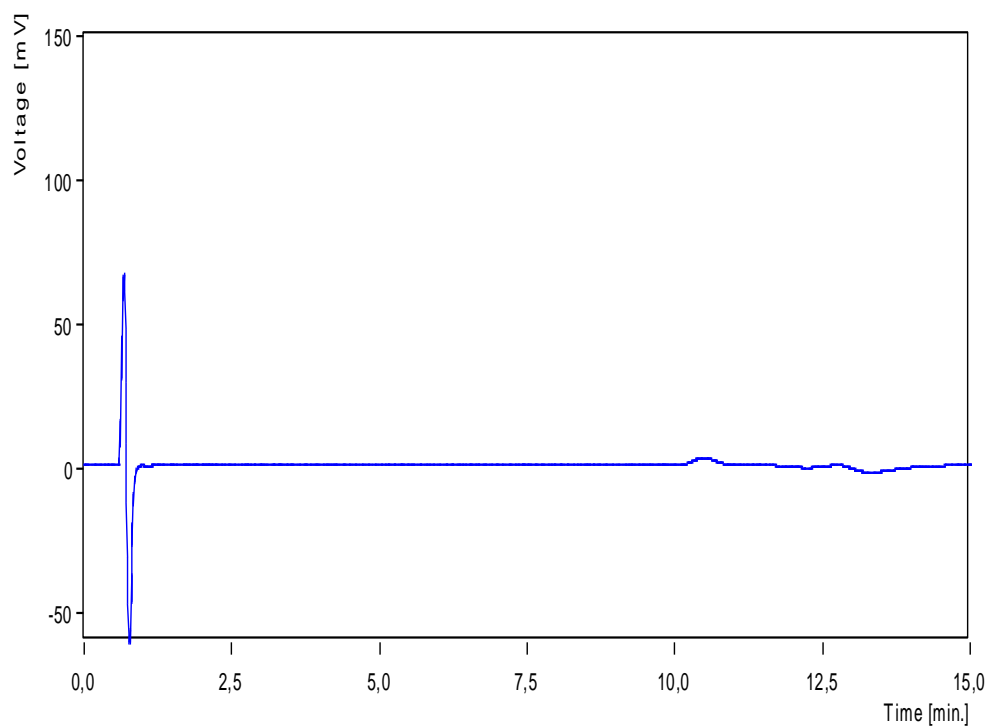
**Tabulka 18: Validační parametry přípravku Aphlox pasta**

(Pro zjišťování validačních parametrů bylo vždy analyzováno šest vzorků ve třech opakováních. Linearita byla stanovena na šesti koncentračních hladinách v rozmezí od 30% do 180%).





**Obrázek 21: Chromatografický záznam reálné analýzy přípravku Aphlox pasta s vnitřním standardem propylparabenem.**



**Obrázek 22: Chromatografický záznam placebo přípravku Aphlox pasta.**

Byla testována krátkodobá stabilita standardního roztoku kyseliny salicylové a methylsalicylatu v methanolu. Roztoky nejsou stabilní a je třeba je připravovat vždy čerstvé v čas potřeby.

Součástí validace bylo také hodnocení robustnosti metody, byly testovány různé poměry mobilních fází (MeOH:voda:kyselina octová v poměrech 55:45:1, 53:47:1, 50:50:1, 47:53:1, 45:55, v/v/v) a jejich vliv na plochu píků a retenční časy. V celém testovacím rozmezí docházelo k dokonalé separaci látek. Složení mobilní fáze ovlivňovalo hlavně délku analýzy, z tohoto hlediska byla doporučena mobilní fáze v poměru 50:50:1 (v/v/v). Vliv změny složení mobilní fáze na plochu píku byl maximálně do 1,32 % (mobilní fáze o poměru 55:45:1, v/v/v).

## **4.10 POROVNÁVÁNÍ NOVÝCH TYPŮ HPLC KOLON**

### **4.10.1. MONOLITICKÉ KOLONY**

Byla porovnávána účinnost monolitických kolon Chromolith a konvenčních C18 kolon Supelco na dvou farmaceutických přípravcích – Ketoprofen gel a Estrogel gel. Složení mobilních fází při analýze na C18 kolonách bylo: pro Ketoprofen gel – acetonitril:methanol:fosforečnanový pufr o pH 3,5 – 40:58:2 (v/v/v), pro Estrogel gel směs acetonitrilu, methanolu a vody v poměru 23:24:53 (v/v/v). Toto složení však obvykle není optimální pro všechny typy kolon. Proto bylo nutno jejich složení změnit. Byla testována různá složení mobilních fází, která vycházela zejména ze zvyšování poměru vodné složky, při různých průtocích (1,0 až 5,0 ml/min).

Při stanovení účinných látek, konzervancí a nečistot v uvedených přípravcích byly testovány monolitické kolony firmy Merck: Chromolith Flash RP-18e, ChromolithSpeedROD RP-18e a Chromolith Performance RP-18e. Typům kolon bylo přizpůsobováno složení mobilních fází a jejich průtok tak, aby byly parametry SST zachovány v přijatelných mezích.

Bylo prokázáno, že monolitické kolony díky jejich porozitě a nízkému zpětnému tlaku mohou zkrátit dobu analýzy až třikrát při zachování dostatečné separační účinnosti. Proto například 11 minut dlouhá analýza může být na monolitické koloně zkrácena na 4 minuty se srovnatelnými výsledky. (Detaily viz příloha VIII.)

#### **4.10.2. ANALYTICKÉ KOLONY ACQUITY V UPLC SYSTÉMU**

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) je relativně nová technika, přinářející nové možnosti v kapalinové chromatografii, hlavně pokud jde o úsporu času a snížení spotřeby chemikálií.

Chromatografický systém UPLC byl vyvinut tak, aby odolával vysokému zpětnému tlaku, který při jeho použití vzniká. Ve spojení s tímto systémem se používají speciální UPLC Acquity kolony, které jsou naplněny částicemi sorbentu o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ . Z HPLC do UPLC systému byly přeneseny analýzy čtyř farmaceutických přípravků. Výsledky byly porovnávány na přípravcích: Triamcinolon krém, obsahující triamcinolon acetonid jako účinnou látku, methylparaben a propylparaben jako konzervancia a triamcinolon jako degradační produkt, Hydrocortison krém (hydrokortison acetát, MP, PP a hydrokortison jako degradační produkt), Indometacin gel (indometacin a jeho degradační produkty – kyselina 4-chlorbenzoová a kyselina 5-methoxy-2-methylindolová) a EstroGel gel (estradiol, MP, PP a degradační produkt estron).

UPLC systém umožňuje zkrácení času analýzy více než 9x ve srovnání s komerčním systémem, využívajícím standardní 5  $\mu\text{m}$  kolony. Ve srovnání s 3  $\mu\text{m}$  kolonami je analýza cca 3x kratší. Separace je prováděna při velmi vysokém tlaku (systém je schopen pracovat při více než 100 MPa), ale ten nemá negativní vliv na kolonu nebo jiné součásti systému. Separční účinnost je oproti konvenčním systémům stejná nebo i vyšší. (Detaily viz příloha IX.)

## **5. PŘÍLOHY**

## 5. 1. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY

1. Ludmila Matysová, Renata Hájková, Petr Solich: *Simultaneous Determination of Methylparaben, Propylparaben, Triamcinolone acetone and its Degradation products in a Topical Cream by RP-HPLC*. Anal. Bioanal. Chem. – 376 (2004) 440-443 (IF 2,695)
2. Jan Dvořák, Renata Hájková, Ludmila Matysová, Lucie Nováková, Michael A. Koupparis, Petr Solich: *HPLC Determination of Ketoprofen and its Degradation Products in Presence of Preservatives in Pharmaceuticals*. J. Pharm. Biomed. Anal. – 36 (2004) 625-629 (IF 1,889)
3. Lucie Nováková, Petr Solich, Ludmila Matysová, Jan Šícha: *HPLC Determination of Estradiol, its Degradation Products and Preservatives in new Topical Formulation Estrogel HBF*. Anal. Bioanal. Chem. - 379 (2004), 781 – 787 (IF 2,695)
4. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Lucie Havlíková, Petr Solich: *Development and Validation of HPLC method for Determination of Indomethacin and its two Degradation Products in Topical Gel*. J. Pharm. Biomed. Anal. – 37 (2005) 899-905 (IF 1,889)
5. Ludmila Matysová, Petr Solich, Petr Marek, Lucie Havlíková, Lucie Nováková, Jan Šícha: *Separation and Determination of Terbinafine and its Four Impurities of Similar Structure using Simple RP-HPLC method*. Talanta – 68 (2006) 713-720 (2,391)
6. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Dagmar Solichová, Michael A. Koupparis,, Petr Solich: *A Comparison of Performance of C18 Monolithic Columns and C18 Conventional Particle-Packed Columns in HPLC Analysis of Pharmaceuticals*. J. Chromatogr. B – 813 (2004) 191-197 (IF 2,391)
7. Lucie Havlíková, Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich: *HPLC Determination of Estradiol and its Degradation Products*. J. Chromatogr. A – 1119 (2006) 216-223 (IF 3,096)

8. Lucie Havlíková, Ludmila Matysová, Lucie Nováková, Petr Solich: *HPLC Determination of Calcium Panthotenate and Two Preservatives in Topical Cream*. J. Pharm. Biomed. Anal. – 41 (2006) 671-675 (**IF 1,889**)
9. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich: *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. Talanta – 68 (2006) 908-918 (**IF 2,391**)

## POSTERY UVEDENÉ VE SBORNÍCÍCH

- 1) L. Matysová, R. Hájková, D. Šatínský, P. Solich: Možnosti využití monolitické HPLC kolony v analýze topických léčivých přípravků, Sborník konference Chiranal 2002 – Pokroky v chromatografii a elektroforéze, Olomouc 2002, p.16, str.71.
- 2) L. Matysová, R. Hájková, P. Solich, J. Šícha: Stanovení kyseliny salicylové a methylsalicylátu v léčivých přípravcích metodou RP-HPLC, Sborník 31. konference Syntéza a analýza léčiv, Bratislava 2002, p.1/II, str. 79.
- 3) R. Sladkovský, L. Matysová, M. Pospíšilová, J. Šícha, P. Solich: Isocratic reversed-phase HPLC method for the simultaneous determination of cloroxine and methylparaben in topical pharmaceutical formulation, International conference Instrumental Methods of Analysis, Modern Trends and Applications, 23. – 27.9.2003, Thessaloniki, Řecko, Conference proceedings IMA 03, str. 509.
- 4) L. Nováková, P. Solich, L. Matysová, J.Šícha: HPLC determination of estradiol, its degradation products and preservatives in new topical preparation Estrogel HBF, International conference Instrumental Methods of Analysis, Modern Trends and Applications, 23. – 27.9.2003, Thessaloniki, Řecko, Conference proceedings IMA 03, str. 501.
- 5) L. Matysová, P. Marek, P. Solich, J. Šícha.: Využití metod HPLC při stanovení hexachlorofenu v topickém léčivém přípravku, Sborník 32. konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice 2003, P-28, str. 66.
- 6) L. Nováková, L. Matysová, P. Solich: Porovnání HPLC analýzy topických léčivých přípravků s využitím monolitických a běžných C18 kolon. Sborník 32. konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice 2003, P-33, str. 72.
- 7) L. Nováková, L. Havlíková, L. Matysová, P. Solich: Development and Validation of HPLC method for Determination of Indomethacin and its two Degradation Products in topical Gel, PBA2004, 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florence, Italy, 2.-6.5.2004, Abstract Book, str.185.
- 8) L.Matysová, L. Havlíková, L. Nováková, P. Solich: Vývoj a validace nových metod pro analýzu topických léčivých přípravků pomocí metody RP-HPLC.



Sborník IX. sjezdu České farmaceutické společnosti, Zlín, 13. až 15.5.2004, P – 7, str.41

- 9) L. Matysová, L. Havlíková, J. Nováčková, S.Rech, P. Solich: Problematika HPLC analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích. Sborník 33. konference Syntéza a analýza léčiv, Farm. Obzor 9, str. 248
- 10) L. Matysová, P. Solich, P. Marek, J. Šícha: Determination of Terbinafine and its Degradation Products in Topical Cream by RP-HPLC. Joint Symposium Regensburg 2004, 6.-9.10.2004 Book of abstracts, P C 88, str. 118
- 11) L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, Solich P.: Development of HPLC method for Determination of Degradation Products of Gels, Joint Symposium Regensburg 2004, 6.-9.10.2004, Book of abstracts, P C 52, str. 109
- 12) L. Nováková, L. Matysová, L. Havlíková, P. Solich: A Comparison of Performance of Various Novel Analytical Columns with Classical C18 stationary phases – ISC 04, 25th International Symposium on Chromatography, October 4 – 8 2004, Paris, France, str. 60
- 13) P. Solich, L. Matysova, L. Novakova, D. Solichova: Novel Methods for HPLC Determination of Degradation Products in Topical Gels, konference PITTCON 2005, Orlando, USA, 27.2. – 4.3.2005, číslo posteru 520-6P
- 14) L. Nováková, L. Havlíková, L. Matysová, P. Solich: Determination of Estradiol and its Degradation Products in Topical Gel, Abstract Book of 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm, Švédsko 26. až 30.6.2005, poster P12:13
- 15) L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich: HPLC Determination of Calcium Pantothenate and two Preservatives in Topical Cream, Abstract Book of 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm, Švédsko 26. až 30.6.2005, poster P12:20
- 16) L. Matysová, L. Havlíková, A. Homolová, P. Solich, J. Šícha: Stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu metodou RP-HPLC, Sborník 34. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno 12. až 14.9.2005, str. 93 (P55)
- 17) H. Sklenářová, L. Matysová, R. Hájková, P. Švecová, J. Šícha: HPLC metoda pro stanovení klotrimazolu a dvou degradačních produktů ve spreji, Sborník 34. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno 12. až 14.9.2005, str.116 (P78)

- 18) L. Matysová, R. Hájková, P. Solich, J. Šícha: Separation and Determination of Terbinafine and its Four Impurities in Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC, Abstract book of the Drug Analysis 2006 Symposium, Namur, Belgie, PK 33
- 19) R. Hájková, H. Sklenářová, J. Klimundová, L. Matysová, P. Solich: Comparison of Ketoprofen Skin Permeation by In-Vitro Test using Franz Cell, Abstract book of the Drug Analysis 2006 Symposium, Namur, Belgie, PE 05
- 20) L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, P. Solich: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení pantothenanu vápenatého, methylparabenu a propylparabenu v topickém léčivém přípravku, Sborník 35. Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice 12. až 15.9.2006, str. 109 (P-39)
- 21) R. Hájková, L. Matysová, E. Rybenská, L. Nováková: Porovnání metod stanovení obsahu konzervačních látek v přípravku Lipolotio krém, Sborník 35. Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice 12. až 15.9.2006, str.89 (P-19)
- 22) L. Havlíková, L. Matysová, R. Hájková, P. Solich: Stanovení chlorhexidin glukonátu v masti metodou HPLC, Sborník 35. Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice 12. až 15.9.2006, str. 90 (P-20)

## 5.2. PŘÍLOHA I.

LUDMILA MATYSOVÁ, RENATA HÁJKOVÁ, PETR SOLICH:  
*SIMULTANEOUS DETERMINATION OF METHYLPARABEN,  
PROPYLPARABEN, TRIAMCINOLONE ACETONIDE AND ITS  
DEGRADATION PRODUCTS IN A TOPICAL CREAM BY RP-HPLC.*  
ANAL. BIOANAL. CHEM. – 376 (2004) 440-443









### 5.3. PŘÍLOHA II.

JAN DVOŘÁK, RENATA HÁJKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ, LUCIE NOVÁKOVÁ, MICHAEL A. KOUPPARIS, PETR SOLICH: *HPLC DETERMINATION OF KETOPROFEN AND ITS DEGRADATION PRODUCTS IN PRESENCE OF PRESERVATIVES IN PHARMACEUTICALS.*

J. PHARM. BIOMED. ANAL. – 36 (2004) 625-629













## 5.4. PŘÍLOHA III.

LUCIE NOVÁKOVÁ, PETR SOLICH, LUDMILA MATYSOVÁ, JAN  
ŠÍCHA: *HPLC DETERMINATION OF ESTRADIOL, ITS DEGRADATION  
PRODUCTS AND PRESERVATIVES IN NEW TOPICAL FORMULATION  
ESTROGEL HBF.*  
ANAL. BIOANAL. CHEM. - 379 (2004), 781 – 787

















## 5.5. PŘÍLOHA IV.

LUCIE NOVÁKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ, LUCIE HAVLÍKOVÁ,  
PETR SOLICH: *DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC  
METHOD FOR DETERMINATION OF INDOMETHACIN AND ITS TWO  
DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL GEL.*  
PHARM. BIOMED. ANAL. – 37 (2005) 899-905

















## 5.6. PŘÍLOHA V.

LUDMILA MATYSOVÁ , PETR SOLICH , PETR MAREK , LUCIE HAVLÍKOVÁ , LUCIE NOVÁKOVÁ , JAN ŠÍCHA .: *SEPARATION AND DETERMINATION OF TERBINAFINE AND ITS FOUR IMPURITIES OF SIMILAR STRUCTURE USING SIMPLE RP-HPLC METHOD.* TALANTA – 68 (2006) 713-720



















## 5.7. PŘÍLOHA VI.

LUCIE HAVLÍKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ, LUCIE NOVÁKOVÁ,  
PETR SOLICH: *HPLC DETERMINATION OF CALCIUM  
PANTHOTENATE AND TWO PRESERVATIVES IN TOPICAL CREAM.*  
J. PHARM. BIOMED.ANAL. – 41 (2006) 671-675













## 5.8. PŘÍLOHA VII.

LUCIE HAVLÍKOVÁ, LUCIE NOVÁKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ,  
PETR SOLICH: *HPLC DETERMINATION OF ESTRADIOL AND ITS  
DEGRADATION PRODUCTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY.*  
J. CHROMATOGR. A – 1119 (2006) 216-223



















## 5.9. PŘÍLOHA VIII.

LUCIE NOVÁKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ, DAGMAR SOLICHOVÁ,  
MICHAEL A. KOUPPARIS,, PETR SOLICH: *A COMPARISON OF  
PERFORMANCE OF C18 MONOLITHIC COLUMNS AND C18  
CONVENTIONAL PARTICLE-PACKED COLUMNS IN HPLC  
ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS.*

J. CHROMATOGR. B – 813 (2004)191-197

















## **5.10. PŘÍLOHA IX.**

**LUCIE NOVÁKOVÁ, LUDMILA MATYSOVÁ, PETR SOLICH:**  
***ADVANTAGES OF APPLICATION OF UPLC IN PHARMACEUTICAL***  
***ANALYSIS.***

**TALANTA – 68 (2006) 908-918**



























## **5.1 1. PŘÍLOHA X.**

**ABSTRAKTY A POSTERY PUBLIKOVANÉ NA ODBORNÝCH  
KONFERENCÍCH V LETECH 2002 – 2006**

# MOŽNOSTI VYUŽITÍ MONOLITICKÉ HPLC KOLONY V ANALÝZE TOPICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Ludmila Matysová, Renata Hájková, Dalibor Šatínský, Petr Solich

*Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci  
Králové, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Česká Republika*

Nejnovějším trendem v HPLC analýze se v současné době ukazuje použití monolitického silikagelu, jako náplně chromatografických kolon (kolony Chromolith™ firmy MERCK). Dosud byly HPLC kolony vyráběny převážně ze silikagelu, jehož malé částice, které zaujímají malý prostor, vytvářely velký odpor, působící proti průtoku mobilní fáze. Zavedením monolitického, vysoce porézního materiálu, obsahujícího kombinaci makropórů a mezopórů umožňuje rychlý postup eluentu a současně poskytuje dostatečně velký povrch pro adsorpci. Díky tomu mohou být použity vysoké průtoky s velmi nízkým zpětným tlakem, čímž dochází oproti separaci na klasické HPLC koloně k výraznému snížení času analýzy. Kolony Chromolith™ jsou vhodné pro vysoce účinnou separaci kyselých, bazických, nepolárních i chelatujících látek, jejich univerzálnost je činí ideálními pro rutinní práci v analytické laboratoři.

Cílem práce bylo porovnat výsledky separace účinných látek, konzervantů a nečistot v topických léčivých přípravcích na konvenčních kolonách a koloně monolytické. Konkrétně se jedná o analýzu krémů a gelů obsahujících jako účinnou látku hydrokortisonacetat, triamcinolonacetonid nebo sodnou sůl diklofenaku, jejich nečistoty a jako konzervační látky methylparaben a propylparaben.

Konkrétní výsledky porovnání různých parametrů separace na obou typech kolon jsou uvedeny na posteru.

Řešeno s finanční pomocí grantu MSM 111600001.

Speciální poděkování firmě MERCK za materiální podporu .



# Možnosti využití monolitické HPLC kolony v analýze topických léčivých přípravků

Ludmila Matysová, Renata Hájková, Dalibor Šatínský, Petr Solich

Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, Hradec Králové

## Úvod

Nejnovějším trendem v HPLC analýze se v současné době ukazuje použití monolitického silikagelu, jako náplně chromatografických kolon (kolony Chromolith<sup>TM</sup> firmy MERCK). Dosud používané HPLC kolony byly vyráběny ze silikagelu, jehož malé částice vytvářejí velký odpor, působící proti průtoku mobilní fáze. Zavedení monolitického, výsoce pórovitého materiálu, obsahujícího kombinaci makropórů a mezopórů umožňuje rychlý postup eluentu a současně poskytuje dostatečně velký povrch pro adsorpci. Díky tomu mohou být použity vysoké průtoky s velmi nízkým zpětným tlakem, čímž dochází oproti separaci na klasické HPLC koloně k výraznému snížení času analýzy. Kolony Chromolith<sup>TM</sup> jsou vhodné pro výsoce účinnou separaci kyselých, bazických, nepolárních i chelataujících látek, jejich univerzálnost je čími ideálními pro rutinní práci v analytické laboratoři.

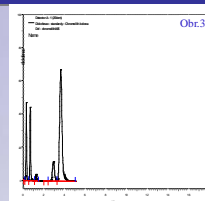
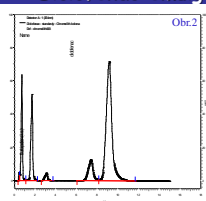
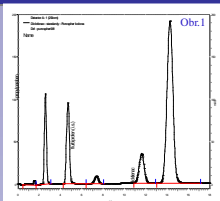
## Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat výsledky separace účinných látek, konzervantů a nečistot v topických léčivých přípravcích na konvenčních kolonách a koloně monolitické. Konkrétně se jedná o analýzu krémů a gelů obsahujících jako účinnou látku sodnou sůl diklofenaku, ketoprofenu nebo hydrokortisonacetátu, jejich nečistoty a jako konzervační látky methylparaben a propylparaben.

## Diclofenac emulze

### Chromatografické podmínky:

- Kolona I: ChromART Purospher RP-18e (Merck)  
125 x 4 mm, 5 µm, předkolona 4 x 4 mm, 5 µm  
Dávkování: 20 µl  
Mobilní fáze: methanol:fosfátový pufr pH 2,5  
65:35 (v/v)  
Průtok: 0,7 ml/min (obr.1)  
Detekce: UV 254 nm
- Kolona Chromolith SpeedROD RP-18e (Merck)  
50 x 4,6 mm  
Mobilní fáze: methanol:fosfátový pufr pH 2,5  
50:50 (v/v)  
Průtok: 2 ml/min (obr.2); 5 ml/min (obr.3)  
Parametry separace jsou shrnuty v tabulce I.

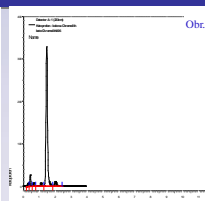
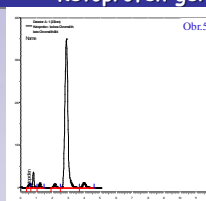
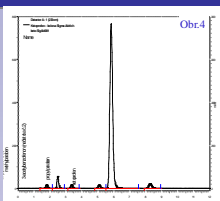


Tabulka I	látka	obr.č.	t <sub>R</sub> (min)	w (min)	N	R <sub>s</sub>	T
methylparaben		1	2,58	1,40	4616	1,86	0,98
		2	0,72	0,62	3920	1,56	0,75
		3	0,31	0,40	2000	3,78	0,87
propylparaben		1	4,70	2,13	9632	4,38	0,91
		2	1,70	1,12	9400	3,75	0,81
		3	0,69	0,53	4000	2,71	0,53
DFI (nečistota)		1	7,35	1,67	15352	4,37	0,65
		2	3,08	1,11	15960	3,67	0,90
		3	1,24	0,38	10400	2,91	1,03
ketoprofen (i.s.)		1	11,62	2,08	20080	5,34	0,75
		2	7,38	2,17	22500	6,54	1,13
		3	2,92	0,85	19940	5,72	2,22
diclofenac		1	14,28	4,12	23368	6,68	0,96
		2	9,16	3,50	27880	10,2	1,12
		3	3,63	1,73	23760	1,79	1,19

## Ketoprofen gel

### Chromatografické podmínky:

- Kolona SUPPELCO Discovery C18 (SigmaAldrich)  
125 x 4 mm, 5 µm, předkolona 20 x 4 mm, 5 µm  
Dávkování: 10 µl  
Mobilní fáze: acetonitril:voda:fosfátový pufr  
pH 3,5 - 40:58:2 (v/v/v)  
Průtok: 1,0 ml/min (obr.4)  
Detekce: UV 233 nm
- Kolona Chromolith SpeedROD RP-18e (Merck)  
50 x 4,6 mm  
Mobilní fáze: acetonitril:voda:fosfátový pufr  
pH 3,5 - 30:68:2 (v/v/v)  
Průtok: 2 ml/min (obr.5); 4 ml/min (obr.6)  
Parametry separace jsou shrnuty v tabulce II.

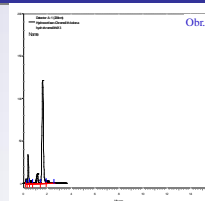
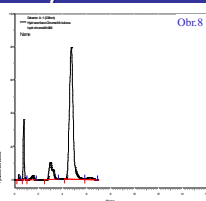
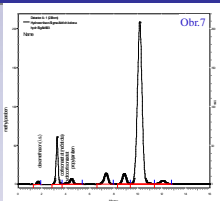


Tabulka II	látka	obr.č.	t <sub>R</sub> (min)	w (min)	N	R <sub>s</sub>	T
KFPA (nečistota)		4	1,77	0,54	9128	1,61	
		5	0,56	0,29	2680	1,58	
		6	0,50	0,37	1180	0,60	
methylparaben		4	2,48	0,79	20976	3,54	1,08
		5	0,80	0,37	8200	1,38	0,97
		6	0,42	0,18	4720	0,54	1,03
ethylparaben (i.s.)		4	3,34	0,69	29248	4,10	1,12
		5	1,19	0,44	13140	2,38	1,01
		6	0,62	0,23	8160	1,65	1,17
propylparaben		4	5,07	0,70	42312	6,85	1,09
		5	2,11	0,59	22780	4,26	1,08
		6	1,08	0,51	17020	3,45	1,06
ketoprofen		4	5,83	2,05	41450	12,54	1,11
		5	2,88	1,18	22600	2,53	1,06
		6	1,46	0,57	19420	2,24	1,13
N-acetylbenzofenon (nečistota)		4	8,26	0,80	63856	6,98	1,12
		5	3,95	0,97	41620	3,12	1,29
		6	1,99	0,57	32760	1,78	1,16

## Hydrokortison krém

### Chromatografické podmínky:

- Kolona SUPPELCO Discovery C18 (SigmaAldrich)  
125 x 4 mm, 5 µm, předkolona 20 x 4 mm, 5 µm  
Dávkování: 10 µl  
Mobilní fáze: methanol:acetonitril:voda  
15:27:58 (v/v/v)  
Průtok: 0,9 ml/min (obr.7)  
Detekce: UV 238 nm
- Kolona Chromolith SpeedROD RP-18e (Merck)  
50 x 4,6 mm  
Mobilní fáze: methanol:acetonitril:voda  
10:18:72 (v/v/v, obr.8)  
13:22:65 (v/v/v, obr.9)  
Průtok: 4 ml/min  
Parametry separace jsou shrnuty v tabulce III.



Tabulka III	látka	obr.č.	t <sub>R</sub> (min)	w (min)	N	R <sub>s</sub>	T
methylparaben		7	3,75	0,84	15280	4,99	0,80
		8	0,78	0,39	6840	3,18	0,97
		9	0,59	0,21	3720	3,19	1,00
hydrokortison (nečistota)		7	4,44	1,67	10448	3,02	0,71
		8	1,51	0,79	8900	3,28	0,69
		9	0,61	0,26	3340	1,43	1,51
hexamethason (i.s.)		7	7,33	1,37	18032	5,20	0,87
		8					
		9					
propylparaben		7	8,84	1,06	27340	2,48	1,01
		8	2,97	1,17	14180	3,91	1,42
		9	1,17	0,64	5560	2,39	0,69
hydrokortison-acetat		7	10,17	2,02	24528	1,98	0,96
		8	4,72	1,66	23140	3,51	1,10
		9	1,61	0,50	16560	1,73	1,03
kortisonacetat (nečistota)		7	12,01	1,40	26528	2,42	0,86
		8	6,26	1,08	27520	2,49	1,15
		9	2,02	0,63	13980	1,52	1,33

## Závěr

Použití monolitických kolon se zásadním způsobem projevuje ve zkrácení doby analýzy, je však třeba upravit poměr organické a vodné fáze v MF oproti separaci na běžných kolonách (ve prospěch vodné fáze, vzhledem ke kratším délkám monolitických kolon). Sířka píku při měření na monolitické koloně se zvyšujícím se průtokem snižuje, počet teoretických pater také, asymetrie píků zůstává prakticky nezměněna a rozlišení se snižuje, nikoliv však na úkor kvality separace. I při použití průtoku 5 ml/min se tlak na monolitické koloně pohybuje kolem 10 MPa (na běžných kolonách i o toto tlaku dosahujeme při průtocích nižších než 1 ml/min). Nedostatkem se může jevit větší spotřeba mobilní fáze, ale tomu lze předejít použitím spořiče mobilní fáze.

## Poděkování

Řešeno s finanční pomocí grantu MSM 111600001. Speciální poděkování firmě Merck za spolupráci.

t<sub>R</sub> - retenční čas  
w - šířka píku na základě  
N - počet pater na metru  
R<sub>s</sub> - rozlišení mezi sledovanými píkami a bezpodmínečně předcházejícím píkem  
T - asymetrie píku  
KRP - 1,1-2,2-4,4-trichlorofenyl-2-sulfonam  
KFP - 1,1-bis(2,4,6-trichlorofenyl)propan-2-on

# STANOVENÍ KYSELINY SALICYLOVÉ A METHYLSALICYLÁTU V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH METODOU RP-HPLC

Ludmila Matysová<sup>1</sup>, Renata Hájková<sup>1</sup>, Petr Solich<sup>1</sup>, Jan Šícha<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>2</sup>Bochemie-Group, Herbacos-Bofarma, Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Česká republika

Kyselina salicylová (2-hydroxybenzoová) má antiseptické, konzervační a antimykotické účinky a používá se proto v topických léčivých přípravcích jako dermatologikum a keratolytikum. Její methylester (methylsalicylát) má antirevmatické účinky na svaly a klouby a protože se dobře vstřebává kůží, je rovněž často používán v topických léčivých přípravcích. [1]

Cílem práce bylo vypracovat chromatografickou metodu pro HPLC analýzu kyseliny salicylové a methylsalicylátu metodou vnitřního standardu, kterým byl zvolen propylparaben. Pro analýzu byla použita kolona LiChroCART Purospher RP-18e (125×4mm, 5μm, Merck) s předkolonou LiChroCART Purospher RP-18e (4×4mm, 5μm, Merck), jako optimální mobilní fáze byla zvolena směs methanolu, vody a kyseliny octové v poměru 50:50:1 (v/v/v) s průtokem 1,5 ml/min a UV detekcí při vlnové délce 240 nm.

Vypracovaná a zvalidovaná metoda byla aplikována pro stanovení obsahu kyseliny salicylové a methylsalicylátu v hromadně vyráběném léčivém přípravku Aphlox pasta. Použita byla i pro analýzy určující homogenitu výrobního procesu a pro sledování obsahu obou látek při stabilitních studiích.

Na základě provedených měření lze konstatovat, že metoda poskytuje správné a přesné výsledky a je vhodná pro analýzu léčivých přípravků obsahujících uvedené látky.

Literatura: 1. Melichar B. a kol.: Chemická léčiva, Avicenum 1987, 191-192.

Problematika byla řešena za podpory grantu MSM 111600001.



# Stanovení kyseliny salicylové a methylsalicylátu v léčivých přípravcích metodou RP-HPLC

Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Renata Hájková<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a</sup>, Jan Šícha<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>b</sup> Bochemie-Group, Herbacos-Bofarma, Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Česká republika

## Úvod

Aphlox pasta obsahuje jako účinné látky methylester kyseliny salicylové (methylsalicylát, obr.1) a kyselinu salicylovou (obr.2). Methylsalicylát má antirevmatické účinky na svaly a klouby a protože se dobře vstřebává kůží, používá se často v topických léčivých přípravcích. Kyselina salicylová má účinky antiseptické, konzervační a antimykotické a v topických léčivých přípravcích se užívá jako dermatologikum a keratolytikum [1,2].

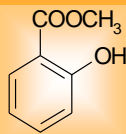
## Cíl práce

Cílem práce bylo vypracovat chromatografickou metodu pro HPLC analýzu kyseliny salicylové a methylsalicylátu metodou vnitřního standardu, kterým byl zvolen propylparaben. Vypracovanou metodu poté aplikovat na léčivý přípravek Aphlox pasta s možností využití i pro další přípravky obsahující tyto léčivé látky.

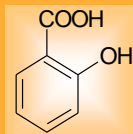
Stanovení těchto dvou látek vedle sebe v léčivých přípravcích nebylo dosud v odborné literatuře publikováno, pouze v článku, uvedeném v kapitole Literatura [3] byl popsán postup stanovení v krvi, ale po předchozí bazické hydrolyze.

### Postup práce:

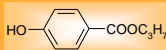
- Rešerše
- Změření UV-spekter
- Hledání optimálních chromatografických podmínek
- Hledání vhodného vnitřního standardu
- Aplikace metody na léčivé přípravky



Obr.1: Methylsalicylát

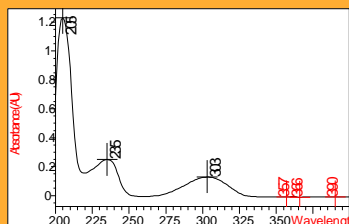


Obr.2: Kyselina salicylová

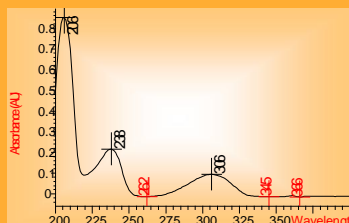


Obr.5: Vnitřní standard - propylparaben

## UV spektra



Obr.3: UV-spektrum kyseliny salicylové



Obr.4: UV-spektrum methylsalicylátu

## Výsledky a diskuse

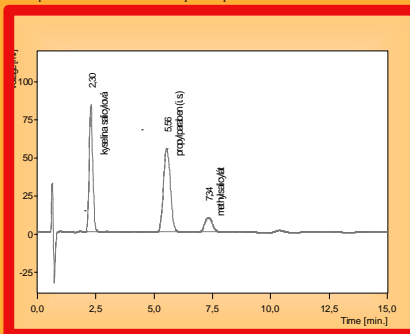
Při volbě optimálních chromatografických podmínek bylo čerpáno z článku, uvedeného v kapitole Literatura [3]. Oproti podmínkám v tomto článku uvedeným byly provedeny změny s ohledem

### Optimální chromatografické podmínky:

- HPLC přístroj: a) Pumpa: LCP 4100, ECOM Praha  
b) Autosampler: Waters 717 plus  
c) UV detektor: Waters 486
- Kolona: LiChroCART Purospher RP-18e, 125x4mm, 5 µm, Merck
- Předkolona: LiChroCART Purospher RP-18e, 4x4mm, 5 µm, Merck
- Dávkovaný objem: 20 µl
- Mobilní fáze: methanol : voda : kyselina octová (50 : 50 : 1, v/v/v)
- Průtok MF: 1,5 ml/min
- Detekce: UV 240 nm
- Teplota: laboratorní
- Vyhodnocení: Chromatografická stanice CSW společnosti DataApex s.r.o.
- Vnitřní standard: propylparaben

### Příprava vzorku pasty:

- Naváženo přesně asi 0,5 g pasty do centrifug. zkumavky o objemu 50 ml
- Přidáno 20,00 ml roztoku vnitřního standardu propylparabenu v methanolu o koncentraci  $c = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  a uzavřeno (vzhledem k tekavosti methylsalicylátu)
- Směs umístěna na 10 min do ultrazvukové lázně
- Centrifugace 15 min při rychlosti 3000 otáček/min
- Supernatant dávkován autosamplrem přímo na kolonu



Obr.6: HPLC chromatogram separace methylsalicylátu a kyseliny salicylové s využitím propylparabenu jako vnitřního standardu

## Závěr

Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro HPLC stanovení methylsalicylátu a kyseliny salicylové s využitím metody vnitřního standardu, kterým byl jako nejvhodnější zvolen propylparaben.

Uvedená metoda byla také úspěšně zvalidována a z výsledků validace je patrné, že ji je možno využít v další praxi pro rutinní analýzy farmaceutických přípravků obsahujících methylsalicylát a kyselinu salicylovou.

Vypracovaná metoda byla aplikována pro stanovení obsahu methylsalicylátu a kyseliny salicylové v přípravku APHLOX pasta. Byla použita pro analýzy při určování homogeneity výrobního procesu. Výsledky potvrzují výbornou reprodukovatelnost i citlivost metody.

## Literatura

- Melichar B. a kol.: Chemická léčiva, Avicenum Praha, 1987, 185-186.
- Mikro-verze AISLP 2001.2 pro MS Windows.
- Levin, B., Caplan, Y. H.: Liquid Chromatographic Determination of Salicylate and Methylsalicylate in Blood and Application to a Postmortem Case, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 8, 1984, 239-241.

## Poděkování

Problematika byla řešena za podpory grantu MSM 111600001.

# ISOCRATIC REVERSED-PHASE HPLC METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CLOROXINE AND METHYLPARABEN IN TOPICAL PHARMACEUTICAL FORMULATION

Radek Sladkovský <sup>a</sup>, Ludmila Matysová <sup>a</sup>, Marie Pospíšilová <sup>a</sup>, Jan Šícha <sup>c</sup>, Petr Solich <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University,

<sup>b</sup> The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University,  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>c</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd, Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic

## Introduction

Cloroxine (5,7-dichlor-8-quinolinole, Figure 1) is quinolinol derivate, used as intestinal disinfection and in dermatology as antiseptic substance. The pharmaceutical formulation (paste) containing cloroxine as an active compound with antiseptic activity was developed for treatment of dermatological diseases <sup>1,2</sup>. In order to prevent bacterial growth, preservative is used – methyl ester of p-hydroxybenzoic acid (methylparaben - Figure 1).



**Figure 1** – Major component and preservative in Endiaron paste 5%: (a) cloroxine (CLX); (b) methylparaben (MP).

For such a formulation, a method capable to analyse simultaneously the active component cloroxine and preservative methylparaben was developed. Thereafter, this HPLC method was successfully applied for the separation, quantification, homogeneity and stability study of both compounds in the pharmaceutical formulation Endiaron paste 5%.

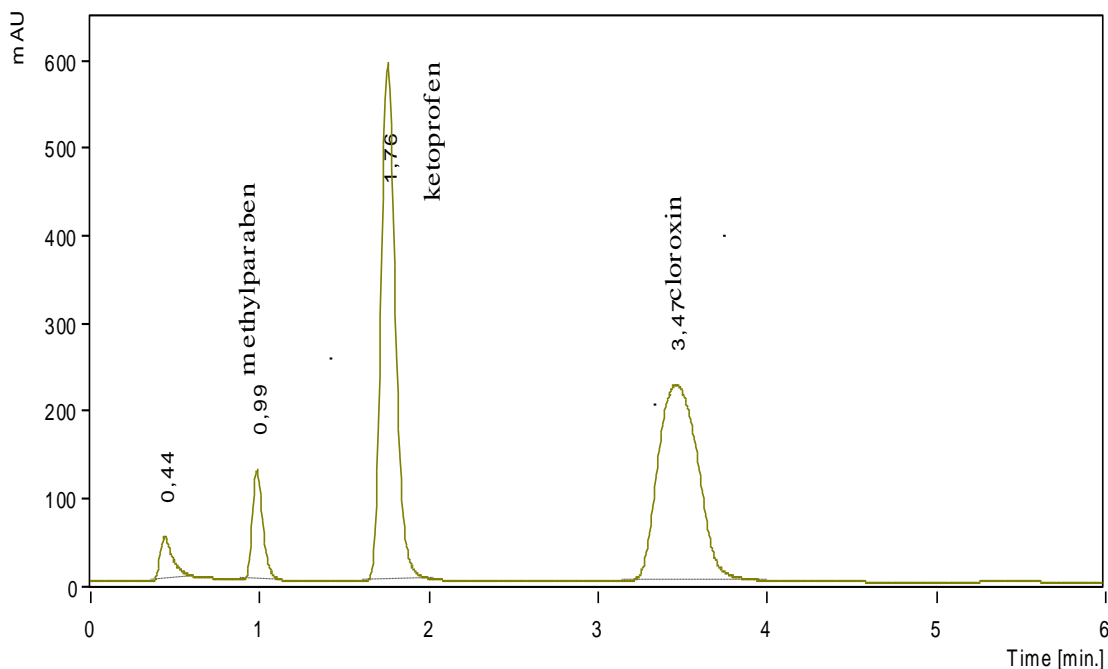
## Experimental

### Chromatographic system

The LC system, consisting of a gradient pump LCP 4100 (Ecom, Prague, Czech Republic), Waters autosampler 717 plus, variable wavelength UV detector Waters 486

(Waters, Milford, MA) and a PC for data processing, was controlled by a chromatographic software CSW v.1.7 for Windows (Data Apex s.r.o., Prague, Czech Republic).

Analyses were performed on a 5  $\mu\text{m}$  Xterra 100 $\times$ 3 mm ID column (Waters). The optimal mobile phase for separation of CLX, MP and ketoprofen (KP, used as internal standard) was a mixture of acetonitril and citrate buffer (45:55 v/v). Mobile phase was degassed before application by means of helium. The finally selected and optimised conditions were as follows: injection volume 10  $\mu\text{l}$ , the mobile phase isocratically pumped at a flow rate 1.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  at ambient temperature, and the detection wavelength 260 nm. The final concentrations of the compounds were about 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of cloroxine, 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of methylparaben, and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of internal standard ketoprofen. Figure 2 shows a chromatogram of standard solutions of cloroxine, preservative and ketoprofen as internal standard.



**Figure 2** – Chromatogram of separation of standard solution

### Sample preparation

Portion of a pharmaceutical paste (0.1 g) was mixed with 4.0 ml of EDTA, disodium salt solution in water (0.1 M) and the mixture was placed on the ultrasonic bath for 15 minutes, after that 6.0 ml of hydrochloric acid solution in water (0.1 M) was added and the mixture was placed into the ultrasonic bath for 15 minutes again. Finally, this mixture was supplemented with the internal standard (10.0 ml of a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  solution of ketoprofen in acetonitril) and this mixture was placed into the ultrasonic bath for 10 minutes and then centrifuged at 6000 rpm for 15 minutes. The supernatant was filtered with the membrane filter (size of pores 0.45  $\mu\text{m}$ ). A volume of 10  $\mu\text{l}$  of this solution was analysed by HPLC.



## Results

### Analytical parameters and validation

The optimised method was validated by a standard procedure to evaluate if adequate accuracy, precision, selectivity and linearity had been achieved. The method validation results obtained under the final conditions are shown in Table 1. The method meets all common requirements for accuracy, precision and linearity.

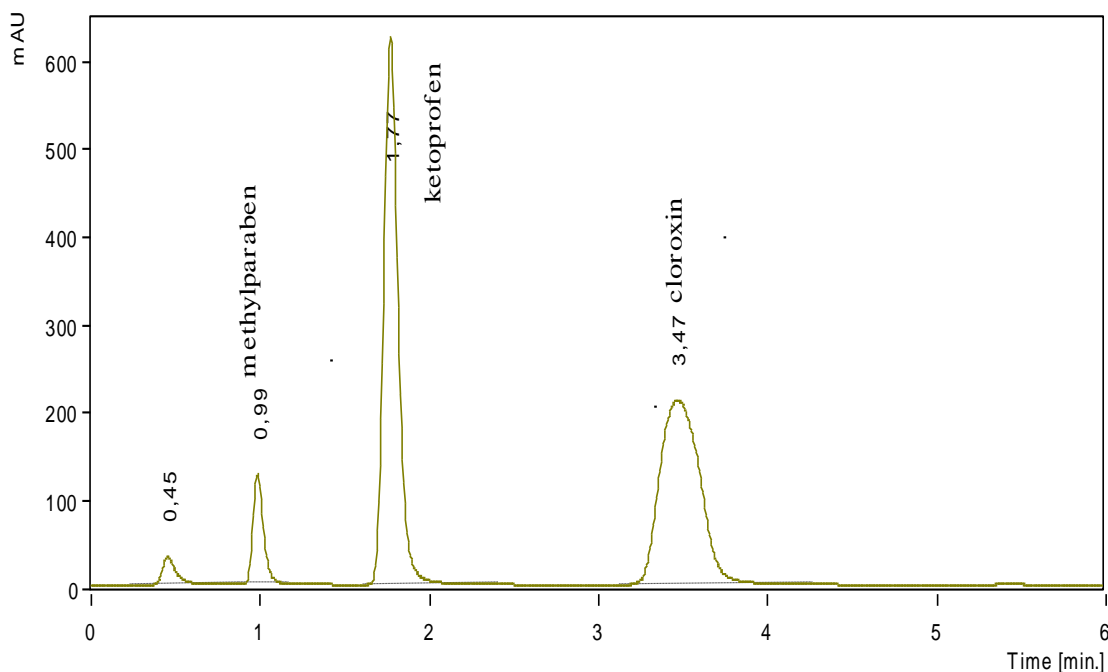
**Table 1** – Method validation results

Validation step	Parameter	CLX	MP	Criteria
System precision	RSD	0.54 %	0.81 %	$X < 2\%$
Method precision	RSD	1.60 %	0.42 %	$X < 2\%$
Accuracy	Spike recovery	103.52 %	103.79 %	$X = 100 \pm 3 \%$
	Recovery RSD	0.18 %	0.53 %	$X < 2\%$
Linearity (n=6)	Correlation coef.	0.9993	0.9996	$X > 0.990$

## Discussion

### Determination in a pharmaceutical product

The chromatogram in Figure 3 was obtained using the described LC method with a sample of topical Endiaron paste 5 % with the added internal standard ketoprofen. Both compounds presented in the sample (cloroxine and methylparaben), and internal standard, are clearly separated.



**Figure 3** – Chromatogram of a topical paste with the internal standard ketoprofen.

## Conclusions

The LC method with UV spectrophotometric detection on an Xterra column was developed for the determination of cloroxine and methylparaben in a topical paste, using ketoprofen as an internal standard.

The total analysis time was less than 6 min. The method has been validated; the results obtained were precise and accurate. The method can use for routine analysis (batch analysis, homogeneity and stability tests) of compounds in pharmaceutical products containing the active compound cloroxine and preservative methylparaben.

This method was successfully applied for the identification, quantitative analysis and stability tests of both compounds in the topical paste – Endiaron paste 5%.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Grant Agency of the Ministry of Education of the Czech Republic – MSM 111600001 and The Research Centre LN00B125.

## References

1. Český lékopis 1997 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd., Prague, Czech Republic, p. 1440.
2. Mikro-version AISLP 2003.1 for MS Windows.
3. Wojtowitz, E.: Reverse-phase high-performance liquid-chromatographic determination of halogenated hydroxyquinoline compounds in pharmaceuticals and bulk drugs, *J. Pharm. Sci.* 73 (10), 1984, s. 1430 –1433.



# Isocratic reversed-phase HPLC method for the simultaneous determination of cloroxine and methylparaben in topical pharmaceutical formulation

Radek Sladkovský<sup>a</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Marie Pospíšilová<sup>a</sup>, Jan Šícha<sup>c</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> The Research Centre LN00B125

<sup>c</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic

## INTRODUCTION

Cloroxine (5,7-dichlor-8-quinoline, Figure 1) is quinolinol derivate, used as intestinal disinfection and in dermatology as antiseptic substance. The pharmaceutical formulation (paste) containing cloroxine as an active compound with antiseptic activity was developed for treatment of dermatological diseases <sup>1,2</sup>. In order to prevent bacterial growth, preservative is used - methyl ester of p-hydroxybenzoic acid (methylparaben - Figure 1).

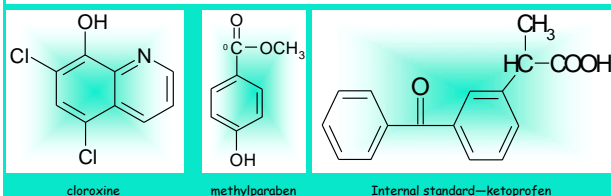


Fig.1: Major components of Endiaron paste and internal standard—Ketoprofen

## AIM OF THE WORK

The purpose of this study was to develop a new HPLC method for the determination of two compounds in topical paste - active component cloroxine and preservative methylparaben, using internal standard (ketoprofen). Thereafter, this method has been validated and successfully applied for the separation, quantification and stability study of all compounds in the pharmaceutical formulation - Endiaron paste 5%.

## CHROMATOGRAPHIC SYSTEM

Pump: Ecom LCP 4100  
 Autosampler: Waters 717 plus  
 UV detector: Waters 486  
 PC for data processing (with chromatographic software CSW v.1.7 for Windows)

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimal chromatographic conditions:

column: Xterra 100 x 3 mm ID, 5 μm (Waters)  
 column temperature: ambient  
 injection volume: 10 μl  
 mobile phase: mixture of acetonitrile and citrate buffer (45:55 v/v), mobile phase was degassed before application by means of helium  
 flow rate: 1.0 ml.min<sup>-1</sup>  
 UV detection: λ = 260 nm  
 internal standard: ketoprofen  
 time of analysis: 6 min

### Sample preparation:

Portion of a pharmaceutical paste (0.1 g) was mixed with 4.0 ml of EDTA, disodium salt solution in water (0.1 M) and the mixture was placed on the ultrasonic bath for 15 minutes, after that 6.0 ml of hydrochloric acid solution in water (0.1 M) was added and the mixture was placed into the ultrasonic bath for 15 minutes again. Finally, this mixture was supplemented with the internal standard (10.0 ml of a 10 μg.ml<sup>-1</sup> solution of ketoprofen in acetonitril) and this mixture was placed into the ultrasonic bath for 10 minutes and then centrifuged at 6000 rpm for 15 minutes. The supernatant was filtered with the membrane filter (size of pores 0.45 μm). A volume of 10 μl of this solution was analysed by HPLC.

## CHROMATOGRAM

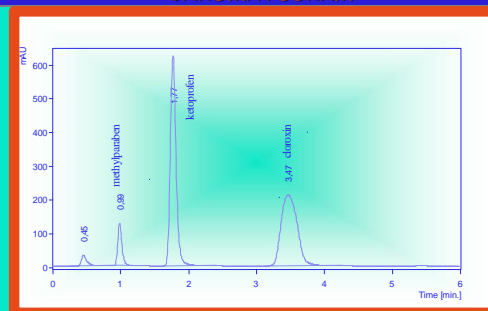


Fig.2: Chromatogram of all compounds in topical paste Endiaron paste 5% with the allowance of the internal standard (ketoprofen, 100 μg.ml<sup>-1</sup>).

## METHOD VALIDATION RESULTS

Validation step	Parameter	Cloroxine	Methylparaben	Criteria
System precision	RSD <sup>a</sup>	0.54 %	0.81 %	X < 2%
Method precision	RSD <sup>b</sup>	1.60 %	0.42 %	X < 2%
Accuracy	Spike recovery <sup>b</sup>	103.52 %	103.79 %	X = 100 ± 5 %
	Recovery RSD <sup>b</sup>	0.18 %	0.53 %	X < 2%
Linearity (n=6) <sup>c</sup>	Correlation coef.	0.99927	0.99961	X > 0.9990
Sample stability <sup>d</sup>	% change in response factors	0.93 %	0.53 %	X < 2%

<sup>a</sup> six injections  
<sup>b</sup> three preparations each, two injections of each preparation  
<sup>c</sup> at 10, 100, 500, 1000, 2000 μg levels  
<sup>d</sup> two-day stability data at 20°C for both compounds

## CONCLUSION

The LC method with UV spectrophotometric detection on an Xterra column was developed for the determination of cloroxine and methylparaben in a topical paste, using ketoprofen as an internal standard.

The total analysis time was less than 6 min. The method has been validated; the results obtained were precise and accurate. The method can use for routine analysis (batch analysis, homogeneity and stability tests) of compounds in pharmaceutical products containing the active compound cloroxine and preservative methylparaben.

This method was successfully applied for the identification, quantitative analysis and stability tests of both compounds in the topical paste - Endiaron paste 5%.

## REFERENCES

1. Český lékopis 1997 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd., Prague, Czech Republic, p. 1440.
2. Mikro-version AISLP 2003.1 for MS Windows.
3. Wojtowitz, E: Reverse-phase high-performance liquid-chromatographic determination of halogenated hydroxyquinoline compounds in pharmaceuticals and bulk drugs, J. Pharm. Sci. 73 (10), 1984, s. 1430-1433.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support of the Grant Agency of the Ministry of Education of the Czech Republic - MSM 111600001 and the Research project LN00B125.

# HPLC DETERMINATION OF ESTRADIOL, ITS DEGRADATION PRODUCTS AND PRESERVATIVES IN NEW TOPICAL PREPARATION ESTROGEL HBF

Lucie Nováková<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Jan Šícha<sup>c</sup>

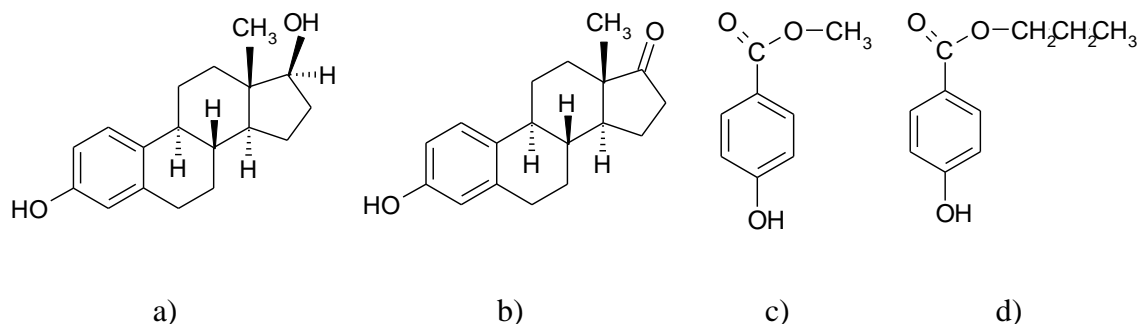
<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup>The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>c</sup>Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic  
email: [novakoval@faf.cuni.cz](mailto:novakoval@faf.cuni.cz), [solich@faf.cuni.cz](mailto:solich@faf.cuni.cz), [matysova@faf.cuni.cz](mailto:matysova@faf.cuni.cz), [jan.sicha@worldonline.cz](mailto:jan.sicha@worldonline.cz)

## Introduction

Estradiol is a steroid hormone naturally occurring in human body. Lack of this compound at older women causes climacteric syndrom (hot flushes, night sweats, urogenital atrophy and depressive moods) and increases risk of postmenopausal osteoporosis. This is why different pharmaceutical formulations, especially tablets and transdermal plasters, containing estradiol were developed. Recently a new type of transdermal formulation - a topical gel containing estradiol as an active substance - has been developed. This kind of administration is very convenient, because estradiol in transdermal form is absorbed directly into the blood circulation, there is no influence of primary hepatic metabolism and fast degradation. Another positive feature of the use of transdermal formulation is that the amount of hormone administrated to the body is lower comparing to peroral administration. Estradiol is stored in a subcutaneous tissue and is gradually released into the blood circulation. It is metabolized at liver, forming estrone and consequently estriol.

There is a need to develop new analytical methods for simultaneous determination and quantification of active substance, preservatives and possible impurities in pharmaceutical formulations. In our study, high performance liquid chromatography with UV detection was chosen for separation, determination and quantification of estradiol (figure 1a) as an active substance, methylparaben (figure 1c) and propylparaben (figure 1d) as preservatives and estrone (figure 1b) as impurity according to USP 25 in topical pharmaceutical formulation Estrogel.



**Figure 1:** Active substance, preservatives and degradation product in Estrogel gel

## Experimental

### Apparatus

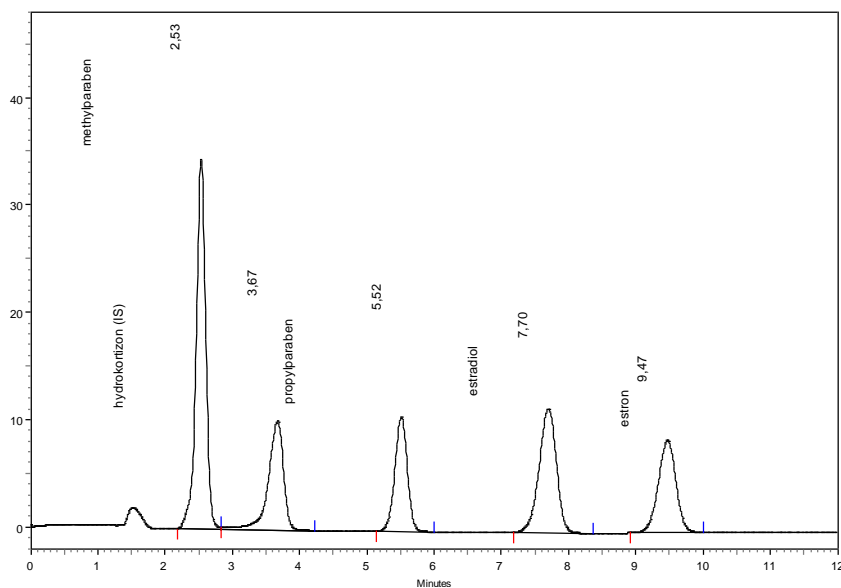
Analyses were performed on Shimadzu LC-2010 C system with UV detection. Chromatographic software Class VP 5 was used for data collection and processing.

### Chemicals

All solvents and water used for analyses were of HPLC grade purity. Standards used for identification and quantification were purchased from Sigma – Aldrich and from Merck.

### Procedure

Optimal separation of all compounds mentioned above was reached under the following chromatographic conditions: analytical column Discovery™ C18 (250 x 3,0 mm ID, 5 µm), mobile phase as a mixture of acetonitrile, methanol and water (23:24:53 v/v/v) filtered before use on Millipore device. Mobile phase was isocratically pumped at flow rate 0,9 ml/min. Temperature of column oven was kept at 40 °C and detection of compounds was accomplished at 225 nm. Injection volume was 10 µl. Hydrocortizone was chosen as optimal internal standard for quantification.



**Figure 2:** Chromatogram of separation of compounds in standard solution

### Sample preparation

Extraction procedure was developed on a basis of pharmacopoeial method with simple adjustments. Amount of 0,5 g of topical gel accurately weighed (which means 1,5 mg of estradiol) was transferred into 50,0 ml centrifuge tube and 20,0 ml of internal standard solution in acetonitrile (1 mg/100 ml of hydrocortizon in acetonitrile) was added. This mixture was sonicated for 10 minutes and then centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm. Supernatant was injected directly into the analytical column.

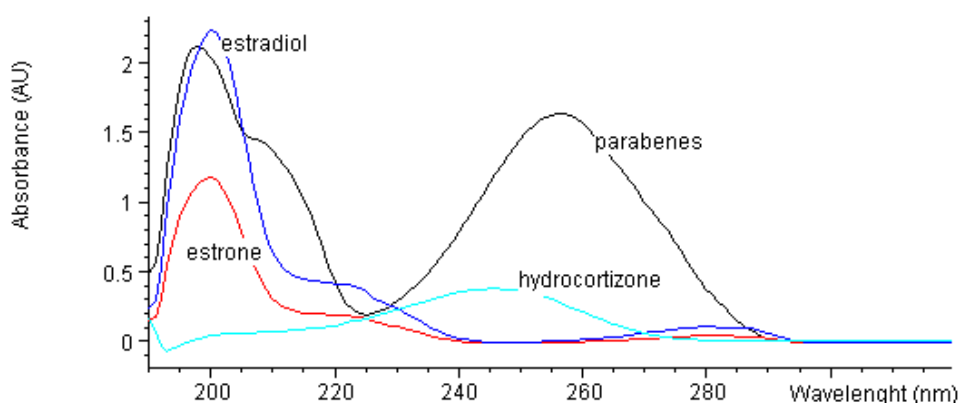
## Results and discussion

### Chromatographic conditions

Supelco Discovery C18 (250 x 3,0 mm ID, 5  $\mu$ m) analytical column was chosen for separation of all compounds studied. Firstly, analysis were performed at laboratory temperature. In order to improve repeatability of single run and separation of compounds, for shortening analysis time and also to decrease column backpressure, which is important to extend column lifetime, the column oven temperature was increased to 40 °C.

Various mixtures of acetonitrile, methanol and water were tested as mobile phase. As regards to resolution, peak asymetry and analysis time, the rate of individual components was optimized to (23:24:53 v/v/v). Optimal flow rate was set up to 0,9 ml/min, elution was accomplished isocratically.

Another problem was to choose optimal wavelength for detection of all compounds together. As it could be seen in figure 3, obviously absorption maximum of preservatives (methylparaben and propylparaben) is about 250 nm, but it is impossible to quantify active substance estradiol and its degradation product estrone at this wavelength, because they doesn't show any absorption there. Their maximum is at about 200 nm, which is also wavelength recommended by USP 25, but there is still poor detector response there. Wavelength 225 nm appears to be an ideal one, because it is selective enough and it shows sufficient absorption of all compounds studied. This wavelength was found experimentally after measuring all spectra.



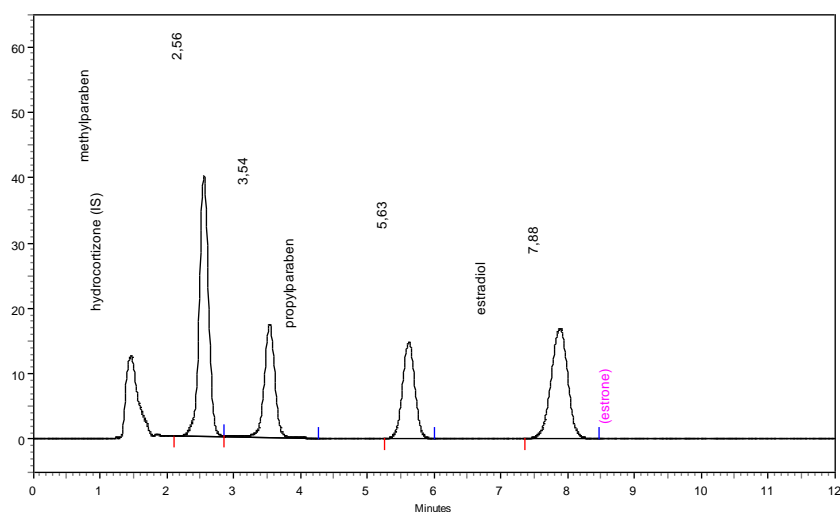
**Figure 3:** UV spectra of examined compounds

Several compounds were tested as internal standards for quantification. Dexametazone and hydrocortizone are two steroidal compounds, similar to active substance estradiol and estrone degradation product, ethylparaben and buthylparaben are similar to structure of preservatives. Two of them, ethylparaben and hydrocortisone, could be used for final quantification, because they have suitable chromatographic properties. Finally, hydrocortizone was chosen as internal standard for its similar structure.

### Isolation procedure

Chromatogram in figure 4 is an illustration of good separation of all compounds tested. Acetonitrile containing internal standard hydrocortizone was used as extraction agent. The procedure as described above gives recovery from 96,6 – 101,7 %. Using this procedure

and chromatographic conditions mentioned above allows isolation, identification and quantification of all examined compounds in topical gel.



**Figure 4:** Chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical formulation Estrogel HBF

## Conclusions

New analytical method for determination and quantification of estradiol, its degradation product estrone and preservatives using internal standard for quantification was developed. Separation was performed by HPLC with UV detection at 225 nm. All compounds were well separated with sufficient resolution, good reproducibility and peak asymmetry at relatively short time, total analysis time was less than 12 minutes.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Grand Agency of the MSMT of the Czech republic – FRVS No. 2999/2003 and by Research project LN00B125 of Czech Ministry of Education.

## References

1. A. Donantes, S. Stanchonsky, J. Pharm. Sci., 1994, 83, 379 - 381
2. P. K. Zarzycki, R. Smith, J. Chromatogr., 2001, 912, 45 - 52
3. J. Li, P. S. Shah, J. Chromatogr. 2002, 954, 159 – 171



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

Lucie Nováková<sup>a</sup>, Lucie Havlíková<sup>a,b</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup> 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.

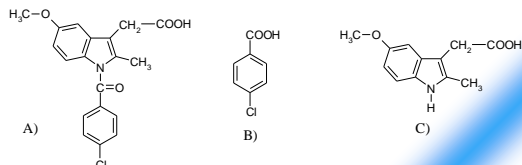
Chemically it is 1 - (4 - chlorobenzoyl) - 5 - methoxy - 2 - methylindoleacetic acid. By decomposition it forms two degradation products: 4-chloro-benzoic acid and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid. They have to be monitored together with an active substance both during manufacturing process and storage 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

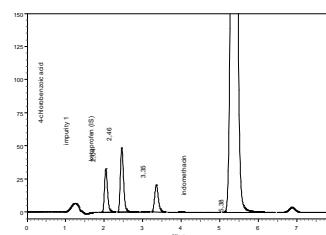
0.5 g of topical gel accurately weighed was transferred into 50.0 ml centrifuge tube

20.0 ml of internal standard solution in acetonitrile was added (1 mg/ml)

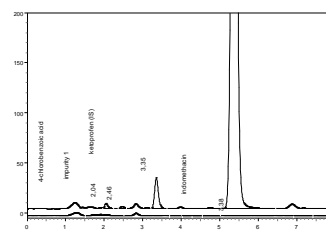
sonication for 10 minutes

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
<b>SST</b>				
theoretical plates <sup>a</sup>	7658	4000	3103	N > 1500
Asymmetry <sup>a</sup>	1.06	1.15	1.24	T < 1.5
Resolution <sup>a</sup>	5.59	2.70	3.11	R <sub>s</sub> > 1.5
repeatability-4, b	0.34	0.23	0.18	R.S.D. < 1%
repeatability-A <sup>b</sup>	0.18	0.66	0.45	R.S.D. < 1%
<b>Validation</b>				
Precision <sup>c</sup> [% RSD]	1.39	3.25	3.10	R.S.D. < 5%
Linearity (correlation coefficient)	0.9999 <sup>d</sup>	0.9999 <sup>d</sup>	0.9999 <sup>d</sup>	R > 0.9990
Accuracy <sup>e</sup> [% RSD]	0.70	0.62	1.13	R.S.D. < 5%
Accuracy <sup>f</sup> [% recovery]	98.53	98.27	96.22	100±5%
selectivity	no interference	no interference	no interference	-
LOD [mg/ml]	-	5.69.10 <sup>-5</sup>	2.25.10 <sup>-4</sup>	-
LOQ [mg/ml]	-	1.90.10 <sup>-4</sup>	7.5.10 <sup>-4</sup>	-

<sup>a</sup> made in three replicates

<sup>b</sup> made in six replicates

<sup>c</sup> six samples injected three times each

<sup>d</sup> at 20, 50, 80, 100, 120, 150 % levels, three replicates

<sup>e</sup> 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.

## Acknowledgments

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



# VYUŽITÍ METOD HPLC PŘI STANOVENÍ HEXACHLOROFENU V TOPICKÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

Ludmila Matysová<sup>1</sup>, Petr Marek<sup>1</sup>, Petr Solich<sup>1,2</sup>, Jan Šícha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>2</sup>Výzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>3</sup>Bochemie-Group, Herbacos-Bofarma, Štrosova 239, 530 02 Pardubice, Česká republika

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení karbetopendeciniumbromidu a hexachlorofenu metodou RP-HPLC v topickém léčivém přípravku (Septonex mast). Jednou z cest, vedoucích k vypracování metody ke stanovení obou těchto látek v masti zároveň, byla vzhledem k prakticky nulové absorpci UV záření karbethopendeciniumbromidu nepřímá detekce, využívající principu iontové párové chromatografie. Pro opakovaně nereprodukovatelné výsledky získané u nově vyvinuté metody se výzkum dále zaměřil na stanovení samotného hexachlorofenu.

Byla vypracována metoda stanovení hexachlorofenu v uvedeném přípravku. Pro analýzu byla použita kolona LiChroCART Purospher RP-18e (125x4 mm, 5 µm, Merck) s předkolonou LiChroCART Purospher RP-18e (4x4 mm, 5 µm, Merck), jako mobilní fáze byla zvolena směs methanolu, vody a kyseliny octové v poměru 85:15:1 (v/v/v) s průtokem 1,5 ml/min a UV detekcí při vlnové délce 299 nm.

Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení obsahu hexachlorofenu v hromadně vyráběném léčivém přípravku Septonex mast. Metoda je určena ke sledování obsahu hexachlorofenu v rámci stabilitní studie a testování homogenity výrobního procesu.

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



# VYUŽITÍ METOD HPLC PŘI STANOVENÍ HEXACHLOROFENU V TOPICKÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

LUDMILA MATYSOVÁ<sup>A</sup>, PETR MAREK<sup>A</sup>, PETR SOLICH<sup>A,B</sup>, JAN ŠÍCHA<sup>C</sup>

<sup>A</sup>KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ  
FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, HEYROVSKÉHO 1203, HRADEC KRÁLOVÉ

<sup>B</sup>VÝZKUMNÉ CENTRUM LNOOB125

<sup>C</sup>BOCHEMIE GROUP, HERBACOS-BOFARMA, ŠTROSSOVA 239,  
530 02 PARDUBICE

## ÚVOD

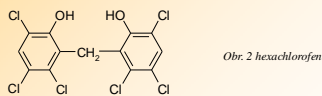
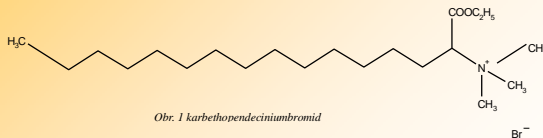
Septonex mast je přípravek, který se používá jako desinficiens v dermatologii, především k prevenci infekce drobných poranění. Obsahuje dvě účinné látky—Karbethopendeciniumbromid (obr. 1) a Hexachlorofen (obr. 2).

Karbethopendeciniumbromid se ve farmácii využívá pro své baktericidní a částečné antimykotické účinky jako lokální antiseptikum, dezinfekční prostředek a konzervans očních kapek.

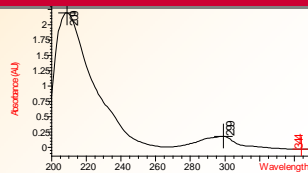
Hexachlorofen je účinnou bakteriostaticky působící látkou. Používá se jako antiseptikum do např. mýdel k mytí chirurgu nebo do přípravku proti akně<sup>1,2</sup>.

## CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracovat metodu HPLC s UV detekcí pro stanovení hexachlorofenu (pro karbethopendeciniumbromid nebyla tato metoda sledována vzhledem k jeho prakticky nulové absorpci UV záření.), tuto metodu aplikovat na léčivý přípravek Septonex mast s možností využití pro další léčivé přípravky tuto látku obsahující.



## UV SPEKTRUM HEXACHLOROFENU



## VÝSLEDKY A DISKUZE

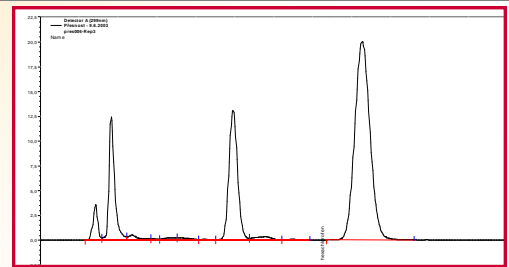
### Optimální chromatografické podmínky:

HPLC přístroj:	Shimadzu LC-2010C, Shimadzu corp., Japonsko
kolona:	LiChroCART Purospher RP-18e, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm, velikost částic 5 µm (Merck)
teplota:	laboratorní
dávkování:	20 µl
mobilní fáze:	methanol—voda—kyselina octová (85:15:1; v/v/v), před použitím filtrována zařízením Millipore (filtr ze skleněných vláken, velikost póru 0,7 až 1,3 µm)
prtok:	1,5 ml.min <sup>-1</sup>
UV detekce:	λ = 299 nm
Vyhodnocení:	chromatografická stanice Class VP, verze 5.0, Shimadzu

### Příprava vzorku masti:

Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství masti odpovídající 0,5 mg hexachlorofenu, (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,0 ml methanolu a směs byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs umístěna na 15 min do mrazicího boxu. Vzniklý roztok byl filtrován membránovým filtrem (0,45 µm) a dávkován autosamplermem na kolonu.

## CHROMATOGRAM



## VYBRANÉ VALIDAČNÍ PARAMETRY

	Parametr	Hexachlorofen	Požadavek
Vhodnost systému	RSD <sup>a</sup>	0,13%	X < 2%
Přesnost	RSD <sup>b</sup>	1,85%	X < 2%
Správnost	Výtěžnost <sup>b</sup>	102,72%	X = 100 ± 3 %
	RSD <sup>b</sup>	0,71%	X < 2%
Linearity (n=6) <sup>c</sup>	Korelační koeficient	0,999916	X > 0,9990
Stabilita roztoku standardu <sup>d</sup>	S <sub>T</sub> <sup>d</sup>	0,12	X < 2%

<sup>a</sup> Šest nástříků

<sup>b</sup> 6x vzorek samostatně připraven, pro každou navážku 2 nástříky

<sup>c</sup> při koncentraci 50, 75, 100, 125, 150, 200 % (100% = 2,64 mg/100 ml)

<sup>d</sup> stabilita po 72 hodinách

## ZÁVĚR

Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro HPLC stanovení hexachlorofenu.

Uvedená metoda byla také úspěšně validována a z výsledků validace je patrné, že ji je možno využít v další praxi pro rutinní analýzy farmaceutických přípravků obsahujících hexachlorofen.

Vypracovaná metoda byla aplikována pro stanovení obsahu hexachlorofenu v přípravku SEPTONEX mast (obsah hexachlorofenu 0,1%). Výsledky potvrzují výbornou reprodukovatelnost i citlivost metody.

## LITERATURA

- [1] Mikró verze AISLP, v. 2003.3
- [2] Český lékopis 2002 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd., Praha, Česká republika 2003.

## PODEKOVÁNÍ

Problematika byla řešena za podpory grantu MSM 111600001 a Výzkumného centra LNOOB125.

# POROVNÁNÍ HPLC ANALÝZY TOPICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ S VYUŽITÍM MONOLITICKÝCH A BĚŽNÝCH C18 KOLON

Lucie Nováková<sup>a</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, <sup>b</sup> Výzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Česká republika  
email: [novakoval@faf.cuni.cz](mailto:novakoval@faf.cuni.cz)

Trendem dnešní kapalinové chromatografie je vývoj nových sorbentů, které jsou schopny separovat i problematické látky jako např. polární nebo bazické, pracovat v širokém rozmezí teplot i pH a provést analýzu v nejkratším možném čase.

Jedním z takových typů sorbentů je monolitický silikagel (Chromolith<sup>TM</sup>, firma Merck). Vyznačuje se odlišnou strukturou vzhledem k běžnému silikagelu. Zatímco konvenčně používané kolony jsou plněny malými silikagelovými částicemi sférického tvaru, monolitické kolony obsahují speciální silikagel, který se neskládá z částic. Vyrábí se pomocí speciální sol-gel technologie a tak se získá jednolitý vysoce porézní materiál, který ve své struktuře obsahuje mezopóry a makropóry a také je bez příměsí kovů. Sorbent neklade tak velký odpor protékající mobilní fázi, ale přitom poskytuje dostatečný povrch pro absorpci látek. Díky tomu lze použít vyšší průtokové rychlosti bez negativního nárůstu zpětného tlaku a tak zkrátit čas analýzy při zachování rozlišení píků. Výhodou je i krátký čas potřebný k ekvilibraci kolony při použití gradientu koncentračního.

Cílem této práce je porovnat metodiky zavedené a validované na běžných kolonách se stacionární fází C18 (Discovery RP C18) s aplikacemi na monolitické kolony (Chromolith<sup>TM</sup>) o různých délkách. Konkrétně se jedná o porovnání separace účinných látek, nečistot a konzerancií v topických léčivých přípravcích Estrogel gel (estradiol, methylparaben, propylparaben a estron) a přípravek Ketoprofen gel (ketoprofen, methylparaben, propylparaben a nečistoty A a C dle platného lékopisu).

Projekt byl řešen s podporou grantu FRVŠ 2999/2003 a výzkumných záměrů MSM 111600001.



# POROVNÁNÍ HPLC ANALÝZY TOPICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ S VYUŽITÍM MONOLITICKÝCH A BĚŽNÝCH C18 KOLON

Lucie Nováková<sup>a</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, <sup>b</sup> Výzkumné centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika  
email: novakoval@faf.cuni.cz

## Úvod

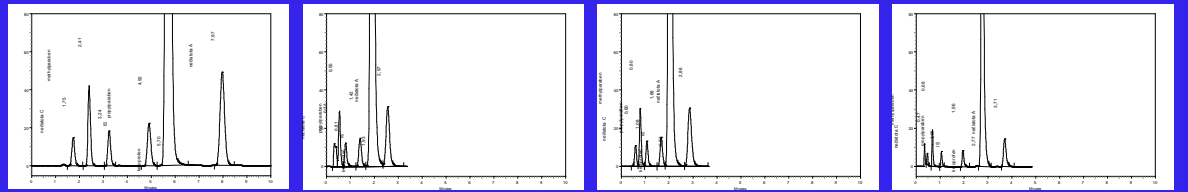
Trendem dnešní kapalinové chromatografie je vývoj nových sorbentů, které jsou schopny separovat i problematické látky, pracovat v širokém rozmezí teplot i pH a provést analýzu v nejkratším možném čase při zachování dokonalé separace. Jedním z takových typů sorbentů je monolitický silikagel, který se vyrábí pomocí speciální sol-gel technologie a tak se získá jednolitý vysoce porézní materiál. Má ve své struktuře mezopory a makropory a také je bez příměsí kovů. Sorbent neklade tak velký odpor protékající mobilní fázi, ale přitom poskytuje dostatečný povrch pro absorpci látek. Díky tomu lze použít vyšší průtokové rychlosti bez negativního nárůstu zpětného tlaku a tak zkrátit čas analýzy při zachování rozlišení píků.

## Cíl práce

Cílem této práce je porovnat metodiky zavedené a validované na běžných kolonách se stacionární fází C18 s aplikacemi na monolitické kolony (Chromolith™) o různých délkách. Konkrétně se jedná o porovnání separace účinných látek, nečistot a konzerancí v topických léčivých přípravcích Estrogel gel (estradiol, methylparaben, propylparaben a estron) a přípravek Ketoprofen gel (ketoprofen, methylparaben, propylparaben a nečistoty A a C dle platného lékopisu).

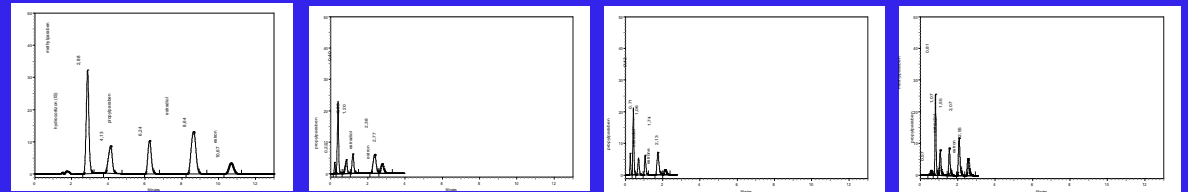
## Experimentální práce

### Ketoprofen



látka	t <sub>R</sub> (min)	W (min)	N	R <sub>s</sub>	T	Podmínky:
nečistota C	1,75	0,13	960	1,95	1,10	analytická kolona, Discoversy™ C18 (25 x 4,0 mm ID, 5 µm)
methylparaben- IS	2,41	0,11	2280	2,58	1,25	monolitická kolona, Chromolith™ Flash RP-18 e (25 x 4,0 mm ID)
propylparaben	3,24	0,13	3294	3,90	1,27	monolitická kolona, Chromolith™ SpeedROD RP-18 e (50 x 4,6 mm ID)
ketoprofen	4,92	0,16	5158	6,20	1,03	monolitická kolona, Chromolith™ Performance RP-18 e (100 x 4,6 mm ID)
nečistota A	7,97	0,21	7981	6,77	1,13	monolitická kolona, Chromolith™ Performance RP-18 e (100 x 4,6 mm ID)

### Estrogel



látka	t <sub>R</sub> (min)	W (min)	N	R <sub>s</sub>	T	Podmínky:
methylparaben	2,88	0,16	1721	3,38	1,42	analytická kolona, Discoversy™ C18 (25 x 4,0 mm ID, 5 µm)
hydrokortizon- IS	4,13	0,24	1639	3,58	1,07	monolitická kolona, Chromolith™ Flash RP-18 e (25 x 4,0 mm ID)
propylparaben	5,24	0,21	5048	5,48	1,11	monolitická kolona, Chromolith™ SpeedROD RP-18 e (50 x 4,6 mm ID)
estradiol	8,64	0,29	5085	5,74	1,02	monolitická kolona, Chromolith™ Performance RP-18 e (100 x 4,6 mm ID)
estron	10,67	0,29	7772	4,18	1,08	monolitická kolona, Chromolith™ Performance RP-18 e (100 x 4,6 mm ID)

## Závěr

Bylo provedeno porovnání běžných analytických metod s využitím C18 kolon a metod používajících monolitické kolony o různých délkách (25, 50, 100 mm). Použitím těchto kolon došlo k významnému zkrácení doby analýzy stejně jako k poklesu zpětného tlaku na koloně. Po úpravě složení mobilní fáze ve prospěch vody bylo možné metody aplikovat k analýze standardů. Byly vybrány optimální podmínky z hlediska kvality separace, délky analýzy a spotřeby rozpouštědla a ty byly dále aplikovány při analýze farmaceutických přípravků Ketoprofen gel a Estrogel gel. Nevýhodou byla vysoká spotřeba mobilní fáze, což lze kompenzovat použitím solvent-saveru.

Projekt vznikl za podpory grantu FRVŠ 2999/2003 a výzkumných záměrů MSM 111600001

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

L. Nováková<sup>a</sup>, L. Matysová<sup>a</sup>, L. Havlíková<sup>a,b</sup>, P. Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup>The 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-chlorobenzoic 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<sup>a</sup>, Lucie Havlíková<sup>a,b</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup> 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.

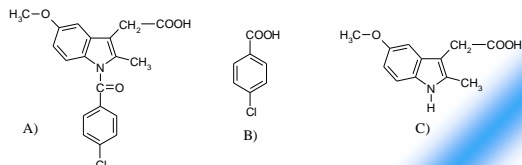
Chemically it is 1 - (4 - chlorobenzoyl) - 5 - methoxy - 2 - methylindoleacetic acid. By decomposition it forms two degradation products: 4-chloro-benzoic acid and 5-methoxy-2-methylindoleacetic acid. They have to be monitored together with an active substance both during manufacturing process and storage 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

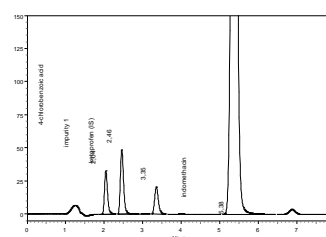
0.5 g of topical gel accurately weighed was transferred into 50.0 ml centrifuge tube

20.0 ml of internal standard solution in acetonitrile was added (1 mg/ml)

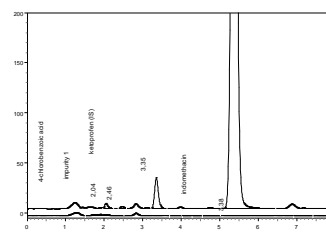
sonication for 10 minutes

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
<b>SST</b>				
theoretical plates <sup>a</sup>	7658	4000	3103	N > 1500
Asymmetry <sup>a</sup>	1.06	1.15	1.24	T < 1.5
Resolution <sup>a</sup>	5.59	2.70	3.11	R <sub>s</sub> > 1.5
repeatability- <sup>a, b</sup>	0.34	0.23	0.18	R.S.D. < 1%
repeatability-A <sup>b</sup>	0.18	0.66	0.45	R.S.D. < 1%
<b>Validation</b>				
Precision <sup>a</sup> [% RSD]	1.39	3.25	3.10	R.S.D. < 5%
Linearity (correlation coefficient)	0.9999 <sup>d</sup>	0.9999 <sup>d</sup>	0.9999 <sup>d</sup>	R > 0.9990
Accuracy <sup>a</sup> [% RSD]	0.70	0.62	1.13	R.S.D. < 5%
Accuracy <sup>a</sup> [% recovery]	98.53	98.27	96.22	100±5%
selectivity	no interference	no interference	no interference	-
LOD [mg/ml]	-	5.69.10 <sup>-5</sup>	2.25.10 <sup>-4</sup>	-
LOQ [mg/ml]	-	1.90.10 <sup>-4</sup>	7.5.10 <sup>-4</sup>	-

<sup>a</sup> made in three replicates

<sup>b</sup> made in six replicates

<sup>c</sup> six samples injected three times each

<sup>d</sup> at 20, 50, 80, 100, 120, 150 % levels, three replicates

<sup>e</sup> 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.

## Acknowledgments

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.Matysová<sup>1</sup>, L.Havlíková<sup>1,2</sup>, L.Nováková<sup>1</sup>, P.Solich<sup>1,2</sup>,

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

Email: [matysova@faf.cuni.cz](mailto: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.Matysová<sup>1</sup>, L.Havlíková<sup>1,2</sup>, L.Nováková<sup>1</sup>, P.Solich<sup>1,2</sup>

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

## Úvod

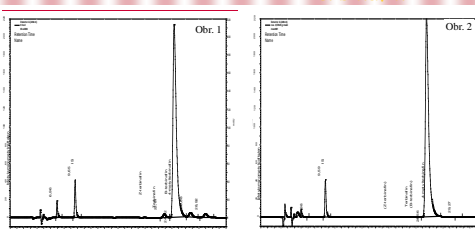
Na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové se provádí v rámci spolupráce s farmaceutickou praxí vývoj nových metod pro stanovení obsahu léčivých látek, konzervancí a nečistot v topických léčivých přípravcích. Využívá se metody HPLC, která je pro tuto analýzu vhodná, neboť jako separační metoda umožňuje kvantitativní hodnocení a identifikaci složek 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. Konkrétně se jedná o účinné látky: terbinafin, indometacin a estradiol.

## Cíle práce

V dostupné ať už lékopisné nebo jiné odborné literatuře je minimum informací o HPLC metodách, které provádí současně stanovení účinné látky, nečistot i konzervancí 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

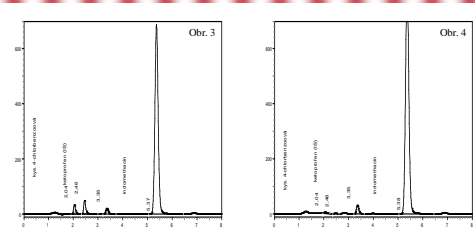
**Chromatografické podmínky:**  
Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP.  
Kolona: NUCLEOSIL 100-5-CN (Bischoff Chromatography), 250 x 4,6 mm; 5 mm  
Dávkování: 2 µl  
Detekce: UV 226 nm  
Mobilní fáze: Tetrahydrofuran-acetonitril-citratový pufr pH 4,50 = 10:20:70 (v/v/v)  
Průtok: 0,8 ml/min  
Teplota: 25 °C Izokratický režim  
Chromatogram standardů: terbinafin, definované nečistoty a propylparaben (i.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	28,77	
	$w_{rel}$	0,50	0,14	0,41	0,51	0,55	
	N	12 309	12 394	16 249	16 274	15 245	N>1500
	$R_{ij}$	1,89	9,33	25,22	2,73	2,53	$R_{ij}>1,5$
	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	x<5%
	Linearity RSD (n=6)	0,99976	0,9986	0,99973	0,9983	0,99925	x<0,990
Správnost	výtěžnost - (%)	97,07	98,58	99,27	100,29	99,71	x=100±5%
	-RSD (%)	1,41	1,35	0,92	1,45	1,77	x<2%

## Indometacin

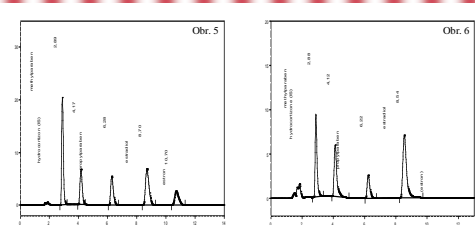
**Chromatografické podmínky:**  
Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP  
Kolona: Zorbax® SB-Phenyl, Agilent Technologies, 75 x 4,6mm; 3,5 mm  
Dávkování: 5 µl  
Detekce: UV 237 nm  
Mobilní fáze: Acetonitril – kyselina fosforečná 0,2 % (v/v) = 50:50  
Průtok: 0,6 ml/min  
Teplota: 25 °C Izokratický režim  
Chromatogram standardů: 5-methoxy-2-methylindol-3-octová kyselina, 4-chlorbenzová kyselina a indometacin s vnitřním standardem ketoprofenem – obr.3  
Chromatogram gelu 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-octová kyselina	4-chlorbenzová kyselina	požadavek
SST	$t_R$ (min)	5,38	2,04	2,46	
	$w_{rel}$	3,14	0,08	0,09	
	N	7665	3103	4000	N>1500
	$R_{ij}$	5,59	2,70	5,33	$R_{ij}>1,5$
	T	1,06	1,23	1,14	T<2
Přesnost	RSD (%)	1,39	3,1	3,25	x<5%
	Linearity RSD (n=6)	0,999964	0,999981	0,999991	x<0,990
Správnost	výtěžnost - (%)	98,25	96,22	98,27	x=100±5%
	-RSD (%)	0,70	1,13	0,62	x<2%

## Estradiol

**Chromatografické podmínky:**  
Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., JAP.  
Kolona: SUPELCO Discovery C18 (Sigma-Aldrich), 250 x 3,0 mm; 5 mm  
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 estron s vnitřním standardem hydrokortizonem – obr.5  
Chromatogram gelu 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	estron	požadavek
SST	$t_R$ (min)	8,70	2,89	6,28	10,69	
	$w_{rel}$	0,20	0,13	0,20	0,29	
	N	6015	2772	5438	7430	N>1500
	$R_{ij}$	6,12	4,99	6,86	4,24	$R_{ij}>1,5$
	T	1,23	1,30	1,28	1,34	T<2
Přesnost	RSD (%)	0,39	0,43	1,15	2,24	x<5%
	Linearity RSD (n=6)	0,99987	0,99998	0,99995	0,99981	x<0,990
Správnost	výtěžnost - (%)	97,19	99,20	98,51	97,65	x=100±5%
	-RSD (%)	0,14	0,72	1,20	0,16	x<2%

## Závěr

V rámci vývoje provádíme na našem pracovišti kromě vývoje zároveň kompletní validace nových metod, 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 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 MŠMT, Výzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LN00B125.

$t_R$  - retenční čas  
 $w_{rel}$  - síla píku v podvlné výšce (mm)  
N - počet píků na měřítku  
 $R_{ij}$  - rozdíl mezi sledovanými píky a bezpečnostní předcházejícím píkem  
T - asymetrie píku  
RSD - koeficient variability  
x - průměr  
n - počet samostatných měření, 3 měření  
MANN - 1,2% Methylaminomethylpiperazin



## **Problematika HPLC analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích.**

L. MATYSOVÁ<sup>a</sup>, L.HAVLÍKOVÁ<sup>a</sup>, J.NOVÁČKOVÁ<sup>a</sup>, S.RECH<sup>b</sup>, P. SOLICH<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>b</sup> Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Pharmazeutische Fakultät, Poppelsdorf, Germany

<sup>c</sup> 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<sup>a</sup>, L. HAVLÍKOVÁ<sup>a,c</sup>, J. NOVÁČKOVÁ<sup>a</sup>, S. RECH<sup>b</sup>, P. SOLICH<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<sup>b</sup>Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Pharmazeutische Fakultät, Poppelsdorf, Germany

<sup>c</sup>Výzkumné centrum LNO08125, 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 metodou 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

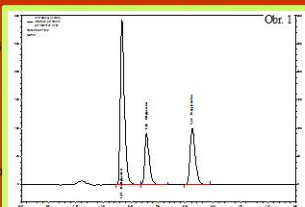
V rámci Kontrolní laboratoře na Katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové jsou prováděny kompletní validace vyvinutých HPLC metod, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKL u ostatní platné normy.

Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnoveji 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: Sňmadzu 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)  
Přítok: 1,0 ml/min  
Teplota: 25 °C  
Izokratický režim  
Chromatogram přípravku s přidávkem vnitřního standardu ethylparabenu – obr. 1  
Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.1



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

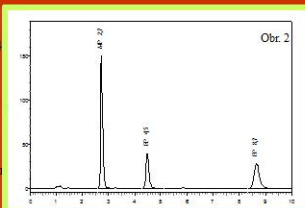
### Proces izolace parabenů z masti:

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 autosamplerem přímo na kolonu.

## Heparin gel

### Chromatografické podmínky:

Sestava: Sňmadzu 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 - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,085% = 30 : 70 (v/v)  
Přítok: 1,1 ml/min  
Teplota: 25 °C  
Izokratický režim  
Chromatogram přípravku s přidávkem vnitřního standardu ethylparabenu – obr. 2  
Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.2



Tab. č.2	parametr	MP	PP	požadavek
SST	t <sub>R</sub> (min)	2,74	8,69	
	w <sub>0,05</sub>	0,09	0,21	
	N	5081	9161	N>1500
	R <sub>ij</sub>	4,16	1,97	R <sub>ij</sub> >1,5
	T	1,39	1,20	T<2
Přesnost	RSD (%)	0,25	0,37	x<<%
Linearity (n=6)	RSD (%)	0,999975	0,99997	x>0,9990
Správnost	výtěčnost (%)	101,07	100,41	x=100±5%
	-RSD (%)	0,06	0,56	x<<%

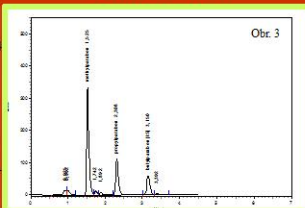
### Proces izolace parabenů z gelu:

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 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 autosamplerem přímo na kolonu.

## Lipolotio krém

### Chromatografické podmínky:

Sestava: Sňmadzu 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)  
Přítok: 1,1 ml/min  
Teplota: 25 °C  
Izokratický režim  
Chromatogram přípravku s přidávkem vnitřního standardu butylparabenu – obr. 3  
Parametry validace jsou shrnuty v tabulce č.3



Tab. č.3	parametr	MP	PP	požadavek
SST	t <sub>R</sub> (min)	1,78	2,67	
	w <sub>0,05</sub>	0,07	0,08	
	N	2943	4781	N>1500
	R <sub>ij</sub>	3,32	1,90	R <sub>ij</sub> >1,5
	T	1,42	1,30	T<2
Přesnost	RSD (%)	1,38	1,18	x<<%
Linearity (n=6)	RSD (%)	0,999912	0,999996	x>0,9990
Správnost	výtěčnost (%)	98,22	95,71	x=100±5%
	-RSD (%)	0,28	0,66	x<<%

### 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 fosfátového 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 autosamplerem 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 SÚKL u 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.

**Legenda:**  
N<sub>rel</sub> = retenční čas  
w<sub>rel</sub> = šířka piku v polovině výšky (min)  
N = počet piků na směs  
R<sub>ij</sub> = rozlišení za seri sledovaných a předcházejících piků  
T = čas eluce piku  
RSD = koeficient 3 směšitelky  
x = koncentrace 60, 80, 100, 120, 160, 200%  
x = samostatných naměřen, 3 směšitelky  
MP = methylparaben, propylparaben

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Vyzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LNO08125.

## **DETERMINATION OF TERBINAFINE AND ITS DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL CREAM BY RP-HPLC.**

Matysová L.<sup>a</sup>, Solich P.<sup>a,b</sup>, Marek P.<sup>a</sup>, Šícha J.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>c</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic

A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of active component terbinafine and its four degradation products (1-methylaminomethylnaphtalene, Z-terbinafine, 4-methyl terbinafine and  $\beta$ -terbinafine) occurring in formulation after long-term stability tests, presented in cream using propylparaben as an internal standard was developed and validated.

The chromatographic separation was performed on a NUCLEOSIL 100-5-CN column, the mobile phase for separation of all compounds consists of a mixture of tetrahydrofurane, acetonitrile and citrate buffer (pH = 4.50) (10 : 20 : 70 v/v/v). The analysis time (for determination of terbinafine and its four degradation products) was less than 32 min at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup> and detection at 226 nm. The method was found to be applicable for routine analysis (stability tests, homogeneity) of terbinafine in - pharmaceutical product – topical cream Terbinafin cream in control laboratory.

*The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministry of Education of the Czech Republic – MSM 111600001 and the Research project LN00B125.*



# DETERMINATION OF TERBINAFINE AND ITS DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL CREAM BY RP-HPLC

Matysová L.<sup>a</sup>, Salich P.<sup>a,b</sup>, Marek P.<sup>a</sup>, Šícha J.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> The Research Centre LN00B125, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>c</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrössova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic

## INTRODUCTION

Terbinafine (Figure 1), (E)-N-(6,6-dimethyl-2-hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naphthalene methanamine hydrochloride is an allylamine derivative reported to have a broad spectrum of antifungal activity. It is considered to act by inhibition of fungal sterol synthesis. Terbinafine as fungicidal agent affected dermatophytes and some yeasts, as hydrochloride is used also orally for the treatment of dermatophyte infections of the skin and nails. It is also applied to the skin in the occurrence of dermatophytoses, pityriasis versicolor, and cutaneous candidiasis occurrence. This substance interferes with the cytoplasmic membrane integrity of fungi by blocking membrane ergosterol synthesis. Terbinafine is used for treatment of dermal affections in the form of creams, gels, tablets and solutions.

## AIM OF THE WORK

The purpose of this study was to develop a new HPLC method for the determination of five compounds in topical cream - active component terbinafine hydrochloride and its degradation products 1-N-methylaminoethyl-naphthalene (MAMN), β-Terbinafine, Z-Terbinafine and 4-Methyl-Terbinafine (Figure 1), using internal standard (propylparaben). Thereafter, this method has been validated and successfully applied to separation, quantification and stability tests of all compounds in the pharmaceutical formulation - Terbinafin cream.

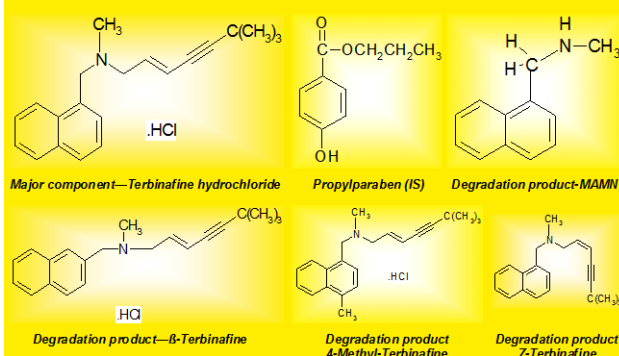


Figure 1: Major component Terbinafine hydrochloride, its degradation products and internal standard—Propylparaben

## CHROMATOGRAPHIC SYSTEM

Shimadzu LC-2010 C system (Shimadzu, Japan) with built-in UV-VIS detector and autosampler  
PC for data processing (with chromatographic software Class VP, Shimadzu Japan)

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimal chromatographic conditions:

column: 250 × 4.6 mm I.D. NUCLEOSIL 100-5-CN, 5 μm (Bischoff Chromatography)  
column temperature: ambient  
injection volume: 2 μl  
mobile phase: mixture of tetrahydrofuran, acetonitrile and citrate buffer (pH = 4.50) (10 : 20 : 70 v/v/v)  
flow rate: 0.8 ml·min<sup>-1</sup>  
UV detection: λ = 226 nm  
internal standard: propylparaben  
time of analysis: 32 min

### Sample preparation:

Portion of a pharmaceutical cream (0.5 g) was supplemented with the internal standard (20 ml of a 250.0 mg·l<sup>-1</sup> solution of propylparaben in acetonitril), after that 50 μl of phosphoric acid (85%) was added, the mixture was placed into the ultrasonic bath for 15 min and then centrifuged at 6000 rpm for 15 min. A volume of 2 μl of supernatant was analysed by HPLC.

## CHROMATOGRAM

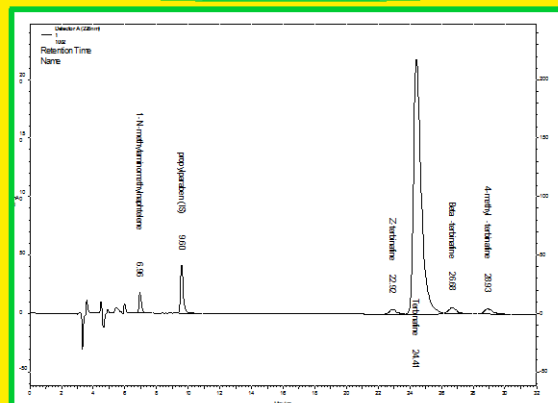


Figure 2: Chromatogram of standard solution of terbinafine and its degradation products with the addition of the internal standard (propylparaben, 250 μg·ml<sup>-1</sup>)

## METHOD VALIDATION RESULTS

Validation step	System precision	Method precision	Accuracy	Linearity (n=6) <sup>c</sup>	Sample stability	
	RSD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Spike recovery	Recovery RSD <sup>b</sup>	Correlation coef.	% Change in response factor
Terbinafine	0.26%	2.72%	97.07%	1.41%	0.99976	0.81%
MAMN	0.28%	3.66%	98.58%	1.35%	0.99860	0.86%
β-Terbinafine	0.79%	4.02%	100.29%	1.45%	0.99830	0.40%
4-Methyl-Terbinafine	0.92%	4.81%	99.71%	1.77%	0.99925	0.62%
Z-Terbinafine	0.78%	1.31%	99.27%	0.92%	0.99973	0.36%
Criteria	X < 2%	X < 5%	X = 100 ± 5%	X < 2%	X > 0.9900	X < 2%

<sup>a</sup> six injections  
<sup>b</sup> three preparations each, two injections of each preparation at 30, 60, 120, 180, 240, 300 min for terbinafine, from concentration 0.2 mg·l<sup>-1</sup> to 3 mg·l<sup>-1</sup> for degradation products  
<sup>c</sup> two-day stability data at 4°C for all compounds  
<sup>d</sup> MAMN: 1-N-methylaminoethyl-naphthalene

## CONCLUSION

A novel HPLC method with UV spectrophotometric detection for determination of terbinafine and its degradation products in a topical cream, using propylparaben as internal standard, NUCLEOSIL 100-5-CN column and UV detection at 226 nm was developed.

The total analysis time was less than 32 min. Method has been validated, the results obtained were precise and accurate. This method was successfully applied for the identification, quantitative analysis and stability tests of all major compounds in a topical cream - Terbinafin cream.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministry of Education of the Czech Republic - MSM 111600001 and the Research project LN00B125.

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

Matysová L.<sup>1</sup>, Havlíková L.<sup>1,2</sup>, Nováková L.<sup>1</sup>, Solich P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>2</sup> The Research Centre LN00B125,  
Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic  
Email: [matysova@faf.cuni.cz](mailto: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<sup>1,2</sup>, L. Matysová<sup>1</sup>, L. Nováková<sup>1</sup>, P. Šolich<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, <sup>2</sup>The Research Centre LN00B125,  
 Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

## Introduction

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. The aim of this work is to introduce newly developed and validated HPLC 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 accessible pharmaceutical literature about stability-indicating HPLC methods for determination of active substance, its degradation product 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 are: estradiol, indomethacin and ketoprofen.

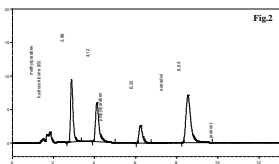
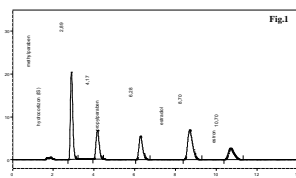
## Experimental

### 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 225 nm  
 flow rate: 0.5 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 - see text

**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
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 <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.23	1.30	1.38	1.34	T<2.0
<b>Validation</b>					
precision <sup>a</sup> RSD (%)	0.39	0.43	1.15	2.24	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.99987	0.99998	0.99995	0.99981	R<0.9990
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	0.19	99.20	98.51	97.65	x=100±5%
accuracy <sup>c</sup> - RSD (%)	0.14	0.72	1.20	0.16	R.S.D.<5%
LOD (mg/l)	-	-	-	0.0012	-
LOQ (mg/ml)	-	-	-	0.040	-

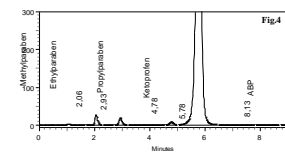
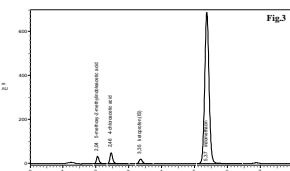
### Indomethacin

**Chromatography**  
 instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP.  
 analytical column: Zorbax SB-Phenyl 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 Indomethacin 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
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	5.59	2.70	5.33	R <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.06	1.23	1.14	T<2
<b>Validation</b>				
precision <sup>a</sup> RSD (%)	0.39	3.10	3.25	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.999964	0.999981	0.999991	R<0.9990
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	99.53	96.22	98.27	x=100±5%
accuracy <sup>c</sup> - 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	-

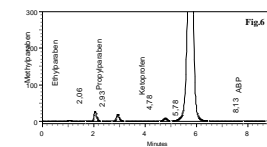
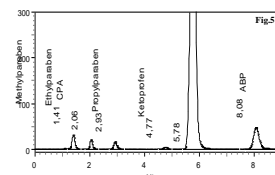
### Ketoprofen

**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-phosphoric 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** - same as estradiol



### Method Validation

Parameter	ketoprofen	methylparaben	propylparaben	ABP	CPA	Limits
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	8113	2295	5119	7718	913	N>1500
resolution	2.490	3.872	6.568	6.878	3.193	R <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.21	1.37	1.31	1.22	1.33	T<2
<b>Validation</b>						
precision <sup>a</sup> RSD (%)	1.90	1.92	1.92	0.62	1.93	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.99940	0.99920	0.99965	0.99973	0.99980	R<0.9990
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	103.14	104.59	102.63	103.22	103.3	x=100±5%
accuracy <sup>c</sup> - RSD (%)	0.40	0.31	1.06	0.49	0.47	R.S.D.<5%
LOD (mg/l)	-	-	-	0.014	0.040	-
LOQ (mg/ml)	-	-	-	0.046	0.135	-

## Conclusions

All of these methods are validated.  
 All methods are successfully used in practical analysis (stability studies and tests of homogeneity) of topical pharmaceutical preparations for commercial use.

## Aknowledgments

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

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

Lucie Nováková<sup>a</sup>, L. Matysová<sup>a</sup>, L. Havlíková<sup>a,b</sup>, P. Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup> 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), mehylparaben, propylparaben (preservatives) and estrone (degradation product) is performed on conventional C18 (250 x 3.0 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ ) 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**  $\mu\text{m}$ ) and Zorbax Eclipse XDB – C18 (4.6 x 50 mm, **1.8**  $\mu\text{m}$ ). 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<sup>a</sup>, Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Lucie Havlíková<sup>a,b</sup>, Petr Solich<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, <sup>b</sup> 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 mode 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 gel – 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: hydrocortizone

## Results and discussion

ODS 5	methylparaben					hydrocortizone (IS)					propylparaben					estradiol					estrone				
	t <sub>r</sub>	N	H	R <sub>s</sub>	T	t <sub>r</sub>	N	H	R <sub>s</sub>	T	t <sub>r</sub>	N	H	R <sub>s</sub>	T	t <sub>r</sub>	N	H	R <sub>s</sub>	T	t <sub>r</sub>	N	H	R <sub>s</sub>	T
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	1.69	1918	29573	4.37	1.11	2.61	2514	33520	5.08	1.28	4.28	5969	79587	7.77	1.04	6.09	6741	89880	7.00	1.02	7.94	8207	109427	5.71	1.04
XDB 3.5	0.62	736	9813	2.78	1.29	0.97	1211	16147	3.44	1.28	1.54	2595	33933	5.14	1.11	2.23	3895	51933	4.83	1.06	2.89	4964	66187	4.33	1.02
XDB 3.5	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	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	6.58	1.10	3.92	5476	73013	5.10	1.03
XDB 1.8	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	9011	100220	6.37	1.01	5.71	6057	121740	4.56	1.05
XDB 1.8	0.93	1037	20740	3.62	1.13	1.46	1852	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	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	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<sub>r</sub> – retention time [min], N – theoretical plate number, H – height equivalent of theoretical plate, R<sub>s</sub> – peak resolution, T – peak asymmetry  
 ODS 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.

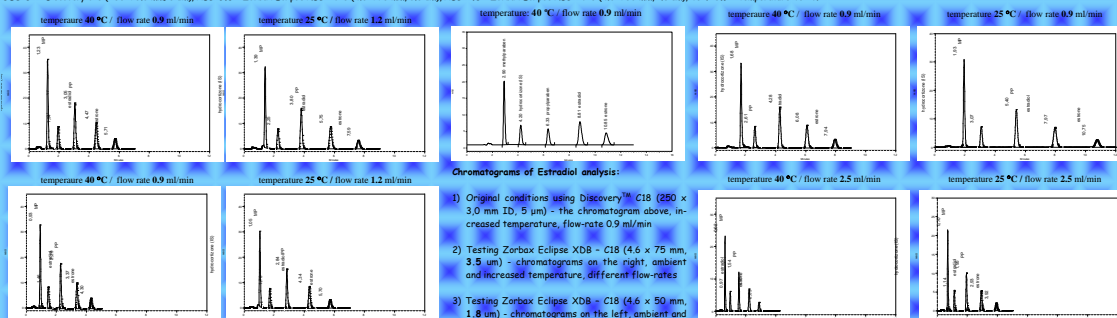


Table of system suitability data for all tested analytical columns.

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, hydrocortizone (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.

## Acknowledgments

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



520-6P

**NOVEL METHODS FOR HPLC DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL GELS**

Petr Solich, Charles University - Prague, Faculty of Pharmacy Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove 500 05, Czech Republic, Ludmila Matysova, Lucie Novakova, Dagmar Solichova

To assure the high quality and safety of pharmaceutical products, it is necessary to carry out stability-indicating methods, which are able to determine active substances and its impurities and/or degradation products, present at extremely low levels compared to the active substances. Preferably, all this should be done 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. The currently studied and developed methods are for pharmaceutical gels: Estrogel gel, Indometacin gel and Alltoprofen gel, in which estradiol, indomethacin and ketoprofen, respectively and their impurities are determined during the stability studies. Chromatographic conditions and validation parameters will be presented for all methods (System Suitability Test parameters, validation parameters including precision, linearity, selectivity, accuracy, LOD and LOQ). 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.

Keywords: Liquid Chromatography, Pharmaceutical, Quality Control  
Application Code: Pharmaceutical  
Methodology Code: Liquid Chromatography



# NOVEL METHODS FOR HPLC DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS IN TOPICAL GELS

Petr Solich<sup>1</sup>, Ludmila Matysova<sup>1</sup>, Lucie Novakova<sup>1</sup>, Jan Sicha<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic  
<sup>2</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Strossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic

## Introduction

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 aim of this work

There is a lack of information in accessible pharmaceutical literature about stability-indicating HPLC methods for determination of active substance, its degradation product 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 are: estradiol, indomethacin and ketoprofen.

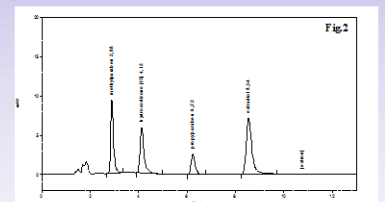
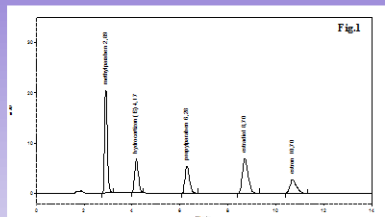
## Experimental

### 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 (25:24:53 v/v/v)  
 injection volume: 5 µl detection: UV 225 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.

**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	5015	2772	5438	7430	N>1500
resolution	5.12	4.99	6.86	4.24	R <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.23	1.30	1.28	1.34	T<2
Validation					
precision <sup>a</sup> RSD (%)	0.39	0.43	1.15	2.24	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.99987	0.99998	0.99995	0.99981	R>0.9990
correlation coefficient					
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	97.19	99.00	98.51	97.65	x=100±5%
- RSD (%)	0.14	0.72	1.20	0.16	R.S.D.<5%
LOD (mg/l)	-	-	-	0.0012	-
LOQ (mg/l)	-	-	-	0.040	-

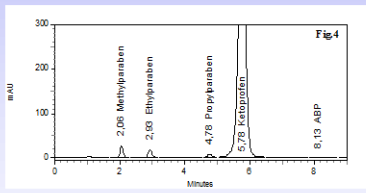
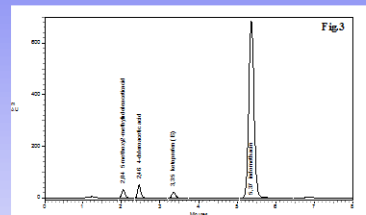
### Indomethacin

**Chromatography**  
 instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP.  
 analytical column: Zorbax SB-Phenyl 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 Indomethacin 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	5.59	2.70	5.33	R <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.06	1.23	1.14	T<2
Validation				
precision <sup>a</sup> RSD (%)	0.39	3.10	3.25	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.999964	0.999981	0.999991	R>0.9990
correlation coefficient				
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	99.53	96.22	98.27	x=100±5%
- 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	-

## Conclusions

All of these methods are validated. All methods are successfully used in practical analysis (stability studies and tests of homogeneity) of topical pharmaceutical preparations for commercial use.

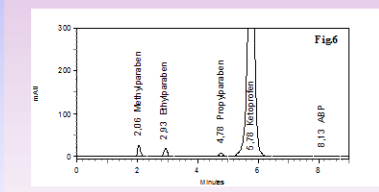
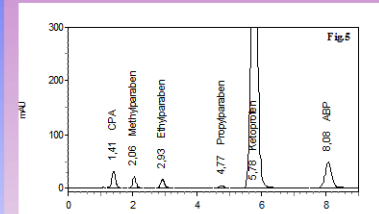
### Ketoprofen

**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-phosphoric 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 2,6-carboxyphenylpropionic 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** - same as estradiol



### 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	6.978	3.199	R <sub>s</sub> >1.5
asymmetry	1.21	1.37	1.31	1.22	1.23	T<2
Validation						
precision <sup>a</sup> RSD (%)	1.90	1.92	1.92	0.62	1.93	R.S.D.<5%
linearity <sup>b</sup>	0.99940	0.99920	0.99965	0.99973	0.99980	R>0.9990
correlation coefficient						
accuracy <sup>c</sup> - recovery (%)	103.14	104.59	102.63	103.22	103.3	x=100±5%
- 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	-

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education, project MSM No.0021620822.

## 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,  $\Delta$  9/11-estrone,  $\Delta$  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



29<sup>th</sup> International Symposium on  
High Performance Liquid Phase  
Separations and Related Techniques  
26 - 30 June 2005 Stockholm - SWEDEN

## Introduction

Estradiol, chemically 1,3,5(10)-estratrien-3, 17 $\beta$ -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)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol), estradiol 3-methyl ether (chemically 17 $\beta$  hydroxy-3-methoxyestra-1,3,5(10)-triene), estradiol 17-acetate (chemically 1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol 17-acetate), D<sup>9(11)</sup>-estrone (1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one), and D<sup>9(11)</sup>-estradiol (1,3,5(10),9(11)-estratetraen-3,17 $\beta$ -diol). Considered intermediates of estradiol are D<sup>9(11)</sup>-estrone, and D<sup>9(11)</sup>-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
$\Delta^9$ -estradiol	-OH	-OH	
estrone	=O	-OH	
ethynyl estradiol	-OH	-OH, -CEC	
estradiol 17-acetate	-OH	-O-CO-CH <sub>3</sub>	
$\alpha$ -estradiol-hemihydrate	-OH	-OH / * 0.5 H <sub>2</sub> O	
estradiol-3-methylether	-OCH <sub>3</sub>	-OH	
$\Delta^9$ (11) estrone			-OH
$\Delta^9$ (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  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

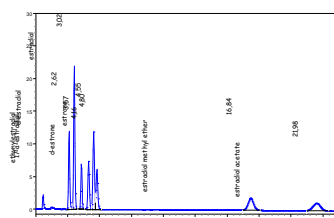
### Method validation

Parameter	SST	repeatability $t_R$	repeatability A	theoretical plates	resolution	asymmetry
$\Delta^9$ -estradiol	0.00	0.36	8038	-	1.15	
estradiol	0.00	0.74	8803	2.18	1.06	
estrone+ $\Delta$ 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	

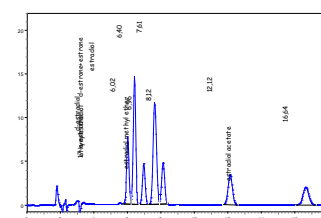
Validation substance	Parameter	precision [RSD %]	linearity [C.O.V.]	accuracy [% rec]	accuracy [RSD %]	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
$\Delta^9$ -estradiol	0.63	0.99924	99.60	1.94	1.29x10 <sup>-5</sup>	4.30x10 <sup>-5</sup>	
17a estradiol	0.79	0.99917	100.56	1.24	1.98x10 <sup>-5</sup>	6.59x10 <sup>-5</sup>	
estrone+ $\Delta$ estrone	0.48	0.99918	99.18	1.15	1.03x10 <sup>-5</sup>	3.43x10 <sup>-5</sup>	
ethynylestradiol	0.62	0.99902	100.58	0.78	2.37x10 <sup>-5</sup>	7.89x10 <sup>-5</sup>	
estradiol-Me-ether	0.57	0.99912	101.98	0.30	1.41x10 <sup>-5</sup>	4.70x10 <sup>-5</sup>	
estradiol acetate	0.99	0.99943	102.19	0.73	1.14x10 <sup>-4</sup>	3.81x10 <sup>-4</sup>	
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.

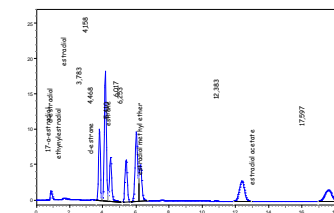
## Results and discussion



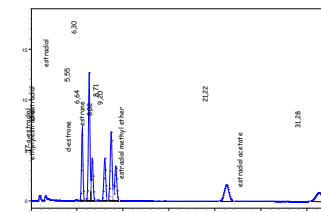
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB C18, 1.8  $\mu$ m, mobile phase consisted of: acetonitrile, 0.085 % phosphoric acid (40:60)



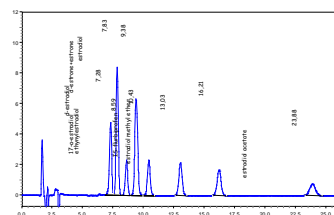
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB CN, mobile phase consisted of: acetonitrile, tetrahydrofuran, phosphoric acid 0.085% (30:10:60)



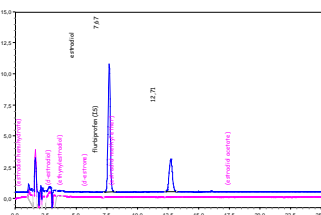
Chromatogram of separation of compounds in standard solution using analytical column Zorbax SB Phenyl, mobile phase consisted of: acetonitrile, 0.085 % phosphoric acid (40:60)



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 Estrogelel 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 (D<sup>9(11)</sup>-estradiol, 17a estradiol, estrone, D<sup>9(11)</sup>-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 D<sup>9(11)</sup>-estrone were not perfectly separated. The two degradation products estrone and D<sup>9(11)</sup>-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 MSM of the Czech Republic - FRVS No. 1239/2005 and also to MSM 0021620822.

## 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](mailto: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 *sány e* with recovery after *sány* preparation procedures.

Different analytical columns with various stationary phases were tested. The conventional octadecylsilica sorbent Supelco Discovery<sup>TM</sup> C18 (125 mm x 4.0 mm, 5  $\mu$ 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  $\mu$ m). *sány* separation was achieved by *sány* of Zorbax TSM (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) column. Finally, Hypersil ODS column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) was used for the analysis. The analysis time was 12 minutes, at flow rate of 0.7 ml.min<sup>-1</sup>. 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. Havlíková<sup>1</sup>, L. Matysová<sup>1</sup>, L. Nováková<sup>1</sup>, P. Solich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department 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 conventional octadecylsilica sorbent Supelco Discovery™ C18 (125 mm x 4.0 mm, 5 mm) 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 mm).

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<sup>-1</sup>. Chromatography was performed with binary mobile phase composed of methanol and phosphoric acid pH 2.5 65:35 (v/v).

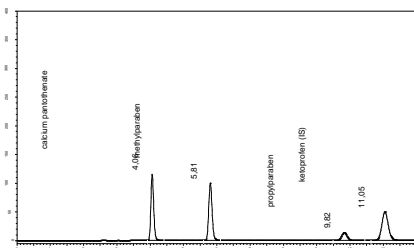
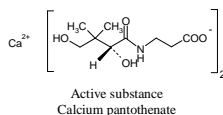
The method was validated according to ICH guideline recommendations.

### Chromatography

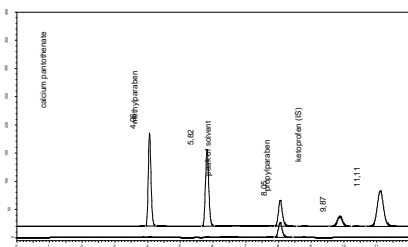
instrumentation: Shimadzu LC-2010 C, Shimadzu corp., JAP.  
 analytical column: Hypersil ODS column (Hypersil, UK), 250 x 4.6 mm ID; 5 μm  
 mobile phase: methanol and phosphoric acid pH 2.5 (65:35 v/v)  
 injection volume: 2 μl detection: UV 214 nm  
 flow rate: 0.7 mL·min<sup>-1</sup> column oven temperature: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

### 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 solution of internal standard in a mixture of methanol phosphate buffer pH 3.1 80:20 (v/v) was added (5 mg/ml)  
 sonication for 20 minutes → centrifugation for 15 minutes at 6000 rpm  
 supernatant was filtered through the 0.45 mm filter and injected directly into the analytical column



Chromatogram of separation of compounds in standard solution



Chromatogram of separation of compounds in pharmaceutical topical preparation Calcium pantothenicum

### Method Validation

Parameter	Calcium pantothenate	Methylparaben	Propylparaben	Criteria
<b>SST</b>				
Repeatability – retention time <sup>a</sup>	R.S.D (%) 4.06	5.81	9.82	X < 1%
Repeatability – area <sup>a</sup>	R.S.D (%) 681 006	727 493	152 800	X < 1%
Theoretical plates <sup>b</sup>	10042	14860	17068	N > 1500
Resolution <sup>b</sup>	9.94	10.07	16.15	R <sub>s</sub> > 1.5
Asymmetry <sup>b</sup>	1.14	0.95	1.06	T < 2
<b>Validation</b>				
Precision <sup>c</sup>	R.S.D.(%) 3.36	1.65	1.60	X < 5%
Linearity <sup>d</sup>	Correlation coefficient 0.99981	0.99987	0.99985	R > 0.9990
Accuracy <sup>e</sup>	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	

<sup>a</sup> made in six replicates  
<sup>c</sup> six samples injected three times each

<sup>b</sup> made in three replicates  
<sup>d</sup> 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 - FRVS No. 939/2005

# STANOVENÍ DIKLOFENAKU SODNÉHO A JEHO DEGRADAČNÍHO PRODUKTU METODOU RP-HPLC

MATYSOVÁ LUDMILA<sup>a</sup>, HAVLÍKOVÁ LUCIE<sup>a</sup>, HOMOLOVÁ ALŽBĚTA<sup>a</sup>, SOLICH PETR<sup>a</sup>, ŠÍCHA JAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup> 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](mailto:ludmila.matysova@faf.cuni.cz)

<sup>b</sup> 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.<sup>[1]</sup>

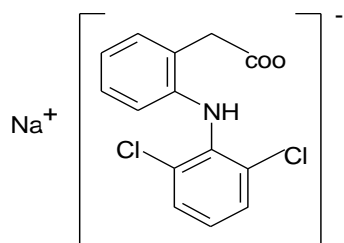
Sodná sůl diklofenaku se nejčastěji rozkládá za vzniku degradačního produktu s chemickým názvem 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (obr. 2).<sup>[2]</sup>

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).

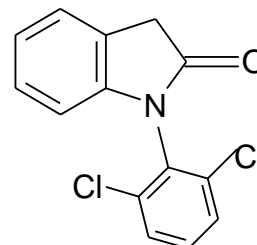
Byla vypracována metoda vnitřního standardu, kterým byl zvolen flurbiprofen. Pro analýzu byla využita kolona SUPELCO Discovery C18, 125x4 mm, velikost částic 5 μm. Optimální mobilní fází byla směs methanolu a kyseliny fosforečné o pH 2,5 v poměru 65:35 (v/v) a průtoku 1,0 ml/min., s UV detekcí při 254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



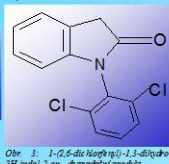
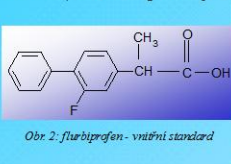
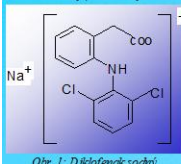
# Stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu metodou RP-HPLC

Ludmila Matysová<sup>a</sup>, Lucie Havlíková<sup>a</sup>, Alžběta Homolová<sup>a</sup>, Renata Hájková<sup>a</sup>, Jan Šícha<sup>b</sup>

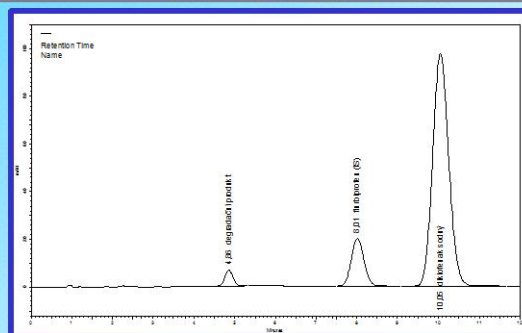
<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
<sup>b</sup>Herbacos-bofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice

## Úvod

Diklofenak sodný je antiflogistikum ze skupiny derivátů kyseliny fenylacetové, 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 emulgelů pro léčbu projevů revmatismu měkkých tkání a kloubových pouzder, lokalizovaných projevů zánětlivých a degenerativních revmatických onemocnění.<sup>[1]</sup>Sodná sůl diklofenaku se nejčastěji rozkládá za vzniku degradačního produktu s chemickým názvem 1-(2,6-dichlorofenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (obr. 3, dále degradační produkt).<sup>[2]</sup>



## Chromatogram přípravku



## Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu s UV detekcí pro stanovení obsahu diklofenaku sodného (obr.1) a jeho degradačního 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

## Vybrané validací parametry

Parametr	Opakovatelnost (RSD) <sup>a</sup>	Přesnost (RSD) <sup>b</sup>	Správnost (Výtěžnost) (RSD) <sup>b</sup>	Linearita pro n=6 <sup>c</sup> (korelační koeficient)	Stabilita (S <sub>r</sub> ) <sup>d</sup>
Diklofenak sodný	0,07%	0,61%	99,71%	0,04%	0,999964
Degrazační produkt	0,22%	1,38%	99,94%	0,18%	0,999530
Limit	< 1%	< 5%	100 ± 5%	< 5%	> 0,9990

<sup>a</sup> 6 nástříků

<sup>b</sup> 6x vzorek samostatně připraven, pro každou navážku 2 nástříky

<sup>c</sup> při koncentraci 40, 60, 80, 100, 120, 140 % (100% = 25,23 mg/100 ml)

<sup>d</sup> faktor stability po 72 hodinách

Nejnižší detekovatelná koncentrace degradačního produktu 1-(2,6-dichlorofenyl)-2-indolinonu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je 0,00006 mg.l<sup>-1</sup>, kvantitativní limit (LOQ) představuje koncentrace 0,00021 mg.l<sup>-1</sup>

## Závěr

Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro HPLC stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního 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 degradačního produktu v gelu a použita pro analýzu v rámci stabilitní studie uvedeného přípravku. Výsledky potvrzují výbornou reprodukovatelnost, přesnost a správnost vyvinuté metody.

## Literatura

<sup>[1]</sup> Mikro verze AISLP 2005.2 pro MS Windows

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

## Poděkování

Problematika byla řešena za podpory projektu MSM 0021620822.



# HPLC METODA PRO STANOVENÍ KLOTRIMAZOLU A DVOU DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ VE SPREJI

SKLENÁŘOVÁ HANA<sup>a</sup>, MATYSOVÁ LUDMILA<sup>a</sup>, HÁJKOVÁ RENATA<sup>a</sup>,  
ŠVECOVÁ PETRA<sup>a</sup>, ŠÍCHA JAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, [Ludmila.Matysova@faf.cuni.cz](mailto:Ludmila.Matysova@faf.cuni.cz)

<sup>b</sup> Herbacos-Bofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice

Byla vyvinuta a validována nová HPLC metoda se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti pro stanovení čtyř složek ve vzorku roztoku aplikovaného jako sprej. Tato metoda popisuje stanovení aktivní složky klotrimazolu a dvou degradačních produktů, imidazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, s použitím ibuprofenu jako vnitřního standardu. Řešení celkové analýzy bylo zatíženo různou aciditou analyzovaných složek; zatímco klotrimazol má pKa 4,7 a ibuprofen 5,2, imidazol má odlišnou pKa hodnotu 6,9. Nakonec bylo dosaženo analýzy všech zmíněných látek za stejných podmínek.

Chromatografická separace byla provedena na 3,5  $\mu\text{m}$  Zorbax<sup>®</sup> SB-Phenyl koloně (75 mm  $\times$  4,6 mm i.d., Agilent Technologies), optimální složení mobilní fáze pro separaci klotrimazolu, degradačních produktů, imidazolu a (2-chlorfenyl)difenylmethanolu, a ibuprofenu jako vnitřního standardu představovalo směs acetonitrilu a vody s hodnotou pH upravenou kyselinou fosforečnou na 3,5 (65 : 35, v/v). Průtok mobilní fáze byl 0.5 ml.min<sup>-1</sup> a detekce byla provedena při 210 nm. Celkový čas analýzy byl kratší než 10 min.

Popsaná metoda byla aplikována pro rutinní stanovení (stanovení obsahu a stabilitní testy) uvedených látek v roztoku používaném ve formě spreje.

Práce byla provedena s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR ve formě Výzkumného záměru - MSM 0021620822.



# HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF CLOTRIMAZOLE AND TWO DEGRADATION PRODUCTS IN SPRAY SOLUTION

Sklenářová H.<sup>a</sup>, Matysová L.<sup>a</sup>, Hájková R.<sup>a</sup>, Švecová P.<sup>a</sup>, Šícha J.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, Ludmila.Matysova@faf.cuni.cz

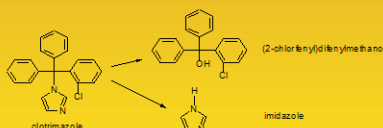
<sup>b</sup> Herbacos-Bofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice, Czech Republic

## INTRODUCTION

### Clotrimazole

- \* a common drug with antifungal activity used in spray and topic formulations<sup>[1]</sup>
- \* has two known degradation products which should be monitored in stability tests
- \* determination of active substance and its stability or degradation is a substantial parameter for production of safe formulations

Fig. 1: Chemical structures of clotrimazole and its degradation products



## AIM OF THE WORK

- \* to optimize HPLC determination of clotrimazole, its degradation products and proper internal standard
- \* to find the simplest way of sample preparation (from spray solution)
- \* to validate the methodology for routine analysis of the cited substances in spray formulation

## METHOD OPTIMISATION

- \* Detection wavelength was chosen according to the spectra of the analyzed compounds and its relative concentrations in samples

- \* Various chromatographic columns were tested:
  - Purospher RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm, Merck)
  - Supelco Discovery R C18 (150 x 4 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich)
  - Supelco discovery ZR-P80 (15 x 4.6 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich)
  - Zorbax SB-phenyl (75 x 4.6 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies)
  - Zorbax TMS (250 x 4.6 mm, 5 µm, Agilent Technologies)

- \* Mobile phase composition was tested: different ratio of the organic and water phase acidity of the mobile phase
- \* Internal standard was chosen

Fig. 2: Chromatogram of sample with addition of IS

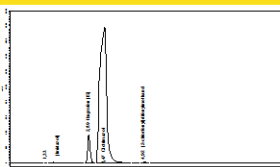
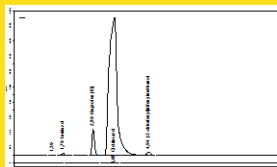


Fig. 3: Chromatogram of placebo (lower curve) and standards with addition of IS (upper curve)



### Optimized conditions

**Chromatographic column:** Zorbax SB-phenyl (75 x 4.6 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies)  
**Mobile phase:** Mixture of acetonitrile and water, pH conditioned by phosphoric acid to 3.5 (65 : 35, v/v)  
**Internal standard:** ibuprofen  
**Flow rate:** 0.5 mL min<sup>-1</sup>; isocratic elution  
**Detection wavelength:** 210 nm  
**Volume of the sample:** 5 µl  
**Temperature of the analysis:** 25 °C  
**Total analysis time:** 10 min  
**Sample preparation:** dilution (1 g of spray solution in 20 ml of acetonitrile, with addition of IS)

## METHOD VALIDATION

### Validation steps<sup>[2-4]</sup>

- \* repeatability
- \* peak asymmetry
- \* peak resolution
- \* number of theoretical plates
  - \* linearity
  - \* precision
  - \* accuracy (recovery)
  - \* selectivity
- \* robustness (mobile phase composition, stability)
  - \* LOD, LOQ (for degradation products)

Tab. 1: Validation parameters

validation steps	criteria	clotrimazole	CLT	imidazole	comments
repeatability <sup>a</sup> , RSD (%)	RSD < 1 %	0.05	0.29	0.20	a—six injections
peak asymmetry <sup>b</sup> , T	T < 2	1.14	1.05	1.03	b—three injections
peak resolution <sup>c</sup> , R	R > 1.5	2.34	3.68	6.09	c—three preparations each, two injections of each preparation
number of TP <sup>d</sup> , N	N > 900	1046	5641	1535	d—at 80, 80, 100, 120, 130 % levels for clotrimazole; from concentration 0.5 to 50 mg/l <sup>e</sup> for degradation products; n = 6; three injections
linearity <sup>d</sup>	R > 0.9900	R = 0.999991	R = 0.99968	R = 0.999945	e—two-day stability data at 20 °C for all compounds
precision <sup>e</sup> , RSD (%)	RSD < 5 %	0.59	0.28	0.47	
accuracy <sup>e</sup> , mean ± RSD (%)	100 ± 5 %, RSD < 5 %	99.12 ± 1.13	100.61 ± 0.28	103.85 ± 0.48	
selectivity		+	+	+	
stability <sup>e</sup> , RSD (%)	RSD < 1 %	0.55	0.18	0.33	

## CONCLUSION

The HPLC method with UV spectrophotometric detection on a Zorbax SB-phenyl column was developed for the determination of clotrimazole, (2-chlorophenyl)diphenylmethanol and imidazole using ibuprofen as an internal standard.

The developed method is suitable to be used for routine analysis of clotrimazole content and stability tests of clotrimazole formulations in liquid forms—in spray solutions in detail. The validation parameters fulfill all set requirements. The total analysis time is 10 min because of potential other degradation products occurrence, which could be determine as a "sum of undefined degradation products".

## REFERENCES

- [1] Micro Version AISLP, v. 2005.2
- [2] Czech Pharmacopoeia (2002), Grada Publishing, Prague, Czech Republic, p. 2309
- [3] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995, p. 11260
- [4] International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, US FDA Federal Register, Vol. 62, March 1997, p. 2746

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge financial support by the Ministry of Education of the Czech Republic - MSM 0021620822.

# SEPARATION AND DETERMINATION OF TERBINAFINE AND ITS FOUR IMPURITIES IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY RP-HPLC.

**Matysová L.<sup>a</sup>, Hájková R.<sup>a</sup>, Solich P.<sup>a</sup>, Šícha J.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

<sup>b</sup> *Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrossova 239, 530 02 Pardubice, Czech Republic*

Reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of active component terbinafine and its four impurities (1-methylaminomethylnaphtalene, Z-terbinafine, 4-methyl terbinafine and  $\beta$ -terbinafine) occurring in formulation after long-term stability tests, applied for analysis of two pharmaceutical formulations (cream and spray) using propylparaben as an internal standard was developed and validated.

The chromatographic separation was performed on a NUCLEOSIL 100-5-CN column, the mobile phase for separation of all compounds consists of a mixture of tetrahydrofuran, acetonitrile and citrate buffer (pH = 4.50) (10 : 20 : 70 v/v/v). The analysis time (for determination of terbinafine and its four impurities) was less than 40 min at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup> and detection at 226 nm (1).

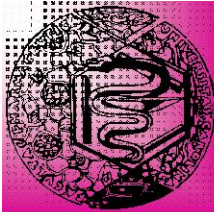
Both pharmaceutical formulations were analyzed under the same chromatographic conditions but the isolation procedures were different. The sample of cream was sonificated with internal standard solution, centrifuged and then injected to HPLC system. Terbinafin spray was mixed with internal standard solution in volumetric flask and after filling up standard volume was injected to chromatograph.

The method was found to be applicable for routine analysis (stability tests, homogeneity) of terbinafine in pharmaceutical products – topical cream and spray - in control laboratories.

*The authors gratefully acknowledge the financial support of the Ministry of Education of the Czech Republic – MSM 0021620822.*

## Reference:

- (1) L. Matysová , P. Solich , P. Marek , L. Havlíková , L. Nováková , J. Šícha, Separation and Determination of Terbinafine and its Four Impurities of Similar Structure Using Simple RP-HPLC Method, *Talanta*, 68, 713(2006).



# SEPARATION AND DETERMINATION OF TERBINAFINE AND ITS FOUR IMPURITIES IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY RP-HPLC.

Matysová L.<sup>a</sup>, Hájková R.<sup>a</sup>, Solich P.<sup>a</sup>, Šícha J.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

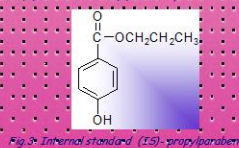
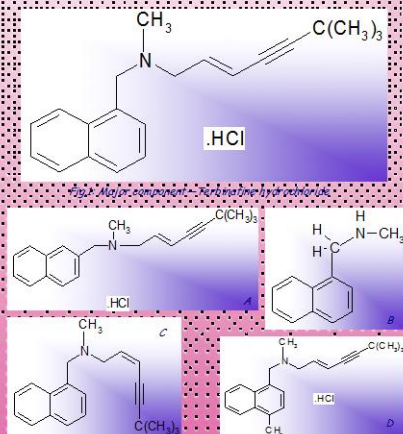
<sup>b</sup> Bochemie Group, Herbacos-Bofarma Ltd., Štrossova 239, 530 02 Pardubice,

## Introduction

Terbinafine (Figure 1) (6,6-dimethyl-2-(3,4-dimethyl-1-naphthyl-1-naphthylene)methanone; hydrochloride, *vs. vs.*) is a synthetic derivative reported to have a broad spectrum of antifungal activity. It is considered to act by inhibition of fungal ergosterol synthesis. Terbinafine is fungicidal against affected dermatophytes and some yeasts, as hydrochloride salt, used mostly for the treatment of dermatophyte infections of the skin and nails. It is also applied to the skin in the occurrence of dermatophytoses, psoriasis, seborrhea and eczema. Conditions are reported that terbinafine interferes with the cytoplasmic membrane integrity of fungi by blocking ergosterol biosynthesis. Terbinafine is used for treatment of fungal infections of the skin of treated, e.g., athletes' foot, tinea corporis [1,2].

## Aim of the work

The purpose of this study was to develop a simple, efficient method for the determination of terbinafine and its degradation products in a topical cream and spray. The degradation products were 4-methyl-terbinafine (A), 2-terbinafine (B), 4-methyl-terbinafine (C), and 4-methyl-terbinafine (D). The internal standard propylparaben (Figure 2) was used. The method has been validated and successfully applied for the separation, identification and stability tests of all compounds in the pharmaceutical formulations: Terbinafine cream and Terbinafine spray.



## Chromatographic system

Shimadzu LC-2010 C system (Shimadzu, Japan) with built-in UV-VIS detector and autosampler  
 PC for data processing (with chromatographic software Class VP, version 6.12, Shimadzu Japan).

## Results and discussion

### Optimized conditions:

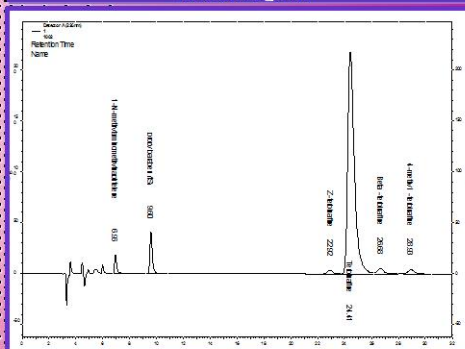
column:	250 x 4.6 mm I.D. NUCLEOSIL 100-5-CN, 5 μm (Biosichromatography)
column-temperature:	ambient
injection volume:	2 μl
mobile phase:	mixture of tetrahydrofuran, acetonitrile and citrate buffer (pH = 4.50) (10 : 20 : 70 v/v/v)
flow rate:	0.8 ml/min
UV detection:	λ = 226 nm
internal standard:	propylparaben
time of analysis:	32 min.

### Sample preparations:

**Cream:** Portion of a pharmaceutical cream (0.5 g) was supplemented with the internal standard (20 ml of a 250.0 mg.l<sup>-1</sup> solution of propylparaben in acetonitrile), after that 50 μl of phosphoric acid (85%) was added, the mixture was placed into the ultrasonic bath for 15 min and then centrifuged at 6000 rpm for 15 min. A volume of 2 μl of supernatant was analyzed by HPLC.

**Spray:** 1 g of spray solution in 20 ml of acetonitrile with addition of IS.

## Chromatogram



## Conclusion

A novel HPLC methods with UV spectrophotometric detection for determination of terbinafine and its degradation products in a topical cream and spray, using propylparaben as internal standard, NUCLEOSIL 100-5-CN column and UV detection at 226 nm were developed. The chromatographic conditions of the both formulations are the same, only sample preparations are different.

The total analysis time was less than 32 min. Methods have been validated, the results obtained were precise and accurate. These methods were successfully applied for the identification, quantitative analysis and stability tests of all compounds in the pharmaceuticals - Terbinafine cream and Terbinafine spray.

## References

- [1] Micro Version ATSLP, v.2006.2.
- [2] L. Matysová, P. Solich, P. Marek, L. Hájková, L. Nováková, J. Šícha, *Talanta* 68(2006), 713-720

## Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support of the Grant Agency of the Ministry of Education of the Czech Republic - MSM 0021620822.

Drug Analysis 2006, Namur, Belgium

# COMPARISON OF KETOPROFEN SKIN PERMEATION BY IN-VITRO TEST USING FRANZ CELL

**Hájková R.<sup>a</sup>, Sklenářová H.<sup>a</sup>, Klimundová J.<sup>a</sup>, Matysová L.<sup>a</sup>, Solich P.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

The overall composition of gel and thermodynamic properties of drugs influence the drug release from the topical formulations. The release of the drug is one of several criteria used to characterize finished preparations. At present there is no official rule for the performance of such release testing. Recommendations dealing with in-vitro skin absorption testing were published by OECD (1) and was used for comparison of two topical formulations with ketoprofen. Comparison of both formulations should be carried out for bioequivalence study of technologically different gels basis which would affect drug release.

Nine Franz diffusion cells fitted with an excised pig skin were used for modeling of permeation of the drug through the human skin after application of gel. Franz cells were maintained in water bath and the acceptor fluid was mixed. Samples of gels were applied on the skin and samples of acceptor fluid with released drug content were taken. The medium for drug release was isotonic phosphate buffer with addition of 0,05% of sodium azide.

The volume of acceptor fluid was filled up after each sample up-take by fresh acceptor fluid and concentration changes were recalculated. Samples were determined using HPLC method which was validated in the same laboratory (2).

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF.

## References:

- (1) OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.28, Guidance Document for the conduct of skin absorption studies, Paris (2004).
- (2) J.Dvořák, R.Hájková, L.Matysová, L.Nováková, M.Koupparis, P.Solich, HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in presence of preservatives in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 36(3), 625 (2004).



# Comparison of Ketoprofen Skin Permeation by in-vitro test using Franz Cell

Hájková R.<sup>a</sup>, Sklenářová H.<sup>a</sup>, Klimundová J.<sup>a</sup>, Matysová L.<sup>a</sup>, Solich P.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

## INTRODUCTION

The overall composition of ointment and thermodynamic properties of drugs influence the drug release from the topical dosage form. The release of the drug is one of several criteria used to characterize finished preparations. At present there is no official rule for the performance of such release testing. Recommendations dealing with in-vitro skin absorption testing were published by OECD [1] and was used for comparison of two topical formulations with Ketoprofen as an active substance—Ketoprofen gel (Herbacos-bofarma Ltd.) and Profenid gel (Laboratoire Aventis). Comparison of both formulations should be carried out for bioequivalence study of technologically different gels bases which would affect drug release.

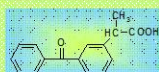


Fig. 1: Ketoprofen

## EXPERIMENTAL

- Skin of the pig ears were excised by dermatom (layer thickness 300 µm), disinfected with 70% ethanol and dipped to betaine solution because of preserving skin vitality, then it was soaked in isotonic buffer with 0.05% sodium azide for 5 min and before measurement stored under 4°C (max. 10 days)
- Water bath temperature was set to 32°C, nine Franz diffusion cells (volume 15 ml) were filled with isotonic buffer (with sodium azide) and the upper side was covered with a plate with circular hole (d = 1cm) for active substance liberation
- Area about 3x3 cm was cut out of the skin, placed on the plate and covered up with the second plate with the same hole
- Each Franz cell was tempered for 30 min in the water bath and acceptor fluid was mixed by magnetic stirrer (400 rpm)
- Samples of gels were applied on the skin in amount of 0.5 g of gel and covered again with glass upper part
- Samples of acceptor fluid with released drug content were taken out (using Hamilton pipette) in 11 intervals in the case of 30 hours lasting test
- The volume of sample was 300 µl, samples were determined using HPLC method which was validated in the same laboratory [2]
- The volume of acceptor fluid was filled up after each sample up-take by fresh acceptor fluid and concentration changes were recalculated.



Fig. 2: Franz cell

## CHROMATOGRAPHIC SYSTEM

chromatographic system: Shimadzu LC-2010 C (Shimadzu, Japan) with built-in UV-VIS detector and autosampler  
 column: SUPELCO Discovery C18, 125x4 mm ID, 5 µm (Sigma-Aldrich)  
 column temperature: ambient  
 injection volume: 10 µl  
 mobile phase: mixture of acetonitrile, water and phosphate buffer pH 3.5 (40:58:2 v/v/v)  
 flow rate: 1.0 ml.min<sup>-1</sup>  
 UV detection: λ = 233 nm  
 time of analysis: 7 min  
 PC far data processing (with chromatographic software Class VP, version 6.12, Shimadzu Japan)

## CHROMATOGRAMS

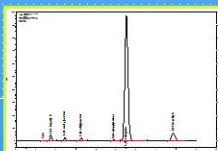


Fig. 3: Chromatogram of standards

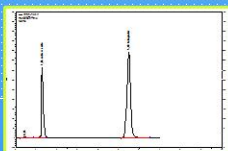


Fig. 4: Chromatogram of sample after 20 hod permeation

## DATA EVALUATION [3]

$$C_{cor} = C_{measured} + \frac{volume_{sample}}{volume_{acceptor}} (C_1 + C_2 + \dots + C_{measured} - 1)$$

$$Q_a = \frac{C_{cor} \cdot volume_{acceptor}}{A}$$

$Q_a$  ...released amount [µg.cm<sup>-2</sup>]  
 A ...the area of membrane, through which the released substance passed

## RESULTS OF PERMEATION

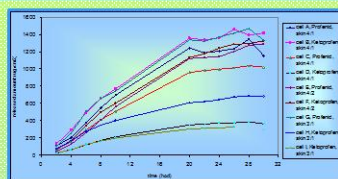


Fig. 5: Comparison of ketoprofen skin permeation I

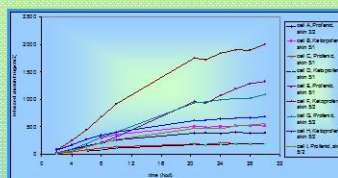


Fig. 6: Comparison of ketoprofen skin permeation II

## SOLUTION OF PROBLEMS

- Isotonic buffer with sodium azide should be degassed before measurement because of bubbles in Franz cell affected permeation rate and profile
- Two compared formulations should be put on the same skin graft of the same animal in parallel
- Plates are good to be lubricated with Lucosan for better adhesion of the skin to the cell material (glass)
- After taking out 300 µl of sample from the Franz cell not only the same volume of fresh buffer should be filled in but there should be used such a volume of buffer to get always soaked skin (the buffer is also evaporated) - the added volume is involved in the calculation

## CONCLUSION

Optimum amount of the sample applied to the skin graft was set (0.5 g) and differences between experiments with covered (occlusion) and open skin were found not to be statistically significant.

Comparison of permeation profiles of the active substance ketoprofen in two formulations—Ketoprofen gel (Herbacos-bofarma Ltd.) and Profenid gel (Laboratoire Aventis) was carried out. Following the cited recommendations [1] obtained results should be in interval 80–120%. The statistic evaluation will be completed by pharmaceutical technology expert.

In Figures 5 and 6 there were compared all experiments—including those in which technical problems arose and will be excluded from the calculation. After solution of such problems and repeating experiments bioequivalence study will be finished.

## REFERENCES

- [1] OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 28, Guidance Document for the conduct of skin absorption studies, Paris (2004).
- [2] J. Dvořák, R. Hájková, L. Matysová, L. Nováková, M. Koupparis, P. Solich, HPLC determination of Ketoprofen and its degradation products in presence of preservatives in pharmaceuticals, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 36(3), 625 (2004).
- [3] J. Klimundová, D. Satínský, H. Sklenářová, P. Solich, Automation of simultaneous release test of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, Talanta, Vol. 69, 730 (2006).

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF and by the Ministry of Education, MSM 0021620822.

Drug Analysis 2006, Namur, Belgium

# VÝVOJ A VALIDACE METODY PRO STANOVENÍ PANTOTHENANU VÁPENATÉHO, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU V TOPICKÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

HAVLÍKOVÁ LUCIE, MATYSOVÁ LUDMILA, NOVÁKOVÁ LUCIE, SOLICH PETR

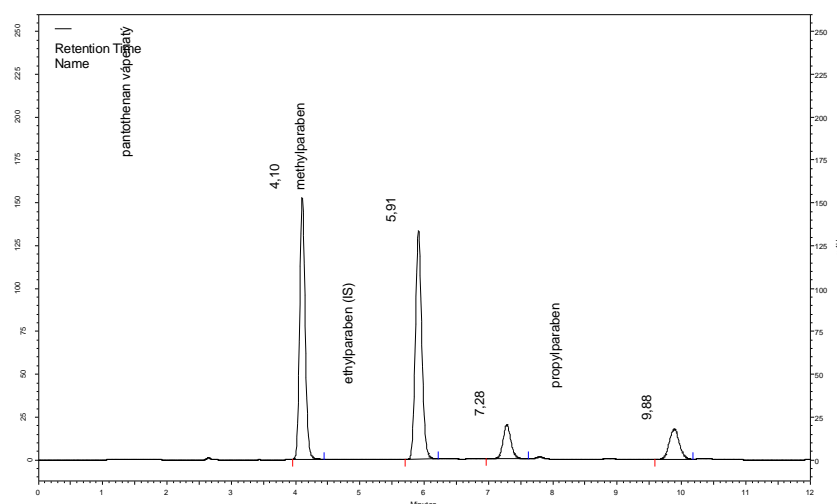
UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ludmila.matysova@faf.cuni.cz

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 sledována 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 pantothénát mast, která bude použita pro rutinní analýzy přípravku v rámci stabilitní studie. Výsledky validace potvrzují reprodukovatelnost, přesnost a správnost metody.

Obrázek: Chromatogram směsi standardů (pantothenan vápenatý, methylparaben a propylparaben s vnitřním standardem ethylparabenem).



Problematika byla řešena za podpory výzkumného záměru MSM 0021620822.



# VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ PANTOTHENANU VÁPENATÉHO, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU V TOPICKÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

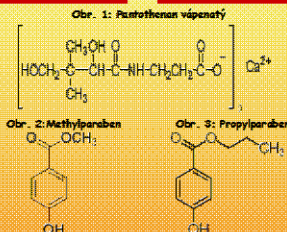
HAVLÍKOVÁ LUCIE, MATYSOVÁ LUDMILA, NOVÁKOVÁ LUCIE, SOLICH PETR

katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ludmila.matysova@faf.cuni.cz

## Úvod

Kyselina pantothenová tvoří součást komplexu vitamínu B. Pantothenan vápenatý (CP, obr. 1), se používá na podporu epitelizace poraněné kůže nebo sliznice a růstu granulační tkáně. Je dále využíván při léčení zánětů a poranění očních spojivek a rohovky, při popáleninách, omrzlinách apod. [1]

Parabeny (obr. 2,3) 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]

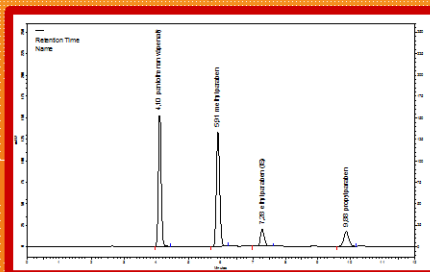


## Cíl práce

- vývoj a optimalizace nové RP-HPLC metody pro současné stanovení pantothenanu vápenatého jako účinné látky a methylparabenu a propylparabenu jako konzervancí, obsažených v přípravku Calcium pantothenát mast
- nalezení co nejjednodušší a zároveň účinné metody izolace stanovených látek z topického léčivého přípravku
- kompletní validace metody podle platných norem

## Optimalizace metody

Obr. 4: Chromatogram roztoku standardů



- ♦ byla zvolena vlnová délka pro UV detekci - na základě proměření UV spekter stanovených látek
- testované chromatografické kolony:
- ♦ Supelco Discovery C18 (125mmx4,0 mm, 5µm, Sigma-Aldrich)
- ♦ Zorbax SB-CN (150mmx4,6mm, 5µm, Agilent Technologies)
- ♦ Zorbax TMS (250mmx4,6mm, 5µm, Agilent Technologies)
- ♦ Hypersil ODS (250mmx4,6mm, 5µm, Hypersil UK)
- ♦ Složení mobilní fáze:
- ♦ testovány směsi organické (methanol, acetonitril) a vodné fáze o kyselém pH (roztok kyseliny fosforečné)
- ♦ - byl nalezen vhodný vnitřní standard

### Optimální chromatografické podmínky:

- ♦ Chromatografická kolona: Hypersil ODS (250mmx4,6mm, 5µm, Hypersil UK)
- ♦ Mobilní fáze: methanol-kys. fosforečná pH 2,5 = 65:35 (v/v)
- ♦ Vnitřní standard: ethylparaben
- ♦ Průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min
- ♦ Vlnová délka: UV 214 nm
- ♦ Dávkování: 2 µl
- ♦ Teplota: 25°C
- ♦ Délka analýzy: 12 min

## Validace

### Validační parametry: [2,3]

- ♦ Test způsobilost systému (opakovatelnost, počet teoretických pater, rozlišení pík, asymetrie pík)
  - ♦ Přesnost
  - ♦ Správnost
  - ♦ Linearita
  - ♦ Selektivita
- ♦ Robustnost (změny složení mobilní fáze, stabilita)

Tabulka 1: Validační parametry

parametr	požadavek	CP	methylparaben	propylparaben
opakovatelnost <sup>a</sup> , RSD (%)	RSD < 1 %	0,12	0,23	0,15
Asymetrie pík <sup>b</sup> , T	T < 2	1,29	1,08	1,16
Rozlišení pík <sup>b</sup> , R	R > 1,5	10,01	6,73	10,05
Počet teoretických pater <sup>b</sup> , N	N > 900	10301	15608	17900
linearita <sup>c</sup>	R > 0,9900	R = 0,999978	R = 0,999994	R = 0,999993
presnost <sup>d</sup> , RSD (%)	RSD < 5 %	2,98	2,78	2,84
Správnost <sup>e</sup> , výtečnost ± RSD (%)	100 ± 5 %, RSD < 5 %	99,15 ± 0,81	99,69 ± 2,04	98,06 ± 1,65
stabilita <sup>f</sup> , S <sub>r</sub> (%)	S <sub>r</sub> < 1 %	0,09	0,07	0,99

*Hypothesis:*  
 a-5 nástrky  
 b-3 nástrky  
 c-6x vzorek azoatane připraven pro každou nástrku 3 nástrky  
 d-3x 40, 80, 120, 160, 200 % dělení vzhledem k obsahu pantothenanu vápenatého; n = 6; 3 nástrky  
 e-3 nástrky po 48 hodinách při 20 °C pro všechny analýzy  
 CP-pantothenan vápenatý

## Závěr

Vpracovaná HPLC metoda slouží pro stanovení účinné látky pantothenanu vápenatého a konzervačních látek methylparabenu a propylparabenu v přípravku Calcium pantothenát mast HBF. Na základě provedené validace metody lze konstatovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení uvedených látek v přípravku Calcium pantothenát mast.

## Literatura

- [1] Micro Verze ATSLP, v. 2006.2
- [2] Český lékopis 2005, Grada Publish ing, Praha, Česká republika
- [3] International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA41-08/2006>

## Poděkování

Problematika byla řešena za podpory projektu MSM 0021620822



# **POROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ OBSAHU KONZERVAČNÍCH LÁTEK V PŘÍPRAVKU LIPOLOTIO KRÉM**

HÁJKOVÁ RENATA<sup>1</sup>, MATYSOVÁ LUDMILA<sup>1</sup>, RYBENSKÁ EVA<sup>1</sup>, NOVÁKOVÁ LUCIE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; Renata.Hájková@faf.cuni.cz

Cílem práce bylo vyvinout a zvalidovat metody pro rutinní stanovení konzervačních látek v přípravku Lipolotio krém, který se vyrábí buď s přídavkem kyseliny sorbové nebo se směsí methylparabenu a propylparabenu jako konzervantů. Parabeny se používají ve velkém množství topických léčivých přípravků, protože jsou málo toxické a jejich antimikrobiální účinnost není závislá na pH. Kyselina sorbová má fungicidní účinky, je inhibitorem plísní, kvasinek a bakterií a používá se kromě léčivých přípravků také ke konzervaci potravin a kosmetických přípravků (1).

Metoda extrakce konzervačních látek z krému se ukázala jako velmi složitá a bylo nutno otestovat mnoho extrakčních směsí pro dosažení potřebné výtěžnosti; extrakce se liší podle přidané konzervační látky, detailní postup je uveden na posteru. Pro analýzu methylparabenu a propylparabenu byla použita kolona SUPELCO Discovery C18 (125×4mm, 5 μm, Sigma-Aldrich), jako optimální mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril - voda (50:50, v/v) s průtokem 1,1 ml/min a nejvhodnějším vnitřním standardem byl zvolen butylparaben. Pro analýzu kyseliny sorbové byla použita kolona Zorbax Elipse XDB – C18 (75×4,6mm, 3,5 μm, Agilent), mobilní fáze acetonitril - 0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (40:60, v/v) s průtokem 1,0 ml/min, jako vnitřní standard byl použit propylparaben. Detekce byla v obou případech provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 253 nm.

Vypracované a optimalizované metody byly kompletně zvalidovány a úspěšně aplikovány pro stanovení obsahu konzervačních látek v hromadně vyráběném léčivém přípravku Lipolotio krém, a v rámci sledování obsahu konzervačních látek při stabilitních studiích.

(1) Mikroverze AISLP 2006.2 pro MS Windows

*Problematika byla řešena za podpory výzkumného záměru 0021620822 MSM.*



# Porovnání metod stanovení obsahu konzervačních látek v přípravku Lipolotio krém

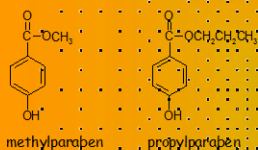
Hájková Renata, Matysová Ludmila, Rybenská Eva, Nováková Lucie

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Renata.Hajkova@faf.cuni.cz

## CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vyvinout a zvalidovat HPLC metody pro rutinní stanovení konzervačních látek v přípravku Lipolotio krém, který se vyrábí buď s přísadkou kyseliny sorbové nebo se směsí methylparabenu a propylparabenu jako konzervantů. Parabeny se používají ve velkém množství topických léčivých přípravků, protože jsou málo toxická a jejich antimikrobiální účinnost není závislá na pH. Kyselina sorbová má fungicidní účinky, je inhibítozem plísní, kvasinek a bakterií a používá se kromě léčivých přípravků také ke konzervaci potravin a kosmetických přípravků. Jako velmi složitá se ukázala především extrakce konzervačních látek z krému, pro dosažení potřebné výťažnosti byla nutná oteřování mnoha extrakčních směsí.

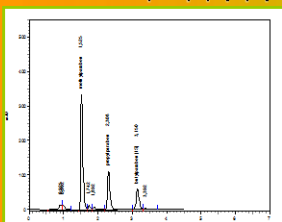
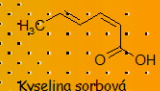
## POROVNÁNÍ METOD



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 octonitrilu a fosfátového pufru o pH 3,0 (30:70 (v/v)) a koncentrací 6 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 d dávkováni autostabilizován kadmium.

### Extrakční postup:

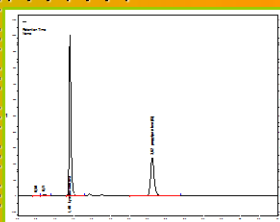
Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml bylo odváženo množství krému odpovídající 1 mg kyseliny sorbové (asi 0,5 g), bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu - propylparabenu ve směsi kyseliny fosforečné 0,085% a tetrahydrofuranu (20:80 (v/v)) a koncentrací 6 mg/100 ml a zkumavka byla umístěna na vodní lázeň zabíhající na 70°C po dobu 15 minut. Poté byla směs umístěna po dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant byl filtrován přes membránový filtr a dále byl autostabilizován na kolonu.



SUPELCO Discovery C18  
 (Sigma-Aldrich) (125 x 4 mm, 5 μm)  
 30 μl  
 voda : octonitril = 90:10 (v/v)  
 11 ml/100 ml  
 izokraticky  
 25 °C  
 1 ml, 252 min  
 butylparaben

### Chromatografické podmínky:

Kolona: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent) (75 x 4,6 mm, 5 μm)  
 Dávkování objem: 5 μl  
 Mobilní fáze: H<sub>2</sub>O : 0,085% CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H : 60 : 40 (v/v)  
 Průtok: 1,0 ml/min  
 Režim: izokraticky  
 Teplota: 25 °C  
 Detekce: UV 253 nm  
 Vnitřní standard: propylparaben



### Vybrané validační parametry:

parametr	opakovatelnost (RSD <sup>a</sup> )		přesnost (RSD <sup>b</sup> )		správnost		linearita (korelační koeficient <sup>c</sup> )		přesnost (RSD <sup>b</sup> )		správnost		linearita (korelační koeficient <sup>c</sup> )	
	A	T <sub>1</sub>	výž. ž. 1	výž. ž. 2	výž. ž. 1	RSD <sup>a</sup>	0,999912	0,999906	0,66%	0,00%	0,02%	98,91%	1,02%	0,99978
methylparaben (MP)	0,56%	0,44%	1,38%	98,22%	0,28%	0,999912								
propylparaben (PP)	0,58%	0,40%	1,48%	95,71%	0,66%	0,999906								
limit	< 1%	< 1%	< 5%	100 ± 5%	< 5%	> 0,99990								

<sup>a</sup> 6 nástříků, C<sub>inj</sub> = 2,64 mg/100 ml, C<sub>pr</sub> = 1,56 mg/100 ml  
<sup>b</sup> vzorek připraven směsí až 6x, př. každod na nástřík 3 nástříky  
<sup>c</sup> 6 koncentrací (40%-200%), pro každou 3 nástříky

## ZÁVĚR

Obě vypracované a optimalizované metody byly kompletně zvalidovány a jsou úspěšně aplikovány při stanovení obsahu konzervačních látek v hromadně vyráběném léčivém přípravku Lipolotio krém a dále v rámci sledování obsahu konzervačních látek při stabilitních studiích.

## PODĚKOVÁNÍ

Problematika byla řešena za podpory výzkumného záměru MSM 0021620822.

# Stanovení chlorhexidin glukonátu v masti metodou HPLC

Havlíková Lucie<sup>1</sup>, Matysová Ludmila<sup>1</sup>, Hájková Renata<sup>1</sup>, Petr Solich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzita 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 µm). 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

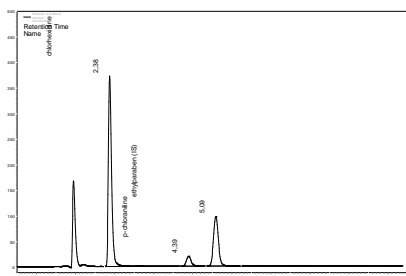
## Úvod

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. Vynuté a validované metody se používají pro stabilní studie topických léčivých přípravků.

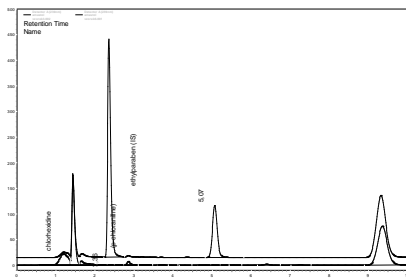
## Cíl práce

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, kvasinám a dermatofytickým plísním.

## Experimentální část



Chromatogram standardů: chlorhexidin, p-chloranilin a vnitřní standard ethylparaben



Chromatogram masti s obsahem chlorhexidinu a přidávkem 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 kyselinou 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 dávkován na kolonu

## Validace metody

Parametr		Chlorhexidin	p-chloranilin	Limit
<b>SST</b>				
Opakovatelnost-retenční čas <sup>a</sup>	R.S.D (%)	0,37	0,07	X < 1%
Opakovatelnost-plocha <sup>a</sup>	R.S.D (%)	0,07	0,33	X < 1%
Počet teoretických pater <sup>b</sup>		4002	7109	N > 2000
Rozlišení <sup>b</sup>		7,16	9,99	R <sub>s</sub> > 1,5
Asymetrie <sup>a</sup>		1,81	1,18	T < 2
<b>Validace</b>				
Přesnost <sup>b</sup>	R.S.D.(%)	1,72	1,87	X < 5%
Linearita <sup>a</sup>	Korelační koeficient	0,99964	0,99901	R > 0,9990
Správnost	Výtěžnost	99,72	100,38	X = 100± 5%
	R.S.D (%)	2,72	1,53	X < 5%
LOD (mg.ml <sup>-1</sup> )		-	6,65.10 <sup>-4</sup>	
LOQ (mg.ml <sup>-1</sup> )		-	2,22.10 <sup>-4</sup>	
Selektivita		Žádná interference	Žádná interference	

<sup>a</sup>n=6

<sup>b</sup>6 vzorků, každý nařídán 3x

<sup>c</sup>chlorhexidin - koncentrační rozmezí 5.12.10<sup>-2</sup>-17,85.10<sup>-2</sup> mg.ml<sup>-1</sup>

<sup>d</sup>p-chloranilin - koncentrační rozmezí 5.10<sup>-6</sup>-6.10<sup>-5</sup> mg.ml<sup>-1</sup>

## Závěr

Byla vyvinuta metoda vysokoučinné 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 stabilní studie uvedené masti k veterinárnímu užití.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 0021620822

## 6. SHRnutí

Tato disertační práce je věnována vývoji HPLC metod, které splňují všechny požadavky kladené na vhodnost, přesnost a správnost, pro analýzu farmaceutických přípravků. Doložení těchto vlastností metody je proces, který se nazývá validace.

Předložená práce nejprve pojednává o teoretických základech chromatografie jako takové, s důrazem na chromatografii kapalinovou, včetně HPLC. Popisuje instrumentaci v HPLC, kde jsou zmíněny i nové trendy ve vývoji stacionárních fází, ať už se jedná o monolitické kolony, stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého, HILIC stacionární fáze a sub-2-mikronové kolony. Je zde i část věnovaná UPLC, jednomu z dalších trendů ve vývoji kapalinové chromatografie. V další části je probírán vývoj HPLC metod pro analýzu farmaceutik a také kapitola, věnující se analýze léčivých přípravků, včetně přípravy vzorků k analýze, sledování stabilit léčivých přípravků a část, která se věnuje analýze nečistot.

Poslední poměrně rozsáhlá kapitola teoretické části této práce se věnuje validacím analytických metod. Požadavky na validace se zabývá několik autorit, které vydávají závazné normy a/nebo doporučení, jimiž je třeba se během tohoto procesu řídit. V České republice je to Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL - Věstník SÚKL, ČL 2005). V Evropské unii jsou validace zmíněny v Evropském lékopisu (Ph. Eur. 5). V USA je validacím věnována stať v lékopise (USP 29) a zabývá se jimi například Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Institucí, která se snaží sjednotit validační předpisy pro Evropskou unii, USA a Japonsko je ICH (Internacional Conference on Harmonisation). Jak z uvedeného vyplývá, je problematika validací řešena několika institucemi a byla snaha tento proces lépe poznat a zpřehlednit. V této části disertace je validace probrána poměrně podrobně. Jsou zde popsány jednotlivé parametry validačního procesu, jako je přesnost, správnost, linearita, selektivita, robustnost, detekční a kvantitativní limit. Část je věnována i testu vhodnosti systému (System suitability test), což je velmi důležitá součást validačního procesu zejména instrumentálních metod pro analýzu farmaceutických přípravků. Každý parametr je zde popsán a komentován z pohledu dvou autorit, zabývajících se validacemi – v České republice SÚKL a v zahraničí ICH.

Prakticky bylo v rámci této práce vyvinuto sedm nových metodik pro topické léčivé přípravky (masti, gely, krémy), ze kterých byly vypracovány publikace, přijaté do

významných zahraničních odborných časopisů, jako jsou *Journal of Chromatography A* a *B*, *Talanta*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* a *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. V rámci práce byly ještě vyvinuty další tři popsané metody, které byly publikovány kromě jiných pouze formou posterů na odborných konferencích.

Pomocí těchto nově vyvinutých metod lze hodnotit dané léčivé přípravky v rámci sledování jejich stability a při výstupní kontrole a kontrole homogenity těchto farmaceutických preparátů. Metody řeší analýzu účinných látek, případných konzervancí a rozkladných produktů v rámci jedné analýzy.

Metody byly aplikovány na léčivé přípravky, nejčastěji gely a krémy. V přípravku *Triamcinolon krém* se stanovuje obsah účinné látky triamcinolonu acetonidu, methylparabenu a propylparabenu jako konzervačních látek a triamcinolonu, což je degradační produkt účinné látky. V *Ketoprofen gelu* se podobně stanovuje ketoprofen, parabeny a dva degradační produkty. Na přípravek *Estrogel gel* byly vyvinuty dvě metodiky, protože SÚKL během stabilitní studie zvýšil požadavky na sledování nečistot a výrobce zároveň změnil složení přípravku tím, že ho začal vyrábět bez parabenů. Novější metodika proto umožňuje sledovat v gelu obsah účinné látky estradiolu a zároveň hladiny šesti nečistot. V rámci analýzy přípravku *Indometacin gel* se stanovuje obsah účinné látky indometacinu a jeho dvou degradačních produktů – kyseliny 4-chlorbenzoové a kyseliny 5-metoxy-2-methylindolové. Dalším přípravkem, kde se stanovuje obsah více nečistot, je *Terbinafin krém*. Zde se kromě účinné látky terbinafinu sleduje obsah nečistoty z výroby (methylaminomethylnaftalen) a tří degradačních produktů terbinafinu (*Z*-terbinafin,  $\beta$ -terbinafin a 4-methylterbinafin). Zde byl vývoj komplikovanější vzhledem k velice podobné struktuře rozkladných produktů. Posledním přípravkem je *Calcium pantothenát mast*. Metodika vyvinutá pro tento léčivý přípravek zahrnuje stanovení obsahu pantothenanu vápenatého jako účinné látky a methylparabenu a propylparabenu jako konzervancí. Při analýze všech přípravků je pro kvantifikaci používána metoda vnitřního standardu, což jednak zvyšuje přesnost stanovení a je vhodné vzhledem k postupu při izolaci stanovovaných látek z mast'ových (gelových, krémových) základů těchto topických léčivých přípravků.

Všechny vyvinuté metody byly kompletně validovány podle doporučení všech zmíněných autorit. Metody byly shledány dostatečně vhodné, přesné a spolehlivé pro analýzu zmíněných přípravků a mnohé z nich jsou již s úspěchem aplikovány na jejich rutinní analýzu (například při sledování stability a při výstupních kontrolách).

Některé z těchto metod byla aplikovány při analýze na nových typech stacionárních fází. Těmi byly některé monolitické kolony, na kterých byly analyzovány přípravky Ketoprofen gel a Estrogel gel. Tyto stacionární fáze jsou výhodné zejména proto, že při jejich použití vzniká jen velmi nízký zpětný tlak v systému, takže se dají použít relativně vysoké průtoky mobilní fáze. To vede k několikanásobnému zkrácení analýzy. Diskutabilní je ale vzhledem k takto vysokým hodnotám průtoku vysoká spotřeba rozpouštědel, což je negativní vzhledem k životnímu prostředí, nehledě na finanční stránku. Detaily porovnání jsou uvedeny v příloze VIII.

V příloze IX. jsou provedena srovnání vyvinutých metod na běžných C18 kolonách s výsledky analýz na acquity kolonách v UPLC systému. Bylo testováno pět přípravků (Diclofenac emulgel, Triamcinolon krém, Estrogel gel, Indometacin gel a Hydrocortison krém), u kterých byly opět sledovány obsahy účinných a konzervačních látek a hladiny degradačních produktů. Metoda UPLC byla jednoznačně lepší z hlediska kvality separace, rozlišení, délky analýzy a spotřeby rozpouštědel. Díky menšímu rozmývání chromatografických píků dochází k přesnějšímu odečítání dat a tím k zpřesnění analýzy. Diskutabilní by vzhledem k extrémnímu zkrácení analýzy a přiblížení se píků na chromatogramech byla možná analýza tzv. nedefinovaných nečistot, kdy zkrácení chromatografického záznamu a přiblížení se píků stanovovaných látek vzájemně prakticky neumožňuje sledovat píky těchto nečistot.

## 7. SUMMARY

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHODS

The doctoral thesis concerns with development of HPLC methods for analysis of pharmaceutical formulations, which meet all requirements for suitability, precision and reliability. Documentation of these parameters is called validation.

At first theoretical principles of chromatography are described in this work, with the emphasis to liquid chromatography, included HPLC. The instrumentation in HPLC is described, mentioning the new trends in stationary phase's development – for example monolithic columns, zirconia stationary phase, HILIC and sub-2-microns phases. In the other part UPLC system, one of the new trends in liquid chromatography development is discussed. Next part deals with the development of HPLC methods for analysis of pharmaceuticals and is followed by chapter, in which analysis of pharmaceutical formulations is described, included preparation of the samples before analysis, stability monitoring and further the analysis of impurities.

The last, relatively large chapter is dealing with the validation of analytical methods. Several institutions are concerned with validation requirements. They issue recommendation and/or guidelines, which are cogent for this process. In the Czech Republic there exists State Institute for Drug Control (SUKL – Bulletin of SUKL, Czech Pharmacopoeia). The validations are mentioned in European Pharmacopoeia (Ph.Eur.5) too. The validation chapter is described in the US Pharmacopoeia (USP 29); FDA (Food and Drug Control) and ICH (International Conference on Harmonization) are dealing with validation too. The ICH associates validation requirements for the European Union, USA and Japan. The validation process is controlled by several institutions and it was the reason for transparent and clear description of this problem. In this chapter the validation process is threshed relatively closely. The described parameters of validation procedure are precision, accuracy, linearity, selectivity, robustness, limit of detection, limit of quantitation. One part is dealing with the system suitability test, very important part of validation process (mainly in instrumental methods for analysis of pharmaceutical formulations). Each parameter is described with comments. The parameters are classified in term of two authorities – SUKL and the ICH.



In term of this work seven new methods for analysis of topical formulations (ointments, gels, and pastes) were developed; the papers were accepted in international journals: Journal of Chromatography A and B, Talanta, Analytical and Bioanalytical Chemistry and Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Other three methods, which were published as posters on several analytical conferences, were developed.

The pharmaceutical formulations are analyzed using the above mentioned methods during their stability testing and quality and homogeneity control. The methods solved analysis of active substances, preservatives and degradation products in one analysis.

The new methods were applied to pharmaceutical formulations, in most cases to gels and creams. In *Triamcinolon cream* triamcinolone acetonide as an active substance, methylparaben and propylparaben as preservatives and triamcinolone as degradation product are determined. In *Ketoprofen gel* ketoprofen parabens and two degradation products are similarly determined. Two methods for analysis of *Estrogel gel* were developed, because SUKL increased its requirements for monitoring impurities and producer changed composition of this preparation. Thus the latest method monitors assay of estradiol and its six impurities. In terms of analysis of *Indometacin gel* indomethacin and its two degradation products – 4-chlorbenzoic acid and 5-methoxy-2-methylindolacetic acid - are determined. *Terbinafin cream* is next formulation, in which more impurities are tested. In this formulation terbinafine as an active substance, methylaminomethylnaphtalene as impurity erased in a production process and three degradation products of terbinafine – Z-terbinafine,  $\beta$ -terbinafine and 4-methylterbinafine - are determined. The last pharmaceutical is *Calcium pantothenát mast*. Calcium pantothenate as an active substance and methylparaben and propylparaben as preservatives are determined. During analysis of these formulations internal standard method, which increases precision and accuracy, was used. This method is very suitable with regard to isolation from ointment matrices.

All of the methods were completely validated with respect to guidelines of all mentioned institutes. Methods were found sufficiently suitable, precise and reliable for analysis of the mentioned formulations and they are applied for their routine analysis (for example during stability testing or quality control).

The developed methods were transferred to the new types of stationary phases. They were represented by monolithic columns; on those Ketoprofen gel and Estrogel

gel were analyzed. An advantage of these phases is very low back pressure, so they can be used with high flow rates of mobile phases. It leads to shorter analyses. High consumption is debatable considering environmental and financial aspects (for details see attachment VIII).

A comparison of developed methods using conventional ODS columns and acquity columns in the UPLC system was described in attachment IX. Five formulations were tested – Diclofenac emulgel, Triamcinolon cream, Estrogel gel, Indomethacin gel and Hydrocortison cream, in those contents of active substances, preservatives and degradation products were monitored. The UPLC method was advantageous from the point of view of separation quality, resolution, time of analysis and consumption of solvents. By virtue of minor band broadening more precise data evaluation and hence better analysis precision were reached. This method would be debatable considering determination of undefined impurities. The shorter recording of analysis and shorter distance between peaks on chromatogram makes monitoring of these impurities practically impossible.

## 8. ZÁVĚR

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je metoda často využívaná v kontrole léčiv. Je to především z toho důvodu, že jde o metodu separační, která umožňuje zároveň kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí (podle použitého detektoru) a v relativně krátkém čase. Pro analýzu postačuje velmi malé množství vzorku a celou metodu lze velice snadno automatizovat za využití automatického dávkovače i pro velké série vzorků, což je velmi vhodné pro rutinní využití metody. Metoda je v čím dál větší míře začleňována do lékopisných článků, což umožňuje její další vývoj.

V rámci této disertační práce bylo vyvinuto několik metod pro analýzu topických léčivých přípravků. Použitím HPLC bylo možno v daných případech stanovovat jak obsah účinných látek a konzervancí, tak hladiny nečistot a degradačních produktů stanovovaných léčiv. To je velice důležité v rámci sledování stability léčiv a léčivých přípravků, kdy je možno odhadovat míru stability daného přípravku právě na základě obsahu degradačních produktů.

Samostatnou část práce tvoří validace analytických metod, což je proces velice důležitý při zavádění nové metodiky. Jsou zde srovnána kritéria několika institucí, které se validacemi analytických metod zabývají. Validace je podrobně popsána, včetně komentářů zmíněných autorit k jednotlivým validačním parametrům. V praktické části jsou potom všechny vyvinuté metody kompletně validovány a výsledky validací jsou doloženy.

Výhody kapalinové chromatografie jsou dále zvýrazněny zaváděním nových trendů ve vývoji této metody. Jedním z trendů jsou nové typy stacionárních fází, jako jsou například monolitické kolony, tzn. kolony

naplněné monolitickou modifikací silikagelu. Výhody a nevýhody této fáze jsou v práci v příloze VIII popsány a dokumentovány srovnáním analýz léčivých přípravků na kolonách běžných a molitických.

UPLC je dalším z nových typů kapalinové chromatografie. V rámci publikace v příloze IX byly opět srovnány analýzy několika přípravků a výhody této metodiky byly popsány a podrobně dokumentovány.

Výsledky této disertační práce ukazují na několika případech vývoj nových HPLC metod a jejich zavádění do rutinní analýzy. Nové metody jsou kompletně validovány a výsledky validace jsou přehledně zpracovány.

Validace jako nedílná součást vývoje analytických metod a hlavně jejich zavádění do rutinních procesů v rámci kontroly léčiv byla v této práci zpřehledněna, což umožňuje lepší orientaci v daném problému, definuje parametry, které je nutno v rámci validace proměřit a kriteria, která je nutno pro úspěšné zvalidování metody splnit.

## 9. SEZNAM LITERATURY

1. Klimeš a kol., Kontrola chemických léčiv I., Karolinum, 2002, Praha.
2. Klimeš a kol., Kontrola chemických léčiv II., Karolinum, 2004, Praha.
3. Lindsay S., High performance liquid chromatography, John Willy&Sons, 1992, New York.
4. Meyer V. R., Practical high-performance liquid chromatography. John Willy&Sons, 1996, New York.
5. Heftman E., Chromatography 6th edition, Journal of Chromatography library vol. 69 A, Elsevier 2004.
6. Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a. s., 2005, Chromatografické separační metody (2.2.46), 177.
7. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., Practical HPLC Metod Development, John Wiley & Sons, 1997, New York.
8. Kazakevich Y., McNair H., Liquid Chromatography Basic, [http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/) - 10/2005.
9. Nováková L., Matysová L., Solich P., Talanta 68(2006), 908-918.
10. Karlíček R. a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, 1998, Praha.
11. <http://www.zirchrom.com/default.asp> - 10/2005.
12. Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka., Tanaka N., J. Chromatogr. A 797 (1998) 121.
13. Kalina M., Chromolith – Nástup monolitických kolon, ChemInfo, Červen 2001, str.20-21.
14. European Pharmacopoeia 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2005.
15. Švec F., Chem. Listy, 98 (2004) 232.
16. <http://sweb.cz/HPLC/> - 01/2006.
17. Kuffner D., AMDS-Systém pro automatický vývoj HPLC metod, Waters, Seminář Vize 2002, 03. 12. 2002, Praha.
18. Application Examples with Rapid Resolution HT HPLC Columns, Agilent Technologies, 2003.
19. Joseph M., High-throughput HPLC with Short Columns and New Sub Two-Micron Particles, Agilent Technologies, Separation Times 16 (2003).

20. Barber W. E., Joseph M., Broske A. D., Increasing Sample Throughput Using Zorbax Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT columns, Agilent Technologies, 2003.
21. Acquity UPLC columns, 720001140EN, Waters Corporation, Milford, USA, 2005.
22. Barber W. E., Joseph M. J., Fast liquid Chromatography and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Antibiotics Using Rapid Resolution HT HPLC Columns with Sub Two-Micron (1.8  $\mu\text{m}$ ) Particles, Agilent Technologies, 2003.
23. Guo Y., Gaiki S., J. Chromatogr. A 1074 (2005) 71.
24. Wide Ch., Conze W., Mitoma Y., A new microbore column for the analysis of polar compounds by HILIC, P3:43, 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 26. – 30. červen, 2005, Stockholm, Švédsko.
25. Ultra Performance LCTM by Design, 720000880EN, Waters Corporation, Milford, USA, 2004.
26. Exner M., Hardware a software pro UPLC s UV/VIS detekcí, Vize 2005, Waters, 02. 11. 2004, Praha.
27. <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-68ZRPZ&WT.svl=1-07/2005>.
28. Agilent Zorbax Column Selection Guide for Analytical HPLC, Agilent Technologies, 2004.
29. Sadek P. C., The HPLC Solvent Guide, John Wiley and Sons, New York, 2002.
30. Gilar M., Van Deemterovy křivky a sorbent pro UPLC, Vize 2005, Waters, 02. 11. 2004, Praha.
31. Adamovics J. A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997.
32. <http://analyt.wz.cz/priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf> – 08/2006.
33. 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.
34. International Conference on Harmonization (ICH): Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, US FDA Federal Register, Vol. 62, May 1997, p. 27115.

35. International Conference on Harmonization (ICH): Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms, US FDA Federal Register, Vol. 62, May 1997, p. 25634.
36. REG 83 – Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, Věstník SÚKL 8/2005, 13.
37. International Conference on Harmonization (ICH): Q3A(R): Impurities in New Drug Substances, US FDA Federal Register, Vol. 68, February 2003, p. 6924.
38. International Conference on Harmonization (ICH): Q3B(R): Impurities in New Drug Products, US FDA Federal Register, Vol. 68, Novembre 2003, p. 64628.
39. International Conference on Harmonization (ICH): Q3C: Impurities: Guideline for Residual Solvents, US FDA Federal Register, Vol. 62, Decembre 1997, p. 67377.
40. International Conference on Harmonization (ICH): Q3C(M): Impurities: Guideline for Residual Solvents (Maintenance), US FDA Federal Register, Vol. 68, Novembre, 2003, p. 64352.
41. 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.
42. Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a. s., 2005, Kapalinová chromatografie (2.2.29), 161.
43. Šabartová J., Věstník SÚKL 1/1994, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv (1993), Validace Analytických Metod, 6.
44. International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA41> - 08/2006.
45. Reviewer guidance, Validation of Chromatographic methods, Centre of Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1994.
46. European Pharmacopoeia 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2005.
47. United States Pharmacopoeia 29, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2006.
48. Shabir G. A., J. Chromatogr. A 987 (2003) 57-66.
49. Holík M., Validace analytických metod, Postup při práci a příprava protokolu se zaměřením na HPLC a TLC, příručka.
50. <http://www.effichem.cz> – 08/2006.
51. <http://sweb.cz/HPLC/Suma/Validace> - 08/2006.
52. <http://cskb.cz/doporuceni/validace> - 12/2005.
53. <http://ecochem.cz/navrh.jsp?idSec=3-2-4> - 08/2006.

54. <http://europa.eu.int/eur-lex/cs/dd/docs/2002/32002D0657-CS.doc> - 12/2005.
55. <http://www.usp.org/aboutUSP/> - 08/2006.
56. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> - 08/2006.
57. [http://www.labcompliance.com/methods/meth\\_val.htm](http://www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm) - 08/2006.