

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Monitorování nečistot v léčivých přípravcích

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové dne 1.5.2007

Pavλίna Ryšavá

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady při vypracování této práce a za zprostředkování interních materiálů Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Souhrn

Tato práce zpracovává téma *Monitorování nečistot v léčivých přípravcích* a blíže se zabývá nečistotami ve třech přípravcích. Přípravek Clotrimazol roztok se používá jako antimykotikum a stanovují se v něm nečistoty Imidazol a (2-Chlorfenyl)difenylmethanol. Přípravek Indometacin gel se používá jako antirevmatikum, antiflogistikum a analgetikum a stanovují se v něm nečistoty 4-Chlorbenzoová kyselina a 5-Methoxy-2-methylindol-3-octová kyselina. Přípravek Hydrocortison krém se používá jako antiflogistikum a antialergikum a stanovují se v něm nečistoty Hydrocortison a Cortison-acetát. Práce je rozdělena do osmi kapitol, hlavní část tvoří kapitoly 3-7. Třetí kapitola popisuje stanovení nečistot z pohledu Lékopisu. Ve čtvrté kapitole jsou uvedeny přijaté principy pro registrační dokumentace revidované směrnicemi International Conference on Harmonisation. Pátá kapitola se zabývá stabilitními zkouškami. V dalších dvou kapitolách je popsáno stanovení výše uvedených nečistot různými analytickými metodami, které jsou zhodnoceny a porovnány. Význam práce spočívá ve vytvořeném přehledu užívaných metod při stanovení nečistot.

Abstract

This thesis works up the topic *The Impurities Monitoring in the Pharmaceutical Formulations* and it deals with impurities in three formulations more closely. Clotrimazol solution is used as antifungal agent and the Imidazole and (2-Chlorophenyl)diphenylmethanol are determined in it. Indometacin gel is used as antirheumatic agent, anti-inflammatory agent and analgetic and the 4-Chlorobenzoic acid and 5-Methoxy-2-methylindol-3-acetic acid are determined in it. Hydrocortison cream is used as an anti-inflammatory agent and antiallergic agent and the Hydrocortisone and Cortisone acetate are determined in it. The thesis is divided into eight chapters; its main part consists of chapters 3-7. The third chapter describes the determination of impurities from the pharmacopoeia point of view. In the fourth chapter, there are specified the accepted principles for registration applications audited by the guideline International Conference on Harmonisation. The fifth chapter deals with the tests of stability. In the next two chapters, there is described the determination of the impurities by various analytical methods, which are evaluated and compared. The significance of this thesis lies in the summary of used methods in the determination of impurities.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	LÉKOPIS	3
3.1	EVROPSKÝ LÉKOPIS	3
3.2	ČESKÝ LÉKOPIS 2005	3
4	ICH	6
4.1	NEČISTOTY V NOVÝCH LÉČIVÝCH LÁTKÁCH	7
4.1.1	<i>Posuzování nečistot</i>	7
4.1.2	<i>Klasifikace nečistot</i>	7
4.1.3	<i>Základ pro uvádění a kontrolu nečistot</i>	8
4.1.4	<i>Analytické postupy</i>	9
4.1.5	<i>Specifikace</i>	9
4.2	NEČISTOTY V NOVÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH	10
4.2.1	<i>Rozsah směrnice</i>	10
4.2.2	<i>Základ pro uvádění a kontrolu degradačních produktů</i>	10
4.2.3	<i>Analytické postupy</i>	11
4.2.4	<i>Specifikace</i>	11
5	STABILITA LÉČIVÉ LÁTKY A KONEČNÉHO PŘÍPRAVKU	13
5.1	LÉČIVÁ LÁTKA	13
5.1.1	<i>Specifikace</i>	14
5.1.2	<i>Zátěžové (stresové) zkoušky</i>	14
5.2	KONEČNÝ PŘÍPRAVEK	15
5.2.1	<i>Specifikace</i>	15
5.3	PROTOKOL O STABILITĚ	16
6	STANOVENÍ NEČISTOT V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH	17
6.1	CLOTRIMAZOLUM	17
6.1.1	<i>Účinná látka</i>	17
6.1.2	<i>Stanovení nečistot v přípravku CANESTEN roztok</i>	18
6.1.3	<i>Stanovení nečistot v přípravku CLOTRIMAZOL krém</i>	19
6.2	INDOMETACINUM	20
6.2.1	<i>Účinná látka</i>	20
6.2.2	<i>Stanovení nečistot v přípravku INDOMETACIN gel</i>	21
6.3	HYDROCORTISONI ACETAS	23
6.3.1	<i>Účinná látka</i>	23
6.3.2	<i>Stanovení nečistot v přípravku HYDROKORTISON krém</i>	24
7	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD PRO HODNOCENÍ NEČISTOT V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH	25
7.1	PŘÍPRAVEK CLOTRIMAZOL HBF SPRAY 1%	25
7.1.1	<i>Analytický postup</i>	25
7.1.2	<i>Test vhodnosti chromatografického systému</i>	25
7.1.3	<i>Validace analytické metody</i>	26
7.1.4	<i>Závěr</i>	28

7.2	PŘÍPRAVEK INDOMETACIN HBF GEL 1%	29
7.2.1	<i>Analytický postup</i>	29
7.2.2	<i>Test vhodnosti chromatografického systému</i>	29
7.2.3	<i>Validace analytické metody</i>	30
7.2.4	<i>Závěr</i>	32
7.3	PŘÍPRAVEK HYDROKORTISON HBF KRÉM 1%	33
7.3.1	<i>Analytický postup</i>	33
7.3.2	<i>Test vhodnosti chromatografického systému</i>	33
7.3.3	<i>Validace analytické metody</i>	34
7.3.4	<i>Závěr</i>	35
8	ZÁVĚR	36

SEZNAM LITERATURY

SEZNAM ZKRATEK

1 Úvod

V posledních letech je kladen stále větší důraz na kontrolu nečistot v léčivých přípravcích. Evropský lékopis vydává společné normy, které zajišťují bezpečné užívání léčiv nemocnými a spotřebiteli, a které usnadňují volný pohyb léčivých přípravků v Evropě.

Při monitorování nečistot je třeba dodržovat přijaté principy revidované směrnicemi International Conference on Harmonisation v nových, ale i v již existujících člancích Evropského lékopisu. ICH zavedly obecné harmonizované metody, jejichž specifikace musí vyhovovat jak v případě výrobků už na trh uvedených, tak v případě nových výrobků předložených k registračnímu procesu.

Léčivý přípravek musí splňovat požadavky lékopisu po celou dobu své použitelnosti, která je stanovena na základě výsledků stabilitních studií. Součástí stabilitních zkoušek jsou zátěžové zkoušky, které mohou pomoci identifikovat pravděpodobné rozkladné produkty, což může následně pomoci stanovit mechanismus degradace a vnitřní stabilitu molekuly. Sledování rozkladných produktů je také užitečné pro vývoj a validaci vhodných analytických metod.

Stanovení nečistot v léčivých přípravcích se často provádí chromatografickými metodami.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo monitorování nečistot Imidazolu a (2-Chlor-fenyl)difenylmethanolu v léčivém přípravku Clotrimazol roztok; nečistot Kyseliny 4-chlorbenzoové a 5-methoxy-2-methylindol-3-octové v přípravku Indometacin gel a nečistot Hydrocortisonu a Cortison-acetátu v přípravku Hydrocortison krém.

3 Lékopis¹

3.1 Evropský lékopis

Cílem Evropského lékopisu je podpora veřejného zdraví tím, že zabezpečí vznik uznávaných společných norem, které budou používat zdravotničtí odborníci a jiní pracovníci zabývající se jakostí léčiv. Takové normy mají mít vhodnou kvalitu jako základ bezpečného užívání léčiv nemocnými a spotřebiteli. Existence těchto norem usnadňuje volný pohyb léčivých přípravků v Evropě a zajišťuje jakost léčivých přípravků dovážených z Evropy.

Evropské lékopisné články vypracovávají skupiny expertů a pracovní skupiny, které spolupracují s národními lékopisnými autoritami, oprávněnými autoritami pro registraci léčiv, národními kontrolními laboratořemi a laboratoří Evropského lékopisu; spolupracují s nimi rovněž výrobci těchto látek a/nebo farmaceutičtí výrobci, kteří tyto látky používají.

Lékopis tedy zajišťuje přípravu kvalitních léčivých přípravků, jehož nezbytnou součástí je dostatečná kontrola nečistot. Základní pokyny pro sledování profilu nečistot v léčivých přípravcích v České republice jsou uvedeny v **Českém lékopise 2005** (ČL 2005).

3.2 Český lékopis 2005

Na základě přehodnocení postupu kontroly nečistot byla, za významné pomoci předsedů chemických skupin a po konzultaci s odborníky z těchto skupin, do pátého vydání zahrnuta nová stať *Kontrola nečistot v látkách pro farmaceutické použití*. Požadavky týkající se nečistot se uvádějí v konkrétních člancích a v obecném článku *Corpora ad usum pharmaceuticum* (Látky pro farmaceutické použití), které se navzájem doplňují. Konkrétní články předepisují přijatá kritéria pro nečistoty, zatímco obecný článek rozebírá potřebu kvalifikace, identifikace a uvádění organických nečistot, které se vyskytují v léčivých látkách. Kontrola nečistot se provádí chromatografickými separačními metodami. V současné době je zkouška na čistotu limitní zkouškou (porovnání ploch píků). V článku, ve kterém se uvádí individuální limit pro nečistotu, je často potřeba určit způsob identifikace, např. za použití referenční látky, typického chromatogramu nebo relativní retence. Uživatel látky může považovat za potřebné identifikovat jiné nečistoty než ty, pro které článek uvádí způsob identifikace, např. ověřit vhodnost specifikace pro

¹ V kapitole 3 byl použit zdroj [1]

daný profil nečistot porovnáním s profilem v odstavci *Nečistoty*. Uživatel pro tuto identifikaci musí použít vhodné vědecké metody.

Seznam všech známých a možných nečistot, které mají být kontrolovány zkouškami uvedenými v určitém článku, vychází z informací dostupných v době vypracování nebo revize článku a tyto informace nemusí být vyčerpávající. Seznam může být rozdělen na dvě části:

- **Specifikované nečistoty** jsou nečistoty, které se v článku uvádí jednotlivě a jsou limitovány specifickým přijatým kritériem. Specifikovaná nečistota může být identifikovaná nebo neidentifikovaná.
- **Jiné detegovatelné nečistoty** jsou potenciální nečistoty s definovanou strukturou, které jsou detegovatelné zkouškami uvedenými v článku, ale není známo, že by byly normálně přítomny v množství nad mezní hodnotou pro identifikaci v látkách použitých v léčivých přípravcích registrovaných kompetentními autoritami členských států *Úmluvy o vypracování Evropského lékopisu*. Jsou to nespecifikované nečistoty limitované podle obecně přijatého kritéria.

Jestliže látka obsahuje jiné nečistoty než ty, které jsou uvedeny v odstavci *Nečistoty*, musí se ověřit, že jsou tyto nečistoty detegovatelné metodou popsanou v článku, jinak se musí vyvinout nová metoda a požádat o revizi článku. V závislosti na zjištěném obsahu a navrhovaných limitech se musí zvážit identifikace a/nebo kvalifikace těchto nečistot.

Organické nečistoty přítomné v léčivých látkách v množství nad 0,1% se musí kvalifikovat a kdekoliv je to možné identifikovat; pokud denní dávka léčivé látky je vyšší než 2g, je spodní hranice pro hodnocení nečistoty snížena na 0,05%. Toxické nebo farmakologicky aktivní nečistoty přítomné v množství pod 0,1% se kontrolují zvláštní zkouškou. Nečistoty, které nejsou kvalifikované, nesmí být přítomny v množství nad 0,1%.

Zkouška na příbuzné látky: Vedlejší skvrna (skvrny) na chromatogramu zkoušeného roztoku se vizuálně porovnává (porovnávají) s odpovídající(mi) skvrnou (skvrnami) na chromatogramu porovnávacího roztoku obsahujícího nečistotu (nečistoty) nebo se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku připraveného ředěním zkoušeného roztoku. Jestliže je ve zkoušce předepsáno sečítání nečistot nebo stanovení obsahu některé nečistoty, je důležité zvolit vhodné nastavení prahové hodnoty a vhodné podmínky pro integraci ploch píků. U takovýchto zkoušek je limit pro zanedbatelnost píků obecně 0,05%. Nastavení prahové hodnoty systému pro sběr dat odpovídá nejméně polovině

tohoto limitu. Plochy píků nečistot, které nejsou úplně odděleny od hlavního píku, jsou přednostně integrovány za použité extrapolace sedlo-sedlo (tangenciální oddělení minoritního píku). Píky rozpouštědla nebo rozpouštědel použitých pro rozpuštění vzorku se rovněž zanedbávají.

Požadavky na **zbytková rozpouštědla** jsou uvedeny v článku *Corpora ad usum pharmaceuticum* spolu s obecnými statěmi *Totožnost a kontrola zbytkových rozpouštědel a Zbytková rozpouštědla*. Všechny léčivé a pomocné látky jsou předmětem důležité zkoušky na zbytková rozpouštědla, dokonce i když v jednotlivém článku není uvedena žádná specifická zkouška. Tyto požadavky jsou uvedeny v ICH směrnici *Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R3)*.

Léčivý přípravek musí vyhovovat požadavkům lékopisu po celou dobu své použitelnosti, kterou schvaluje oprávněná autorita na základě výsledků stabilitních studií. Cílem stabilitních zkoušek je prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů prostředí a doporučit podmínky skladování. Oprávněná autorita může předepsat zvláštní podmínky, které se musí dodržovat, aby se zabránilo znečištění přípravků a pokud možno i jejich znehodnocení.

Na konci velkého počtu článků je seznam známých nebo možných nečistot, které lze prokazatelně kontrolovat zkouškami na čistotu. Známé nečistoty, včetně též „dosavadních nečistot“, jsou nečistoty nalezené v řadě šarží určité látky. Možné nečistoty jsou takové nečistoty, u nichž by se mohlo na základě znalosti výrobního procesu očekávat, že budou nalezeny, avšak jejich přítomnost v šaržích nebyla při vypracování lékopisného článku prokazatelně zjištěna. Tento seznam nečistot je určen k tomu, aby usnadnil použití článku zejména během řízení, na jehož základě se uděluje povolení k tomu, aby dané léčivo mohlo být uvedeno na trh s léčivy, viz publikace ICH, *Impurities in new drug substances*. Řada možných nečistot nějaké látky získané daným výrobním postupem může být porovnána se seznamem nečistot ke zjištění, zda lékopisný článek umožňuje dostatečnou kontrolu. Záměrem *Lékopisné komise* je zahrnout takové seznamy do nových článků a připojit je k již existujícím článkům při jejich revizi.

4 ICH²

Evropská lékopisná komise rozhodla na zasedání v březnu 2002 o používání přijatých principů a termínů revidovaných směrnice ICH v nových, ale i v již existujících člancích Evropského lékopisu tam, kde je to možné. Zavedly se tak obecné harmonizované metody, jejichž specifikace musí vyhovovat, jak v případě výrobků už na trh uvedených, tak v případě nových výrobků předložených k registračnímu procesu.

ICH definuje následující pojmy:

- **nečistota** – jakákoliv složka nové léčivé látky, která není chemicky ucelená jednotka (entita) definovaná jako nová léčivá látka
– jakákoliv složka nového léčivého přípravku, která není léčivá látka nebo pomocná látka v léčivém přípravku
- **profil nečistot** – popis identifikovaných a neidentifikovaných nečistot přítomných v nové léčivé látce/v novém léčivém přípravku
- **potenciální nečistoty** – nečistoty, které teoreticky mohou vznikat během výroby nebo uchovávání
- **identifikované nečistoty** – nečistoty, ve kterých byly dokázány strukturální vlastnosti
- **neidentifikované nečistoty** – nečistoty, ve kterých nebyly dokázány strukturální vlastnosti, a které jsou definovány pouze kvalitativními analytickými vlastnostmi (př. chromatografický retenční čas)
- **specifikované nečistoty** – nečistoty, které jsou jednotlivě vyjmenovány a limitovány specifickým akceptačním kritériem
- **nespecifikované nečistoty** – nečistoty, které jsou limitovány obecným akceptačním kritériem
- **degradační (rozkladné) produkty** – nečistoty pocházející z chemické změny v léčivé látce během výroby a/nebo vznikající během uchovávání nového léčivého produktu vlivem např. světla, teploty, pH, vlhkostí nebo reakcí s pomocnou látkou a/nebo s obalovým materiálem
- **identifikační práh** – limit, nad kterým by nečistoty měly být identifikovány
- **kvalifikační práh** – limit, nad kterým by nečistoty měly být kvalifikovány
- **kvalifikace** – proces získávání a hodnocení dat, který určuje biologickou bezpečnost jednotlivých nečistot nebo dává profil nečistot na specifikovaných hladinách

² V kapitole 4 byly použity zdroje [2], [3], [4], [5]

- **zbytková rozpouštědla** – organické těkavé látky, které se používají nebo vznikají při výrobě léčivých látek, pomocných látek nebo léčivých přípravků
- **PDE** – povolená denní dávka – nejvyšší přijatelný denní příjem zbytkových rozpouštědel v léčivých přípravcích

4.1 Nečistoty v nových léčivých látkách

Tato směrnice je určena k poskytnutí výchozích podkladů pro registrační dokumentace na obsah a kvalifikaci nečistot v nových léčivých látkách, které nebyly předtím registrované v regionu nebo členském státu. V tomto pokynu nejsou obsaženy biologické/biotechnologické léčivé substance, peptidy, oligonukleotidy, radiofarmaka, kvasné produkty a polosyntetické produkty z nich odvozené, rostlinné produkty a surové produkty zvířecího nebo rostlinného původu.

4.1.1 Posuzování nečistot

Nečistoty v nových léčivých látkách jsou určeny ze dvou pohledů:

- **chemické aspekty** zahrnují klasifikaci a identifikaci nečistot, záznam výroby, seznam nečistot ve specifikacích a stručnou diskusi z analytických postupů
- **bezpečnostní aspekty** zahrnují specifický dohled na kvalifikaci těch nečistot, které nebyly přítomny nebo byly přítomny v podstatně nižších hladinách

4.1.2 Klasifikace nečistot

Nečistoty mohou být klasifikovány do následujících kategorií:

- **Organické nečistoty** mohou vznikat během výrobních procesů a/nebo uchovávání nové léčivé látky. Mohou být identifikované nebo neidentifikované, těkavé nebo netěkavé a zahrnují: výchozí materiály, vedlejší produkty, meziproducty, degradační (rozkladné) produkty, činidla, ligandy a katalyzátory.
- **Anorganické nečistoty** vznikají během výrobních procesů. Jsou převážně známé a identifikované a zahrnují: činidla, ligandy, katalyzátory, těžké kovy, anorganické soli a ostatní materiály (např. filtry nebo aktivní uhlí).
- **Zbytková rozpouštědla** jsou definována jako organické těkavé látky, které se používají nebo vznikají při výrobě léčivých látek, pomocných látek nebo léčivých přípravků.

4.1.3 Základ pro uvádění a kontrolu nečistot

Organické nečistoty: Žadatel by měl shrnout všechny aktuální a potenciální nečistoty pravděpodobně vzniklé během syntéz, čištění a skladování nové léčivé látky, a možné degradační produkty. Dále by měl shrnout laboratorní studie, které vedly k detekci nečistot, jak u komerčně vyrobené šarže, tak během zátěžových stabilitních zkoušek, které se většinou používají k identifikaci potenciálních nečistot vznikajících při uchovávání látky. Tyto studie vedou k charakterizaci struktury aktuálních nečistot přítomných v nové léčivé látce v hladině větší než je identifikační práh a dále také degradační produkty a nečistoty vyrobené komerčními postupy v hladině větší než je identifikační práh. V této studii by měly být uvedeny i pokusy, které nevedou k identifikaci (nečistoty nejsou v hladině větší než identifikační práh).

Anorganické nečistoty jsou převážně známé a kvantifikované pomocí lékopisných nebo jiných vhodných postupů. Přestup katalyzátoru do nové léčivé látky by měl být hodnocen během vývoje. Akceptační kritéria by měla být založena na lékopisných standardech nebo známých bezpečnostních datech.

Zbytková rozpouštědla popisuje ICH s cílem doporučit pro pacientovu bezpečnost přípustné množství zbytkových rozpouštědel v léčivech. Tato směrnice zároveň doporučuje užívání méně toxických rozpouštědel. Rozpouštědla nejsou běžnými výrobními pochody zcela odstranitelná. Vhodný výběr rozpouštědla pro syntézu léčivé látky může zvýšit výtěžek nebo ovlivnit vlastnosti, jako je krystalická forma látky, čistota a rozpustnost. Protože zbytková rozpouštědla nejsou užitečná z terapeutického hlediska, měla by být všechna odstraněna v možném rozsahu tak, aby se vyhovělo specifikaci přípravku, GMP nebo ostatním požadavkům na jakost. Léčivé přípravky by neměly obsahovat větší koncentrace zbytkových rozpouštědel, než jaké mohou být doloženy údaji o bezpečnosti.

Tato směrnice klasifikovala zbytková rozpouštědla do třech tříd:

- **rozpouštědla třídy 1:** Rozpouštědla, kterých je lépe se vyvarovat, tj. známé lidské karcinogeny, silně podezřelé lidské karcinogeny a látky nebezpečné pro životní prostředí.
- **rozpouštědla třídy 2:** Rozpouštědla s omezeným použitím, tj. negenetoxické zvířecí karcinogeny nebo možná příčinná agens jiné ireverzibilní toxicity, jako je neurotoxicita nebo teratogenicita; rozpouštědla podezřelá z jiných významných, ale reverzibilních toxicit.

- **rozpouštědla třídy 3:** Rozpouštědla s nízkým toxickým potenciálem (není třeba žádný expoziční limit s ohledem na zdraví). Tato třída nezahrnuje rozpouštědla známá jako ohrožující lidské zdraví v koncentracích běžně přijatých v lékopisech. Avšak pro mnohá tato rozpouštědla nejsou k dispozici dlouhodobé studie toxicity nebo karcinogenity. Dostupné údaje naznačují, že jsou méně toxická v akutních nebo krátkodobých studiích a nemají genotoxické účinky. Uvažuje se, že množství těchto zbytkových rozpouštědel 50mg/den nebo méně by mohlo být přijatelné bez upřesňování. Vyšší množství mohou být také přijatelná, odpovídají-li možnostem výroby a požadavkům GMP.

4.1.4 Analytické postupy

Registrační žádosti by měly zahrnovat dokumentaci o tom, že analytické postupy byly validovány a že jsou vhodné pro detekci a kvantifikaci nečistot.

Zbytková rozpouštědla se obvykle stanoví za použití chromatografických metod, jako je plynová chromatografie. Je-li to možné, měly by se použít jakékoliv harmonizované postupy pro stanovení hladin zbytkových rozpouštědel, jak jsou popsány v lékopisech. Jinak si výrobci mohou pro jednotlivá stanovení vybrat nejvhodnější validované analytické postupy. Jsou-li přítomna pouze rozpouštědla třídy 3, mohou se použít nespecifické metody, jako je ztráta sušením.

4.1.5 Specifikace

Specifikace je definována jako seznam testů s odkazy na analytické metody a také s uvedenými akceptačními kritérii pro jednotlivé zkoušky, případně rozmezími přijatelnosti nebo dalšími kritérii pro popsané zkoušky. Jde tedy o ustanovení souboru kritérií, které nová léčivá látka nebo nový léčivý přípravek musí splňovat, aby mohly být považovány za přijatelné pro zamýšlené užití. Specifikace je rozhodující standard kvality, který je navrhován a posuzován výrobcem a následně schválen příslušnými autoritami ICH.

Specifikace pro nové léčivé látky by měla zahrnovat seznam nečistot. Pro předpoklad nečistot pravděpodobně se vyskytujících 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. Pro nečistoty, které vykazují toxický nebo nečekaný farmakologický efekt, by měl být stanoven limit kvantifikace a detekce až na minimální hladiny látky,

které je třeba kontrolovat. Měla by být uvedena akceptační kritéria pro neidentifikované nečistoty a pro celkovou sumu nečistot.

Specifikace nové léčivé látky by měly zahrnovat:

- organické nečistoty
 - každou specifikovanou známou nečistotu
 - každou specifikovanou neznámou nečistotu
 - jakoukoli nespecifikovanou nečistotu s akceptačním kritériem ne větším než identifikační práh
 - celkovou sumu nečistot
- anorganické nečistoty
- zbytková rozpouštědla

4.2 Nečistoty v nových léčivých přípravcích

Tato směrnice poskytuje výchozí podklady pro registrační dokumentace na obsah a kvalifikaci nečistot v nových léčivých přípravcích, vyrobených chemickou syntézou z nových, dosud neregistrovaných léčivých látek.

4.2.1 Rozsah směrnice

Tento pokyn je určen pouze pro ty nečistoty v nových léčivých přípravcích, které jsou klasifikovány jako degradační produkty léčivé látky nebo reakčními produkty léčivé látky s pomocnou látkou a/nebo s obalovým materiálem. Obecně platí, že nečistoty přítomné v nové léčivé látce nemusí být monitorovány nebo specifikovány v novém léčivém přípravku, jestliže nejsou také degradačními produkty.

4.2.2 Základ pro uvádění a kontrolu degradačních produktů

Žadatel by měl shrnout degradační produkty pozorované během výroby a/nebo stabilitní studie nového léčivého přípravku. Dále by měl shrnout laboratorní studie, které vedly k detekci degradačních produktů v novém léčivém přípravku. Degradační produkty pozorované při stabilitních studiích prováděných za doporučených skladovacích podmínek by měly být identifikovány, jestliže jsou přítomny v hladině větší než identifikační práh. Do registrační žádosti by měly být zahrnuty i laboratorní studie, které nejsou úspěšné při identifikaci degradačních produktů. Degradační produkty přítomné v hladině nižší než je identifikační prahová hodnota nemusí být identifikovány.

4.2.3 Analytické postupy

Registrační žádost by měla obsahovat dokument o tom, že analytické postupy byly validovány a že jsou vhodné pro detekci a kvantifikaci degradačních produktů. Hladiny degradačních produktů by měly být měřeny různými metodami, včetně těch, které porovnávají analytické odpovědi degradačních produktů k vhodným referenčním standardům nebo odpovědi vlastní léčivé látky. Referenční standardy použité pro kontrolu degradačních produktů by měly být ohodnoceny a charakterizovány podle jejich zamýšleného užití.

Analytické výsledky by měly být dostupné v registrační žádosti pro všechny významné šarže nového léčivého přípravku užívaného pro klinické, bezpečnostní a stabilitní testy a zároveň pro zamýšlené komerční procesy. Obvykle jsou uvedeny hodnoty pro jednotlivé nečistoty a zároveň i celková suma nečistot.

Pro každou šarži nového léčivého přípravku by mělo být v registrační dokumentaci uvedeno: popis, síla a velikost šarže, datum a místo výroby, obalový materiál, výrobní postupy, obsah jednotlivých degradačních produktů i celkové sumy, použití šarže, referenční analytické postupy, číslo šarže léčivé látky použité v léčivém přípravku a skladovací podmínky pro stabilitní studie.

4.2.4 Specifikace

Specifikace pro nové léčivé přípravky by měla zahrnovat seznam degradačních produktů, jejichž vznik je očekáván během výroby komerčních přípravků a za doporučených skladovacích podmínek. Zahrnutí nebo vyloučení degradačních produktů ze specifikace by mělo být v dokumentaci odůvodněno.

Akceptační kritérium pro daný degradační produkt by mělo být stanoveno s ohledem na akceptační kritéria, 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. Akceptační kritérium by nemělo být nastaveno výše, než je kvalifikovaná hladina degradačního produktu.

Specifikace nového léčivého přípravku by měly zahrnovat:

- každý specifikovaný známý degradační produkt
- každý specifikovaný neznámý degradační produkt
- jakýkoliv nespecifikovaný degradační produkt s akceptačním kritériem ne větším než identifikační práh
- celkovou sumu degradačních produktů

V následujících tabulkách jsou uvedeny limity pro degradační produkty v novém léčivém přípravku

<u>maximální denní dávka</u>	<u>limit</u>
≤ 1g	0,1%
> 1g	0,05%

tabulka 1 – Limity uvádění

<u>maximální denní dávka</u>	<u>limit</u>
< 1mg	1,0% nebo 5μg TDI, ten který je nižší
1mg – 10mg	0,5% nebo 20μg TDI, ten který je nižší
> 10mg – 2g	0,2% nebo 2mg TDI, ten který je nižší
> 2g	0,10%

tabulka 2 – Limity identifikace

<u>maximální denní dávka</u>	<u>limit</u>
< 10mg	1,0% nebo 50μg TDI, ten který je nižší
10mg – 100mg	0,5% nebo 200μg TDI, ten který je nižší
> 100mg – 2g	0,2% nebo 3mg TDI, ten který je nižší
> 2g	0,15%

tabulka 3 – Limity kvalifikace

- maximální denní dávka – množství látky přijaté za den
- Limity jsou vyjádřeny buď jako procentuální obsah v léčivé látce nebo jako TDI – celkový denní příjem degradačních produktů. Nižší limity mohou být vhodné, jestliže degradační produkt je neobyčejně toxický.

5 Stabilita léčivé látky a konečného přípravku³

Nezbytnou součástí kontroly nečistot jsou stabilitní zkoušky, jejichž cílem je prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů prostředí jako je teplota, vlhkost a světlo, doporučit podmínky uchovávání a stanovit dobu reatestace pro léčivou látku („re-test period“) a dobu použitelnosti pro konečný přípravek („shelf-life“).

Požadavky na informace o stabilitě **známé** léčivé látky a konečného přípravku, které jsou součástí registrační dokumentace, jsou uvedeny v pokynu *REG-83*. Znamou léčivou látkou se rozumí taková léčivá látka, která je obsažena v některém léčivém přípravku registrovaném v rámci Evropského společenství. Požadavky týkající se **nových** léčivých látek uvádí pokyn *Note for Guidance on Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Novou léčivou látkou se rozumí taková léčivá látka, která není obsažena v žádném léčivém přípravku, registrovaném v rámci Evropského společenství. Za novou léčivou látku se pro účely tohoto pokynu považuje i nová sůl známé léčivé látky, její ester nebo derivát s jinou než kovalentní vazbou.

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.

5.1 Léčivá látka

Informace o stabilitě léčivé látky jsou nedílnou součástí systematického přístupu k hodnocení stability.

- Pro léčivé látky nepopsané v monografii uznávaného lékopisu (Evropský lékopis nebo lékopisy členských států EU) jsou požadovány stabilitní zkoušky.
- Pro léčivé látky popsané v monografii uznávaného lékopisu, která obsahuje vhodné limity pro zkoušku na rozkladné produkty, ale v níž není definována doba reatestace, mohou být použity dva postupy:
 1. Žadatel deklaruje, že léčivá látka vyhovuje příslušné lékopisné monografii při zkoušení bezprostředně před výrobou konečného přípravku. V tom případě se nepožadují žádné stabilitní zkoušky s podmínkou, že byla prokázána vhodnost lékopisné monografie pro léčivou látku konkrétního výrobce.

³ V kapitole 5 byl použit zdroj [6]

2. Žadatel stanoví dobu reatestace na základě výsledků dlouhodobé stabilitní studie.

5.1.1 Specifikace

Ve stabilitní studii se sledují všechny parametry léčivé látky, které se mohou během skladování měnit, a které by mohly mít vliv na jakost, bezpečnost a/nebo účinnost. Stabilitní studie má hodnotit fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické vlastnosti léčivé látky. Zkoušky musí být provedeny za použití validovaných a stabilitu indukujících kontrolních metod. U zkoušek se uvedou číselné limity, rozmezí, příp. další kritéria popsaných zkoušek, včetně horních limitů pro obsah jednotlivých nečistot a rozkladných produktů i pro jejich celkový obsah. Zdůvodnění těchto limitů má být založeno na požadavcích bezpečnosti a/nebo účinnosti. Pro léčivé látky popsané v monografii uznávaného lékopisu mají být zkoušky provedeny v souladu s touto monografií nebo za použití metody, která byla validována oproti metodě lékopisné („cross-validation“). Rovněž je třeba doložit, že všechny potenciální nečistoty (rozkladné produkty i nečistoty pocházející ze syntézy nebo výrobního postupu) jsou dostatečně kontrolovány.

5.1.2 Zátěžové (stresové) zkoušky

Tyto zkoušky 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 indukující. Sledování rozkladných produktů během zátěžových zkoušek je také užitečné 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.

Zkoušky je možné provádět s jednou šarží léčivé látky a mají zahrnovat vliv teploty (přírůstky po 10°C), vliv vlhkosti, 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 i zkoušky fotostability.

- Pro léčivé látky popsané v monografii uznávaného lékopisu, které zcela splňují její požadavky, nejsou požadovány žádné údaje o rozkladných produktech, pokud jsou uvedeny v odstavci *Zkoušky na čistotu* a/nebo v odstavci *Nečistoty* příslušné monografie.

- Pro léčivou látku nepopsanou v monografii uznávaného lékopisu mohou být použity dva postupy:
 1. Předpokládaný mechanismus degradace může být doložen údaji publikovanými ve vědecké literatuře.
 2. Jestliže ve vědecké literatuře, včetně oficiálních lékopisů, nejsou dostupné žádné údaje, je třeba provést zátěžové zkoušky. Výsledky těchto zkoušek budou tvořit nedílnou součást informací, poskytnutých *Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv*.

Dále jsou v pokynu uvedeny postupy pro výběr šarží, volba obalu a uzávěru, četnost zkoušení (dlouhodobé stabilitní zkoušky: na počátku studie, každé 3 měsíce během prvního roku, každých 6 měsíců během druhého roku a dále jednou ročně až do navrhované doby reatestace; zrychlené stabilitní studie: v minimálně třech časových bodech – 0, 3 a 6 měsíců), podmínky uchovávání (léčivá látka má být hodnocena za takových podmínek uchovávání, které ověří její tepelnou stabilitu, a je-li to vhodné její citlivost na vlhkost), závazek ke sledování stability pro poregistrační období a vyhodnocení stabilitní studie.

5.2 Konečný přípravek

Stabilitní studie konečného přípravku mají vycházet ze znalostí chování a vlastností léčivé látky a lékové formy.

5.2.1 Specifikace

Specifikace, které má přípravek vyhovovat po celou navrhovanou dobu použitelnosti („shelf-life“ specifikace) má brát v úvahu již dostupné informace o stabilitě. Případné odchylky „shelf-life“ specifikace od specifikace platné při propouštění z výroby („release“ specifikace) mají být zdůvodněny vyhodnocením stability a změn pozorovaných během skladování. Jakýkoli rozdíl v limitech pro obsah konzervačních látek mezi „release“ a „shelf-life“ specifikací má být podložen validovanou korelací mezi chemickým stanovením obsahu této látky a zkouškou na protimikrobní účinnost. Tuto zkoušku je tedy nutno provést s přípravkem, v němž bude obsah konzervační látky odpovídat dolnímu limitu shelf-life specifikace. Zkouška má být provedena během farmaceutického vývoje přípravku s jeho konečným složením (kromě koncentrace konzervační látky). U jedné primární stabilitní šarže konečného přípravku má být pro kontrolu provedena na konci

doby použitelnosti zkouška na protimikrobní účinnost konzervační látky (kromě stanovení obsahu této látky), a to i v případě, kdy není žádný rozdíl v limitech pro obsah konzervační látky mezi „release“ a „shelf-life“ specifikací.

5.3 Protokol o stabilitě

Jako doklad o provedených stabilitních zkouškách je součástí registrační dokumentace protokol o stabilitě, který obsahuje:

- název přípravku, výrobce
- sílu a lékovou formu
- 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. Výsledky zkoušek mají být shrnuty přehledně do tabulek pro každou šarži a mají v nich být uvedeny počáteční hodnoty, výsledky získané během stabilitních zkoušek v předepsaných intervalech a limity jednotlivých zkoušek. V závěru mají být výsledky vyhodnoceny, komentovány a na jejich základě určeny podmínky pro uchovávání, druh vnitřního obalu a doba použitelnosti.

6 Stanovení nečistot v léčivých přípravcích

6.1 Clotrimazol⁴

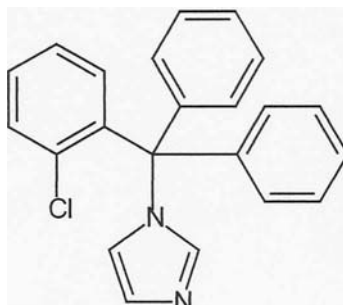
6.1.1 Účinná látka

○ **Název**^[1]

- Latinský název ČL 2005: **Clotrimazolium**
- Anglický název Ph.Eur.4: **Clotrimazole**
- Český název ČL 2005: **Klotrimazol**

○ **Vzorec a molekulová hmotnost**^[1]

- Sumární vzorec: $C_{22}H_{17}ClN_2$
- Strukturní vzorec:



- Molekulová hmotnost: $M_r = 344,84$

○ **Charakteristika**^[1]

Je to 1-[(2-Chlorfenyl)difenylmethyl]-1H-imidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5% až 100,5% sloučeniny $C_{22}H_{17}ClN_2$.

○ **Vlastnosti**^[1]

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96% a v dichlormethanu.

○ **Farmakodynamické vlastnosti**^[7]

Klotrimazol je imidazolový derivát se smrtícím účinkem na nižší houby určený k místnímu použití. Způsobuje inhibici syntézy ergosterolu, která vede ke strukturálnímu a funkčnímu poškození cytoplazmatické membrány. Působí na patogenní a podmíněně patogenní houby rodu *Candida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Nocardia* a některé další mikromycety.

⁴ V kapitole 6.1 byly použity zdroje [1], [7], [8], [9], [10]

- ***Farmakokinetické vlastnosti***^[8]

Po aplikaci na kůži se vstřebává méně než 2% podané dávky. Vrchol plazmatické koncentrace je menší než 10 ng/ml a nevyvolává žádné systémové ani jiné změny. Biologický poločas Klotrimazolu v 1% koncentraci je ve všech vrstvách kůže 25 – 27 hodin.

- ***Lékopisné zkoušky na čistotu***^[1]

Dle ČL 2005 se stanovení nečistot Imidazol a (2-Chlorfenyl)difenylmethanol provádí tenkovrstvou chromatografií za použití vrstvy silikagelu. Pro stanovení Imidazolu se používá silikagel G R a pro stanovení (2-Chlorfenyl)difenylmethanolu silikagel GF₂₅₄R.

6.1.2 Stanovení nečistot v přípravku CANESTEN roztok

- ***Lékopisná definice roztoku***^[1]

Jsou to tekuté přípravky různé viskozity určené k místnímu účinku nebo transdermálnímu přenosu léčivých látek.

- ***Stanovení pomocí HPLC***^[9]

Pro stanovení Klotrimazolu ve farmaceutickém přípravku byla vyvinuta HPLC metoda. Klotrimazol je stabilní v alkalickém prostředí, v kyselém prostředí hydrolyzuje na degradační produkty Imidazol a (2-Chlorfenyl)difenylmethanol. Tato metoda byla úspěšně použita jako stabilitu indukující metoda pro stanovení Klotrimazolu v přítomnosti kyselých degradačních produktů. Byla použita chromatografie na obrácených fázích a mobilní fáze o složení acetonitril + 25mM trishydroxymethylaminomethan ve fosfátovém pufru (pH = 7) v poměru 55:45 (v/v) s UV detekcí při 260 nm. Jako vnitřní standard byl použit Ketoconazol. Chromatografický systém umožňuje dokonalou separaci; retenční čas pro Klotrimazol je 9,2 min., pro (2-Chlorfenyl)difenylmethanol 3,4 min. a pro Imidazol 2 min. Navrhovaná metoda je vhodná stabilitní metoda, která poskytuje účinnost 100,08 ± 0,20%.

- ***Stanovení pomocí TLC – denzitometrie***^[9]

Vedle HPLC byla studována metoda TLC s denzitometrickým vyhodnocením skvrn. Tato metoda byla rovněž použita jako stabilitu indukující metoda k separaci a kvantifikaci Klotrimazolu v přítomnosti kyselých degradačních produktů. TLC separace byla provedena na vrstvě silikagelu F₂₅₄, systém rozpouštědel byl složen z chloroformu +

acetonu + 25% amoniaku v poměru 7:1:0,1 (v/v/v). K vyhodnocení se použilo denzitometrické snímání při 260 nm. Imidazol neabsorbuje záření o 260 nm, musí být vizualizován parami jodu. Účinnost této metody byla $100,09 \pm 0,55\%$.

6.1.3 Stanovení nečistot v přípravku CLOTRIMAZOL krém

- *Lékopisná definice krém*^[1]

Krémy jsou vícefázové přípravky obsahující lipofilní a vodnou fázi. Podle typu kontinuální (vnější) fáze se dělí na hydrofobní a hydrofilní.

- *Stanovení pomocí MEKC*^[10]

Byla studována možnost využití prosté a rychlé MEKC metody pro separaci a stanovení Klotrimazolu a jeho degradačních produktů ve farmaceutickém přípravku. Stanovení touto metodou trvalo 15 min. a byl použit SDS. Pro MEKC separaci byly použity elektroforetické substráty složené z SDS-fosfátového pufru a různě koncentrovaných alkoholů nebo acetonitrilů. Optimální podmínky pro stanovení byly určeny 50mM SDS + 15% acetonitril + 5% butanol (v/v/v) o pH 7,2. Výsledky byly porovnány s metodou HPLC. Studií bylo dokázáno, že metoda MEKC poskytuje selektivitu a přesnost a je validní pro stanovení Klotrimazolu a jeho degradačních produktů.

6.2 Indometacinum⁵

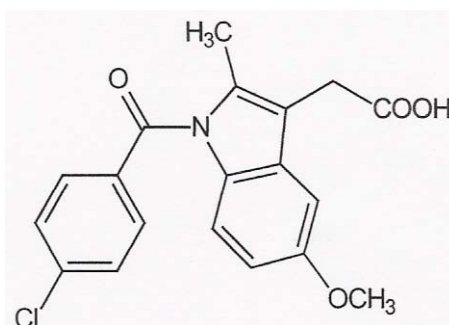
6.2.1 Účinná látka

○ **Název**^[1]

- Latinský název ČL 2005: **Indometacinum**
- Anglický název Ph.Eur.4: **Indometacin**
- Český název ČL 2005: **Indometacin**

○ **Vzorec a molekulová hmotnost**^[1]

- Sumární vzorec: C₁₉H₁₆ClNO₄
- Strukturní vzorec:



- Molekulová hmotnost: M_r = 357,79

○ **Charakteristika**^[1]

Je to Kyselina [1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]octová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5% až 100,5% sloučeniny C₁₉H₁₆ClNO₄.

○ **Vlastnosti**^[1]

Bílý nebo žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

○ **Farmakodynamické vlastnosti**^[8]

Indometacin je nesteroidní antirevmatikum, antiflogistikum s analgetickým a antipyretickým účinkem. Je vhodný pro dlouhodobé užívání u revmatoidní artritidy, ankylosující spondylitidy a osteoartritidy. Indometacin je inhibitor syntézy prostaglandinů, jeho účinek je podmíněn snížením prostaglandinů v tkáních postižených zánětem, potlačuje projevy zánětu.

⁵ V kapitole 6.2 byly použity zdroje [1], [8], [11], [15]

- ***Farmakokinetické vlastnosti***^[8]

Po perkutánní aplikaci je Indometacin prokazatelný v synoviální bláně i v kloubním mazu a ve svalu. Vylučuje se jako nezměněná účinná látka i jako metabolity O-demetyl-indometacin a N-dechlorbenzoyl-indometacin.

- ***Lékopisné zkoušky na čistotu***^[1]

Dle ČL 2005 se provádí zkoušky na příbuzné látky tenkovrstvou chromatografií za použití vrstvy silikagelu HF₂₅₄R.

6.2.2 Stanovení nečistot v přípravku INDOMETACIN gel

- ***Lékopisná definice gelu***^[1]

Gely jsou tvořeny tekutinami, které gelovají za přítomnosti vhodných gelotvorných látek. Podle složení se dělí na hydrofobní a hydrofilní gely.

- ***Stanovení pomocí HPLC***^[11]

Pro určení složení přípravku Indometacin gel byla validována metoda HPLC na obrácených fázích (RP-HPLC) s UV spektrofotometrickou detekcí. V analýzách léčivých přípravků mají HPLC techniky nejširší použití.

- ***Stanovení pomocí UPLC***^[15]

UPLC je poměrně nová technika, která dává nové možnosti v kapalinové chromatografii. Vyznačuje se snížením času analýzy a menší spotřebou rozpouštědel. UPLC chromatografický systém byl navržen speciálním způsobem, aby odolal vysokému protitlaku. V koloně byly použity částičky o průměru 1,7 μm. Čas analýzy byl touto metodou snížen 9x ve srovnání se systémem užívající 5 μm částice. Oproti koloně s průměrem částic 3 μm bylo zkrácení 3x. Separace se provádí za velmi vysokého tlaku (nad 100 MPa), ale nebyl zjištěn negativní vliv na analytickou kolonu ani jiné části chromatografického systému.

Tato metoda byla použita pro stanovení látek a pro kontrolní stabilitní studie v přípravku Indometacin gel, který obsahuje účinnou látku Indometacin a degradační produkty Kyselinu 4-Chlorbenzoovou a Kyselinu 5-Methoxy-2-methylindolactovou. Byly vyvinuty a testovány nové druhy stacionárních fází. Pro zkrácení času analýzy a zvýšení účinnosti byla použita stacionární fáze o menším průměru částí a kratší kolona. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu + 0,2% kyseliny fosforečné v poměru 50:50 (v/v). Oproti

HPLC bylo potřeba snížit injekční objem a snížit průtokovou rychlost mobilní fáze. Časy analýzy se zkrátily 4,7x a spotřeba rozpouštědla byla snížena 5x oproti HPLC. UPLC metoda má nižší účinnost pro první a poslední eluční pík (je to způsobeno nízkým injekčním objemem). Citlivost UPLC systému s injekčním objem 2 μ l byla stejná jako u HPLC s injekčním objem 5 μ l.

6.3 Hydrocortisoni acetas⁶

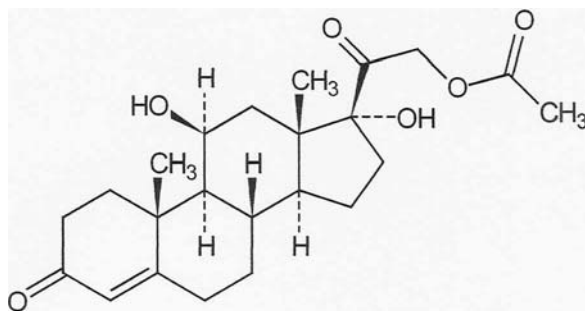
6.3.1 Účinná látka

○ **Název**^[1]

- Latinský název ČL 2005: **Hydrocortisoni acetas**
- Anglický název Ph.Eur.4: **Hydrocortisone acetate**
- Český název ČL 2005: **Hydrokortison-acetát**

○ **Vzorec a molekulová hmotnost**^[1]

- Sumární vzorec: $C_{23}H_{32}O_6$
- Strukturní vzorec:



- Molekulová hmotnost: $M_r = 404,50$

○ **Charakteristika**^[1]

Je to 11 β ,17-dihydroxy-3,20-dioxopregn-4-en-21-yl-acetát. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0% až 103,0% sloučeniny $C_{23}H_{32}O_6$.

○ **Vlastnosti**^[1]

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v dichlormethanu.

○ **Farmakodynamické vlastnosti**^[12]

Hydrokortizon je protizánětlivá látka ze skupiny kortikosteroidních hormonů. Místně použitý způsobuje ústup zánětu kůže, tlumí alergické projevy, svědění a zarudnutí kůže.

○ **Farmakokinetické vlastnosti**^[13]

Kortikoidy se vstřebávají přes stratum corneum. Místní biologickou dostupnost zvyšuje mikronizace a druh masťového základu, ze strany organismu poškozený kožní povrch, ať už zánětem či úrazem, dále při horečce.

⁶ V kapitole 6.3 byly použity zdroje [1], [12], [13], [14], [15]

- ***Lékopisné zkoušky na čistotu***^[1]

Dle ČL 2005 se provádí zkouška na příbuznou látku Kortison-acetát R kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou detekcí při 254 nm.

6.3.2 Stanovení nečistot v přípravku HYDROKORTISON krém

- ***Lékopisná definice krému***^[1]

Krémy jsou vícefázové přípravky obsahující lipofilní a vodnou fázi. Podle typu kontinuální (vnější) fáze se dělí na hydrofobní a hydrofilní.

- ***Stanovení pomocí HPLC***^[14]

Pro stanovení složení v krému pro lokální použití byla validována metoda HPLC na obrácených fázích (RP-HPLC) s UV spektrofotometrickou detekcí. Metoda popisuje stanovení účinné složky Hydrokortison-acetátu, jeho degradačních produktů Hydrokortisonu a Kortison-acetátu (vyskytující se po dlouhodobých stabilitních testech) a dvou konzervačních látek přítomných v krému Methylparabenu a Propylparabenu. Jako vnitřní standard byl užit Dexamethason. Optimální složení mobilní fáze je methanol + acetonitril + voda v poměru 15:27:58 (v/v/v). Čas analýzy je méně než 13 min. Na základě požadavku zadavatele byla nakonec validována metoda, pro stanovení pouze nečistoty hydrokortisonu.

- ***Stanovení pomocí UPLC***^[15]

Tato metoda byla použita pro stanovení látek a pro kontrolní stabilitní studie v přípravku Hydrocortison krém, který obsahuje účinnou látku Hydrokortison-acetát, degradační produkt Hydrokortison a konzervační látky Methylparaben a Propylparaben. Použitá mobilní fáze byla směs methanol + acetonitril + voda v poměru 15:27:58 (v/v/v). Separace probíhala za laboratorní teploty. Detekce byla při 238 nm. Při stanovení Hydrokortison krému dává UPLC metoda mnohem větší účinnost pro všechny sloučeniny. Největší rozdíly oproti HPLC byly u degradačního produktu Hydrokortisonu, a to 7,28x větší účinnost. Nejmenší rozdíl dává účinná látka Hydrokortison-acetát, a to 2,5x větší účinnost. Rozlišení pík bylo vyšší v UPLC analýze kromě páru pík Propylparaben – Dexamethazon (IS).

7 Validace analytických metod pro hodnocení nečistot v léčivých přípravcích

Na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové byla vypracována a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení účinných látek a nečistot v přípravcích Clotrimazol HBF spray 1%, Indometacin HBF gel 1% a Hydrokortison HBF krém 1%.

7.1 Přípravek CLOTRIMAZOL HBF spray 1%⁷

- účinná látka: **Klotrimazol**
- nečistoty: **Imidazol**
(2-Chlorfenyl)difenylmethanol
- metoda: **HPLC**
- vnitřní standard: **Ibuprofen**
- validaci provedla: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.
Kontrolní laboratoř 526
Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

7.1.1 Analytický postup

Byl stanoven obsah nečistoty Imidazolu a obsah nečistoty (2-Chlorfenyl)difenylmethanolu. Dále byl stanoven obsah nedefinovaných nečistot (plocha píku nesmí být větší než 0,2 násobek hlavní plochy daného porovnávacího roztoku standardů) a celkový obsah nečistot přítomných ve spreji.

7.1.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, který se skládá:

- z měření **účinnosti chromatografické kolony** (počtu teoretických pater = N), musí splňovat požadavek $N > 900$
 - výsledky: Imidazol N = 1535
(2-Chlorfenyl)difenylmethanol N = 5641

⁷ V kapitole 7.1 byl použit zdroj [16]

- ze stanovení **asymetrie chromatografických píků** (T), musí splňovat požadavek $T < 2$
 - výsledky: Imidazol $T = 1,03$
(2-Chlorfenyl)difenylmethanol $T = 1,05$

- z **rozlišení chromatografických píků** (R_{ij}), musí splňovat požadavek $R_{ij} > 1,5$
 - výsledky:

mrtvý objem – Imidazol	$R_{ij} = 2,14$
Imidazol – Ibuprofen (IS)	$R_{ij} = 6,09$
Clotrimazol – (2-Chlorfenyl)difenylmethanol	$R_{ij} = 3,68$

- z měření **opakovatelnosti analýzy** (s_r), musí splňovat požadavek $s_r < 1\%$
 - výsledky: Imidazol

- spočítáno z retenčního času	$s_r = 0,47\%$
- spočítáno z plochy píku	$s_r = 0,20\%$

 (2-Chlorfenyl)difenylmethanol

- spočítáno z retenčního času	$s_r = 0,33\%$
- spočítáno z plochy píku	$s_r = 0,29\%$

7.1.3 Validace analytické metody

Byla provedena validace metody HPLC zahrnující:

- **přesnost:** Byly analyzovány roztoky vzorku Clotrimazol HBF spray 1% (navážka + roztok standardů nečistot) a následně byly porovnány plochy píků nečistot naměřených v jednotlivých navážkách vzorku; musí splňovat požadavek $s_r < 5\%$.
 - výsledky: Imidazol $s_r = 0,47\%$
(2-Chlorfenyl)difenylmethanol $s_r = 0,28\%$

- **linearitu:** Byla použita metoda vnitřního standardu (jako IS byl použit Ibuprofen). Závislost $A_{\text{vzorek}}/A_{\text{IS}}$ kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.
 - výsledky: Imidazol:

- koeficient korelace $R = 0,999945$

(2-Chorfenyl)difenylmethanol:

- koeficient korelace $R = 0,99968$

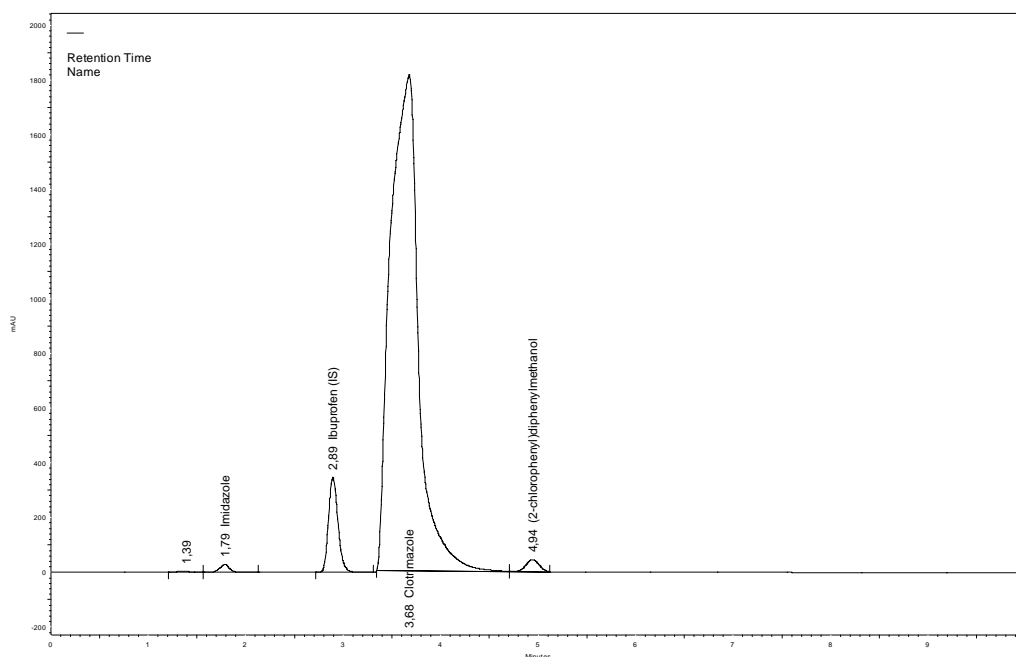
- **správnost:** Byl změřen roztok standardů, dále byly analyzovány modelové vzorky (placebo + přídavek nečistot), které byly paralelně připravené s přídavkem roztoku standardů; musí splňovat požadavek $R = 100 \pm 5\%$ a také $s_R < 5\%$.

- výsledky: R vyhovuje pro všechny vzorky

Imidazol $s_R = 0,48\%$

(2-Chorfenyl)difenylmethanol $s_R = 0,28\%$

- **selektivitu:** Na chromatogramu roztoku standardů látek, analyzovaných v přípravku Clotrimazol HBF spray 1% je patrná dokonalá separace sledovaných složek i vnitřního standardu.



obrázek 1 – Chromatogram přípravku Clotrimazol HBF spray 1%

- výsledky: Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce Klotrimazolu i nečistot.

- **robustnost** (míra vlivu proměnných experimentálních podmínek):

- a) vliv složení mobilní fáze bylo testováno při poměru acetonitril – voda: posuzování dle vlivu na plochu chromatografického píku a dle vlivu na retenční čas

- výsledky: Studií bylo doporučeno použití mobilní fáze v poměru 65 : 35 (acetonitril – voda).
- b) stabilita roztoku standardních látek Imidazolu a (2-Chlorfenyl)difenylmethanolu byla testována při uchovávání:
 - za snížené teploty (5°C), chráněné před světlem
 - za laboratorní teploty, za přístupu světla
- výsledky: Studií bylo zjištěno, že roztoky nečistot Imidazolu a (2-Chlorfenyl)difenylmethanolu v acetonitrilu je možné používat při uchovávání za snížené teploty nebo za laboratorní teploty po dobu 72 hod. od jeho přípravy.
- **detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ):** Bylo změřeno placebo a z rozpětí šumu v okolí retenčního času stanovovaných nečistot byla odhadnuta směrodatná odchylka. Dále bylo změřeno placebo s jednotlivými přídávky nečistot.
 - výsledky: LOD (Imidazol) = 0,00119 mg/l
LOQ (Imidazol) = 0,00397 mg/l
LOD ((2-Chlorfenyl)difenylmethanol) = 0,00086 mg/l
LOQ ((2-Chlorfenyl)difenylmethanol) = 0,00286 mg/l.

7.1.4 Závěr

Na základě provedené validace metody lze konstatovat, že vypracovaná HPLC metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení nečistot Imidazolu a (2-Chlorfenyl)difenylmethanolu v přípravku Clotrimazol HBF spray 1%.

7.2 Přípravek *INDOMETACIN HBF gel 1%*⁸

- účinná látka: **Indometacin**
- nečistoty: **Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová**
Kyselina 4-chlorbenzoová
- metoda: **HPLC**
- vnitřní standard: Ketoprofen
- validaci provedla: Mgr. Lucie Nováková,
Kontrolní laboratoř 526
Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

7.2.1 Analytický postup

Byl stanoven obsah nečistoty Kyseliny 5-methoxy-2-methylindol-3-octové a obsah nečistoty Kyseliny 4-chlorbenzoové. Dále byl stanoven obsah nedefinovaných nečistot a celkový obsah nečistot přítomných v gelu.

7.2.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, který se skládá:

- z měření **účinnosti chromatografické kolony** (počtu teoretických pater = N), musí splňovat požadavek $N > 1500$
 - výsledky: Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová N = 3103
Kyselina 4-chlorbenzoová N = 4000
- ze stanovení **asymetrie chromatografických píků** (T), musí splňovat požadavek $T < 2$
 - výsledky: Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová T = 1,23
Kyselina 4-chlorbenzoová T = 1,14
- z **rozlišení chromatografických píků** (R_{ij}), musí splňovat požadavek $R_{ij} > 1,5$
 - výsledky:
Kys. 5-methoxy-2-methylindol-3-octová – Kys. 4-chlorbenzoová $R_{ij} = 2,70$
Kys. 4-chlorbenzoová – Ketoprofen (IS) $R_{ij} = 5,33$

⁸ V kapitole 7.2 byl použit zdroj [17]

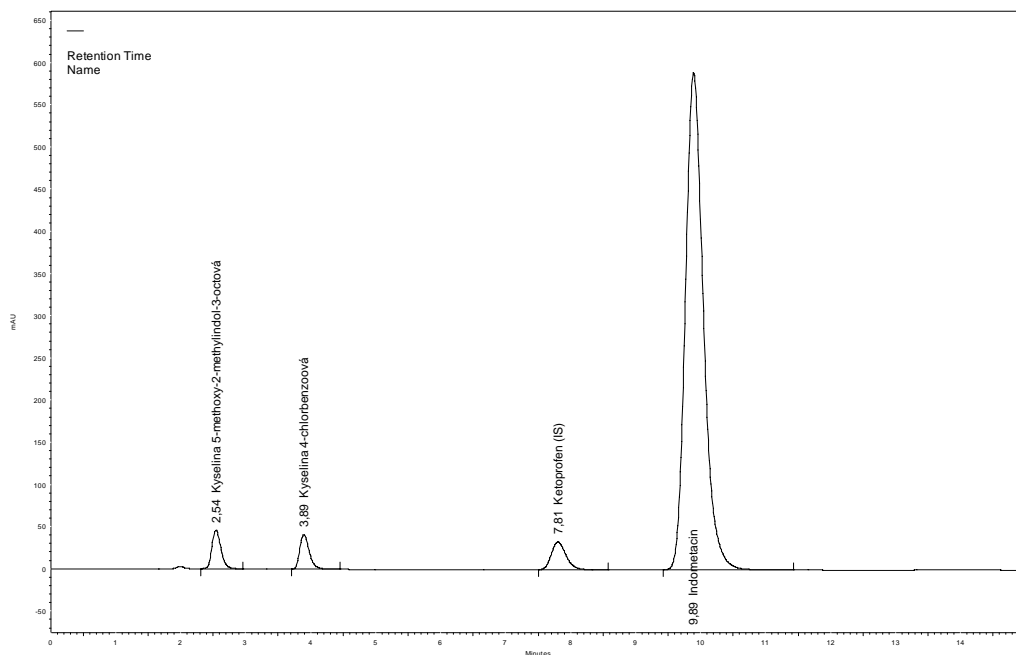
- z měření **opakovatelnosti analýzy** (s_r), musí splňovat požadavek $s_r < 1\%$
 - výsledky: Kys. 5-methoxy-2-methylindol-3-octová
 - spočítáno z retenčního času $s_r = 0,18\%$
 - spočítáno z plochy píku $s_r = 0,45\%$
 - Kyselina 4-chlorbenzoová
 - spočítáno z retenčního času $s_r = 0,23\%$
 - spočítáno z plochy píku $s_r = 0,66\%$

7.2.3 Validace analytické metody

Byla provedena validace metody HPLC zahrnující:

- **přesnost:** Byly analyzovány roztoky vzorku Indometacin HBF gel 1% (navážka + roztok standardů nečistot) a následně byly porovnány plochy píků nečistot naměřených v jednotlivých navážkách vzorku; musí splňovat požadavek $s_r < 5\%$.
 - výsledky: Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová $s_r = 3,10\%$
 - Kyselina 4-chlorbenzoová $s_r = 3,25\%$
- **linearitu:** Byla použita metoda vnitřního standardu (jako IS byl použit Ketoprofen). Závislost $A_{\text{vzorek}}/A_{\text{IS}}$ kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese
 - výsledky: Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová:
 - koeficient korelace $R = 0,999981$
 - Kyselina 4-chlorbenzoová:
 - koeficient korelace $R = 0,999991$
- **správnost:** Byl změřen roztok standardů, dále byly analyzovány modelové vzorky (placebo + přídavek nečistot), které byly paralelně připravené s přídavkem roztoku standardů; musí splňovat požadavek $R = 100 \pm 5\%$ a také $s_R < 5\%$.
 - výsledky: R vyhovuje pro všechny vzorky
 - Kyselina 5-methoxy-2-methylindol-3-octová $s_R = 1,13\%$
 - Kyselina 4-chlorbenzoová $s_R = 0,62\%$

- **selektivitu:** Na chromatogramu roztoku standardů látek, analyzovaných v přípravku Indometacin HBF gel 1% je patrná dokonalá separace sledovaných složek i vnitřního standardu.



obrázek 2 – Chromatogram přípravku Indometacin HBF gel 1%

- výsledky: Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce Indometacin i nečistot.
- **robustnost** (míra vlivu proměnných experimentálních podmínek):
 - a) vliv složení mobilní fáze bylo testováno při poměru acetonitril – kyselina fosforečná: posuzování dle vlivu na plochu chromatografického píku a dle vlivu na retenční čas
 - výsledky: Studií bylo doporučeno použití mobilní fáze v poměru 50 : 50 (acetonitril – kyselina fosforečná).
 - b) stabilita roztoku standardních látek Kyseliny 5-methoxy-2-methylindol-3-octové a Kyseliny 4-chlorbenzoové byla testována při uchování:
 - za snížené teploty (4°C), chráněné před světlem
 - za laboratorní teploty, za přístupu světla
 - výsledky: Studií bylo zjištěno, že roztok nečistoty Kyseliny 5-methoxy-2-methylindol-3-octové v methanolu je možné používat při uchování za snížené teploty do 72 hod. od jeho přípravy a za laboratorní teploty nelze roztok uchovávat. Roztok nečistoty Kyseliny 4-chlorbenzoové je možné

používat při uchovávání za snížené teploty nebo laboratorní teploty do 72 hod. od jeho přípravy.

- **detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ):** Bylo změřeno placebo a z rozpětí šumu v okolí retenčního času stanovovaných nečistot byla odhadnuta směrodatná odchylka. Dále bylo změřeno placebo s jednotlivými přídávky nečistot.

- výsledky:

LOD (kys. 5-methoxy-2-methylindol-3-octová) = $2,25 * 10^{-4}$ mg/l

LOQ (kys. 5-methoxy-2-methylindol-3-octová) = $7,5 * 10^{-4}$ mg/l

LOD (kys. 4-chlorbenzoová) = $5,69 * 10^{-5}$ mg/l

LOQ (kys. 4-chlorbenzoová) = $1,90 * 10^{-4}$ mg/l.

7.2.4 Závěr

Na základě provedené validace metody lze konstatovat, že vypracovaná HPLC metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení nečistot Kyseliny 5-methoxy-2-methylindol-3-octové a Kyseliny 4-chlorbenzoové v přípravku Indometacin HBF gel 1%.

7.3 Přípravek **HYDROKORTISON HBF krém 1%**⁹

- účinná látka: **Hydrokortison-acetát**
- nečistota: **Hydrokortison**
- metoda: **HPLC**
- vnitřní standard: Dexamethazon
- validaci provedla: Ing. Renata Hájková,
Kontrolní laboratoř 526
Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta v HK

7.3.1 Analytický postup

Byl stanoven obsah nečistoty Hydrokortisonu v krému. Dále byl stanoven obsah nedefinovaných nečistot (plocha píku nesmí být větší než 0,2 násobek hlavní plochy daného porovnávacího roztoku standardů) a celkový obsah nečistot přítomných v krému.

7.3.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, který se skládá:

- z měření **účinnosti chromatografické metody** (počtu teoretických pater = N), musí splňovat požadavek $N > 1500$
 - výsledek: Hydrokortison $N = 1561 \pm 0,20$
- ze stanovení **asymetrie chromatografického píku** (T), musí splňovat požadavek $T < 1,2$
 - výsledek: Hydrokortison $T = 1,04$
- z **rozlišení chromatografických píků** (R_{ij}), musí splňovat požadavek $R_{ij} > 1,5$
 - výsledky: Analyzovaná látka a látka před:
Hydrokortison – methylparaben $R_{ij} = 2,688$
Analyzovaná látka a látka za:
Hydrokortison – propylparaben $R_{ij} = 9,398$

⁹ V kapitole 7.3 byl použit zdroj [18]

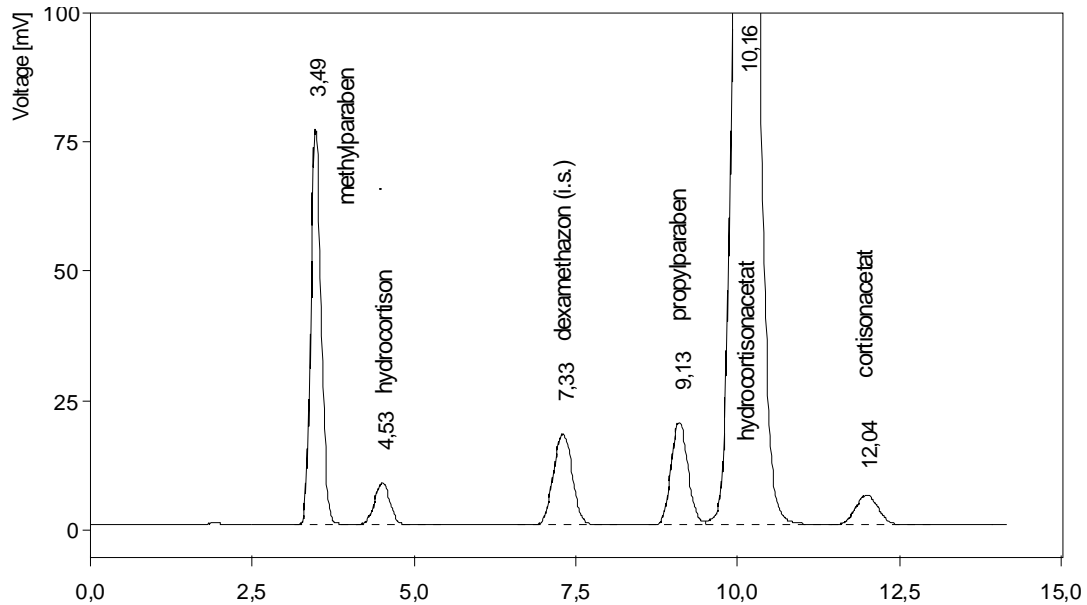
- z měření **opakovatelnosti analýzy** (s_r), musí splňovat požadavek $s_r < 1\%$
 - výsledky: Hydrokortison
 - spočítáno z retenčního času $s_r = 0,11\%$
 - spočítáno z plochy píku $s_r = 0,58\%$

7.3.3 Validace analytické metody

Byla provedena validace metody HPLC zahrnující:

- **přesnost:** Byly analyzovány roztoky vzorku Hydrokortison krém 1%; musí splňovat požadavek $s_r < 5\%$
 - výsledek: Hydrokortison $s_r = 2,56\%$
- **linearitu:** Byla použita metoda vnitřního standardu (jako IS byl použit Dexamethazon). Závislost $A_{\text{vzorek}}/A_{\text{IS}}$ kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese
 - výsledek: Hydrokortison:
 - koeficient korelace $R = 0,999993$
- **správnost:** Byl změřen roztok standardu Hydrokortisonu, dále byly analyzovány modelové vzorky (placebo + přídavek nečistoty), které byly připravené paralelně; musí splňovat požadavek $R = 100 \pm 5\%$ a také $s_R < 5\%$.
 - výsledky: R vyhovuje pro všechny vzorky
 - Hydrokortison $s_R = 2,76\%$
- **robustnost** (míra vlivu proměnných experimentálních podmínek):
 - a) vliv složení mobilní fáze bylo testováno při poměru acetonitril – methanol - voda: posuzování dle vlivu na plochu chromatografického píku a dle vlivu na retenční čas
 - výsledky: Studií bylo doporučeno použití mobilní fáze v poměru 27 : 15 : 58 (acetonitril – methanol - voda)
 - b) stabilita roztoku Hydrokortisonu byla testována při uchovávání:
 - za snížené teploty (4°C), bez přístupu světla
 - za laboratorní teploty, za přístupu světla

- výsledky: Požadavek $S_T < 1\%$ je splněn u roztoku Hydrokortisonu, který byl uchovávaný nejdéle 48 hod. od jeho přípravy, a to při uchovávání za snížené teploty i za laboratorní teploty. Při uchovávání delším než je uvedený časový limit, byla zjištěna hodnota $S_T > 1$.
- **selektivitu:** Na chromatogramu roztoku standardů látek, analyzovaných v přípravku Hydrokortison HBF krém 1% je znázorněna úplná separace složek i IS.



obrázek 3: Chromatogram přípravku Hydrokortison HBF krém 1%

- výsledky: Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce Hydrokortison-acetátu, konzervačním látkám i nečistotě Hydrokortisonu.
- **detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ):** Bylo změřeno placebo a z rozpětí šumu v okolí retenčního času stanovované nečistoty byla odhadnuta směrodatná odchylka. Dále bylo změřeno placebo s přidavkem nečistoty.
 - výsledky: LOD (Hydrokortison) = 0,009 mg/l
LOQ (Hydrokortison) = 0,031 mg/l

7.3.4 Závěr

Na základě provedené validace metody lze konstatovat, že vypracovaná HPLC metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení nečistoty Hydrokortisonu v přípravku Hydrokortison HBF krém 1%.

8 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala rešerší na stanovení nečistot v léčivých přípravcích různými analytickými metodami.

Mezi techniky s nejširším použitím patří metoda HPLC, která poskytuje přesnost, správnost, linearitu, citlivost a robustnost vyhovující požadavkům ICH. Vedle HPLC se používá také metoda TLC s denzitometrickým vyhodnocením skvrn, která je rovněž stabilitu indukující metoda, a která je vhodná k separaci účinné látky a degradačních produktů např. v léčivém přípravku Canesten roztok. Za vhodnou byla také uznána metoda MEKC, která poskytuje selektivitu a přesnost srovnatelnou s metodou HPLC. Používá se ke stanovení nečistot v přípravku Clotrimazol krém. Mezi nejnovější techniky, které se uplatňují při kontrole nečistot patří metoda UPLC, která dává nové možnosti v kapalinové chromatografii. Touto metodou se výrazně snížily časy analýzy a spotřeba rozpouštědel. Metoda UPLC je vhodná k monitorování nečistot v léčivých přípravcích Indometacin gel a Hydrokortison krém.

Seznam literatury

- [1] *Český lékopis 2005*. 1. vyd. Praha : GRADA PUBLISHING a.s., 2005. 3264 s. ISBN 80-247-1532-5.
- [2] International Conference on Harmonization (ICH): Q3A(R1): *Impurities in New Drug Substances*, US FDA Federal Register, Vol. 68, February 2003, p.6924
- [3] International Conference on Harmonization (ICH): Q3C(R3): *Impurities: Guideline for Residual Solvents*, US FDA Federal Register, Vol. 68, December 1997, p.67377
- [4] 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, December 2000, p.83041
- [5] International Conference on Harmonization (ICH): Q3B(R2): *Impurities in New Drug Products*, US FDA Federal Register, Vol. 68, November 2003, p.64628
- [6] REG-83-*Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci*, Věstník SÚKL 8/2005, 13
- [7] *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. 1999-2007 [cit. 04/2007].
Dostupný z WWW: <http://www.sukl.cz/_download/pil/PI64167.doc>.
- [8] Mikroverze AISLP 2007.1 pro MS Windows
- [9] ABDEL-MOETY E.M., KHATTAB F.I., KELANI K.M., ABOUAL-ALAMEIN A.M., *Il Farmaco* 57 (2002), 931-938
- [10] LIN Mei, WU Nian, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 (1999), 945-954
- [11] NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L., HAVLÍKOVÁ L., SOLICH P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005), 899-905
- [12] *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. 1999-2007 [cit. 04/2007].
Dostupný z WWW: <http://www.sukl.cz/_download/pil/PI20152.doc>.
- [13] *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. 1999-2007 [cit. 04/2007].
Dostupný z WWW: <http://www.sukl.cz/_download/spc/SPC20153.doc>.
- [14] HÁJKOVÁ R., SOLICH P., DVOŘÁK J., ŠÍCHA J., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003), 921-927
- [15] NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L., SOLICH P., *Talanta* 68 (2006), 908-918
- [16] *Validace metody pro stanovení obsahu nečistot v přípravku Clotrimazol HBF spray 1%*, Kontrolní laboratoř 526, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 30.5.2005

- [17] *Validace metody pro stanovení obsahu nečistot v přípravku Indometacin HBF gel 1%*, Kontrolní laboratoř 526, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 18.2.2004
- [18] *Validace metody pro stanovení obsahu nečistot v přípravku Hydrokortison HBF krém 1%*, Kontrolní laboratoř 526, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 24.10.2001, revize dne 31.1.2006

Seznam zkratek

ČL 2005	Český lékopis 2005
GMP	Good Manufacturing Practice (Správná výrobní praxe)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
ICH	International Conference on Harmonisation
IS	Internal Standard (vnitřní standard)
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography (micelární elektrokinetická chromatografie)
PDE	Permitted Daily Exposure (povolená denní dávka)
R	zkoumadla
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích)
RV	relativní vlhkost
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecylsulfát sodný)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TDI	Total Daily Intake (celkový denní příjem)
TLC	Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography