

## 6. SHRNU TÍ

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 SÚKLu 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 i 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, β-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.