

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Analytická chemie



**Mgr. Jiří Vojta**

*Využití kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze a příprava monolitických  
stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii*

*Use of liquid chromatography in pharmaceutical analysis and preparation of monolithic  
stationary phases for thin-layer chromatography*

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 7. 2015

Podpis

Tato disertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2011 až 2015 během mého Ph.D. studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43, Praha 2 a za mého působení ve společnosti Zentiva, k.s., U kabelovny 130, 102 37, Praha 10 na pozici PhD Cont.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSMT 0021620857), Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 349511) a projektů SVV Univerzity Karlovy v Praze.

Školitel: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Školitel-konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli panu profesoru Pavlu Coufalovi za jeho dlouhodobé vedení mé experimentální práce, poskytnutí zázemí na Katedře analytické chemie během mých vysokoškolských let, všeobecnou podporu a optimismus i ve chvílích nejobtížnějších. Dále bych rád poděkoval paní docentce Zuzaně Bosákové za pomoc v otázce tématu a odborné konzultace. Kolegům ze separačního týmu Katedry analytické chemie Petrovi Kozlíkovi a Tomáši Křížkovi patří mé díky za jejich podporu, konzultace a nakažlivě dobrou náladu. Aleši Jedličkovi a Pavlu Hanzlíkovi děkuji za vynikající spolupráci a takřka každodenní předávání cenných zkušeností. Nejvřelejší poděkování patří Lucii Janečkové a to zejména za přátelství, které jsme navázali, a za vše, co k němu patří. Mojí milované Terezce hluboce děkuji za její podporu, trpělivost, důvěru, lásku a dceru Barunku.

**Předmětová hesla:**

Analytická chemie, separační metody, farmaceutická analýza

**Klíčová slova:**

Nečistoty, paracetamol, kodein, pitofenon, amlodipin, valsartan, hydrochlorothiazid, iontově párová reversní chromatografie, ultra účinná kapalinová chromatografie, monolit, tenkovrstvá chromatografie

**Subject words:**

Analytical chemistry, separation science, pharmaceutical analysis

**Key words:**

Impurities, paracetamol, codeine, pitophenone, amlodipine, valsartan, hydrochlorothiazide, ion-pair reversed phase chromatography, ultra high performance liquid chromatography, monoliths, thin-layer chromatography

## Abstrakt (CZ)

V rámci první části této práce byly vyvinuty analytické metody pro stanovení nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích. Vývoj metod zahrnoval optimalizaci přípravy vzorků i jejich chromatografického stanovení. Metody byly zvalidovány dle platné mezinárodní směrnice International Conference on Harmonization (ICH) a byla potvrzena jejich aplikovatelnost pro stanovení nečistot ve stabilitních vzorcích léčivých přípravků. Nečistoty paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu v přítomnosti čtvrté účinné látky fempiverin bromidu byly separovány iontově párovou reverzní chromatografií s gradientovou elucí. Byla použita kolona Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm vyhřátá na teplotu 35 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 220 nm pro nečistotu K paracetamolu, 245 nm pro paracetamol a jeho ostatní nečistoty a 285 nm pro kodein, pitofenon a jejich nečistoty. Pro separaci a stanovení nečistot valsartanu, amlodipin besilátu a hydrochlorothiazidu byla vyvinuta UHPLC metoda v reverzním chromatografickém módu s gradientovou elucí. Byla použita kolona Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm vyhřátá na teplotu 30 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 225 nm pro valsartan, jeho nečistoty a nečistotu D amlodipin besilátu, 360 nm a 271 nm pro amlodipin, respektive hydrochlorothiazid a jejich nečistoty.

Ve druhé části práce byly připraveny monolitické stacionární fáze ve formě tenké vrstvy na skleněném nosiči. Polymerizační směsi obsahovaly glycidyl-methakrylát a 2-hydroxyethyl-methakrylát (monomery), ethylenglykol-dimethakrylát (síťovací činidlo), dekan-1-ol, cyklohexan-1-ol, propan-1-ol a butan-1,4-diol (porogenní složky) v různých poměrech a 2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenon (iniciátor). Polymerizace monolitů (UV iniciace, 254 nm) probíhala mezi plexisklovou destičkou a silanizovaným mikroskopickým sklíčkem oddělenými teflonovým těsněním s definovanou tloušťkou 25, 50, 76 a 127 μm. Sledovanými charakteristikami monolitických vrstev byly zejména jejich mechanická odolnost a rychlost vztlínání hexanu v závislosti na složení polymerizační směsi. Vybraná monolitická vrstva byla testována jako stacionární fáze pro hmotnostní detekci s desorpční atmosférickou fotoionizací (DAPPI).

## **Abstract (EN)**

In the first part of this work, analytical methods for determination of impurities of active pharmaceutical ingredients (API) in combined pharmaceutical dosage forms were developed and validated. Development of the methods covered both the optimization of sample preparation procedure and chromatographic conditions. The methods were validated according to International Conference on Harmonization guideline and both of them were confirmed to be able to analyze stability samples. Impurities in paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride in the presence of fourth API fempiverinium bromide were separated by using ion-pair reversed phase chromatography with gradient elution. Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm heated to 35 °C was used as a separation column. A diode array detector was used. The detection wavelengths were set as follows: 220 nm for paracetamol impurity K, 245 nm for paracetamol and its other impurities and 285 nm for codeine, pitophenone and their impurities. Impurities in valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide were separated by reversed phase UHPLC method with gradient elution. Chromatographic column Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm heated to 30 °C and spectrophotometric detection were used. The detection wavelengths were set as follows: 225 nm for valsartan, its impurities and for impurity D of amlodipine besylate, 360 nm and 271 nm for amlodipine, respectively hydrochlorothiazide and their impurities.

In the second part of this work, thin-layer monolithic stationary phases were prepared on a glass holder. Polymerization mixtures contained glycidyl-methacrylate and 2-hydroxyethyl-methacrylate (monomers), ethyleneglycol-dimethacrylate (cross-linker), decan-1-ol, cyclohexan-1-ol, propan-1-ol and butan-1,4-diol (porogens) in different ratios and 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone as an initiator. Monolithic layers were prepared in-situ (UV initiation, 254 nm) between plexiglass and silanized glass layers separated by teflon gasket with defined thickness of 25, 50, 76 and 127 μm. The main examined characteristic of the monolithic layers were their mechanical stability and speed of capillary action of hexane depending on composition of polymerization mixture. The selected monolithic layer was tested as a stationary phase for mass detection with desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI).

## **Obsah**

Abstrakt (CZ).....	6
Abstract (EN).....	7
Seznam zkratk a symbolů .....	10
Cíle práce .....	13
<b>1. Stanovení obsahu nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Teoretický úvod.....</b>	<b>14</b>
1.1.1 HPLC a UHPLC ve farmaceutické analýze.....	14
1.1.2 Stanovení obsahu nečistot v léčivých přípravcích.....	19
1.1.3 Stanovení obsahu nečistot ve Spasmopanu® .....	23
1.1.4 Stanovení obsahu nečistot v tabletách kombinujících valsartan, amlodipin besilát a hydrochlorothiazid.....	28
<b>1.2 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci I.....</b>	<b>33</b>
1.2.1 Data a komentář k vývoji RP-HPLC metody .....	33
1.2.2 Data a komentář k vývoji IP-RP-HPLC metody.....	42
1.2.3 Vývoj postupu přípravy vzorku .....	50
<b>1.3 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci II .....</b>	<b>56</b>
1.3.1 Data a komentář k vývoji UHPLC metody.....	56
1.3.2 Vývoj přípravy vzorku .....	64
<b>Literatura I.....</b>	<b>67</b>
<b>Publikace I.....</b>	<b>83</b>
<b>Publikace II .....</b>	<b>92</b>

<b>2. Příprava monolitických stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii .....</b>	<b>102</b>
<b>2.1 Teoretický úvod .....</b>	<b>102</b>
<b>2.2 Experimentální část .....</b>	<b>104</b>
2.2.1 Použité chemikálie a přístroje .....	104
2.2.2 Postup přípravy a testování monolitických tenkých vrstev .....	105
<b>2.3 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>108</b>
2.3.1 Vývoj postupu přípravy monolitických TLC destiček .....	108
2.3.2 Mechanická odolnost a rychlost vzlínání pro monolitické TLC destičky ..	110
2.3.3 Testování ionizace technikou DAPPI .....	112
<b>Literatura II .....</b>	<b>114</b>
<b>Publikace III .....</b>	<b>117</b>
<b>3. Závěr .....</b>	<b>126</b>
Prohlášení o spoluautorství .....	127
Seznam publikací, přednášek a plakátových sdělení .....	128

## Seznam zkratek a symbolů

<i>A</i>	koeficient van Deemterovy rovnice
AMLO	amlodipin
API	účinná léčivá látka
<i>Ar</i>	plocha píku
<i>AU</i>	absorbance
<i>B</i>	koeficient van Deemterovy rovnice
bar	bar
BEH	Ethylene bridged hybrid
BP	Britský lékopis
<i>C</i>	koeficient van Deemterovy rovnice
°C	stupeň Celsia
<i>C</i> <sub>18</sub>	oktadecyl
<i>C</i> <sub>8</sub>	oktyl
ČL	Český lékopis
cm	centimetr
<i>d</i>	operátor derivace
DAPPI	desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku
<i>D</i> <sub>M</sub>	difuzní koeficient
DMPAP	2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenon
<i>d</i> <sub>p</sub>	velikost (průměr) částice
$\Delta P$	tlakový spád
EDMA	ethylenglykol-dimethakrylát
$\Phi$	faktor odporu kolony
g	gram
g/L	gram na litr
g/mol	gram na mol
GMA	glycidyl-methakrylát
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
<i>h</i>	výška píku
HCTZ	hydrochlorothiazid
HEMA	2-hydroxyethyl-methakrylát
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
Hz	Hertz
IEC	iontově výměnná chromatografie

ICH	International Conference on Harmonization
IP	ionotově párová chromatografie
JP	Japonský lékopis
<i>l</i>	délka kolony
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
<i>M</i>	molární koncentrace, mol/L
<i>mM</i>	milimolární koncentrace, mmol/L
<i>Mr</i>	relativní molekulová hmotnost
MALDI	matrix assisted laser desorption and ionozation
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
mg	miligram
mg/mL	miligram na mililitr
mL	mililitr
mL/min	mililitr za minutu
mm	milimetr
mm/s	milimetr za sekundu
mol/L	mol na litr
mmol/L	milimol na litr
MS	hmotnostní spektrometrie
mV	milivolt
mV/s	milivolt za sekundu
m/z	hmotnost ku náboji
μL	mikrolitr
μL/min	mikrolitr za minutu
μm	mikrometr
nm	nanometr
NMR	nukleární magnetická resonance
$\eta$	viskozita
PDA	detektor s diodovým polem
Ph. Eur.	Evropský lékopis
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
PVDF	polyvinylidene fluoride (teflon)
<i>R</i>	chromatografické rozlišení
RP	reverzní stacionární fáze (nepolární)
rpm	otáčky za minutu

RSD .....	relativní směrodatná odchylka
SEC .....	vylučovací chromatografie
SFC .....	superkritická fluidní chromatografie
$S_f$ .....	faktor symetrie
$t$ .....	čas
$t_R$ .....	retenční čas
TLC .....	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TOF .....	detektor doby letu
$u$ .....	lineární průtoková rychlost
$u_{OPT}$ .....	optimální lineární průtoková rychlost
$U$ .....	napětí
UV .....	ultrafialová oblast spektra
UHPLC .....	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC® .....	Ultra performance liquid chromatography
UTLC .....	Ultra thin-layer chromatography
USP .....	Americký lékopis
UZ .....	ultrazvuk
VALS .....	valsartan
V .....	volt
W .....	watt
% hm .....	% hmotnostní

## Cíle práce

Cílem první části této práce byl vývoj analytických metod pro stanovení nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích. Pro tento účel byly vybrány dva léčivé přípravky:

- Spasmopan<sup>®</sup>, léková forma čípky kombinující účinné látky paracetamol v obsahu 500 mg, kodein fosfát hemihydrát v obsahu 19,2 mg, pitofenon hydrochlorid v obsahu 10 mg a fenpiverin bromid v obsahu 0,1 mg na jeden čípek.
- Potahované tablety kombinující účinné látky valsartan v obsahu 320 mg, amlodipin besilát v obsahu 10 mg a hydrochlorothiazid v obsahu 25 mg na jednu potahovanou tabletu.

Vývoj metod zahrnoval paralelní optimalizaci přípravy vzorku a chromatografických podmínek. Při přípravě vzorku byly nejdůležitějšími faktory výtěžnost, opakovatelnost, stabilita analytů, kompatibilita s chromatografickými podmínkami, jednoduchost a časová nenáročnost. Vlastní chromatografické metody byly optimalizovány z hlediska selektivity, preciznosti, přesnosti, rozsahu, citlivosti, robustnosti a byly zvalidovány dle platné mezinárodní směrnice ICH. Vhodnost metod pro stabilitní studie léčivých přípravků byla potvrzena analýzou expirované šarže Spasmopanu<sup>®</sup> a degradační studie v případě potahovaných tablet.

Cílem druhé části práce byla příprava monolitických stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii s hmotnostní detekcí analytů pomocí desorpční fotoionizační techniky DAPPI. Na základě publikovaných prací byl vyvinut postup přípravy monolitických tenkých vrstev v podmínkách naší laboratoře. Monolity byly připraveny na bázi methakrylátu z důvodu možnosti iniciace UV zářením a předpokládaného použití v normálním chromatografickém módu. Klíčovými sledovanými parametry byla mechanická odolnost nutná pro desorpční ionizační techniku a rychlost vztlínání mobilní fáze umožňující chromatografickou analýzu.

# 1. Stanovení obsahu nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích

## 1.1 Teoretický úvod

### 1.1.1 HPLC a UHPLC ve farmaceutické analýze

Kapalinová chromatografie (LC) je dnes nejčastěji používanou metodou ve farmaceutické analýze pro stanovení obsahu a čistoty účinných látek jak samotných, tak i jako složek v léčivých přípravcích [1]. Masivní rozvoj HPLC v druhé polovině 20. století vedl ke standardizaci této metody ve farmaceutické analýze a zejména díky její selektivitě a citlivosti umožnil zvýšit nároky na kvalitu léčiv. Metodika LC, včetně požadavků na chromatografický systém, zahrnující parametry HPLC i UHPLC, je obecně popsána v Evropském lékopisu [2].

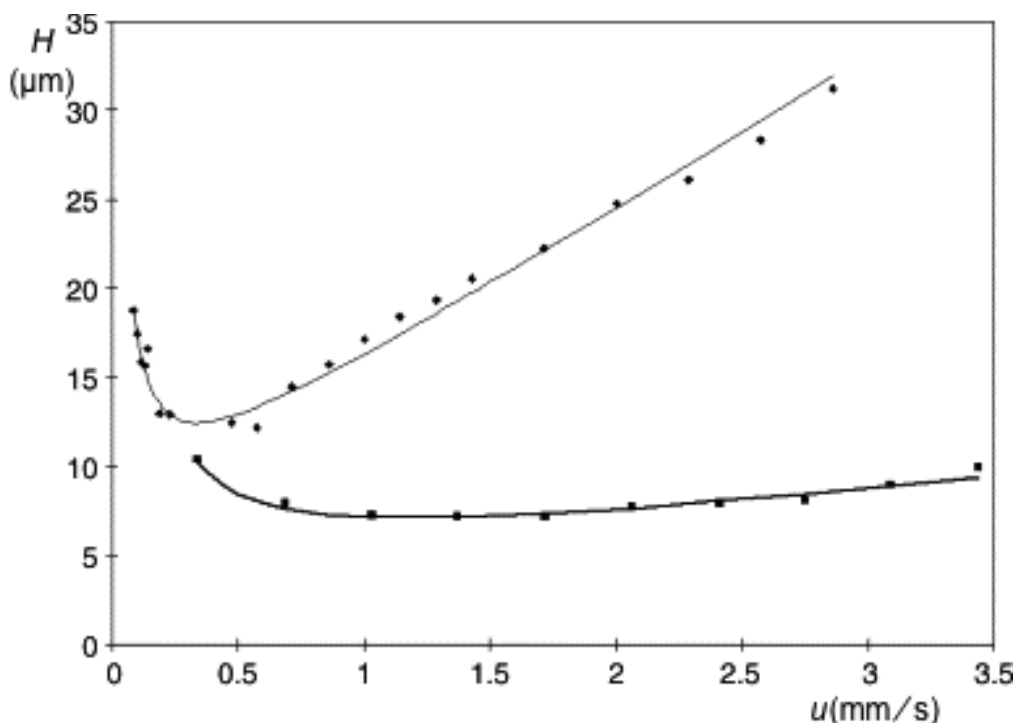
Technologický vývoj LC prakticky kopíruje neustálou snahu o dosažení vyšší separační účinnosti při kratším čase analýzy. Z van Deemterovy rovnice (1) ve zjednodušeném tvaru [3] je patrné, že zvýšení účinnosti separačního systému lze dosáhnout snížením velikosti částic a optimalizací lineární průtokové rychlosti:

$$H = A \cdot d_p + B \cdot D_M / u + C \cdot (d_p)^2 \cdot u / D_M \quad (1)$$

kde  $H$  je výškový ekvivalent teoretického patra,  $A$  koeficient příspěvku vířivé difuze,  $d_p$  velikost částic,  $B$  koeficient příspěvku molekulární difuze,  $D_M$  difuzní koeficient analytu,  $u$  lineární průtoková rychlost a  $C$  koeficient odporu přenosu hmoty.

Na obrázku 1 jsou znázorněny van Deemterovy křivky pro izokratickou analýzu propranololu při použití kolon o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  a 1,7  $\mu\text{m}$  jako typických zástupců podmínek HPLC, respektive UHPLC [3]. Z průběhu křivek jsou patrné hlavní výhody použití malých částic: snížení minimální hodnoty  $H$  a výrazně plošší charakter vzestupné části křivky. V UHPLC se vzrůstající lineární rychlostí, a tedy rychlostí

analýzy nedochází k výrazné ztrátě účinnosti jako u HPLC. Tato vlastnost se dle rovnice (1) projevuje u částic menších než 2,5  $\mu\text{m}$  [4].



**Obr. 1** Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ) na lineární průtokové rychlosti ( $u$ ) pro analýzu propranololu (0,025 mg/mL) za podmínek HPLC (diamanty): kolona Hypersil Advance 150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , mobilní fáze: 25 % acetonitrilu a 75 % vodného 50mmol/L octanamonného pufru o pH 4 a za podmínek UHPLC (čtverce): kolona Acquity BEH  $C_{18}$  100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % vodného 10mM octanamonného pufru o pH 4. Převzato z [3].

Hlavní překážku pro rozšíření kolon s částicemi menšími než 3  $\mu\text{m}$  představoval tlak systému, který se generuje při průtoku mobilní fáze. Velikost zpětného tlaku je nepřímo úměrná druhé mocnině poloměru částice dle Darcyho zákona (2) a při použití optimální lineární průtokové rychlosti  $u_{OPT}$  dle rovnice (3) (získané derivací rovnice (1);  $dH/du$  [3]) je tlak nepřímo úměrný dokonce třetí mocnině  $d_p$  [5].

$$\Delta P = u \cdot l \cdot \eta \cdot \Phi / (d_P)^2 \quad (2)$$

kde  $\Delta P$  je tlakový spád,  $l$  délka kolny,  $\eta$  viskozita mobilní fáze,  $\Phi$  faktor odporu kolony,  $u$  a  $d_P$  mají stejný význam jako v rovnici (1).

$$u_{OPT} = (D_M / d_P) \cdot (B / C)^{1/2} \quad (3)$$

kde  $u_{OPT}$  je optimální lineární průtoková rychlost a ostatní symboly mají význam stejný jako v rovnici (1).

Za optimálního průtoku a shodné délky kolony pak 1,7 $\mu$ m UHPLC částice generují 27krát vyšší tlak než částice o průměru 5  $\mu$ m. Tlakový limit standardní HPLC instrumentace (400 bar) při použití 1,7 $\mu$ m částic by byl dosažen již s kolonami o délce 30 až 50 mm [5]. První významný technický pokrok v instrumentaci čerpadla a injektoru řešící problematiku vysokého tlaku přišel v roce 1997, kdy MacNair a kol. publikoval schéma mikrokapalinového UHPLC systému [6]. Kapilární kolona o délce 66 cm a průměru 30  $\mu$ m byla naplněna 1,5 $\mu$ m neporézními oktadecylovanými částicemi silikagelu při tlaku 4100 barů. Optimální průtok mobilní fáze vyžadoval 1400 barů a bylo dosaženo hodnoty  $H$  2,1  $\mu$ m. Další pokrok v laboratorních podmínkách zahrnoval propojení UHPLC s TOF hmotnostním detektorem v roce 1999 [7], testování gradientového systému a tlaku až 9000 barů při použití 1,0 $\mu$ m částic v témže roce [8] a další vylepšení nástřikového systému v roce 2001 [9]. Prvotní práce o UHPLC využívaly výhradně mechanicky odolných neporézních částic a kapilárních kolon dobře odvádějících frikční teplo z důvodu jejich výhodného poměru povrchu kolony k objemu [5]. Frikční teplo, generované při průtoku mobilní fáze kolonou o průměru 4,6 mm naplněnou 1,0 $\mu$ m neporézními částicemi by vedlo k významnému ohřevu mobilní fáze a ztrátě účinnosti separačního systému vlivem axiálního a radiálního gradientu teploty v koloně [6]. Pro použití porézních 1,5 $\mu$ m částic byl potvrzen průměr kolony 1,0 mm jako plně vyhovující, kdy frikční teplo dosahovalo hodnot běžných v HPLC a nemělo vliv na retenční faktor a separační účinnost [10].

V roce 2004 společnost Waters představila první komerční UHPLC systém Acquity UPLC®. Základem systému bylo binární čerpadlo s vysokotlakým gradientem, inovativní injektor, kolonový termostat s aktivním předehřevem mobilní fáze a spektrofotometrický detektor. Systém byl optimalizovaný pro analýzy při tlaku 1000 barů. Současně byly uvedeny nové UHPLC stacionární fáze z porézních částic o průměru 1,7  $\mu\text{m}$ . Částice byly vyrobeny ze silikagelu, jehož vnitřní struktura byla modifikována ethylenovými můstky (BEH technologie™). Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> separační kolony tedy byly dostatečně mechanicky odolné a zároveň stabilní v rozsahu hodnot pH mobilní fáze 1 - 12 [11, 12]. Stacionární fáze byla naplněna do kolon o průměru 2,1 mm, u kterých frikční teplo nemá významný vliv na separační účinnost [13]. Vysoký tlak a frikční teplo však mají vzájemně opačné efekty na retenci analytů v reverzní chromatografii a chromatografické systémy tedy musí být schopny udržovat konstantní podmínky separace i za podmínek UHPLC [13, 14].

Kontrola tlaku, průtoku, teploty, vysoce odolná těsnění, rychlost a opakovatelnost malých nástřikových objemů, minimální přenos mezi nástřiky, frekvence sběru dat a snížení mrtvého objemu celého systému jsou jen základními parametry, které musely být v rámci vývoje UHPLC výrazně vylepšeny [5, 15, 16]. Zejména systémový objem byl limitujícím parametrem pro velmi rychlé analýzy při použití kolon o rozměrech 50 x 2,1 mm a 50 x 1,0 mm. I přes současný vývoj instrumentace, vlivem mimokolonového objemu může ztráta účinnosti pro tyto kolony dosahovat 20 - 30 %, respektive 30 - 80 % [16]. Rozdíl mezi teoretickou a dosaženou účinností krátkých kolon se také zvyšuje se snižující se velikostí částic [17]. Uvedení Acquity UPLC na trh odstartovalo technologický rozvoj a dnes všichni významní výrobci nabízejí svá UHPLC řešení zahrnující i kvartérní pumpy s nízkotlakým gradientem a detektory rozptylu světla, fluorescenční, refraktometrické a hmotnostní. Jednotlivé systémy se však samozřejmě liší v provedení a konkrétních specifikacích, na což je třeba brát zřetel při vývoji a přenosu metod [16, 18]. V tabulce 1 jsou uvedeny vybrané charakteristiky porovnávací systémy HPLC a UHPLC, které byly použity v rámci této práce.

**Tab. 1** Srovnání hodnot vybraných parametrů: tlak (bar), průtok (mL/min), rozměr kolony (mm), průměr částic ( $\mu\text{m}$ ), objem nástřiku ( $\mu\text{L}$ ), minimální objem vzorku pro nástřik ( $\mu\text{L}$ ), mrtvý objem systému ( $\mu\text{L}$ ), objem detekční cely ( $\mu\text{L}$ ) a frekvence sběru dat (Hz) typických pro systémy HPLC (Waters Alliance 2695) a UHPLC (Waters Acquity UPLC H-Class) s PDA detektory [11].

Parametr	HPLC	UHPLC
maximální tlak (bar)	345	1034
průtok (mL/min)	0,5 - 2,0	0,2 - 0,5
rozměr kolony (mm)	250 x 4,6	100 x 2,1
průměr částic ( $\mu\text{m}$ )	2,7 <sup>a</sup> - 5,0	1,6 <sup>a</sup> - 1,8
objem nástřiku ( $\mu\text{L}$ )	5 - 100	1 - 10
minimální objem vzorku pro nástřik ( $\mu\text{L}$ )	650	360
mrtvý objem systému ( $\mu\text{L}$ )	900	350
objem detekční cely ( $\mu\text{L}$ )	8,4	0,5
frekvence sběru dat (Hz)	1 - 2	10 - 40

<sup>a</sup> částice s pevným jádrem

Vzhledem k technickým rozdílům mezi HPLC a UHPLC systémy je použití kolon naplněných částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  efektivní pouze pro UHPLC chromatografie. Čtyři skupiny fenolických látek (kyseliny, flavonoidy, katechiny a kumariny) byly analyzovány metodami UHPLC (kolona 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) a HPLC (kolona 50 x 4,6 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ). Přestože HPLC metody byly pro stanovení vyhovující, UHPLC metody byly až 8x rychlejší a kromě analýzy katechinů výrazně účinnější, poskytující lepší rozlišení a větší kapacitu píků [19]. Analýzy farmak triamcinolonu, hydrokortisonu, indomethacinu, estradiolu a diklofenaku byly transferovány z HPLC na UHPLC. Porovnáním byly potvrzeny všechny výhody UHPLC oproti HPLC jako zkrácení doby analýzy, nižší spotřeba mobilní fáze, vyšší citlivost a účinnost a tedy i lepší rozlišení analytů bez negativních vlivů vyššího tlaku mobilní fáze [20, 21]. Podobné závěry byly ověřeny i pro stanovení pesticidů v potravinách pro děti metodami HPLC/UHPLC s MS detekcí [22], vitamínu C

v nápojích a léčivých přípravcích [23], kyseliny listové [24], chloroquinu a primaquinu v tabletách [25], trans-10-hydroxy-2-decenové kyseliny v mateří kašičce [26], ftalátu [27] a retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu v lidském séru [28]. Vyšší citlivost UHPLC metody umožnila oproti HPLC přípravu vzorku z polovičního množství lidské plazmy pro stanovení léčiv na potlačení příznaků Alzheimerovy choroby [29]. Nižší průtok mobilní fáze, kratší doba analýzy, a tedy i vyšší počet analýz za jednotku času představují hlavní ekonomickou a ekologickou výhodu UHPLC oproti HPLC. Teoreticky i experimentálně bylo potvrzeno, že lze uspořit až 80 % spotřeby rozpouštědel a nákladů při přenosu metody z HPLC (3,5  $\mu$ m) na UHPLC [30]. Ve dvoudimenzionální chromatografii je pak UHPLC vhodná zejména pro použití ve druhé dimenzi při spojení s HPLC využívající 3 $\mu$ m částice v dimenzi první a to vzhledem ke krátkému mrtvému času, vysoké účinnosti a kapacitě píků UHPLC kolon [31, 32].

Současný vývoj UHPLC se soustředí na neustálé snižování mimokolonových objemů a aplikaci dalších separačních módů jako chirálních separací, HILIC, SEC a IEC [33]. Zavedení UHPLC částic s pevným jádrem přineslo další zvýšení účinnosti separace, avšak nejmodernější 1,3 $\mu$ m částice vytvářejí zpětný tlak na hranici možností UHPLC instrumentace a lze je tak zatím použít pouze v kolonách o délce 50 mm [33, 34]. V následujících letech je očekáván i nárůst aplikací využívajících spojení UHPLC a SFC jako moderní vysoce účinné náhrady chromatografie v normálním módu a chirálních separací nejen ve farmaceutické analýze [33, 35].

### **1.1.2 Stanovení obsahu nečistot v léčivých přípravcích**

Zkouška čistoty účinných látek (API) a léčivých přípravků je v dnešní době jednou ze základních součástí kompletní farmaceutické analýzy. Normativními farmaceutickými díly přispívajícími k zajištění bezpečných, účinných a jakostních léčiv jsou lékopisy. V České republice je platným předpisem Český lékopis (ČL) v aktuálním vydání [36], který ovšem z velké části vychází z lékopisu evropského (Ph. Eur.) [37]. Z pohledu mezinárodní distribuce léčiv jsou dalšími významnými lékopisy: americký (USP) [38], britský (BP) [39] a japonský (JP) [40]. Kromě obecných požadavků na zkušební metody lékopisy uvádějí pro jednotlivé API zpravidla zkoušky totožnosti,

obsahu, případně účinnosti pro antibiotika, a právě čistoty. Americký a Britský lékopis na rozdíl od lékopisu evropského obsahují monografie nejen pro API, ale i pro léčivé přípravky [37 - 39]. V roce 1990 se uskutečnilo první setkání reprezentantů regulačních úřadů a průmyslu z Evropy, USA a Japonska. Byla založena iniciativa ICH a započala tak další fáze mezinárodního sjednocení požadavků na testování a kvalitu léčiv [41]. Podle směrnice ICH lze nečistoty v léčivech a léčivých přípravcích rozdělit na organické, anorganické a zbytková rozpouštědla [42]. Anorganické nečistoty (např. těžké kovy, soli) a zbytková rozpouštědla (např. acetonitril, methanol, aceton) jsou zpravidla známé látky (i toxikologicky) vstupující do syntézy a výroby. Na stanovení těchto nečistot lze tedy po verifikaci aplikovat standardizované postupy a limity uvedené v lékopisech a z pohledu analytické chemie jsou tyto nečistoty výrazně menším problémem než nečistoty organické [43, 44].

Organické nečistoty jsou převážně vstupní reaktanty, meziproducty, vedlejší produkty a degradační produkty. Struktura nečistot může být odvozena z předpokládané syntetické cesty. Směrnice ICH udávají postup pro výpočet identifikačního a kvalifikačního limitu. Pokud se nečistota vyskytuje nad daným limitem, musí být exaktně identifikována, případně musí být kvalifikována její biologická bezpečnost [42, 45]. Pokud je API uvedena v lékopisu zpravidla jsou u ní uvedeny i nečistoty určité syntetické cesty a případně i degradační produkty a jejich limity [36 - 40]. Rozdílné postupy syntézy, složení a formulace konečných léčivých přípravků u jednotlivých výrobců však znamenají, že vždy je nutné lékopisnou metodu verifikovat pro danou API a ve většině případů vyvinout a zvalidovat metodou vlastní. Rovněž je žádoucí provést stresové testy a předběžné stabilitní studie API či léčivého přípravku za účelem získání informace o stabilitě API, identifikace významných degradačních produktů a potvrzení vhodnosti analytické metody pro analýzu stabilitních vzorků (stabilitu indikující metoda) [42, 45]. Metoda stanovení čistoty je tedy nezbytná pro zajištění kvalitních a bezpečných léčiv [44, 46] a jako taková je vyžadována registračními autoritami.

Chromatografická metoda na stanovení čistoty se vzhledem ke své komplexnosti řadí mezi aplikace založené na vysoké účinnosti a rozlišení, jelikož musí být odděleny všechny nečistoty od sebe samotných, od hlavní látky nebo látek, píků placebo a rozpouštědla vzorku. Naproti tomu jednoduché metody na stanovení obsahu hlavních látek nemusí být natolik selektivní a vyvíjí se jako rychlé metody na krátkých kolonách (30 a 50 mm pro UHPLC) s cílem co možná nejvyššího počtu vzorků za jednotku času [47]. Kritickými parametry u metod na stanovení čistoty jsou právě selektivita, citlivost, opakovatelnost a robustnost. Pro dosažení dostatečné účinnosti a rozlišení se metody na čistotu zpravidla vyvíjí na delších kolonách (100 nebo 150 mm pro UHPLC) a čas analýzy není určujícím parametrem [47, 48].

Vývoj chromatografické metody začíná definováním jejího účelu a studiem dostupné literatury. Následují prvotní experimenty založené na teoretických znalostech, případně aplikace pozvolných gradientů na různých kolonách, testování vhodné oblasti pH pufru a parametrů detekce. Z iniciační fáze se vybere nejvhodnější kolona, oblast pH pufru a následuje optimalizace jednotlivých parametrů metody: gradientový program, přesné pH pufru, teplota, případně testování dalších typů kolon. Pro zajištění dostatečné selektivity se vývoj metody provádí se vzorkem spikovaným známými nečistotami, případně vzorkem stresovaným teplem a vlhkem, který by měl obsahovat i hlavní degradační produkty. Rozpouštědlo vzorku musí být kompatibilní s počátečními podmínkami gradientu, aby nedocházelo k deformaci píků na počátku analýzy. Konečným krokem je předběžné ověření opakovatelnosti, citlivosti a linearitě metody před vlastní validací [48].

Dostatečné citlivosti metod na čistotu je často dosaženo výrazným koncentračním předávkováním hlavní látky, které v UHPLC vedou i přes vyšší účinnost k méně symetrickým píkům než v HPLC, což může mít za následek nesplnění lékopisných kritérií [49]. UHPLC oproti HPLC přináší výhody zejména v rychlosti testování jednotlivých parametrů, jelikož časy analýzy a ekvilibrace kolon jsou významně kratší. Optimalizace metody také může být efektivněji zautomatizována pomocí vhodného softwaru a výběru kritických parametrů [48, 50]. Nevýhodami UHPLC jsou nutnost vlastnit odpovídající chromatograf, jehož pořízení je asi o 25 % finančně nákladnější, a

prozatím ne tak široká nabídka stacionárních fází jako pro HPLC [48]. Laboratoře rutinních analýz často nebývají vybaveny UHPLC chromatografy a vyvinutá metoda se tak musí zpětně transferovat na HPLC instrumentaci. Široce využívané jsou tak alternativy k UHPLC poskytující rychlé a účinné separace jako monolitické kolony a stacionární fáze s pevným jádrem [51]. Směrnice ICH o validaci analytických metod předepisuje pro metodu na stanovení čistoty validovat parametry preciznost, přesnost, linearitu, citlivost, selektivitu a robustnost [52]. Preciznost metody vyjadřuje, například pomocí RSD, těsnost shody výsledků získaných opakovanou analýzou minimálně šesti příprav téhož vzorku v rámci jednoho měření. Součástí ověření preciznosti je i mezilehlá preciznost, což je vnitrolaboratorní reprodukovatelnost, kdy stejný vzorek je šestkrát analyzován jiným analytikem, v jiný den pomocí jiné instrumentace. Mezilehlá preciznost se vyjadřuje jako rozdíl mezi absolutními výsledky obou analytiků, případně jako RSD výsledků všech dvanácti příprav [53].

Přesnost metody je těsnost shody mezi naměřenou a správnou hodnotou. Číselně se ověřuje jako procentuální výtěžnost metody analýzou vzorků spikovaných známým množstvím nečistot na několika hladinách pokrývajících rozsah metody. Schopností metody poskytovat odezvu přímo úměrnou koncentraci je linearita metody, která definuje pracovní rozsah metody. Stanovované nečistoty by dle směrnice ICH měly být validovány v rozsahu od reportovacího limitu po 120 % specifikačního limitu [52]. Poměr směrníc regresních křivek nečistoty a API z linearity je odezvový faktor nečistoty vůči hlavní látce, na kterou se nečistoty kvantifikují (převážně z důvodu vysoké pořizovací ceny referenčních standardů nečistot) [54]. Citlivost metody se ověřuje stanovením LOD a LOQ, přičemž hodnota LOQ by neměla být vyšší než reportovací limit nečistoty. LOD i LOQ mohou být vypočteny na základě poměru signálu k šumu, případně pomocí směrnice a směrodatné odchylky úseku regresní křivky či signálu pozadí [45, 52].

Analýzou placebo, rozpouštědla vzorku a vzorku spikovaného všemi dostupnými nečistotami se ověřuje selektivita metody, tedy její schopnost stanovení analytu v přítomnosti potenciálně interferujících látek [52, 53, 55, 56]. Velmi důležitou součástí validace je studie robustnosti metody, neboli její odolnosti vůči malým experimentálním

změnám, které by mohly nastat v rutinním provozu. V případě HPLC/UHPLC metod se sleduje vliv parametrů, jako složení a průtok mobilní fáze, teplota kolony, koncentrace a pH pufru, stabilita roztoků a ověření analýzy na více kolonách stejného typu [52, 53, 56].

Degradační studie se provádí za účelem potvrzení vhodnosti metody pro analýzu stabilitních vzorků. Léčivý přípravek se zatíží stresovými podmínkami tak, aby účinné látky degradovaly z 5 až 15 procent a simulovaly tak potenciální degradaci přípravku během jeho životního cyklu. Standardními podmínkami jsou zvýšená teplota, vlhkost, kyselé, zásadité a oxidační prostředí a expozice denním světlem, případně UV zářením. Analýzou degradovaných vzorků se ověřuje separace a případná identifikace degradačních produktů a spektrální čistota píků hlavních látek. Jsou-li všechny významné degradační produkty separovány a není indikace o koeluci neznámých látek s píky API, analytická metoda je vhodná pro měření stabilitních vzorků [52].

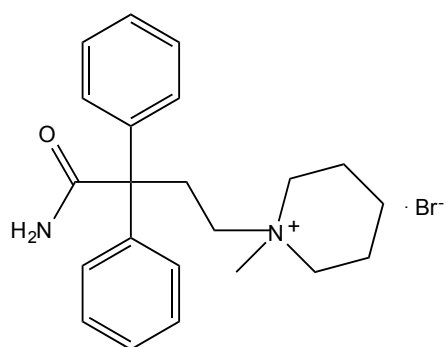
### **1.1.3 Stanovení obsahu nečistot ve Spasmopanu®**

Spasmopan® je léčivý přípravek kombinující v čípkové lékové formě čtyři účinné látky: paracetamol, kodein fosfát hemihydrát, pitofenon hydrochlorid a fempiverin bromid. Spasmopan® se užívá na tlumení bolestivých křečí trávicího traktu a močového měchýře. Kombinuje analgetické a antipyretické účinky paracetamolu [57] s analgetickými a antimotolickými účinky kodeinu [58] a spasmolytickými účinky pitofenonu a fempiverinu [59]. Český, Evropský, Britský, Americký i Japonský lékopis obsahují monografie pouze pro paracetamol a kodein fosfát hemihydrát [36 - 40].

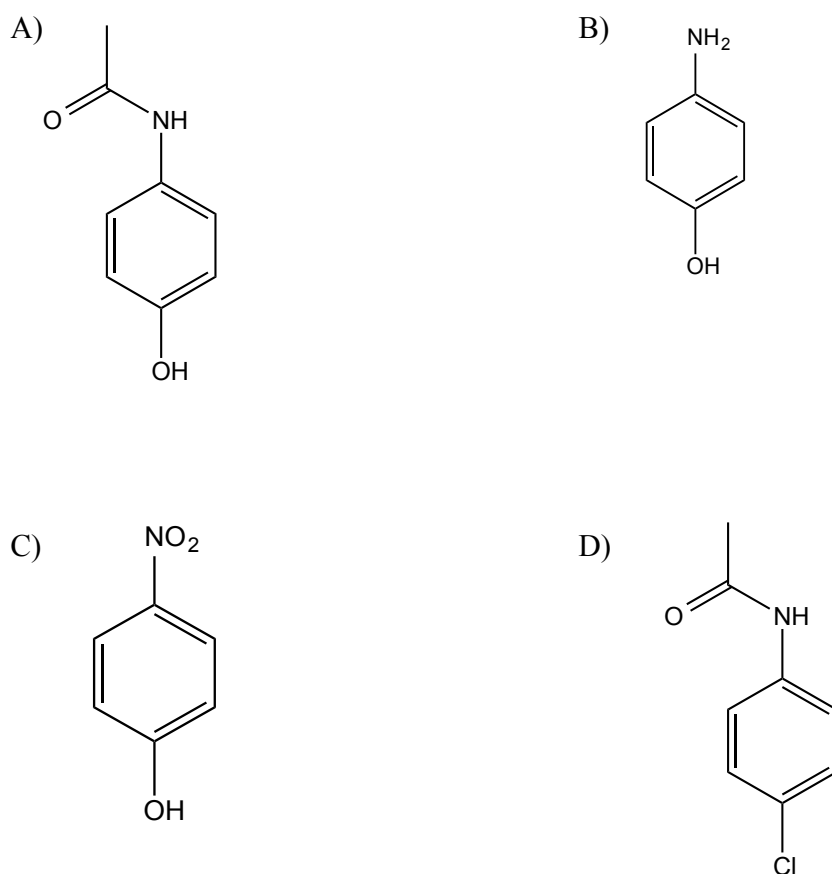
Paracetamol je obecně používán ve vysokých dávkách a může být hepatotoxický [60]. Lékopisné limity pro jeho nečistoty 4-aminofenol, 4-nitrofenol a 4-chloracetanilid jsou tedy velmi nízké (0,005 %, 0,05 % a 0,001 %) [36 - 40]. V lékových formách musí být kontrolován především obsah nefrotoxického 4-aminofenolu [61] jako hlavního degradačního produktu paracetamolu [62]. Přestože paracetamol byl analyzován mnoha různými metodami jako micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC) [63], mikroemulzní kapalinovou a elektrokinetickou chromatografií [64], fluorimetrickou spektroskopií [65, 66], NMR [67, 68] a

TLC [69, 70], HPLC metody s UV spektrometrickou detekcí byly pravděpodobně nejčastěji používanými [71 - 76]. Pro chromatografické stanovení 4-aminofenolu byla rovněž použita ampérometrická detekce [77]. Byly vyvinuty stabilitu indukující HPLC metody na kvantifikaci účinných látek pro kombinace kodein fosfátu, paracetamolu a chlorfeniraminu [39, 78 - 80] a pro analýzu kombinace ibuprofenu, kodeinu a jejich nečistot byla validována MEKC metoda [81]. Jelikož metoda na stanovení čistoty kodeinu je definována lékopisně, a přestože neseperuje nečistoty 10-hydroxykodein a morfin [37], výzkum byl soustředěn na stanovení kodeinu samotného, především ve směsi alkaloidů [82 - 86]. Pitofenon hydrochlorid byl analyzován pouze jako součást screeningových testů [87 - 90] a obsahovými metodami spektrofotometrickými [91, 92] a chromatografickými [93 - 96]. Na rozdíl od paracetamolu a kodeinu, metoda na stanovení čistoty pitofenonu nebyla dosud publikována.

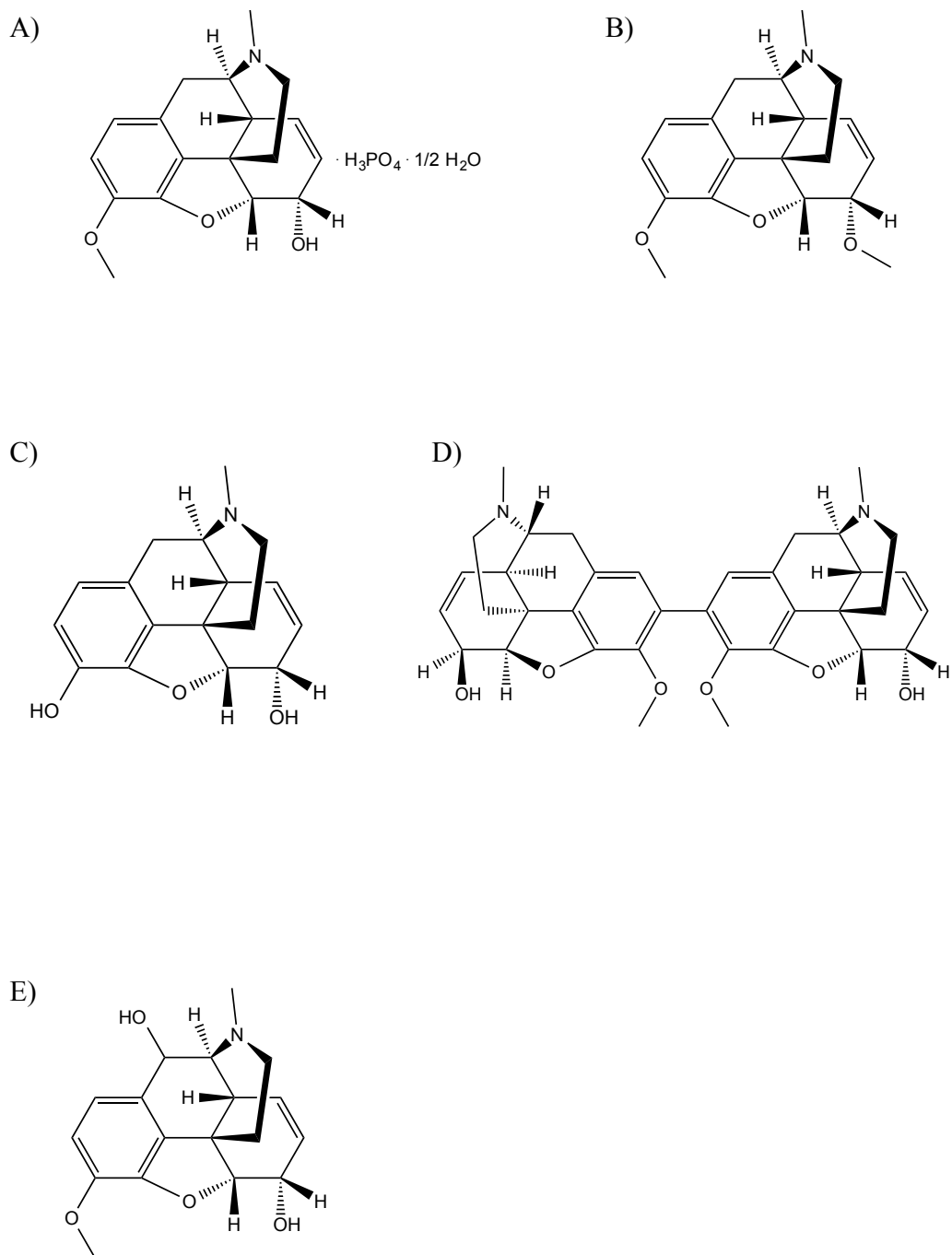
Přestože Spasmopan<sup>®</sup> je dostupný na trhu od roku 1987, metoda na stanovení obsahu nečistot podle současné legislativy musela být vyvinuta a validována [97]. Struktury všech API a nečistot paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu jsou znázorněny na obrázcích 2 až 5. Nečistoty fempiverin bromidu nebyly v této práci relevantní z důvodu nízkého obsahu fempiverin bromidu ve Spasmopan<sup>®</sup> (0,02 % vzhledem k obsahu paracetamolu) [97].



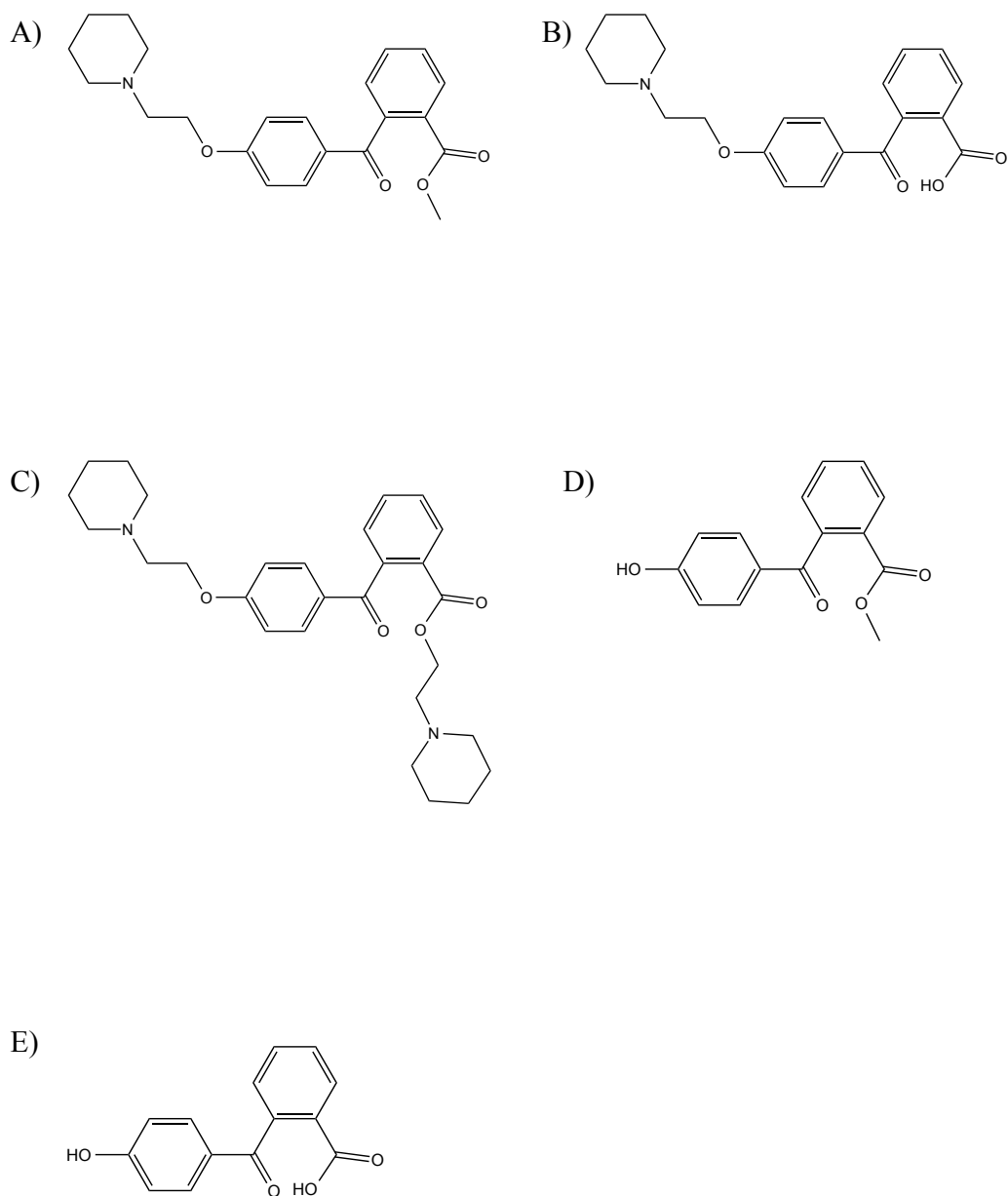
**Obr. 2** *Struktura fenpiverin bromidu*



**Obr. 3** *Struktury paracetamolu a jeho nečistot dle Ph. Eur. [37]. A) paracetamol, B) nečistota K, C) nečistota F, D) nečistota J.*



**Obr. 4** *Struktury kodeinu a jeho nečistot dle Ph. Eur [37]. A) kodein fosfát hemihydrát, B) nečistota A, C) nečistota B, D) nečistota C, E) nečistota E.*



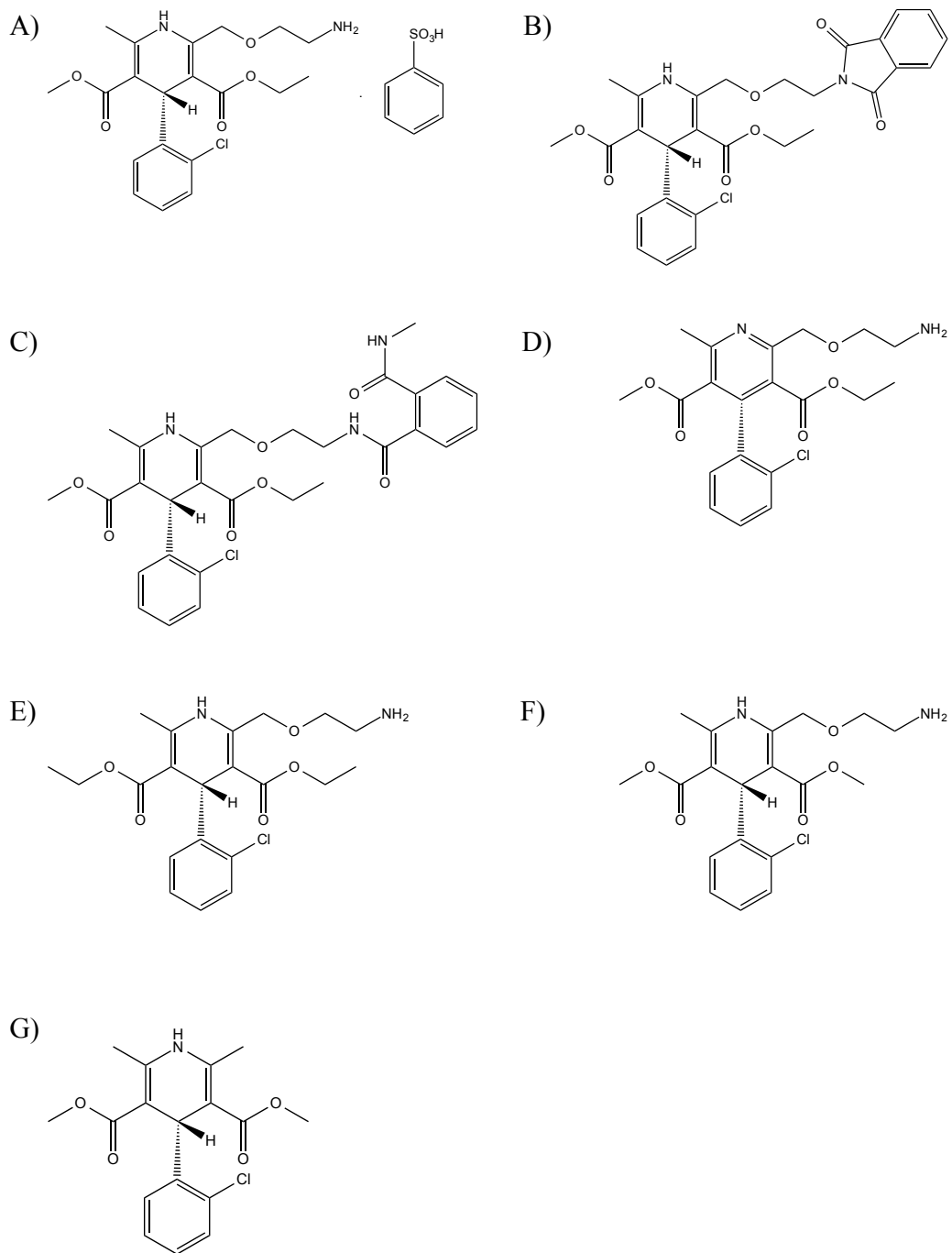
**Obr. 5** *Struktury pitofenonu a jeho nečistot. A) pitofenon: methyl ester 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl] benzoové kyseliny, B) nečistota X: 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl] benzoová kyselina, C) nečistota PEE: 2-(1-piperidinyl)-ethyl ester 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl]benzoové kyseliny, D) nečistota MeKHBB: methyl ester 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoové kyseliny, E) nečistota KHBB: 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoová kyselina (vše od Zentiva, k.s.).*

#### **1.1.4 Stanovení obsahu nečistot v tabletách kombinujících valsartan, amlodipin besilát a hydrochlorothiazid**

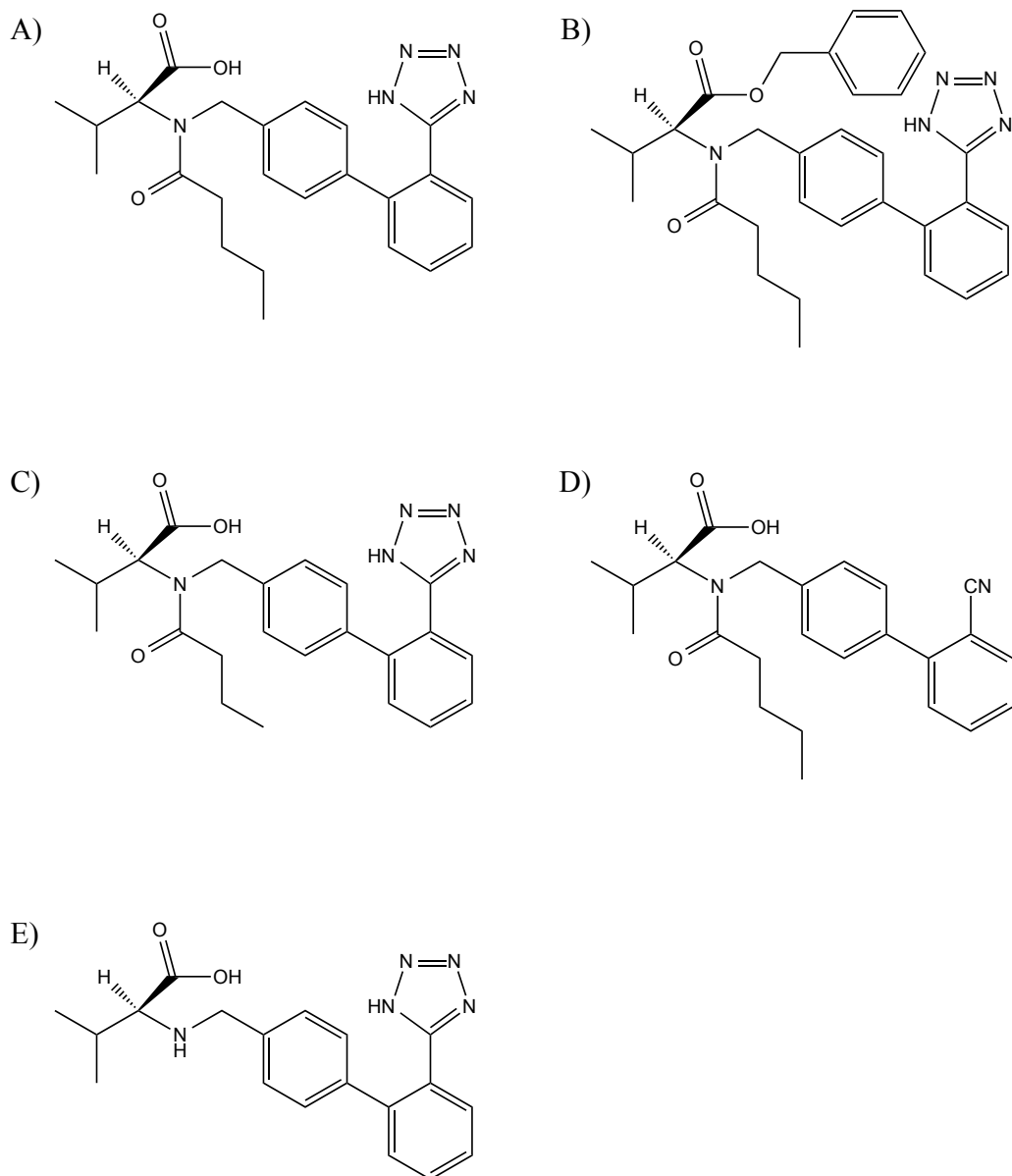
Vysoký krevní tlak je jedním z globálních zdravotních problémů dnešní doby. Je klíčovým faktorem způsobujícím infarkt myokardu a mozkovou mrtvici, a nepřímo tak způsobuje úmrtí 9,4 milionu lidí ročně po celém světě [98]. U většiny pacientů léčba kombinující více přístupů ke snížení hypertenze přináší lepší kontrolu krevního tlaku než terapie pouze jednou účinnou látkou [99]. Valsartan působí jako antagonist angiotensinového receptoru II v renin-angiotensinovém systému, jeho přítomností dochází k vazodilataci a snížení krevního tlaku. Hydrochlorothiazid se řadí do skupiny diuretik a snižuje krevní tlak prostým snížením celkového objemu tekutiny v těle [57]. Amlodipin rovněž způsobuje vazodilatační efekt, ovšem skrze blokaci kalciových kanálů [100].

Všechny tři API jsou široce používané a příslušné lékopisy obsahují jejich monografie definující HPLC metody pro stanovení jejich čistoty [36 - 40]. Pro valsartan a amlodipin byly publikovány i UHPLC metody separující jejich nečistoty [101 - 102]. Léčivé přípravky kombinující valsartan a hydrochlorothiazid byly analyzovány převážně pouze obsahovými metodami [103 - 108] a případné metody na stanovení čistoty této dvojkombinace se zaměřily pouze na jednu nečistotu od každé API [38, 109]. Pro kombinaci amlodipin besilátu a valsartanu byly publikovány pouze metody na stanovení obsahu API [110 - 116] stejně jako pro kombinaci amlodipin besilátu a hydrochlorothiazidu s olmesartan medoxomilem [117 - 119] nebo aliskiren hemifumarátem [120, 121]. Obsah nečistot hydrochlorothiazidu byl stanoven metodami reverzní HPLC společně s nečistotami losartanu [122] a telmisartanu [123], dále pak stabilitu indikující UHPLC metodou pro kombinaci hydrochlorothiazidu s eprosartanem [124] a iontově párovou a reverzní HPLC metodou pro kombinaci s lisinoprilem [125, 126]. Hlavní degradační produkt amlodipinu, nečistota D dle Ph. Eur. [37], byla kvantifikována stabilitu indikující metodou na stanovení čistoty pro kombinaci amlodipinu s atorvastatin kalcielem [127] a amlodipinu s benazeprilem [128].

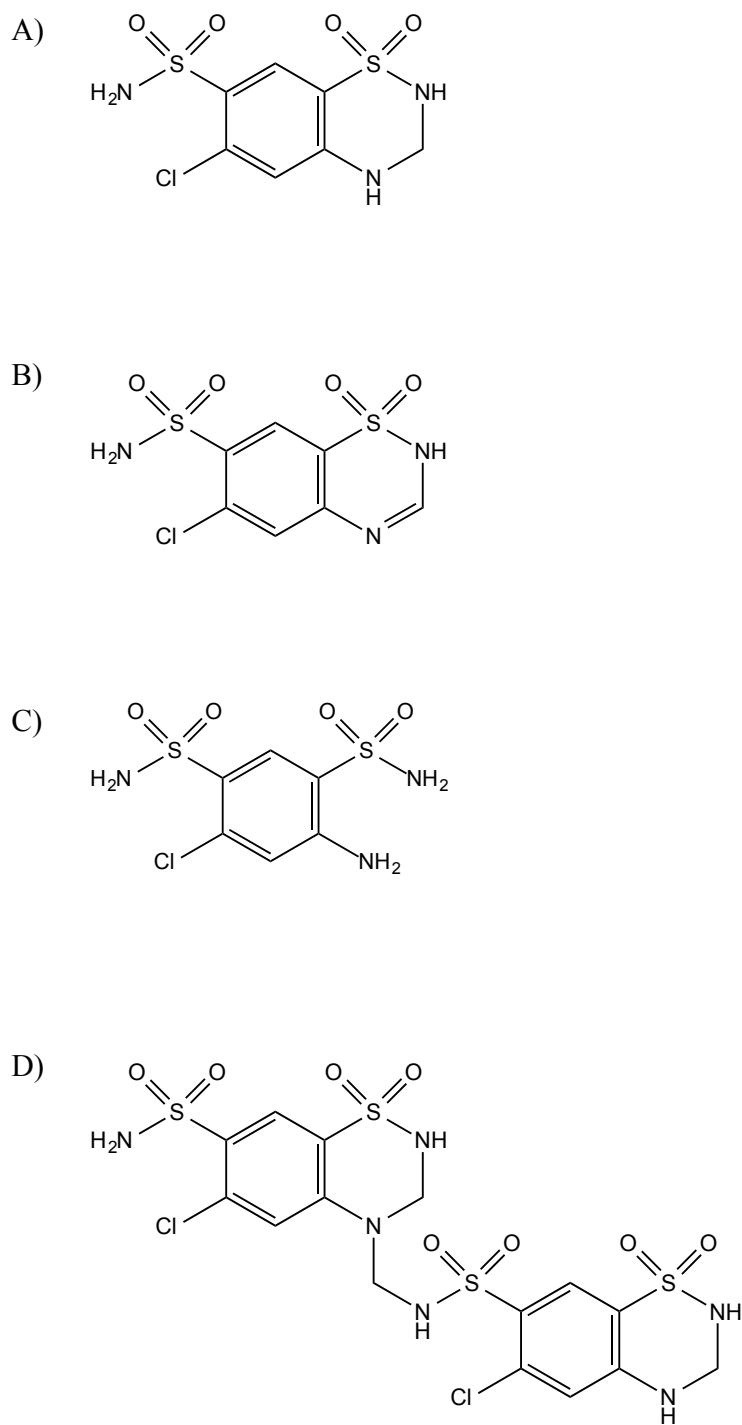
Pro léčivé přípravky kombinující valsartan, amlodipin a hydrochlorothiazid byly dosud publikovány pouze HPLC metody na stanovení obsahu účinných látek [129]. Retenční pořadí těchto tří API v reverzní chromatografii závisí na pH pufru v mobilní fázi. V silně kyselém pH hydrochlorothiazid eluuje jako první, následuje amlodipin a nakonec valsartan [130 - 138]. Při použití pufru s mírně kyselým nebo neutrálním pH se retenční pořadí amlodipinu a valsartanu obrátí [139 - 142]. V závislosti na konkrétní metodě v neutrálním nebo zásaditém prostředí se retence valsartanu sníží natolik, že eluuje jako první, hydrochlorothiazid pak jako druhý a amlodipin jako poslední [143, 144]. Pouze dvě obsahové metody byly publikovány jako stabilitu indikující, přestože nebyla poskytnuta data o spektrální čistotě píků či identifikace degradačních produktů [131, 145]. Obsah amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu v trojkombinaci byl stanoven i spektrofotometrickými metodami [137, 146 - 148]. Stabilitu indikující metoda na stanovení obsahu nečistot a žádná UHPLC metoda obecně dosud nebyla publikována pro trojkombinaci účinných látek valsartan, hydrochlorothiazid, amlodipin [129]. V USP bude pravděpodobně uvedena příslušná monografie s HPLC metodou, aktuální verze však obsahuje informaci pouze o separační koloně a žádné další detaily [38]. Na obrázcích 6 - 8 jsou znázorněny struktury amlodipinu, valsartanu, hydrochlorothiazidu a jejich nečistot použitých v rámci této práce.



**Obr. 6** *Struktury amlodipin besilátu a jeho nečistot dle Ph. Eur [37]. A) amlodipin besilát, B) nečistota A, C) nečistota B, D) nečistota D, E) nečistota E, F) nečistota F, G) nečistota G.*



**Obr. 7** *Struktury valsartanu a jeho nečistot. A) valsartan, B) nečistota B, C) nečistota C, vše dle Ph. Eur. [37] D) nečistota 07: (S)-2-(N-{[2'-kyanobifenyl-4-yl]methyl}pentanamido)-3-methylbutanová kyselina, E) nečistota 09: (S)-3-methyl-2-{[2'-(1H-tetrazol-5-yl)bifenyl-4-yl]methylamino}butanová kyselina*

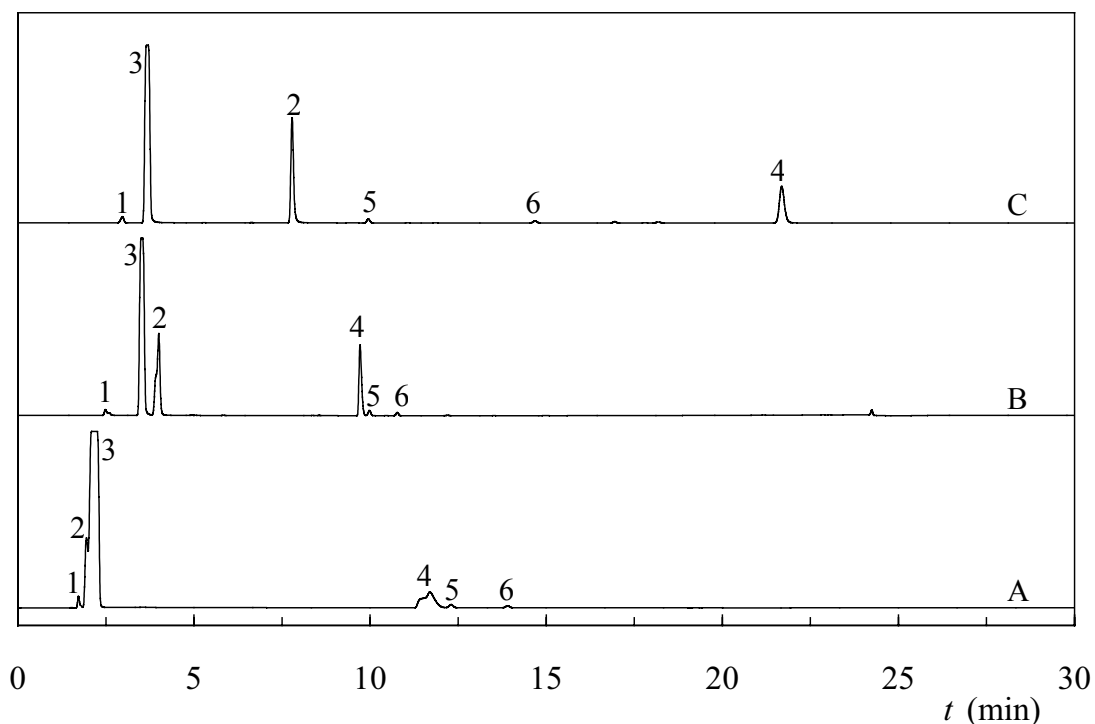


**Obr. 8** *Struktury hydrochlorothiazidu a jeho nečistot dle Ph. Eur. [37].  
A) hydrochlorothiazid, B) nečistota A, C) nečistota B, D) nečistota C.*

## 1.2 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci I

### 1.2.1 Data a komentář k vývoji RP-HPLC metody

Prvním cílem pro separaci API a nečistot ve Spasmopanu® byl vývoj RP-HPLC metody založené na porézních částicích o průměru 3  $\mu\text{m}$  nebo 2,7 $\mu\text{m}$  částicích s pevným jádrem. Zvolené stacionární fáze s nižším zrněním než 5  $\mu\text{m}$  umožnily použití 150mm a 100mm kolon, a tedy vývoj rychlých a přitom dostatečně účinných metod. Vývoj UHPLC metody nebyl realizován z důvodu přístrojového vybavení cílové laboratoře kontroly kvality a potenciálního ucpávání UHPLC kolon zbytkovými složkami placeba. Vzhledem k polaritě paracetamolu, kodeinu a jejich nečistot jsou lékopisné metody založeny na iontově párové chromatografii [37, 38]. Iniciační experimenty v chromatografickém módu RP-HPLC tedy byly zaměřeny na orientační testování kolon a hodnot pH při sledování retence zejména kodeinu, paracetamolu a jeho nečistot. Na obrázku 9 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami v 50% acetonitrilu (viz kapitola 1.2.3) na koloně ACE 3 (C<sub>18</sub>), 150 x 4,6 mm, velikost částic 3  $\mu\text{m}$  (Advanced chromatography technologies; Aberdeen, Skotsko), při použití 10mmol/L fosforečnanového pufru o hodnotách pH 3,0, 5,5 a 7,0. Vzhledem k předpokládané slabé retenci polárních látek byl zvolen pozvolný gradient začínající na 15 % acetonitrilu (gradient 1) pro hodnoty pH pufru 3,0 a 7,0 a na základě těchto analýz byl gradient zrychlen pro analýzu s puftrem o hodnotě pH 5,5 (gradient 2). Znázorněno je prvních 30 minut měření, během kterých eluovaly všechny cílové analyty. Analýzy byly provedeny na systému Acquity UPLC H-Class (viz Publikace II) převedeného do módu pro měření s HPLC kolonami.



**Obr. 9** Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J, a K na hladině 0,1 %. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: ACE 3 (C<sub>18</sub>) 150 x 4,6 mm, 3 μm. Teplota kolony: 25 °C. Objem nástřiku: 5 μL. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufr o pH 3,0 (A), 5,5 (B) a 7,0 (C). Průtok: 0,8 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)] chromatogramy A, C (gradient 1): 0/15, 8/30, 40/60, 45/60, 46/15, 60/15 a chromatogram B (gradient 2): 0/15, 22/85, 23/15, 30/15. Identifikace píků: 1 - nečistota K, 2 - kodein, 3 - paracetamol, 4 - pitofenon, 5 - nečistota F, 6 - nečistota J.

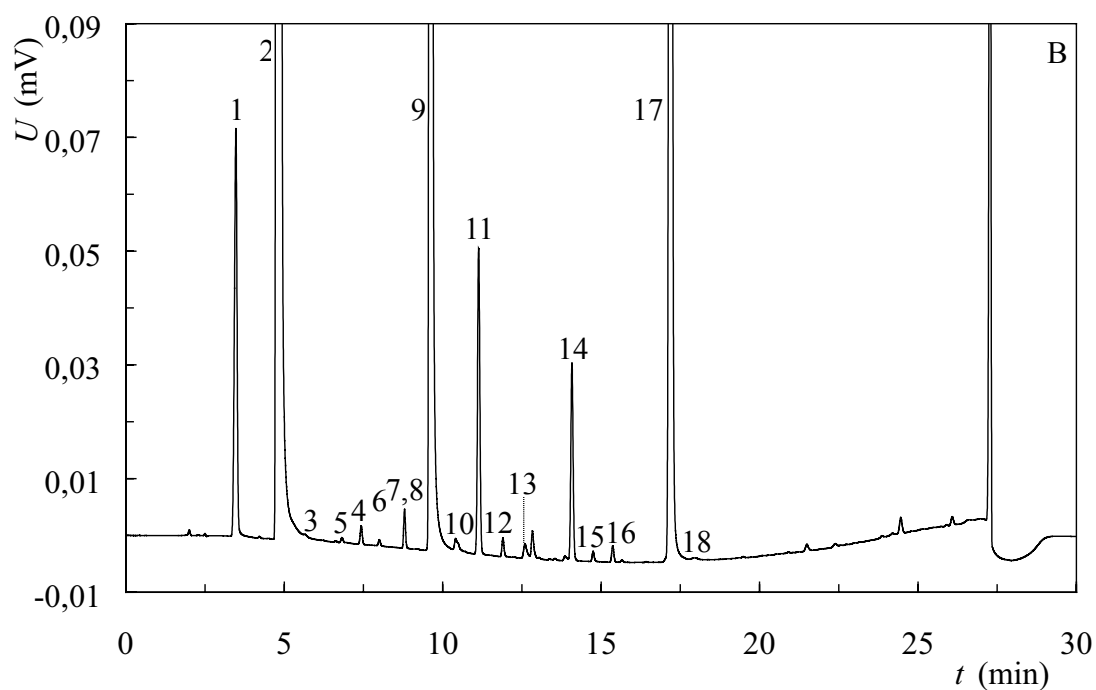
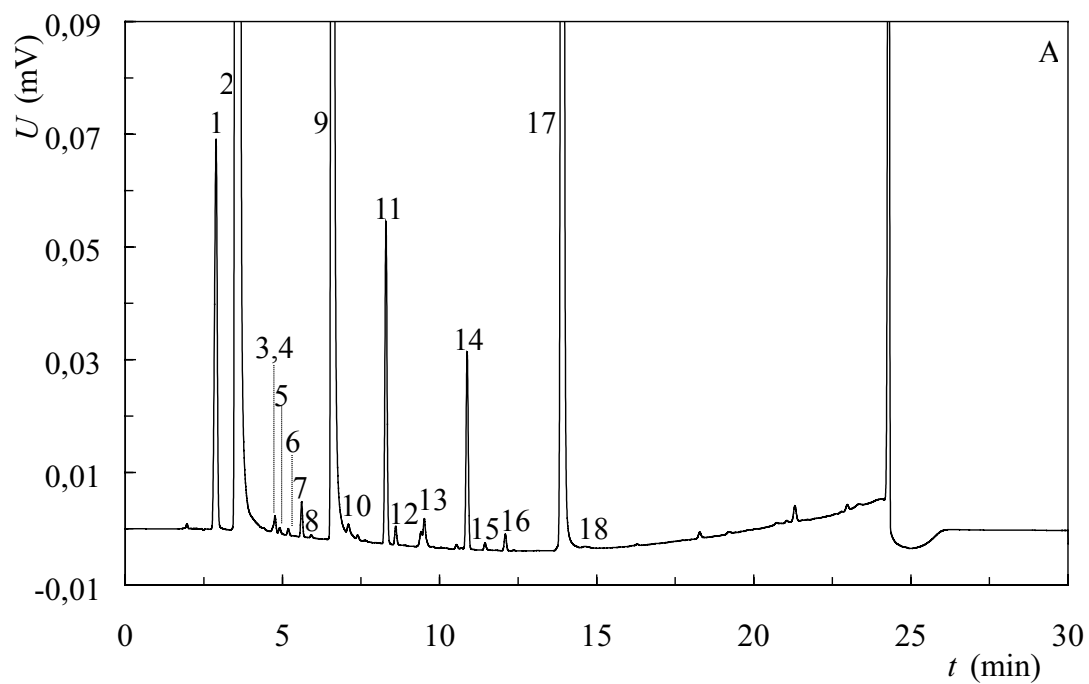
Z obrázku 9 je patrný významný vliv pH pufru především na retenci kodeinu. Při použití pufru o pH 3,0 kodein prakticky koeluoval s paracetamolem, zatímco při pH 7,0 byly všechny API dostatečně odděleny v pořadí paracetamol, kodein a pitofenon. V neutrálním pH rovněž došlo ke změně retenčního pořadí pitofenonu a nečistot F a J oproti analýzám v kyselém prostředí vlivem zejména zvýšení retence pitofenonu. Při použití pufru o neutrálním pH bylo dosaženo symetrických píků nečistoty K, kodeinu a pitofenonu na rozdíl od analýz s pufrů o pH 3,0 a 5,5, kdy byly tyto píky deformovány.

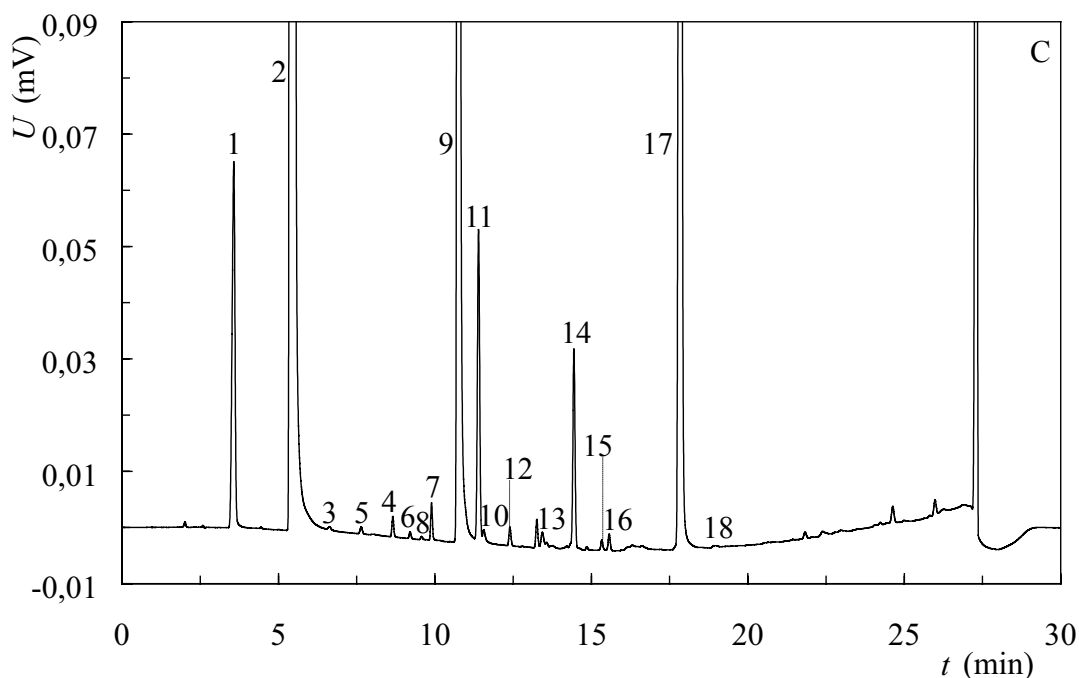
Nejvhodnějšími podmínkami pro další vývoj metody na koloně ACE 3 tedy bylo použití pufru o pH 7,0 a gradientu 2 odpovídajícího chromatogramu B, který významně zkrátí dobu analýzy. Druhou uvažovanou možností bylo použití kolony využívající stacionární fázi s částicemi s pevným jádrem. Byla testována kolona Ascentis Express

RP-Amid 100 x 3,0 mm, velikost částic 2,7  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika), vhodná pro separace polárních látek, s pufrů o hodnotách pH 3,0 a 7,0. Vzhledem k rozdílným rozměrům kolon, byl použit gradient 3 ( $[t \text{ (min)}/\text{acetonitril}(\%)]$ ): 0/15, 12/85, 13/15, 17/15; průtok 0,5 mL/min), přibližně odpovídající gradientu 2 (přepočteno pomocí softwaru Acquity UPLC columns calculator™, Waters; Milford, USA). V kyselém prostředí bylo eluční pořadí srovnatelné s kolonou ACE 3, pík kodeinu na koloně RP-Amid byl však deformován a koeluoval s nečistotou K. Při použití neutrálního pufru byla analýza na koloně RP-Amid přibližně dvakrát rychlejší než na koloně ACE 3. Retenční pořadí hlavních látek bylo pro obě kolony srovnatelné (nečistota K, paracetamol, kodein, nečistota F, nečistota J a pitofenon). Retenční čas pitofenonu na koloně RP-Amid byl 6,9 min a na koloně ACE 3 13,9 min, nicméně zrychlení analýzy na koloně RP-Amid zapříčinilo výrazné snížení rozlišení mezi paracetamolem a kodeinem (2x) a nečistotami F a J (5x). Na koloně RP-Amid tedy došlo ke koeluci dalších nečistot paracetamolu a pitofenonu, které na koloně ACE 3 eluují mezi paracetamolem a kodeinem (viz dále). Zlepšení separace na koloně Ascentis Express RP-Amid by pravděpodobně bylo dosaženo úpravou gradientového programu, který by lépe zohledňoval technologii částic s pevným jádrem. I přes delší čas analýzy byla do dalšího vývoje však zvolena kolona ACE 3 poskytující dostatečnou počáteční selektivitu.

Po primární selekci separační kolony a oblasti pH pufru vhodné pro analýzu byly experimenty zaměřeny na optimalizaci gradientového programu. Bylo sledováno retenční chování píků přítomných ve vzorku spikovaném všemi nečistotami paracetamolu F, J a K. Nečistoty pitofenonu a nečistota A kodeinu byly identifikovány na základě shody retenčních časů píků s referenčními roztoky nečistot a UV spekter. Nečistoty C a E kodeinu byly přiřazeny kodeinu na základě analýzy samotné API, UV spekter a identifikovány zpětně po analýzách metodou IP-RP-HPLC (viz kapitola 1.2.2). Nečistota B kodeinu nebyla v této části vývoje použita z důvodu nedostupnosti. Neznámé nečistoty byly přiřazeny ke konkrétním API na základě podobnosti UV spekter, případně analýzy samotné API tyto nečistoty obsahující. Na obrázcích 10 A - 10 C jsou znázorněny chromatogramy analýz spikovaného vzorku na koloně

ACE 3 (C<sub>18</sub>), 150 x 4,6 mm, 3 μm při použití 10mmol/L fosforečnanového pufru o pH 7,0 s gradientovou elucí acetonitrilu, případně methanolu (gradienty 2, 4 a 5).

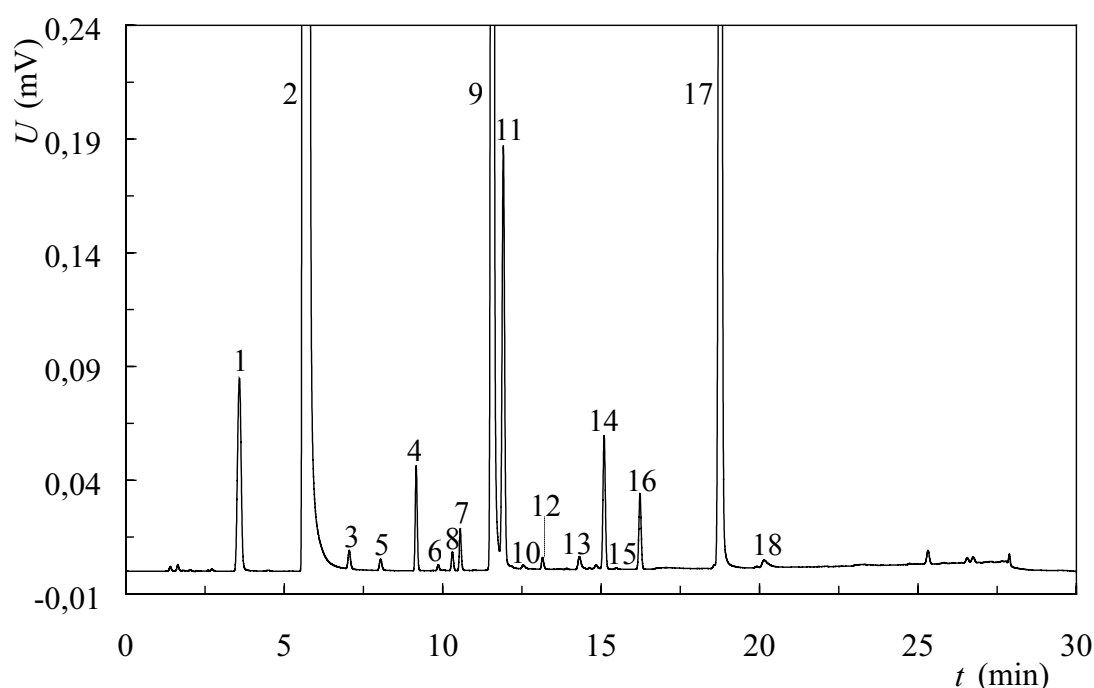




**Obř. 10** Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J, K na hladině 0,1 % na systému Waters UPLC H-Class. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: ACE 3 C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm, 3 μm. Teplota kolony: 25 °C. Objem nástřiku: 5 μL. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufr o pH 7,0. Průtok: 0,8 mL/min. A) Gradient 2: [t(min)/acetonitril(%)] 0/15, 22/85, 23/15, 30/15. B) Gradient 4:[t(min)/acetonitril(%)] 0/10, 5/20, 25/85, 26/10, 35/10. C) Gradient 5:[t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)] 0/5/5, 5/15/5, 25/85/0, 26/5/5, 35/5/5. Identifikace píků: 1 - nečistota K, 2 - paracetamol, 3, 5, 8 - neznámé nečistoty paracetamolu, 4 - nečistota KHBB, 6 - nečistota E, 7 - nečistota X, 9 - kodein, 10 - nečistota C, 11 - nečistota F, 12 - fempiverin, 13 - nečistota A, 14 - nečistota J, 15 - neznámá nečistota kodeinu, 16 - nečistota MeKHBB, 17 - pitofenon, 18 - nečistota PEE.

Neidentifikované píky v chromatogramech pocházejí z rozpouštědla vzorku či se jedná o píky způsobené změnami v gradientu (například poslední pík v chromatogramu). Neoznačený pík elující v blízkosti nečistoty A kodeinu byl identifikován jako doprovodný pík ze standardu nečistoty F paracetamolu. Separace nečistot elujících mezi paracetamolem a kodeinem byla kritickou oblastí analýzy. Použití gradientu 4 vedlo k rozlišení píků neznámé nečistoty paracetamolu a nečistoty KHBB, ale zapříčinilo koeluci jiné neznámé nečistoty paracetamolu s nečistotou X pitofenonu. Všech šest píků retenčně spadajících do této části záznamu bylo odděleno až při použití gradientu 5, který oproti úvodnímu gradientu 2 byl prvních pět minut

méně strmý a zároveň obsahoval methanol na úkor obsahu elučně silnějšího acetonitrilu při zachování poměru vodné a organické složky mobilní fáze v jednotlivých fázích gradientu. Z porovnání chromatogramů B a C je patrný vliv obsahu methanolu zejména na retenci kodeinu a jeho nečistoty C. Retenční faktor kodeinu a nečistoty C se při použití methanolu v gradientu 5 zvýšil z 3,82 na 4,32, respektive z 4,24 na 4,75, zatímco retenční faktor nečistoty F se zvýšil výrazně méně z 4,57 na 4,64. Tento efekt způsobil přiblížení kodeinu k nečistotě F a její koeluci s nečistotou C. Koeluce těchto dvou nečistot byla vyřešena přenesením metody z UPLC systému H-Class na klasický HPLC systém Alliance. Chromatogram analýzy spikovaného vzorku provedené se systémem Alliance je znázorněn na obrázku 11.



**Obr. 11** Analýza vzorku Spasmopanu® (jiná šarže oproti obr. 10) spikovaného nečistotami paracetamolu J (hladina 0,2%), F (hladina 0,3 %) a K (hladina 0,2%) a nečistotami pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE na hladině 0,2 %. Analyzováno na HPLC systému Waters Alliance 2695. Instrumentální podmínky a identifikace pík viz obr. 10, gradientový program 5.

Vlivem rozdílné instrumentace nečistota F eluovala blíže ke kodeinu, přičemž rozlišení ( $R$ ) těchto dvou pík kleslo z 2,0 na 1,0. Nečistota F však není degradačním produktem paracetamolu a její obsah je kontrolován metodou na stanovení čistoty API

paracetamolu. V lékové formě by tedy pravděpodobně byla přítomna na hladině nižší než reportovací limit [45] a hraniční rozlišení 1,0 tak bylo akceptovatelné. Nečistota C se pak vydělila od nečistoty F ( $R = 1,8$ ) a separace všech ostatních píků zůstala zachována, jak je znázorněno výše na obrázku 11. Metoda využívající kolonu ACE 3 C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm a velikosti částic 3 μm, a gradientovou eluci 10mmol/L fosforečnanového pufru o pH 7,0, acetonitrilu a methanolu (dle programu gradient 5, viz obr. 10) dostatečně separovala všechny zjištěné nečistoty a v další fázi byla testována její robustnost.

Robustnost metody je nezbytnou součástí její validace. Z výsledků získaných během vývoje byl patrný vliv pH pufru a obsahu methanolu v mobilní fázi na separaci jednotlivých analytů. Tyto parametry tedy byly testovány přednostně pro potvrzení či vyvrácení vhodnosti metody. V rámci testování robustnosti mohou být nalezeny vhodnější hodnoty než původní podmínky metody. Z tohoto důvodu bylo pro analýzy spikovaného vzorku (viz obr. 11) zvoleno více hodnot pH pufru (konkrétně 6,5, 6,9, 7,0 a 7,2) než bývá obvyklé ve validační studii robustnosti [52]. Zastoupení methanolu v mobilní fázi bylo měněno (3 % a 7 %) na úkor obsahu acetonitrilu. Poměr vodného pufru a organické složky v mobilní fázi zůstal v jednotlivých fázích gradientu zachován. Retenční časy analytů naměřené za jednotlivých testovaných podmínek metody jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tab. 2** Reteční časy ( $t_R$ ) analytů v minutách. Analýzy vzorku spikovaného nečistotami (viz obr. 11) za proměnných hodnot pH vodného pufru a obsahu methanolu v organické složce mobilní fáze. Instrumentální podmínky (gradient 5) a označení píků viz obr. 10.

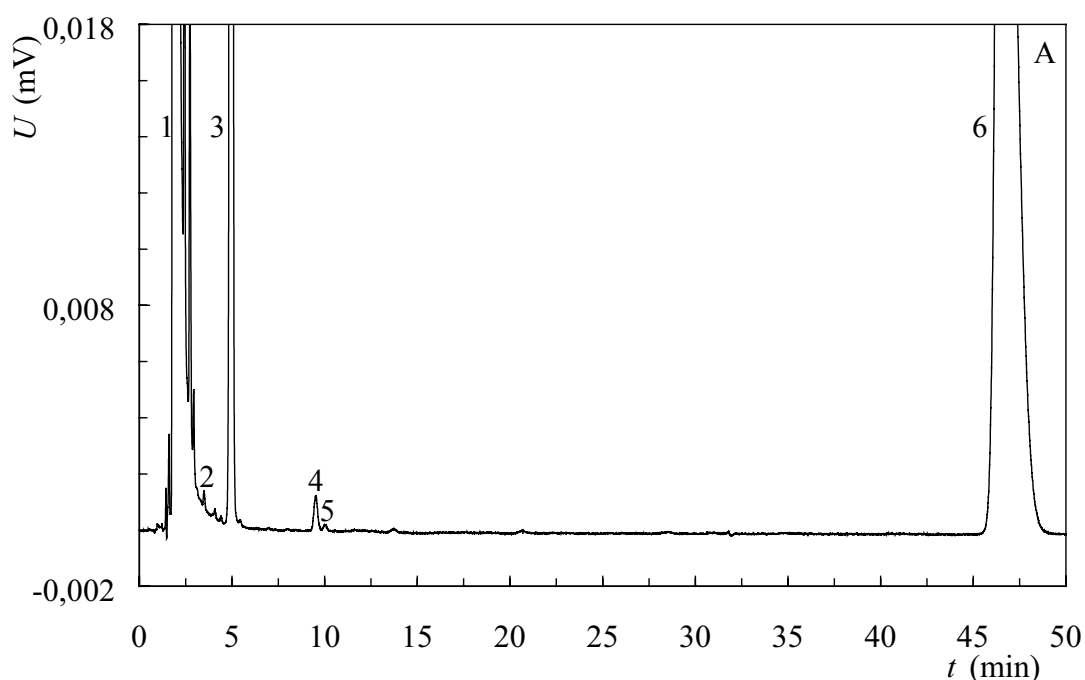
Analyt (číslo píku); $t_R$ (min)	pH 7,0		pH 6,5		pH 6,9		pH 7,2		pH 7,0		pH 7,0	
	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	3 %	3 %	7 %	7 %
nečistota K (1)	3,59	3,54	3,59	3,59	3,69	3,57	3,79					
paracetamol (2)	5,63	5,67	5,70	5,81	5,70	5,40	6,25					
nezn. nečistota paracetamolu (3)	7,07	7,68	7,24	6,93	6,93	6,67	7,72					
nezn. nečistota paracetamolu (5)	8,07	8,07	8,08	8,25	8,25	7,75	8,68					
nečistota KHBB (4)	9,17	9,19	9,14	9,25	9,25	8,60	9,81					
nečistota E (6)	9,86	9,06	9,71	10,19	10,19	9,38	10,57					
nezn. nečistota paracetamolu (8)	10,31	9,98	10,36	10,47	10,47	10,00	10,85					
nečistota X (7)	10,58	9,98	10,36	10,94	10,94	10,10	11,28					
kodein (9)	11,57	9,98	11,21	12,27	12,27	11,18	12,22					
nečistota F (11)	11,92	13,18	12,29	11,41	11,41	11,76	12,39					
nečistota C (10)	12,54	10,29	12,07	13,35	13,35	12,31	13,57					
fenpiverin (12)	13,15	12,21	13,30	13,48	13,48	13,12	13,83					
nečistota A (13)	14,31	12,70	13,94	15,12	15,12	14,21	15,22					
nečistota J (14)	15,10	15,11	15,11	15,26	15,26	14,98	15,66					
nezn. nečistota kodeinu (15)	15,57	13,67	15,48	15,27	15,27	15,25	16,14					
nečistota MeKHBB (16)	16,23	16,39	16,29	16,28	16,28	16,17	16,72					
pitofenon (17)	18,77	16,79	18,33	19,65	19,65	18,83	19,23					
nečistota PEE (18)	20,15	16,79	19,63	21,68	21,68	20,51	21,93					

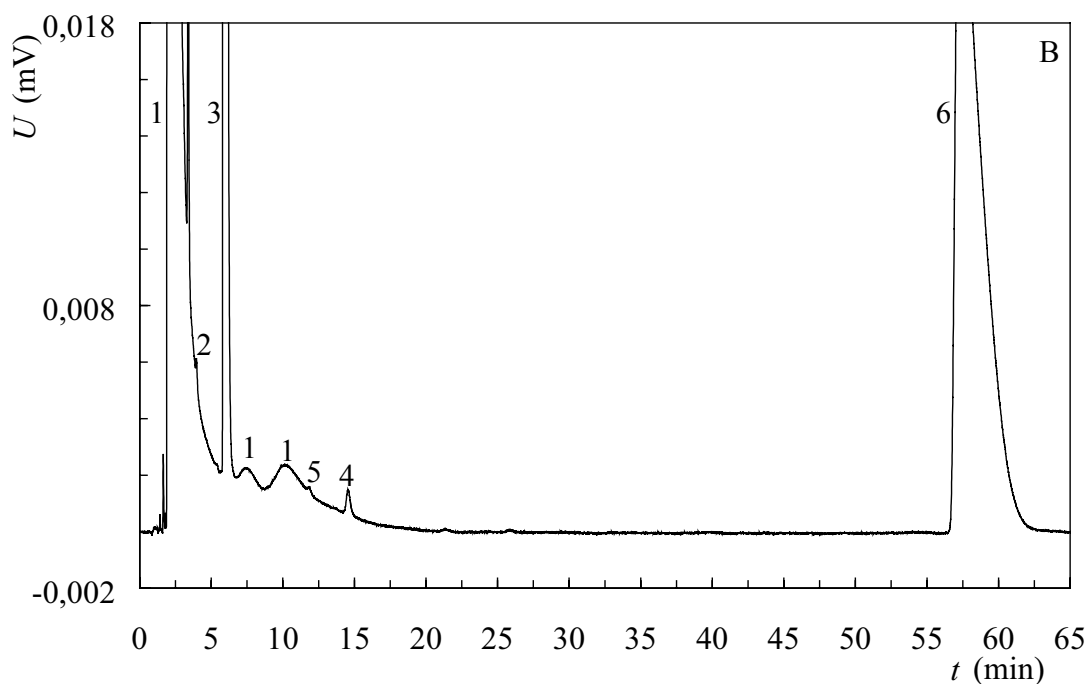
Změna pH pufru o 0,5 na hodnotu 6,5 zapříčinila částečnou koeluci kodeinové nečistoty E s nečistotou KHBB pitofenonu a koeluci nečistoty X pitofenonu a neznámé nečistoty paracetamolu (pík 8, obr. 11) s kodeinem. Dále zapříčinila úplnou změnu retenčního pořadí, jelikož nečistota A kodeinu eluovala před nečistotou F paracetamolu, a také koeluci pitofenonu a jeho nečistoty PEE. Velmi malá změna pH o 0,1 měla za následek koeluci neznámé nečistoty paracetamolu (pík 8, obr. 11) s nečistotou X. Separace těchto dvou nečistot bylo dosaženo při použití pufru o pH 6,9 a gradientu 4 (neobsahujícího methanol, viz obr. 10). V tomto případě se zmíněné nečistoty separovaly v retenčním pořadí: nečistota X a neznámá nečistota paracetamolu, tedy obráceném, než v jakém se separují gradientem 5 při použití pufru o pH 7,0 (viz obr. 11). Zvýšením pH na 7,2 se změnilo retenční pořadí, jelikož nečistota F eluovala před kodeinem. Nečistoty kodeinu C a A částečně koeluovaly s fempiverinem, respektive nečistotou J paracetamolu. Neznámá nečistota paracetamolu (pík 8, obr. 11) koeluovala s nečistotou X při snížení zastoupení methanolu z 5% na 3 %. Za těchto podmínek však bylo dosaženo zlepšení rozlišení mezi kodeinem a nečistotou F. Vyšší obsah methanolu zvýšil retenci kodeinu a jeho nečistot, jak již bylo popsáno výše u obr. 10 a způsobil koeluci kodeinu a nečistoty F, a dále snížení rozlišení mezi nečistotou C a fempiverinem a mezi nečistotami A a J.

Rovněž byl testován vliv teploty kolony, ale i v tomto případě se metoda projevila jako nerobustní. Při zvýšení teploty na 30 °C došlo ke koeluci nečistoty E s neznámou nečistotou paracetamolu (pík 8, obr. 11) a koeluci nečistot A a J, a dále pak k výměně elučního pořadí dvojice píků kodein a nečistota F a dvojice píků fempiverin a nečistota C. U metody RP-HPLC bylo separace všech analytů dosaženo pouze za specifických podmínek (pufr pH 7,0 - gradient 5; pufr pH 6,9 - gradient 4; 25 °C), které by z dlouhodobého hlediska nemusely být opakovatelné, zejména při přenosu metody do jiných laboratoří. Další vývoj analytické metody byl tedy zaměřen na iontové párovou chromatografií (viz kapitola 1.2.2).

### 1.2.2 Data a komentář k vývoji IP-RP-HPLC metody

Vzhledem k problematické dostupnosti nečistot kodeinu, jakožto omamné a psychotropní látky, byla aplikace Ph. Eur. metody na stanovení čistoty kodeinu [149] jedním z prvních přístupů pro analýzu Spasmopanu<sup>®</sup>. Metoda je založena na iontové párové chromatografii na koloně se silikagelem modifikovaným řetězcem C<sub>8</sub>. Definované relativní retence kodeinových nečistot umožnily jejich identifikaci ve vzorku a posouzení vhodnosti metody pro stanovení čistoty Spasmopanu<sup>®</sup> či případně pouze kodeinu, přičemž nečistoty ostatních dvou API by byly stanoveny jinou metodou. Na obrázku 12 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu<sup>®</sup> v 25% acetonitrilu (viz kapitola 1.2.3) na kolonách Symmetry C<sub>8</sub> a Spherisorb C<sub>8</sub> (obě od Waters; Praha, Česká republika) Ph. Eur. metodou na stanovení obsahu nečistot v kodein fosfát hemihydrátu [149].



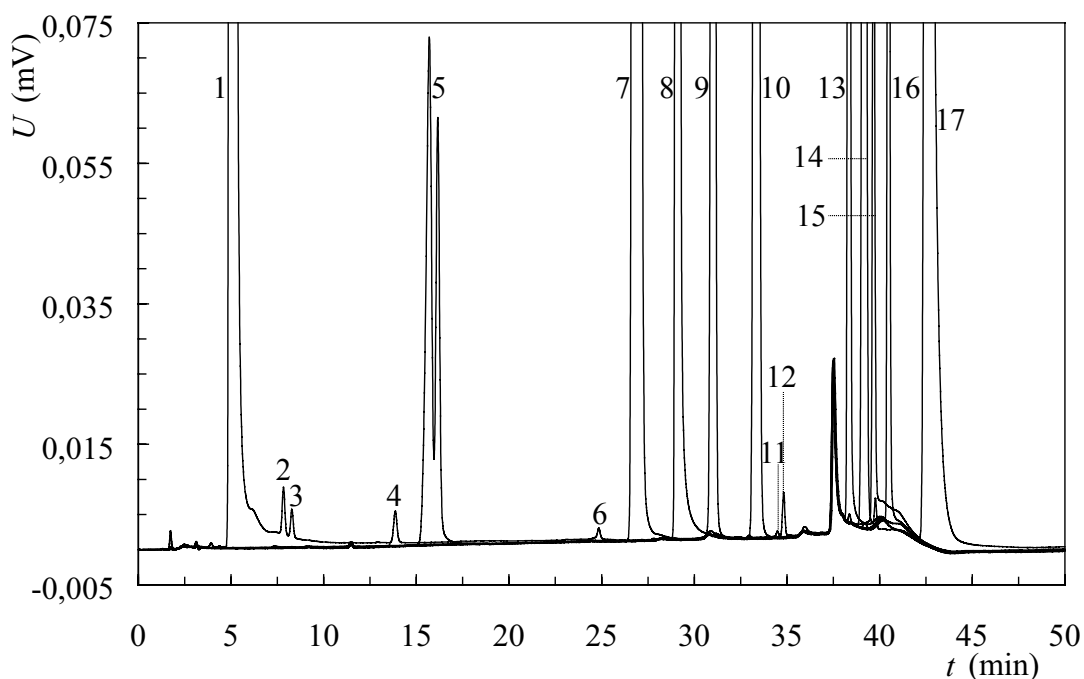


**Obr. 12** Analýza vzorku Spasmopanu® Ph. Eur. metodou na stanovení obsahu nečistot kodeinu. Rozpouštědlo vzorku: 25% acetonitril. Mobilní fáze: oktansulfonát sodný (1,08 g)/kyselina octová (20 mL)/acetonitril (250 mL)/voda (730 mL). Teplota kolony: 25 °C. Průtok: 2,0 mL/min. Detekce: UV,  $\lambda = 245$  nm. Objem nástřiku: 15  $\mu$ L. A) Kolona Symmetry C<sub>8</sub>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m. B) Kolona Spherisorb C<sub>8</sub>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m. Identifikace píků: 1 - paracetamol a jeho neznámé nečistoty, 2 - nečistota E, 3 - kodein, 4 - nečistota C, 5 - nečistota A, 6 - pitofenon.

Z porovnání obou kolon je patrné zejména opačné retenční pořadí nečistot A a C kodeinu. Evropský lékopis předepisuje kolonu Spherisorb C<sub>8</sub> a relativní retenční časy nečistoty A 2,0 a nečistoty C 2,3 [149]. Na této koloně však dochází ke značné deformaci píku paracetamolu a kodein i jeho nečistoty prakticky eluují v jeho zóně. Nečistota E byla integrována ve strmě klesající části eluční křivky, což by mohlo vést k neprecizní a nepřesné kvantifikaci. Metoda neseparuje nečistoty kodeinu B a E a identifikace píku 2 jako nečistoty E byla odvozena zpětně po analýze vzorku finální metodou. Kolona Symmetry C<sub>8</sub> poskytla výrazně lepší separaci kodeinu a jeho nečistot od paracetamolu. V případě nedostupnosti referenčních standardů by však nemohla být použita z důvodu rozdílné selektivity pro nečistoty A a C. Analýza byla provedena i na dalších kolonách stejných parametrů (C<sub>8</sub>, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu$ m). Kolony Intersil, ZorbaxSB, ZorbaxRX a Luna poskytovaly selektivitu obdobnou koloně

Symmetry, zatímco kolona ACE 5 jako jediná odpovídala koloně Spherisorb. Na koloně YMC pak nečistoty A a C eluovaly jako identický pík. Lékopisná metoda na stanovení čistoty kodeinu [149] nemohla být aplikována na analýzu Spasmopanu<sup>®</sup> z důvodu interferujícího paracetamolu. Další testy selektivity této metody potvrdily potenciální koeluci kodeinu s nečistotou J paracetamolu a nečistotou KHBB pitofenonu, pokud by byly přítomny. Vzhledem k izokratické eluci by analýza byla časově náročná, jelikož pitofenon eluoval přibližně po 60 minutách a jeho nečistota PEE až téměř po 120 minutách.

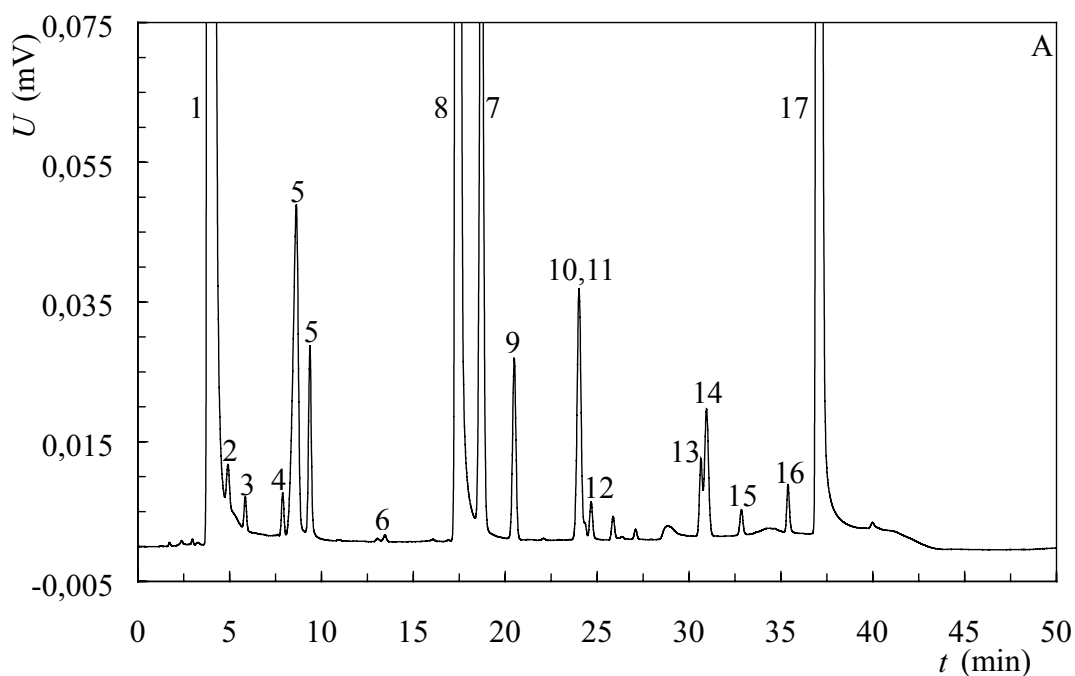
V následující části vývoje již byly dostupné referenční standardy kodeinových nečistot A, C a E. Výchozí podmínky byly převzaty z interní analytické metody na stanovení čistoty léčivého přípravku obsahujícího kodein a paracetamol. Metoda, shodně s výše zmíněnou lékopisnou metodou [149], využívala pro separaci iontové párové činidlo oktansulfonát sodný v kyselém prostředí. Separační kolona však byla Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm) při teplotě 35 °C a eluce byla řízena gradientovým programem obsahujícím acetonitril a methanol. Na obrázku 13 jsou znázorněny přeložené chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu<sup>®</sup> v 50% acetonitrilu a roztoků standardů nečistot paracetamolu a pitofenonu. Píky nečistot kodeinu byly identifikovány na základě validace a tyto nečistoty tedy nemusely být spikovány. Paracetamol zpravidla neobsahoval nečistoty podobně jako kodein, a proto byly jeho nečistoty spikovány, přestože jejich relativní retence byly rovněž známy.

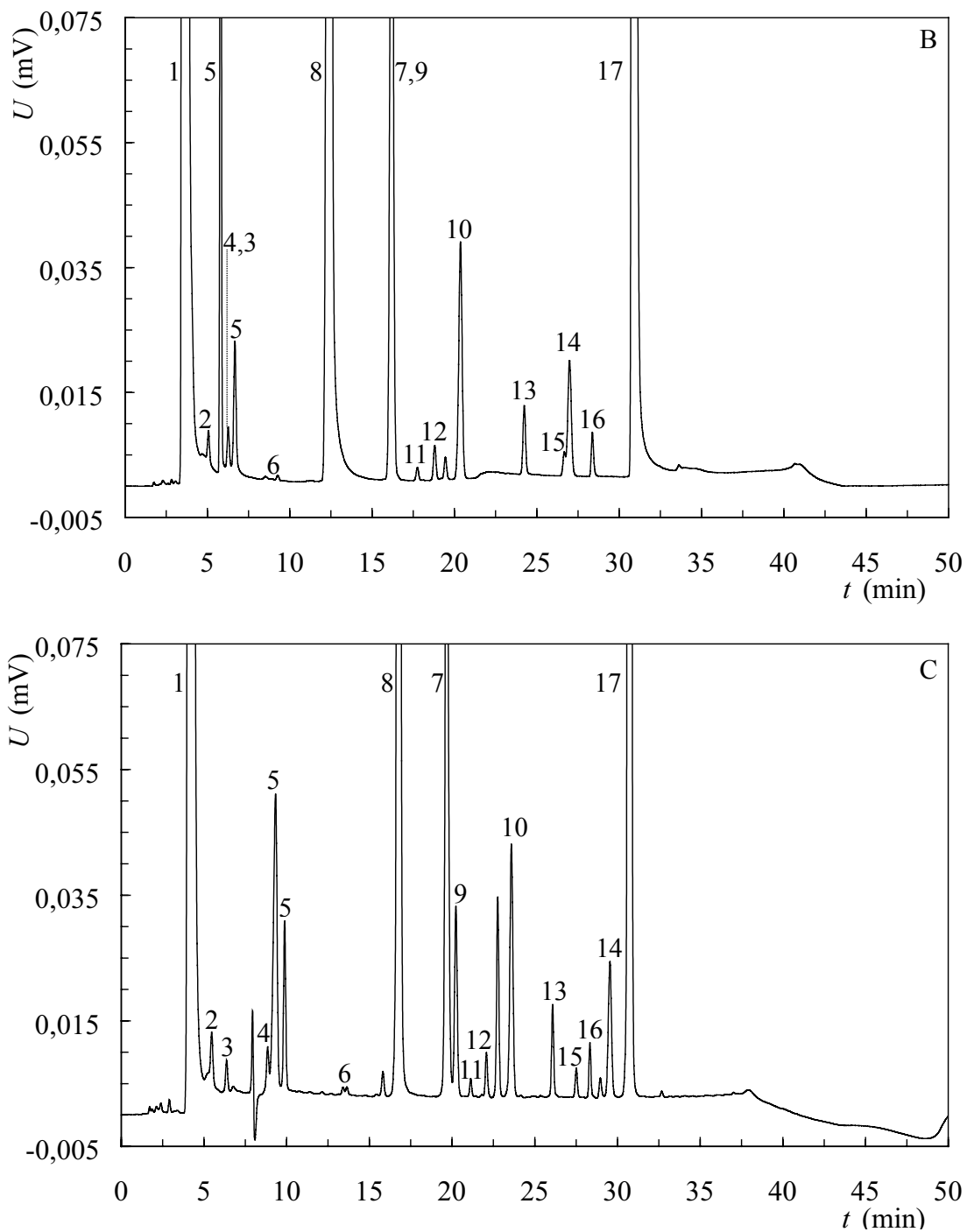


**Obr. 13** Přeložené chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu<sup>®</sup>, referenčních standardů fempiverinu, nečistot paracetamolu F, J a K a nečistot pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE. Rozpouštědlo vzorků: 50% acetonitril. Kolona: Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm. Teplota kolony: 35 °C. Objem nástřiku: 10 μL. Detekce: UV, λ = 220 nm. Mobilní fáze: složka A - pufr: oktansulfonát sodný monohydrát (1,44 g/L), pH 2,5 upraveno 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; složka B - acetonitril; složka C - methanol. Průtok: 1,0 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. Identifikace píků: 1 - paracetamol, 2, 3, 4 - neznámé nečistoty paracetamolu, 5 - nečistota K, 6 - nečistota E, 7 - nečistota F, 8 - kodein, 9 - nečistota KHBB, 10 - nečistota J, 11 - nečistota C, 12 - nečistota A, 13 - nečistota X, 14 - nečistota MeKHBB, 15 - fempiverin, 16 - nečistota PEE, 17 - pitofenon.

Přeložené chromatogramy na obrázku 13 demonstrují nedostatky výchozí metody pro analýzu Spasmopanu<sup>®</sup>. Pík nečistoty K (4-aminofenol, hlavní degradační produkt paracetamolu) byl vlivem eluční síly rozpouštědla vzorku rozštípnutý. Většina píků eluovala až ve druhé polovině analýzy a navíc v části, kdy se gradient navracel do počátečních podmínek a průběh základní linie byl pro integraci píků nevhodný. Rozlišení mezi nečistotami kodeinu A a C bylo 1,5 a částečné koeluce by se daly očekávat i pro píky elující mezi nečistotami pitofenonu X a PEE. Nebyla detekována neznámá nečistota kodeinu (pík číslo 15, obr. 10) pravděpodobně z důvodu koeluce s píkem vzniklým gradientovou změnou ve 38 minutě. Vývoji kompatibilního rozpouštědla vzorku je věnována samostatná kapitola 1.2.3. Z chromatografické části

byla zachována kolona, teplota, pufr a byl měněn gradientový program za účelem zrychlení první poloviny analýzy a zpomalení druhé poloviny tak, aby došlo k separaci všech sledovaných API a nečistot v čase před návratem gradientu na počáteční podmínky. Hlavní změny v gradientu zahrnovaly zvýšení obsahu organické složky v počátečních podmínkách, zrychlení analýzy vynecháním kroků gradientu od počátku analýzy do 15. a 28. minuty a zvýšení eluční síly mobilní fáze nahrazením methanolu acetonitrilem. Na obrázku 14 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami při použití gradientových programů (14 A, 14 B) vedoucích k finálním podmínkám metody (14 C).

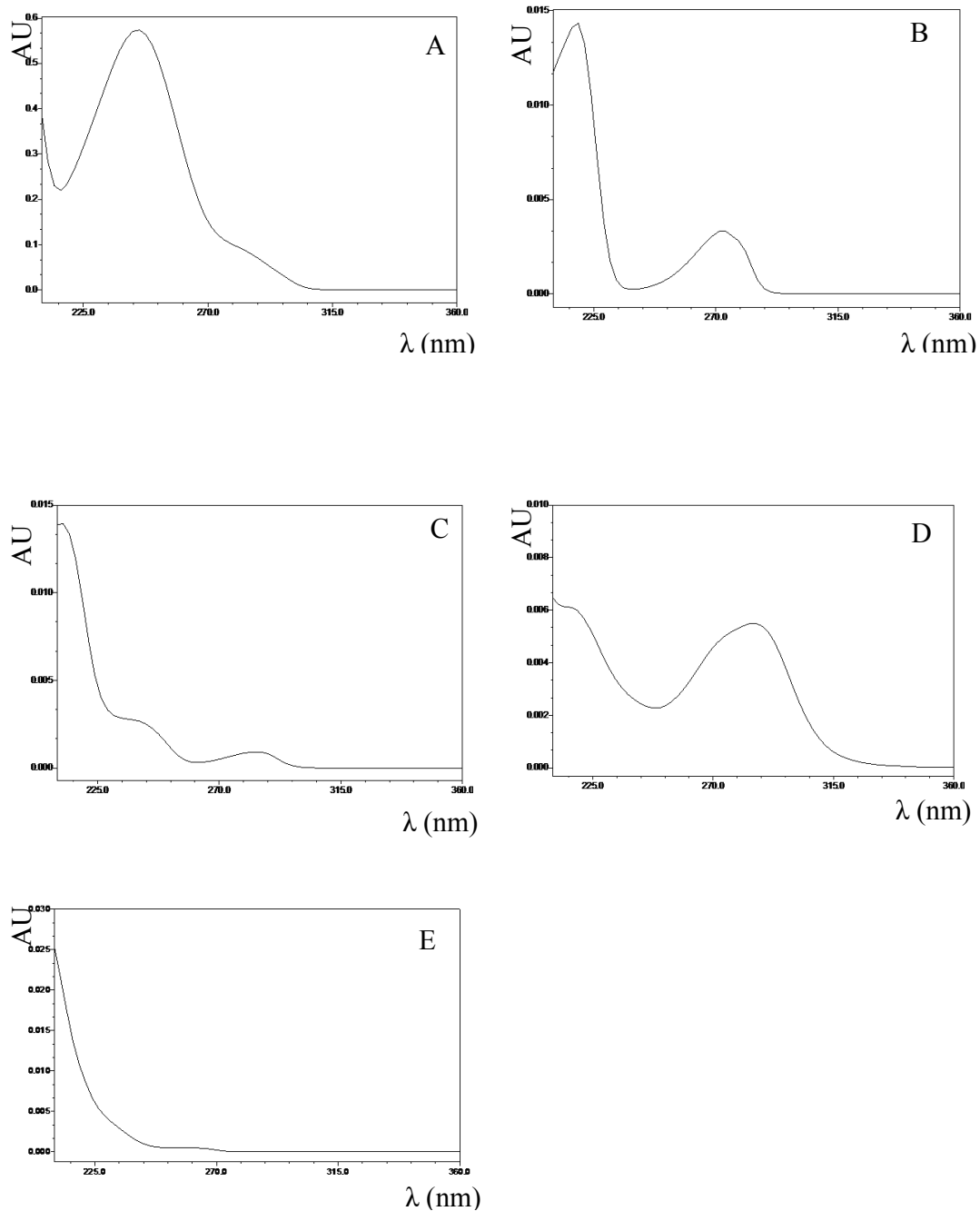




**Obr. 14** Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J a K a pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE na hladině 0,2 %. Instrumentální podmínky a identifikace píků viz obr. 13. Gradientová eluce: [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: A) 0/15/5, 38/35/5, 40/15/5, 50/15/5 B) 0/20/0, 38/40/0, 40/20/0, 50/20/0, C) 0/15/0, 35/40/0, 40/15/0, 50/15/0.

Snížení obsahu pufru v počátečních podmínkách gradientu a jeho zrychlení způsobilo změnu retenčního pořadí kodeinu a nečistoty F a koeluci nečistot C a J. Píky v zadní části chromatogramu však oproti výchozím podmínkám eluovaly v delším časovém období a v rámci vzrůstající části gradientu (obr. 14 A). Nahrazení methanolu acetonitrem zapříčinilo příliš slabou retenci nečistoty K, která tak koeluovala s neznámými nečistotami paracetamolu. Podobně jako u RP-HPLC retence kodeinu a jeho nečistot A a C byly výrazněji závislé na obsahu methanolu v mobilní fázi než retence paracetamolových nečistot F a J. Při použití gradientu neobsahujícího methanol (obr. 14 B) tak došlo k jejich separaci na rozdíl od předchozího gradientu (obr. 14 A). Zvýšení retence analytů při použití gradientu bez methanolu bylo dosaženo opětovným snížením obsahu acetonitrilu v počátečních podmínkách (obr. 14 C). Při použití takto modifikovaného gradientu byly všechny nečistoty dostatečně separovány ( $R \geq 1,7$ ).

Píky nečistot K a E byly za všech podmínek deformovány vlivem použití 50% acetonitrilu jako rozpouštědla vzorku. Nečistota K byla od neznámé nečistoty paracetamolu dostatečně oddělena, jelikož při použití kompatibilního rozpouštědla vzorku (viz kapitola 1.2.3) retenční čas nečistoty K odpovídal pravému vrcholu deformovaného píku. Pík před neznámou nečistotou paracetamolu (pík číslo 4, obr. 14 C), byl způsoben rozpouštědlem vzorku a průběhem gradientu a postupně vymizel s ekvilibrací kolony a změnou rozpouštědla vzorku, přičemž separace analytů se nezměnila. Neoznačený pík mezi nečistotami A a J byl identifikován jako degradační nečistota ze standardu nečistoty F, která se v čerstvě připraveném vzorku nevyskytovala. V tomto retenčním čase standardně eluovala neznámá nečistota kodeinu (pík číslo 15, Obr. 10). Selektivita metody pro nečistotu B kodeinu byla ověřena až před vlastní validací z důvodu nedostupnosti referenčního materiálu. Metoda založená na IP-RP-HPLC byla oproti RP-HPLC metodě robustní a poskytovala píky s lepší symetrií (viz Publikace I). Analytická data byla sbírána pomocí PDA detektoru. Na obrázku 15 jsou znázorněna UV spektra jednotlivých API a nečistoty K, jejíž UV spektrum mělo průběh odlišný od paracetamolu. Vlnové délky pro vyhodnocení dat: nečistota K (220 nm), paracetamol a jeho nečistoty (245 nm), kodein, pitofenon a jejich nečistoty (285 nm) byly zvoleny na základě těchto spekter.



**Obr. 15.** UV spektra paracetamolu (A), nečistoty K (B), kodeinu (C), pitofenonu (D) a fenpiverinu (E). Spektra paracetamolu, kodeinu a pitofenonu byla exportována z analýz referenčního roztoku (0,2% hladina). Spektra nečistoty K a fenpiverinu byla exportována z analýzy vzorku pro ověření selektivity metody (viz Publikace I).

### 1.2.3 Vývoj postupu přípravy vzorku

Čípkovina Spasmopanu® obsahuje nepolární čípkový základ H 15 a W 35 a ethoxylované alkoholy C<sub>12</sub> - C<sub>16</sub>. Tyto složky placebo musely být v rámci přípravy vzorku odstraněny z důvodu možného zanášení a degradace separačních kolon. První experimenty byly zaměřeny na rozpuštění čípku ve vhodném rozpouštědle pomocí ultrazvukové lázně a následném vysrážení nepolární čípkoviny snížením teploty vzorku či náhlou změnou polarit rozpouštědla naředěním vodou. V tabulce 3 jsou shrnuty závěry z rozpuštění jednoho čípku Spasmopanu® v 25 mL acetonitrilu, methanolu, vodě, isopropanolu, dimethylsulfoxidu a acetonu. Vzorky byly rozpouštěny v ultrazvukové lázni za občasného protřepávání při 25 °C a 37 °C po dobu 25 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky filtrovány přes 0,22µm PVDF filtr a vzorky rozpuštěné v acetonitrilu, methanolu a isopropanolu byly naředěny vodou v poměru 1:1.

**Tab. 3** Tabulka pozorování rozpouštění jednoho čípku Spasmopanu® v 25 mL rozpouštědla pomocí ultrazvukové lázně (UZ) po dobu 25 minut při teplotách 25 °C a 37 °C. Pozorování chování vzorků po opětovném vychladnutí z 37 °C na laboratorní teplotu, filtraci (0,22µm) a po ekvivalentním přidavku vody.

Rozpouštědlo	UZ, 25 °C	UZ, 37 °C	Vychladnutí, laboratorní teplota	Přídavek vody po filtraci
methanol	-	bíle zakalený roztok	bílé shluky v čirém roztoku	bílý zákal
acetonitril	-	bíle zakalený roztok	emulze a následně bílé shluky v čirém roztoku	bílý zákal
voda	-	bíle zakalená emulze	emulze a následně malé bílé shluky v bíle zakaleném roztoku	-
isopropanol	-	čirý roztok, na dně malé množství krystalického prášku	malé bílé částičky v čirém roztoku	bílý zákal
dimethylsulfoxid	-	nažloutlý viskózní roztok	velké kompaktní shluky na hladině mírně zakaleného nažloutlého roztoku	-
aceton	čirý roztok, na dně malé množství krystalického prášku	čirý roztok, na dně malé množství krystalického prášku	čirý roztok, na dně malé množství krystalického prášku	-

Z popsaných pozorování a závěrů byly jako nejvhodnější rozpouštědla do dalších experimentů vybrány acetonitril a methanol. V obou rozpouštědlech byl čípek rozpuštěn v ultrazvukové lázni při teplotě 37 °C a po vychladnutí byly složky placebo opětovně vysráženy za vzniku bílých shluků a čirého roztoku. Přídavek ekvivalentního množství vody k filtrátům těchto vzorků však vedl ke sražení dalšího podílu složek placebo.

Samotné ochlazení vzorků tedy nevedlo ke kvantitativnímu odstranění placebo ze vzorku. Roztok vzniklý rozpouštěním ve vodě nebylo možné filtrovat z důvodu ucpání filtru. V acetonu a isopropanolu se vzorek nerozpustil celý. Dimethylsulfoxid narozdíl od methanolu a acetonitrilu poskytuje na začátku chromatogramu výrazný pík rozpouštědla, jelikož absorbuje UV záření od 265 nm níže [150]. V dalším kroku byl jeden čípek rozpouštěn znovu ve 25 mL acetonitrilu a methanolu a zároveň v 50% acetonitrilu a 50% methanolu v ultrazvukové lázni při 37 °C po dobu 20 minut. Pro urychlení srážení byly vzorky chlazeny při -18 °C po dobu jedné hodiny a vzorky v 50% acetonitrilu a 50% methanolu i při 4 °C po dobu jedné hodiny. Vzorky po ochlazení nebyly filtrovány, ale odstředěny při 12 000 rpm po dobu 10 minut.

Všechny čípky se v ultrazvukové lázni rozpustily za vzniku bíle zakalených roztoků. Ochlazení při -18 °C vedlo u vzorků v čistém acetonitrilu a methanolu k velkým shlukům placebo v čirém roztoku, úplnému zmrznutí vzorku v 50% acetonitrilu a malým částicím v roztoku u vzorku v 50% methanolu. Po odstředění byly supernatanty všech vzorků čiré kromě vzorku v 50% methanolu, který musel být filtrován (0,22 $\mu$ m, PVDF). Naředění vzorků v čistém acetonitrilu a methanolu ekvivalentním množstvím vody opět vedlo k dalšímu vysrážení placebo, které bylo odfiltrováno. Část vzorků v 50% acetonitrilu a 50% methanolu, které byly chlazeny při 4 °C, byly odstředěny za vzniku čirého supernatantu, jelikož po ochlazení obsahovaly bílé shluky placebo v čirém roztoku. Zkušební přidání nadbytku vody k malému podílu vzorků v 50% organických rozpouštědlech již nevedlo k vysrážení dalšího placebo. Vzorky byly analyzovány výchozí metodou IP-RP-HPLC (viz kapitola 1.2.2) a byla orientačně ověřena výtěžnost jednotlivých API porovnáním s referenčními roztoky v 50% acetonitrilu o koncentraci 1 mg/mL. Methanol v rozpouštědle vzorku způsoboval výrazné frontování píku paracetamolu. Orientační výtěžnost jednotlivých API byla ve všech vzorcích v rozmezí od 96 % do 104 %, tedy dostačující. Vzhledem k průběhu přípravy a chromatografickým výsledkům byl pro další rozpouštění vybrán 50% acetonitril a postup přípravy zahrnující ochlazení při 4 °C a odstředění vzorku. Při analýze spikovaného vzorku finálními chromatografickými podmínkami však byly v tomto rozpouštědle píky nečistot K a E deformovány (viz obr. 14 C) vlivem eluční síly

50% acetonitrilu. Píky byly deformovány i při snížení nástřiku objemu vzorku na 5  $\mu\text{L}$  či snížení teploty kolony na 25  $^{\circ}\text{C}$  i při zvýšení obsahu organické složky v mobilní fázi na počátku gradientu (obr. 14 A a B). Pík nečistoty E byl symetrický již při použití 40% acetonitrilu jako rozpouštědla vzorku. Pík nečistoty K byl však stále deformován, navíc výtěžnost této nečistoty ve 40% acetonitrilu byla pouze 76 %. Obsah acetonitrilu v rozpouštědle vzorku byl postupně snižován na 30 %, 25 % a 20 % a zároveň byla pro přípravu použita voda okyselená kyselinou fosforečnou (0,5 mL 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na 1000 mL vody) pro zvýšení výtěžnosti nečistoty K (4-aminofenol). Zcela symetrického píku ( $S_f = 1,0$ ) nečistoty K a její dostatečné výtěžnosti (92 %, hladina 0,1 %) bylo dosaženo až při použití okyseleného rozpouštědla vzorku obsahujícího 20 % acetonitrilu. Kvantitativní vysrážení složek placebo v tomto rozpouštědle však vyžadovalo minimálně 2,5 hodiny při 4  $^{\circ}\text{C}$  a následnou filtraci přes 0,22 $\mu\text{m}$  PVDF filtr.

Pro zrychlení přípravy vzorku byl tedy vyvinut alternativní postup založený na extrakci složek placebo z vodné fáze do hexanu. Ke vzorku rozpuštěnému v ultrazvukové lázni bylo přidáno 10 mL hexanu a vzorek byl intenzivně třepán po dobu 10 minut. Následné dělení fází však nebylo optimální a i po 30 minutách ustalování nebylo fázové rozhraní jednoznačné a spodní vodná fáze byla bíle zakalena. Zlepšení dělení fází bylo dosaženo použitím 10 mL okyseleného 50% acetonitrilu pro rozpouštění čípku a třepáním s hexanem. Vzorek byl poté naředěn 15 mL okyselené vody, jemně zamíchán a ponechán v dělicí baňce po 30 minut. Při tomto postupu bylo fázové rozhraní jednoznačné a spodní vodná fáze byla téměř čirá. Vzorek byl filtrován přes 0,45 $\mu\text{m}$  PVDF filtr. Přidání nadbytku vody k malému množství čirého filtrátu nezpůsobilo vysrážení dalšího placebo, a to tedy bylo třepáním z hexanem kvantitativně odstraněno. V tabulce 4 jsou uvedena data kvantitativně porovnávající obě metodiky přípravy vzorku.

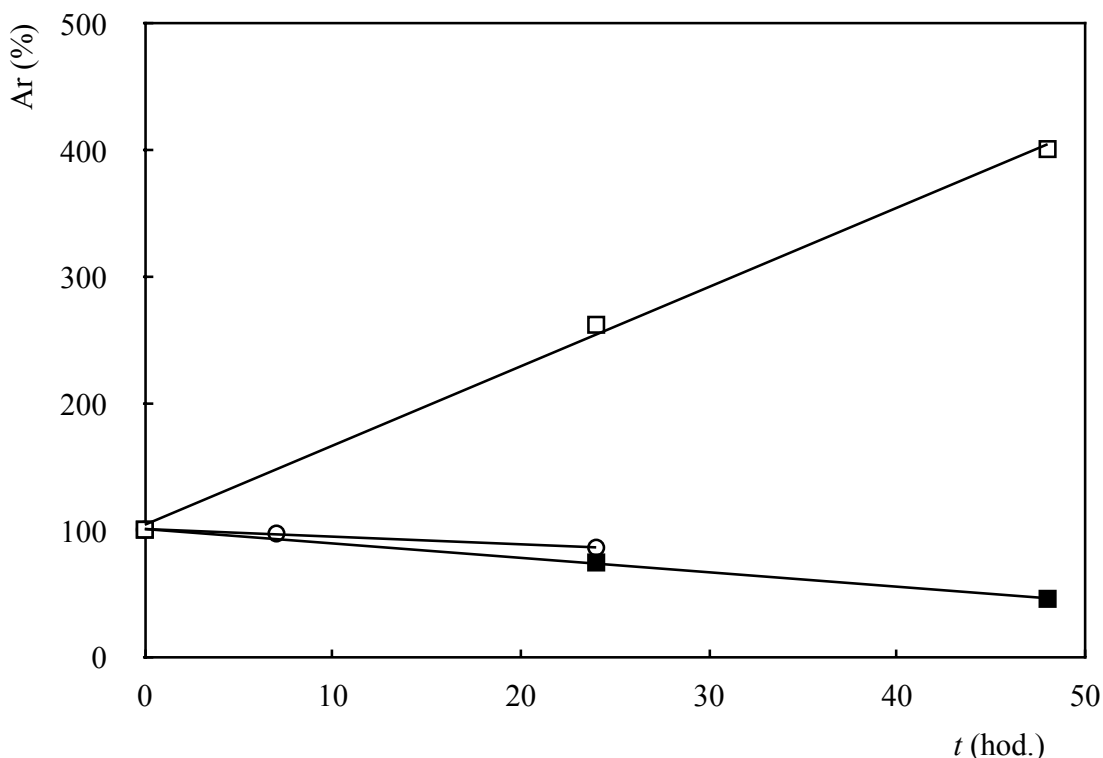
**Tab. 4** Výška (*h*), plocha (*Ar*) a normalizovaná plocha (*Ar*, norm.) pro píky analytů ze vzorků připravených dvěma metodikami pro odstranění složek placebo. Rozpouštědlo vzorku: 20% acetonitril připravený z okyselené vody (0,5 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na 1000 mL vody). Kolona: Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm. Teplota kolony: 35 °C. Objem nástřiku: 10 μL. Detekce: UV, λ = 220 nm. Mobilní fáze: složka A - pufr: oktansulfonát sodný monohydrát (1,44 g/L), pH 2,5 upraveno 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; složka B - acetonitril. Průtok: 1,0 mL/min. Gradientová eluce [*t*(min)/acetonitril(%)]: 0/15, 35/40, 40/15, 50/15.

Metodika	4 °C; 2,5 hodiny			hexan; 10 minut třepání			
	Analyt	<i>h</i> (mV)	<i>Ar</i> (mV/s)	<i>Ar</i> (norm. %)	<i>h</i> (mV)	<i>Ar</i> (mV/s)	<i>Ar</i> (norm. %)
neznámá nečistota paracetamolu		4224	38453	0,14	4387	38389	0,14
kodein		1646819	16432678	59,40	1672109	16498434	59,42
nečistota A		6212	58633	0,21	6200	58431	0,21
nečistota C		2459	21662	0,08	2417	21160	0,08
nečistota X		4069	39260	0,14	4106	39226	0,14
pitofenon		1022479	11074952	40,03	1010442	11108558	40,01

Pro zajištění analytické preciznosti metody a dostatečné citlivosti byly vzorky připraveny z 20 zhomogenizovaných čípků a do 100mL odměrných baněk byly navažovány hmotnostní ekvivalenty dvou čípků. Byla použita šarže Spasmopanu® čtyři roky po datu její výroby. Z dat uvedených v tabulce 4 je patrné, že obě metodiky poskytly kvantitativně srovnatelné výsledky a v dalších experimentech bylo použito už pouze časově méně náročné odstranění placebo třepáním vzorku s hexanem. Pík paracetamolu koncentračně přesáhl pracovní rozsah detektoru a nebyl kvantifikován.

Okyselená voda v rozpouštědle vzorku byla nahrazena oktansulfonátovým pufrem o pH 2,5 použitým v mobilní fázi z důvodu lepší kompatibility a snížení gradientového píku v retenčním čase cca 7,6 minuty (viz obr. 14 C). Obsah nečistoty K ve vzorku byl však v čase závislý na hodnotě pH použitého rozpouštědla. Na obrázku 16 jsou vyneseny závislosti plochy nečistoty K na čase při použití pufrů o hodnotách pH 2,5,

3,0 a 3,5 pro přípravu vzorku. Jelikož nečistota K se ve vzorku přirozeně nevyskytovala, pro měření v pH 3,0 a 3,5 byly použity vzorky spikované na hladině 0,1 %.



**Obr. 16** Závislosti plochy nečistoty K ( $Ar$ ) v % vůči počátečnímu stavu ( $t = 0$  hod.) na čase v hodinách pro hodnoty pH pufru použitého při přípravě vzorku. —□— pH 2,5; —■— pH 3,5; —○— pH 3,0. Vzorky uchovávány při 10 °C, ostatní instrumentální podmínky viz tab. 4.

Nečistota K je hlavním degradačním produktem paracetamolu v kyselém prostředí. Při použití pufru o pH 2,5 se její obsah zvýšil za 24 hodin téměř třikrát a za 48 hodin více než čtyřikrát. Zvoleným akceptačním kritériem pro rozhodnutí o stabilitě vzorku byla změna maximálně 20 % relativních za 24 hodin (viz Publikace I) a vzorek v pH 2,5 tomuto kritériu nevyhověl.

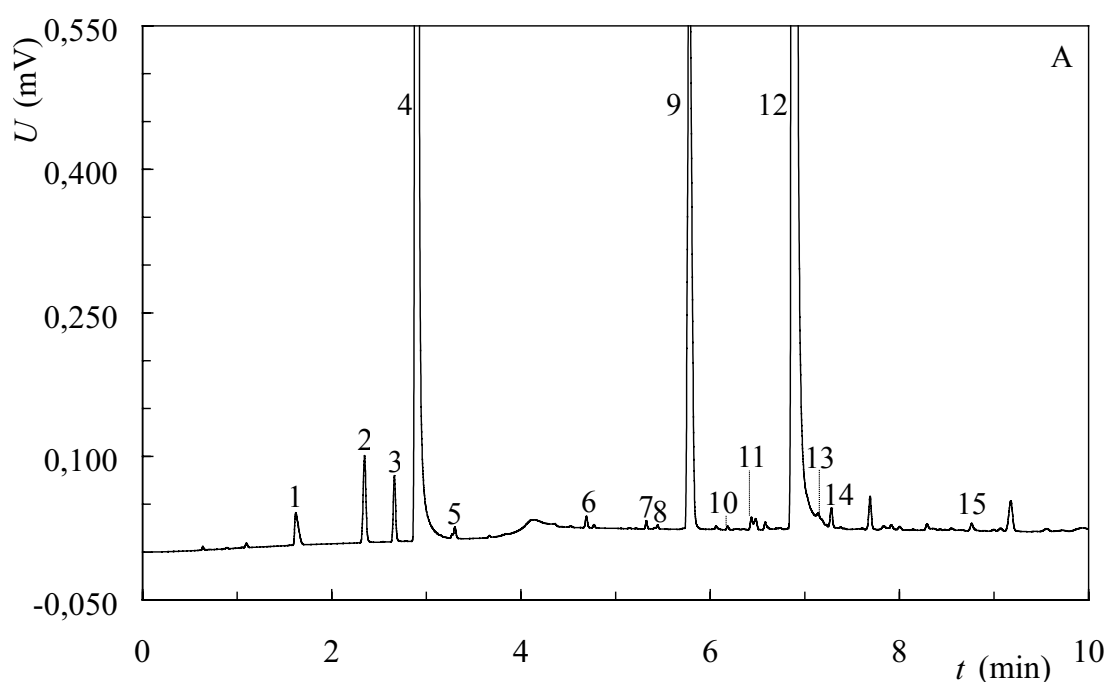
Nevyhovující byl i vzorek připravený při použití pufru o pH 3,5, kdy naopak docházelo k degradaci naspikované nečistoty K [151] a její obsah klesl za 24 hodin o 25 %. Podobné hodnoty byly naměřeny i u vzorků připravených při použití čisté vody a pufru o pH 6,3 v rozpouštědle vzorku. Méně strmý pokles obsahu nečistoty K byl naměřen pro hodnotu pH pufru 3,0 a vzorek připravený s tímto pufrém v rozpouštědle

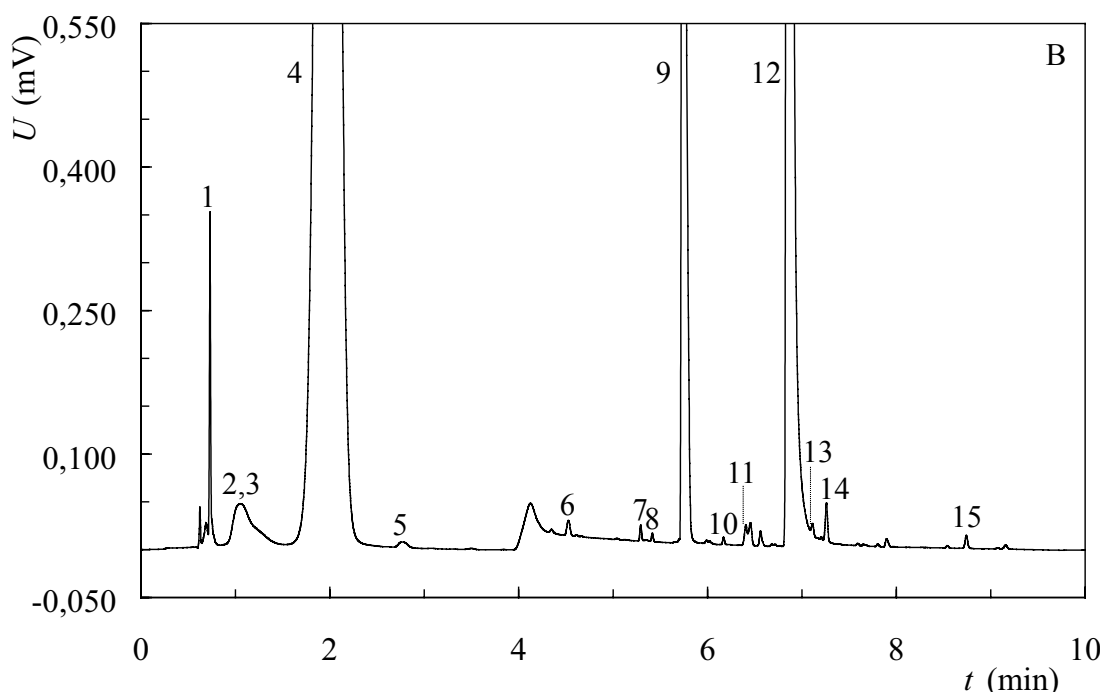
vzorku vyhověl stabilitním kritériím (viz Publikace I). Pokles obsahu nečistoty K pouze o 3,5 % za 24 hodin byl naměřen při použití 50% methanolu jako rozpouštědla vzorku, avšak kodein byl v tomto rozpouštědle nestabilní a obsah jeho nečistoty C narostl o 73 % za stejnou dobu. Konečným rozpouštědlem vzorku byl tedy 20% acetonitril v oktansulfonátovém pufru o pH 3,0.

### 1.3 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci II

#### 1.3.1 Data a komentář k vývoji UHPLC metody

Vývoj metody na stanovení obsahu nečistot amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu byl založen na separačním mechanismu v reverzní fázi. Byla zvolena gradientová eluce pufru v kyselé oblasti pH a acetonitrilu. Metody pro stanovení jednotlivých API v této kombinaci byly publikovány při použití pufrů z celé škály hodnot pH, v kyselé oblasti však bylo dosaženo píků s nejlepší symetrií. Na obrázku 17 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami amlodipinu a hydrochlorothiazidu výchozí metodou s objemy nástřiků vzorku 1,0  $\mu$ L a 2,0  $\mu$ L. Byla použita kolona Acquity UPLC BEH C<sub>8</sub> (100 x 2,1 mm, velikost částic 1,7  $\mu$ m) a 10 mmol/L fosforečnanový pufr o pH 2,5 s gradientem začínajícím na 5 % acetonitrilu (gradient 1), aby bylo dosaženo retence polárního hydrochlorothiazidu a jeho nečistot.



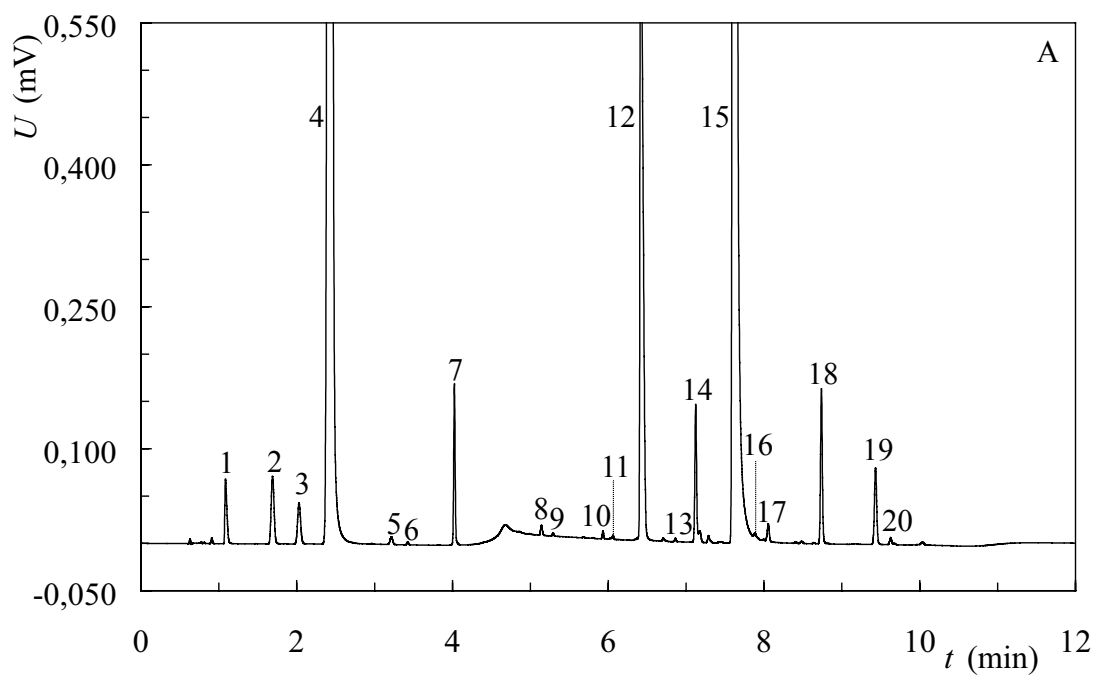


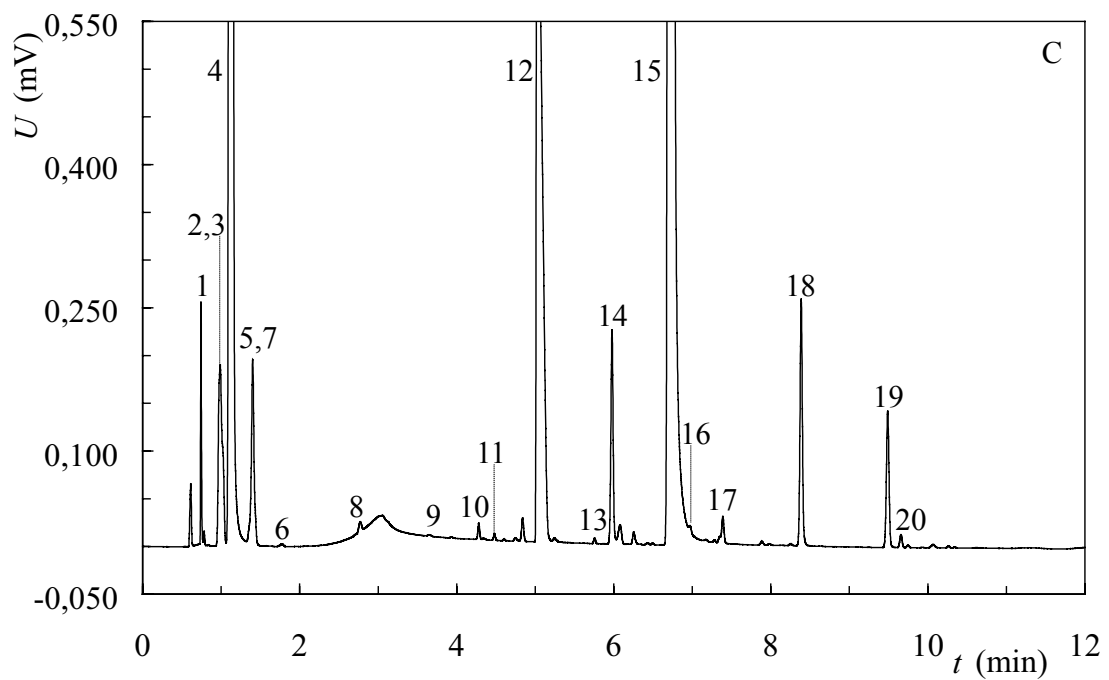
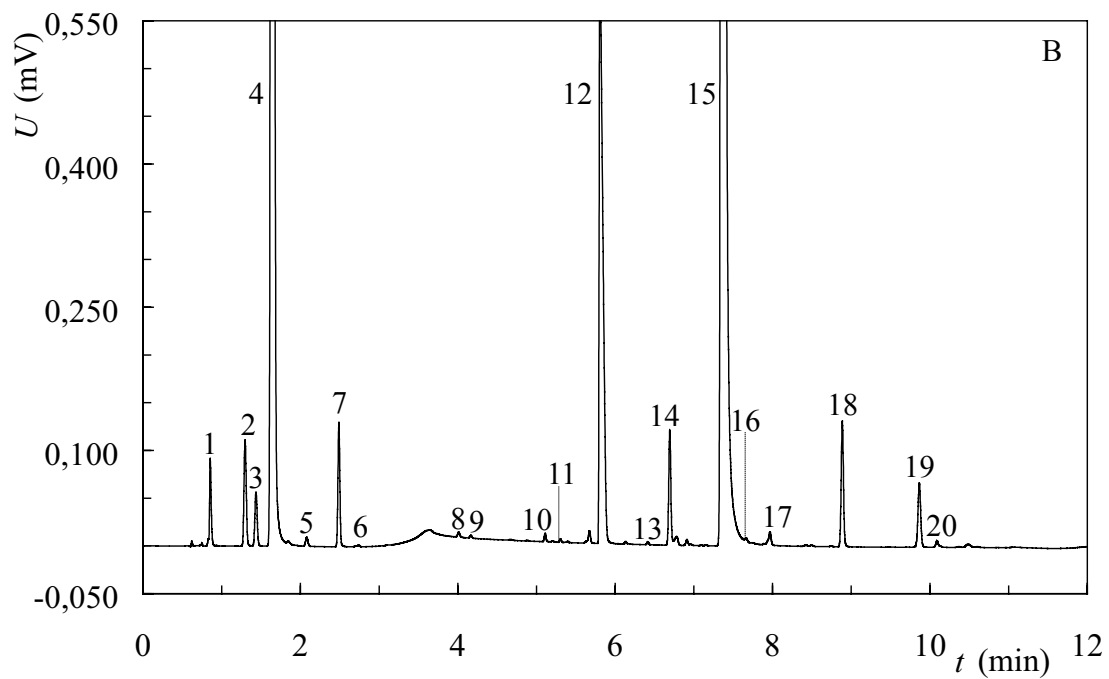
**Obr. 17** Analýza vzorku spikovaného nečistotami A a B hydrochlorothiazidu na hladině 1,0 % a A, B, E, F, G amlodipinu na hladině 0,2 % a nečistoty D amlodipinu na hladině 0,5 %. Rozpouštědlo vzorku: 60% methanol. Kolona: Acquity UPLC BEH C<sub>8</sub> 100 x 2,1 mm, 1,7 μm. Teplota kolony: 25 °C. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5 a acetonitril dle gradientového programu [t(min)/acetonitril(%): 0/5, 7/65, 8/65, 10/5]. Průtok: 0,4 mL/min. A) objem nástřiku 1,0 μL; B) objem nástřiku 2,0 μL. Identifikace píků: 1 - besilát, 2 - nečistota B (HCTZ), 3 - nečistota A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5 - neznámá nečistota HCTZ, 6 - nečistota C (HCTZ), 7 - nečistota D (AMLO), 8 - nečistota F (AMLO), 9 - AMLO, 10 - nečistota E (AMLO), 11 - nečistota C (VALS), 12 - VALS, 13 - nečistota B (AMLO), 14 - nečistota G (AMLO), 15 - nečistota A (AMLO).

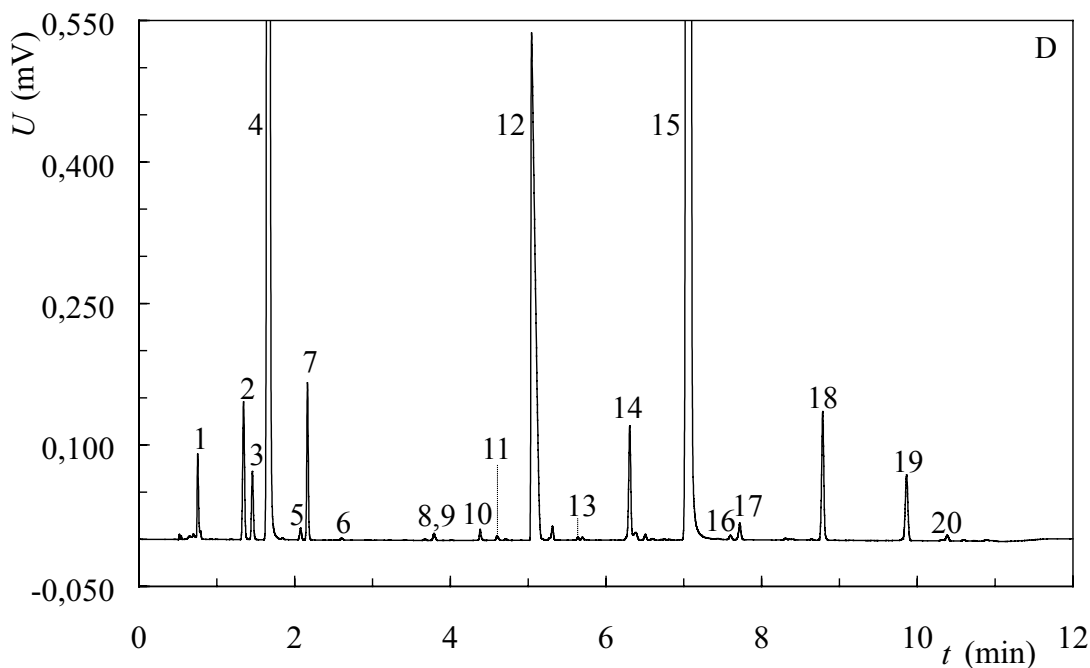
Neidentifikované píky jsou minoritními neznámými nečistotami valsartanu nebo pocházejí z rozpouštědla vzorku a změn v gradientu (poslední pík v záznamu). Z porovnání chromatogramů je patrné, že při objemu nástřiku 2,0 μL došlo k předávkování separačního systému, což se projevilo deformací, koelucí a snížení retenčních časů píků hydrochlorothiazidu a jeho nečistot (obr. 17 B, píky 2 - 5). Objem nástřiku 1,0 μL však neposkytoval dostatečnou citlivost pro amlodipin a jeho nečistoty.

Výchozí metoda také uspokojivě neseparovala všechny studované analyty. Nečistota B amlodipinu eluovala na chvostu píku valsartanu, ale tato částečná koeluce by byla vyřešena použitím rozdílných vlnových délek pro valsartan (225 nm) a

amlodipin (360 nm). Minoritní neznámé nečistoty (obsah < 0,05 %) valsartanu koeluovaly s amlodipinem a částečně i s valsartanovou nečistotou C. Následné kroky zahrnovaly úpravy separačních podmínek a gradientu s testováním vlivu zvýšení obsahu organické složky mobilní fáze na deformaci píků na začátku chromatogramu a zlepšení separace neznámých nečistot valsartanu od studovaných API a nečistot (kritické páry viz Publikace II). Na obrázku 18 jsou znázorněny analýzy vzorku spikovaného nečistotami všech API při použití separačních podmínek vedoucích k finální metodě.







**Obr. 18** Chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami A, B (HCTZ) na hladině 1,0 %, A, B, D, E, F, G (AMLO) na hladině 0,2 %, respektive 0,5 % pro nečistotu D a nečistotami B, C, 07, 09 (VALS) na hladině 0,2 %, respektive 0,3 % pro nečistotu C. Rozpouštědlo vzorku: 60% methanol. Kolony: A, B, C) Acquity UPLC BEH C<sub>8</sub> 100 x 2,1 mm, 1,7 μm; D) Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD 100 x 3,0 mm, velikost částic 1,8 μm. Teplota kolony: 25 °C. Detekce: UV, 225 nm. Mobilní fáze: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5 a acetonitril dle gradientového programu [t(min)/acetonitril(%)]: A) 0/10, 1/10, 8/65, 9/65, 9,5/10, 12/10 (gradient 2); B, D) 0/15, 9/65, 10/65, 10,5/15, 12/15 (gradient 3); C) 0/20, 9/65, 10/65, 10,5/20, 12/20 (gradient 4). Průtok: A, B, C) 0,4 mL/min; D) 0,8 ml/min. Objem nástřiku A, B) 1,0 μL; C, D) 2,0 μL. Identifikace píků: 1 - besilát, 2 - nečistota B (HCTZ), 3 - nečistota A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5, 6 - neznámé nečistoty HCTZ, 7 - nečistota 09 (VALS), 8 - nečistota C (HCTZ), 9 - neznámá nečistota VALS, 10 - nečistota D (AMLO), 11 - nečistota F (AMLO), 12 - AMLO, 13 - nečistota E (AMLO), 14 - nečistota C (VALS), 15 - VALS, 16 - nečistota B (AMLO), 17 - nečistota G (AMLO), 18 - nečistota 07 (VALS), 19 - nečistota B (VALS), 20 - nečistota A (AMLO).

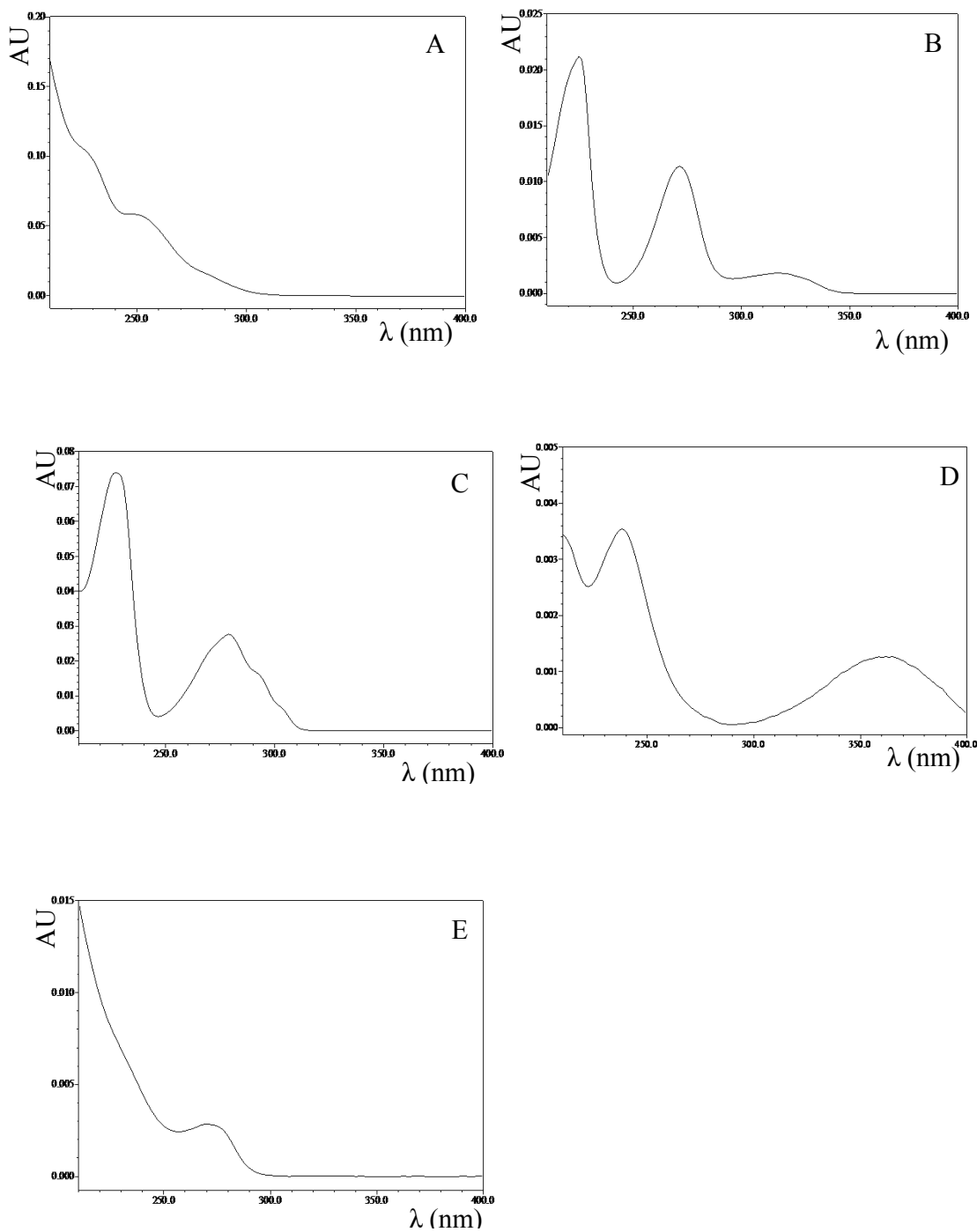
Zvýšení obsahu acetonitrilu na 10 % v počátečních podmínkách gradientu a vložený jednominutový izokratický úsek neměly pozitivní vliv na deformaci píků hydrochlorothiazidu a jeho nečistot A a B při nástřikovém objemu 2,0 μL (neznázorněno). Selektivita při použití gradientu 2 (obr. 18 A) při porovnání s výchozí metodou nebyla prakticky ovlivněna, retenční pořadí a koeluce píků zůstaly srovnatelné. Podobné výsledky byly zaznamenány i při aplikaci gradientu začínajícího na 10 %

acetonitrilu bez počáteční izokratické fáze (neznázorněno). Počáteční množství acetonitrilu 20 % (gradient 4, obr. 18 C) vedlo ke koeluci nečistot hydrochlorothiazidu A a B a koeluci neznámé nečistoty hydrochlorothiazidu s nečistotou 09 valsartanu. Nečistota C hydrochlorothiazidu eluovala na strmé části driftu základní linie, což by mohlo zapříčinit její neprecizní a nepřesnou kvantifikaci. Při použití gradientu 4 s objemem nástřiku 2,0  $\mu\text{L}$  však nedošlo k deformaci píku hydrochlorothiazidu a od amlodipinu se vydělila neznámá nečistota valsartanu (neidentifikovaný pík před píkem 12).

Separace všech analytů bylo dosaženo použitím gradientu 3 začínajícího na 15 % acetonitrilu (obr. 18 B). S tímto gradientem byly dále testovány objemy nástřiku vzorku 1,5  $\mu\text{L}$ , 1,8  $\mu\text{L}$  a 2,0  $\mu\text{L}$ . Za těchto podmínek se píky hydrochlorothiazidu a jeho nečistot deformovaly již při objemu nástřiku 1,5  $\mu\text{L}$ . Srovnatelně s výchozí metodou však objem nástřiku 1,0  $\mu\text{L}$  nepostačoval k dostatečné citlivosti i s ohledem na vývoj tablet obsahujících ještě menší množství amlodipin besilátu. Metoda byla přenesena na kolonu Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD 100 x 3,0 mm, velikost částic 1,8  $\mu\text{m}$ , na které díky většímu objemu kolony bylo možné aplikovat nástřiky až 3,0  $\mu\text{L}$  bez vlivu na symetrii píků. Z obrázku 18 D je patrné, že na této koloně došlo k úplnému oddělení nečistoty B amlodipinu od valsartanu, změně retenčního pořadí pro amlodipin a neznámou nečistotu valsartanu a výrazně hladšímu průběhu základní linie. Zároveň však neznámá nečistota valsartanu koeluovala s nečistotou C hydrochlorothiazidu (píky 8 a 9) a znemožnila tak její kvantifikaci. Částečné separace těchto dvou píků ( $R = 0,9$ ) bylo dosaženo aplikací finálního gradientového programu [ $t(\text{min})/\text{acetonitril}(\%)$ ]: 0/15, 11/75, 12/75, 12,5/15, 15/15 a úplné separace ( $R = 2,3$ ) zvýšením teploty kolony na 30 °C (viz Publikace II). Částečná koeluce neznámé nečistoty valsartanu a jeho nečistoty C zůstala zachována za všech podmínek. Neznámá nečistota však byla vždy minoritní (obsah < 0,05 %) i ve stresovaných vzorcích a vývojových stabilitních studiích a díky rozlišení 1,0 byla nečistota C precizně a přesně kvantifikována (viz Publikace II).

Analytická data byla sbírána pomocí PDA detektoru. Vlnové délky pro vyhodnocení čistoty jednotlivých API byly vybrány na základě jejich UV spekter, případně UV spekter nečistot, které měly odlišný průběh od spekter příslušných API. Na

obrázku 19 jsou znázorněna UV spektra valsartanu, hydrochlorothiazidu a jeho nečistoty A a amlodipinu a jeho nečistoty D. Pro valsartan byla zvolena vlnová délka 225 nm stejně jako pro amlodipinovou nečistotu D, jelikož její spektrum postrádá absorpční pás s maximem při cca 360 nm typický pro amlodipin a jeho nečistoty (obr. 19 D a E). Čistota hydrochlorothiazidu byla vyhodnocována při 271 nm, jelikož jeho nečistota A postrádá absorpční pás s maximem při cca 317 nm (obr. 19 B a C). Ostatní nečistoty amlodipinu byly kvantifikovány při 360 nm. Při této vlnové délce valsartan záření neabsorbuje, a tak byly eliminovány veškeré potenciální interference jeho minoritních nečistot (obr. 19 A a D).



**Obr. 19** UV spektra A) valsartanu, B) hydrochlorothiazidu, C) nečistoty A (HCTZ), D) amlodipinu, E) nečistoty D (AMLO). Spektra valsartanu, hydrochlorothiazidu a amlodipinu byla exportována z analýz referenčního roztoku (0,2% hladina). Spektra nečistot A a D byla exportována z analýzy vzorku pro ověření selektivity metody (viz Publikace II).

### 1.3.2 Vývoj přípravy vzorku

Reprezentativní množství vzorku (20 tablet) bylo zhomogenizováno ve třecí misce a tohoto bylo do 25mL odměrné baňky naváženo 795 mg. Tato navážka zajišťovala dostatečnou koncentraci jednotlivých API, a tedy i požadovanou citlivost metody při objemu nástřiku 2,0  $\mu$ L (viz Publikace II). Ke vzorku bylo přidáno 20 mL rozpouštědla a vzorek byl ultrazvukován po dobu 25 minut za občasného míchání. Odměrná baňka byla rozpouštědlem vzorku doplněna po rysku a vzorek byl odstředěn při 14 000 rpm po dobu 10 minut. Pro tento obecný postup bylo postupně testováno několik rozpouštědel vzorku. Sledovanými parametry byly především stabilita vzorku, výtěžnost nečistot a tvar píků na začátku chromatogramu (nečistoty B a A hydrochlorothiazidu). Závěry z těchto experimentů jsou uvedeny v tabulce 5.

**Tab. 5** Testování rozpouštědla vzorku pro přípravu. 795 mg vzorku/25 mL rozpouštědla, ultrazvuk 25 minut, odstředění 14 000 rpm/10 minut. Chromatografické podmínky viz Publikace II. Sledovány parametry stability vzorku [kritická nečistota B (HCTZ), hladina 0,1 %], výtěžnost [kritická nečistota C (HCTZ), hladina 0,1 %] a tvar píků nečistot B a A (HCTZ).

Parametr / Rozpouštědlo	stabilita nečistoty B (HCTZ)	výtěžnost nečistoty C (HCTZ)	tvar píků
60% CH <sub>3</sub> OH	nevyhovující: 53% nárůst plochy za 18 hodin při 25 °C	nevyhovující: 49 %	symetrické
60% CH <sub>3</sub> OH v 1,6% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	vyhovující	nevyhovující: 51%	symetrické
80% CH <sub>3</sub> OH v 1,6% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	vyhovující: 99,6 %	deformované
60% CH <sub>3</sub> CN v 1,6% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	vyhovující: 100,4 %	deformované
45 % CH <sub>3</sub> OH/15 % CH <sub>3</sub> CN/40 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1,6%)	-	nevyhovující: 65 %	symetrické
30 % CH <sub>3</sub> OH/30 % CH <sub>3</sub> CN/40 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1,6%)	vyhovující: viz Publikace II	vyhovující: 100,0 %	symetrické

Ve výchozím rozpouštědle (60% methanolu) hydrochlorothiazid ve vzorku z léčivého přípravku degradoval na nečistotu B. Bylo-li v tomto rozpouštědle připraveno samostatně 25 mg API hydrochlorothiazidu, degradace byla ještě rychlejší (nárůst plochy o 185 % za 18 hodin při 25 °C). Maximální akceptovatelná změna byla 10 % relativních za zvolenou časovou jednotku (minimálně 24 hodin). Zároveň byla nevyhovující výtěžnost nečistoty C (HCTZ) ze zhomogenizované tabletoviny, což bylo potvrzeno analýzou API obsahující tuto nečistotu a API smíchanou s placebem. Výtěžnost nečistoty C na hladině 0,1 % by měla být v intervalu 70,0 % - 130,0 % [56]. Vzorek API hydrochlorothiazidu s placebem byl dále na 2 hodiny uložen v lednici při 4 °C a následně odstředěn. V tomto případě výtěžnost nečistoty C klesla ze 49 % na 44 %. Zpět na hodnotu 49 % se výtěžnost vrátila, pokud byl vzorek z lednice nejprve znovu vytemperován na 25 °C a až poté odstředěn, čímž byla prokázána sorpce nečistoty C na placebo.

Hydrochlorothiazid byl stabilizován okyselením rozpouštědla vzorku, avšak výtěžnost nečistoty C byla stále nízká. Zvýšení obsahu organické složky či nahrazení methanolu acetonitrilem vedlo ke zvýšené solvatační schopnosti rozpouštědla a dosažení požadované výtěžnosti. Eluční síla těchto rozpouštědel však ovlivnila tvary píků nečistot B a A hydrochlorothiazidu. Při použití 80% methanolu byly píky ve svých vrcholech deformovány a při použití 60% acetonitrilu byly rozmyty a též deformovány. Účinnost separace pro nečistoty B a A byla v 60% acetonitrilu 8300, respektive 7000 teoretických pater, zatímco ve finálním rozpouštědle byla účinnost 15300 a 11800 teoretických pater. Konečné rozpouštědlo vzorku kombinovalo stabilizující efekt kyseliny fosforečné a zvýšenou solvatační schopnost dosaženou částečným nahrazením methanolu za acetonitril, přičemž jeho eluční síla neměla negativní vliv na tvar píků.

Během vývoje složení rozpouštědla vzorku bylo zjištěno, že ultrazvukování vzorku, jeho odstředění a uchovávání v autosampleru by mělo probíhat za kontrolovaných a pro danou fázi nejnižších možných teplot. Důvodem byla neznámá nečistota hydrochlorothiazidu (obr. 18, pík 5), jejíž plocha se při porovnání kontrolovaných a nekontrolovaných podmínek zvýšila z 1838 mV/s na 3359 mV/s. Vzhledem k výkonu ultrazvuku byla minimální možná udržitelná teplota 25 °C. Pro

odstředování a skladování vzorku byla nastavena teplota 10 °C, jelikož při nižší teplotě docházelo po 24 hodinách ke srážení některé složky vzorku a zároveň tato teplota zajistila dostatečnou stabilitu připraveného vzorku.

## Literatura I

- [1] S. Ahuja, S. Scypinsky (Ed.): Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001.
- [2] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015. Chapter 2.2.49.
- [3] S. A. C. Wren, P. Tchelitcheff: Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 140 – 146.
- [4] M. E. Swartz: UPLC an Introduction, LC/GC North America May 2005.
- [5] T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey: Fast Analysis in Liquid Chromatography Using Small Particle Size and High Pressure, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836 – 1848.
- [6] J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson: Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns, *Anal. Chem.* 69 (1997) 983 – 989.
- [7] J. A. Lippert, B. Xin, N. Wu, M. L. Lee: Fast Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography: On-Column UV and Time-of-Flight Mass Spectrometric Detection, *J. Microcol. Sep.* 11 (1997) 631 – 643.
- [8] J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson: Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography: Isocratic and Gradient Elution Using Columns Packed with 1.0- $\mu\text{m}$  Particles, *Anal. Chem.* 71 (1999) 700 – 708.
- [9] N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee: Practical Aspects of Ultrahigh Pressure Capillary Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 1 – 12.
- [10] L. A. Colón, J. M. Cintrón, J. A. Anspach, A. M. Fermier, K. A. Swinney: Very High Pressure HPLC with 1 mm ID Columns, *Analyst* 129 (2004) 503 – 504.
- [11] [www.waters.com](http://www.waters.com) (30. 5. 2015, 16:39)
- [12] [www.waters.com](http://www.waters.com), Literature: Acquity UPLC columns, Library no: 720001140EN.
- [13] A. Villiers, H. Lauer, R. Szcus, S. Goodall, P. Sandra: Influence of Frictional Heating on Temperature Gradients in Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography on 2.1 mm I.D. Columns, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 84 – 91.

- [14] D. V. McCalley: The Impact of Pressure and Frictional Heating on Retention, Selectivity and Efficiency in Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 31 – 43.
- [15] N. Wu, A. M. Clausen: Fundamental and Practical Aspects of Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography for Fast Separations, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1167 – 1182.
- [16] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme: Importance of Instrumentation for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105 – 119.
- [17] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete: Facts and Myths about Columns Packed with sub-3  $\mu\text{m}$  and sub-2  $\mu\text{m}$  Particles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 56 – 64.
- [18] J. M. Cunliffe, S. B. Adams-Hall, T. D. Maloney: Evaluation and Comparison of Very High Pressure Liquid Chromatography Systems for the Separation and Validation of Pharmaceutical Compounds, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1214 – 1223.
- [19] Z. Spáčil, L. Nováková, P. Solich: Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, *Talanta* 76 (2008) 189 – 199.
- [20] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich: Advantages of Application of UPLC in Pharmaceutical Analysis, *Talanta* 68 (2006) 908 – 918.
- [21] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich: Advantages of Ultra Performance Liquid Chromatography over High-Performance Liquid Chromatography: Comparison of Different Analytical Approaches During Analysis of Diclofenac Gel, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2433 – 2443.
- [22] C. C. Leandro, P. Hancock, R. J. Fussell, B. J. Keely: Comparison of Ultra-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Priority Pesticides in Baby Foods by Tandem Quadrupole Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94 – 101.
- [23] I. Klimeczak, A. Gliszczyńska-Świągł: Comparison of UPLC and HPLC Methods for Determination of Vitamin C, *Food Chem.* 175 (2015) 100 – 105.
- [24] J. Jastrebova, H. S. Strandler, J. Patring, T. Wiklund: Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of Dietary Foliates, *Chromatographia* 73 (2011) 219 – 225.

- [25] T. A. Miranda, P. H. R. Silva, G. A. Pianetti, I. C. César: Simultaneous Quantitation of Chloroquine and Primaquine by UPLC-DAD and Comparison with a HPLC-DAD Method, *Malaria J.* 14 (2015) 29 – 35.
- [26] J. Zhou, J. Zhao, H. Yuan, Y. Meng, Y. Li, L. Wu, X. Xue: Comparison of UPLC and HPLC for Determination of trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid Content in Royal Jelly by Ultrasound-Assisted Extraction with Internal Standard, *Chromatographia* 66 (2007) 185 – 190.
- [27] T. Wu, C. Wang, X. Wang, H. Xiao, Q. Ma, Q. Zhang: Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates, *Chromatographia* 68 (2008) 803 – 806.
- [28] I. Citová, L. Havlíková, L. Urbánek, D. Solichová, L. Nováková, P. Solich: Comparison of a Novel Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Retinol and  $\alpha$ -tocopherol in Human Serum with Conventional HPLC Using Monolithic and Particulate Columns, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 675 – 681.
- [29] M. Noetzli, N. Ansermot, M. Dobrinás, C. B. Eap: Simultaneous Determination of Antidementia Drugs in Human Plasma: Procedure Transfer from HPLC–MS to UPLC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 64-65 (2012) 16 – 25.
- [30] S. Chen, A. Kord: Theoretical and Experimental Comparison of Mobile Phase Consumption Between Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6204 – 6209.
- [31] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen: Comparison of Separation Power of Ultra Performance Liquid Chromatography and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography in the Separation of Phenolic Compounds in Beverages, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3466 – 3472.
- [32] M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch: Theoretical and Practical Interest in UHPLC Technology for 2D-LC, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 104 – 112.
- [33] S. Fekete, J. Schappler, J. L. Veuthey, D. Guillarme: Current and Future Trends in UHPLC, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 2 – 14.
- [34] T. H. Walter, R. W. Andrews: Recent Innovations in UHPLC Columns and Instrumentation, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 14 – 20.

- [35] L. Nováková, A. G. G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guilleme: Modern Analytical Supercritical Fluid Chromatography Using Columns Packed with sub-2  $\mu\text{m}$  Particles: A Tutorial, *Anal. Chim. Acta* 824 (2014) 18 – 35.
- [36] Český Lékopis 2009, Státní ústav pro kontrolu léčiv.
- [37] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015.
- [38] USP 37 Second supplement, The United States Pharmacopeial Convention.
- [39] British Pharmacopoeia 2015, The British Pharmacopoeia Secretariat.
- [40] Japanese Pharmacopoeia 16, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- [41] [www.ich.org](http://www.ich.org) (17. 4. 2015, 18:00).
- [42] ICH Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances, 2006.
- [43] ICH Q3C (R5) Guideline for Residual Solvents, 2011.
- [44] S. Görög: Drug Safety, Drug Quality, Drug Analysis, *J. Pharm. Biomed.* 48 (2008) 247 – 253.
- [45] ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products, 2006.
- [46] S. Ahuja: Assuring Quality of Drugs by Monitoring Impurities, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 3 – 11.
- [47] S. M. Chesnut, J. J. Salisbury: The role of UHPLC in Pharmaceutical Development, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1183 – 1190.
- [48] M. W. Dong, K. Zhang: Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography (UHPLC) in Method Development, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 21 – 30.
- [49] P. Petersson, P. Forssen, L. Edström, F. Samie, S. Tatterton, A. Clarke, T. Fornstedt: Why Ultra High Performance Liquid Chromatography Produces More Tailing Peaks than High Performance Liquid Chromatography, Why It Does Not Matter And How It Can Be Addressed, *J. Chrom. A* 1218 (2011) 6914 – 6921.
- [50] A. H. Schmidt, I. Molnár: Using an Innovative Quality-by-Design Approach for Development of a Stability Indicating UHPLC Method for Ebastine in the API and Pharmaceutical Formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78-79 (2013) 65 – 74.

- [51] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J. L. Veuthey: New Trends in Fast and High-Resolution Liquid Chromatography: A Critical Comparison of Existing Approaches, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1069 – 1082.
- [52] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [53] R. LoBrutto, T. Patel, Method validation, in: Y. Kazakevich, R. LoBrutto (Ed.), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2007, 455 – 502.
- [54] USP 37 Second supplement, The United States Pharmacopeial Convention, Chapter 621.
- [55] M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu, S. A. Ozkan: UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters, *Chromatographia* 76 (2013) 1365 – 1427.
- [56] B. Crowther, Validation of Pharmaceutical Test Method, in: S. Ahuja, S. Scypinsky (Ed.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2001, 415 – 443.
- [57] H. Lüllman, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger: *Color Atlas of Pharmacology*, 2nd ed., Thieme, New York, 2000.
- [58] M. J. Neal: *Medical Pharmacology at a Glance*, 7th ed., Wiley, Hoboken, 2012.
- [59] S. K. Kulkarni, I. Ninan, A. Sighn: Antispasmodic Activity of Diclofenac and Its Combination with Pitofenone and Fenpiverinum on Rat Colon, *Indian J. Pharma. Col.* 30 (1998) 323 – 325, CAN 130:148241.
- [60] A. M. Larson, J. Polson, R. J. Fontana, T. J. Davern, E. Lalani, L. S. Hynan, J. S. Reisch, F. V. Schiødt, G. Ostapowicz, O. Shakil, W. M. Lee: Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure: Results of a United States Multicenter, Prospective Study, *Hepatology* 42 (2005) 1364 – 1372.
- [61] L. M. Flower, R. B. Moore, J. R. Foster, E. A. Lock: Nephrotoxicity of 4-aminophenol Glutathione Conjugate, *Hum. Exp. Toxicol.* 10 (1991) 451 – 459, CAN 116:209251.

- [62] X. Feng, Q. Zhang, P. Cong, Z. Zhu: Determination of the Paracetamol Degradation Process with Online UV Spectroscopic and Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares Methods: Comparative Calibration by HPLC, *Anal. Methods* 5 (2013) 5286 – 5293.
- [63] T. Nemeth, P. Jankovics, J. Nemeth-Palotas, H. Kozegi-Szalai: Determination of Paracetamol and Its Main Impurity 4-aminophenol in Analgesic Preparations by Micellar Electrokinetic Chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 746 – 749.
- [64] E. McEvoy, S. Donegan, J. Power, K. Altria: Application of MELC and MEEKC for the Analysis of Paracetamol and Related Impurities in Suppositories, *Chromatographia* 68 (2008) 49 – 56.
- [65] G. Milch, E. Szabo: Derivative Spectrophotometric Assay of Acetaminophen and Spectrofluorometric Determination of Its Main Impurity, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 1107 – 1113.
- [66] B. Dejaegher, M. S. Bloomfield, J. Smeyers-Verbeke, Y. V. Heyd: Validation of a Fluorimetric Assay for 4-aminophenol in Paracetamol Formulations, *Talanta* 75 (2008) 258 – 265.
- [67] J. Forshed, F. O. Andersson, S. P. Jacobsson: NMR and Bayesian Regularized Neural Network Regression for Impurity Determination of 4-aminophenol, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 495 – 505.
- [68] S. L. Eldridge, V. K. Almeida, A. K. Korir, C. K. Larive: Separation and Analysis of Trace Degradants in a Pharmaceutical Formulation Using On-line Capillary Isotachopheresis-NMR, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8446 – 8453.
- [69] E. A. Abdelaleem, N. S. Abdelwahab: Stability-indicating TLC-Densitometric Method for Simultaneous Determination of Paracetamol and Chlorzoxazone and Their Toxic Impurities, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 187 – 191.
- [70] D. A. Shash, J. P. Rana, S. L. Baldania, U. K. Chhalotiya, K. K. Bhatt: High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for the Estimation of Paracetamol, Dicyclomine Hydrochloride, and Mefenamic Acid in Combined Tablet Dosage Form, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 27 (2014) 52 – 57.

- [71] I. U. Khan, M. Ashfaq, S. N. Razzaq, I. Mariam: Simultaneous Determination of Piroxicam and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations Using Stability Indicating HPLC Method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1437 – 1450.
- [72] M. S. Ali, S. Raffiuddin, M. Ghori, A. R. Kahtri: Simultaneous Determination of Paracetamol, Chlorzoxazone, and Related Impurities 4-aminophenol, 4-chloroacetanilide, and p-chlorophenol in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 82 – 93.
- [73] M. Kamberi, C. M. Riley, X. Ma, C. C. Huang: A Validated, Sensitive HPLC Method for the Determination of Trace Impurities in Acetaminophen Drug Substance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 123 – 128.
- [74] O. Calinescu, I. A. Badea, L. Vladescu, V. Meltzer, E. Pincu: HPLC Separation of Acetaminophen and Its Impurities Using a Mixed-Mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 335 – 342.
- [75] R. N. Rao, A. Narasaraju: Rapid Separation and Determination of Process-Related Substances of Paracetamol Using Reversed-Phase HPLC with Photo Diode Array as a Detector, *Anal. Sci.* 22 (2006) 287 – 292.
- [76] M. Crevar, B. Ivkovic, S. Vladimirov, V. Kuntic, Z. Vujic: Statistical Optimization of Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Caffeine Paracetamol and its Degradation Product p-aminophenol, *Acta Chim. Slov.* 55 (2008) 665 – 670.
- [77] E. Wyszeccka-Kaszuba, M. Warowna-Grzeskiewicz, Z. Fijalek: Determination of 4-aminophenol Impurities in Multicomponent Analgesic Preparations by HPLC with Amperometric Detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1081 – 1086.
- [78] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart, A. M. McLaughl: Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Stability-Indicating Analysis of Acetaminophen, Codeine Phosphate, and Sodium Benzoate in Elixirs, *J. Chromatogr.* 354 (1986) 355 – 366.
- [79] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart: Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Stability-Indicating Analysis of Acetaminophen and Codeine Phosphate in Tablets and Capsules, *J. Chromatogr.* 348 (1985) 253 – 263.

- [80] R. Kommana, P. Basappa: Validated Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Codeine Phosphate and Chlorpheniramine Maleate from Their Combined Liquid dosage Form, *Chromatogr. Res. Int.* (2013), 4047277p.
- [81] K. Persson-Stubberud, O. Astrom: Separation of Ibuprofen, Codeine Phosphate, Their Degradation Products and Impurities by Capillary Electrophoresis. II. Validation, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95 – 102.
- [82] Z. Budvari-Barany, G. Szasz, K. Gyimesi-Forras: Optimized and Validated HPLC Methods for Compendial Quality Assessment. II. Opium Alkaloids, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3257 – 3268.
- [83] A. Kulikov, U. Artem, A. P. Biochenko, A.G. Verushkin: Optimization of Micellar LC Conditions for Separation of Opium Alkaloids and Their Determination in Pharmaceutical Preparations, *Anal. Methods* 3 (2011) 2749 – 2757.
- [84] L. Krenn, B. Boros, R. Ohmacht, L. Jelinek: HPLC Separation of Opium Alkaloids on Porous and Non-Porous Stationary Phases, *Chromatographia* 51 (2000) S175 – S178.
- [85] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen: Determination of Opium Alkaloids in Opium by Capillary Electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 687 – 693.
- [86] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen: Comparison of Aqueous and Nonaqueous Capillary Electrophoresis for Quantitative Determination of Morphine in Pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1083 – 1089.
- [87] I. Ojanpera, J. Vartivaara, A. Ruohonen, E. Vuori: Combined Use of Normal and Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography in the Screening for Basic and Quaternary Drugs, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1435 – 1446.
- [88] H. Schuetz, A. Pielmeyer, G. Weiler: Thin-Layer Chromatographic Screening of 500 Toxicologically Relevant Substances by Corrected R<sub>f</sub> Values (R<sub>fc</sub> values) in Two Systems, *Aerztl. Lab.* 36 (1990) 113 – 123, CAN113:110560.
- [89] T. Daldrup, P. Michalke, W. Boehme: A Screening Test for Pharmaceuticals, Drugs and Insecticides with Reversed-Phase Liquid Chromatography – Retention Data of 560 Compounds, *Chromatogr. Newsl.* 10 (1982) 1 – 7, CAN98:84433.

- [90] T. Daldrup, F. Susanto, P. Michalke: Combination of TLC, GLC (OV 1 and OV 17) and HPLC (RP 18) for a Rapid detection of Drugs, Intoxicants and Related Compounds, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 308 (1981) 413 – 427, CAN 96:29498.
- [91] B. Morelli: Determination of Noramidopyrine Methanesulfonate Sodium Salt, Pitophenone Hydrochloride and Fenpiverine Bromide in Pharmaceuticals by Ratio–Spectra Zero–Crossing Derivative Spectrophotometry, *Anal. Lett.* 31 (1998) 2431 – 2445.
- [92] B. Morelli: Determination of Binary Mixtures of Analgesic and Spasmolytic Drugs in Pure and Dosage Forms by Derivative Spectrophotometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 423 – 433.
- [93] T. Galaon, M. Radulescu, V. David, A. Medvedovici: Use of an Immiscible Diluent in Ionic Liquid/Ion Pair LC for the Assay of an Injectable Analgesic, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 1360 – 1368.
- [94] D. Radulovic, L. Zivarovic, D. Zivanov-Stakic: Determination of Mixture of Spasmoanalgetics in Pharmaceutical Preparations Using TLC Densitometry, *Acta Pol. Pharm.* 46 (1989) 506 – 509, CAN 113:158810.
- [95] D. Agbaba, O. Grozdanovic, L. Popovic, S. Vladimirov, D. Zivanov-Stakic: HPTLC in the Quantitative Assay of Drugs, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9 (1996) 116 – 119, CAN 125:96252.
- [96] D. Radulovic, Z. Blagojevic: Thin Layer Chromatography of Some Pharmaceutical Preparations Containing Sodium Metamizole, *Arh. Farm.* 32 (1982) 3 – 7, CAN 97:98433.
- [97] J. Vojta, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and Determination of Impurities in Paracetamol, Codeine and Pitophenone in the Presence of Fenpiverinium in Combined Suppository Dosage Form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 85 – 92.
- [98] A Global Brief on Hypertension, World Health Organization, Geneva, 2013.
- [99] Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 1462 – 1536.

- [100] G. A. McKay, R. M. Walters: Lecture Notes, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 9th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2013.
- [101] C. Krishnaiah, A. R. Reddy, R. Kumar, K. Mukkanti, Stability-indicating UPLC Method for Determination of Valsartan and Their Degradation Products in Active Pharmaceutical Ingredient and Pharmaceutical Dosage Forms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 483 – 489.
- [102] R. Kormany, J. Fekete, D. Guillarme, S. Fekete: Reliability of Simulated Robustness Testing in Fast Liquid Chromatography, Using State-of-the-art Column Technology, Instrumentation and Modelling Software, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 67 – 75.
- [103] M. Kharoaf, N. Malkeih, M. Abualhasan, R. Shubitah, N. Jaradat, A. N. Zaid: Tablet Formulation and Development of a Validated Stability Indicating HPLC Method for Quantification of Valsartan and Hydrochlorothiazide Combination, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2012) 284 – 290.
- [104] P. Antil, D. Kaushik, G. Jain, K. S. Srinivas, I. Thakur: UPLC Method for Simultaneous Determination of Valsartan & Hydrochlorothiazide in Drug Products, *J. Chromatogr. Sep. Technol.* 4 (2013) 1 – 5.
- [105] A. A. Elshanawane, L. M. Abdelaziz, M. M. Kamal, H. M. Hafez: Quantitative Determination of Four Angiotensin-II-receptor Antagonists in Presence of Hydrochlorothiazide by a Gradient Technique HPLC in their Pharmaceutical Preparations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37 (2014) 171 – 186.
- [106] S. Singh, K. Patel, V.K. Agrawal, S. Chaturverdi: Stability Indicating HPTLC Method for Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2012) 468 – 471.
- [107] S. Ahmed, N. N. Atia, N. A. Mohamed: Dual Separation Mode for Simultaneous Determination of Antihypertensive Drug Combinations by High-Performance Liquid Chromatography, *Talanta* 84 (2011) 666 – 672.

- [108] A. A. Ramadan, H. Al-Akraa, M. Maktabi: TLC Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Pure Form and in Tablets Using Butyl-Modified Aleppo Bentonite, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (2013) 762 – 769.
- [109] D. Ivanovic, A. Malenovic, B. Jancic, M. Madenica, M. Maskovic: Monitoring of Impurity Level of Valsartan and Hydrochlorothiazide Employing RP-HPLC Gradient Mode, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 2879 – 2890.
- [110] C. V. N. Prasad, Ch. S. Kumari, J. S. Ramulu: A Stability Indicating RP-HPLC Method with Shorter Runtime for Simultaneous Estimation of Valsartan and Amlodipine from Their Combination Drug Product, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 1 (2011) 102 – 110.
- [111] S. S. Chitlange, K. Bagri, D. M. Sakarkar: Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Valsartan and Amlodipine in Capsule Formulation, *Asian J. Res. Chem.* 1 (2008) 15 – 18, CAN 151:497799.
- [112] Y. R. Reddy, K. K. Kumar, M. R. P. Reddy, K. Mukkanti: Rapid Determination of Amlodipine Besylate and Valsartan in Pharmaceutical Preparations by Stability-Indicating Ultra Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.: Indian J.* 11 (2012) 335 – 341, CAN 157:616076.
- [113] S.R. Dhaneshwar, N. G. Patre, M. V. Mahadik: Validated TLC Method for Simultaneous Quantitation of Amlodipine Besylate and Valsartan in Bulk Drug and Formulation, *Chromatographia* 69 (2009) 157 – 161.
- [114] N. H. Al-Shaalan, M. A. Alnowaiser: Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Valsartan in Pharmaceutical Formulation Using High Performance Liquid Chromatography, *J. Chem. Pharm. Res.* 2 (2010) 129 – 134.
- [115] N. K. Ramadan, H. M. Mohamed, A. A. Moustafa: Rapid and Highly Sensitive HPLC and TLC Methods for Quantitation of Amlodipine Besilate and Valsartan in Bulk Powder and in Pharmaceutical Dosage Forms and in Human Plasma, *Anal. Lett.* 43 (2010) 570 – 581.
- [116] L. Peikova, B. Tsvetkova: RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Valsartan in Pharmaceutical Dosage Form, *Pharmacia (Sofia)* 60 (2013) 19 – 23.

- [117] P. S. Jain, M. K. Patel, A. P. Gorle, A. J. Chaudhari, S. J. Surana: Stability-Indicating Method for Simultaneous Estimation of Olmesartan Medoxomile, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide by RP-HPLC in Tablet Dosage Form, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 680 – 687.
- [118] G. P. Pandya, H. S. Joshi: Development and Validation of Stability Indicating HPLC Assay Method for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate, Olmesartan Medoxomil and Hydrochlorothiazide in Tablet Formulation, *Pharm. Sin.* 4 (2013) 145 – 152.
- [119] N. Dubey, A. Jain, A. K. Raghuwanshi, D. K. Jain: Stability-Indicating HPTLC Method for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate, Hydrochlorothiazide and Olmesartan Medoxomil in Combined Tablet Dosage Forms, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 25 (2012) 475 – 480.
- [120] R. I. El-Bagary, G. Patonay, A. A. Elzahr, E. F. Elkady, W. A. Ebeid: Ion-Pair LC Method for Simultaneous Determination of Aliskiren Hemifumarate, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide in Pharmaceuticals, *Chromatographia* 77 (2014) 257 – 264.
- [121] M. M. Salim, W. M. Ebeid, N. El-Enany, F. Belal, M. Walash, G. Patonay: Simultaneous Determination of Aliskiren Hemifumarate, Amlodipine Besylate, and Hydrochlorothiazide in Their Triple Mixture Dosage Form by Capillary Zone Electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1206 – 1213.
- [122] D. L. Hertzog, J. F. McCafferty, X. G. Fang, R. J. Tyrrell, R. A. Reed: Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Losartan Potassium, Hydrochlorothiazide, and Their Degradation Products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 747 – 760.
- [123] S. Mukhopadhyay, K. Kadam, L. Sawant, D. Nachane, N. Pandita: Simultaneous Determination of Related Substances of Telmisartan and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage Form by Using Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method, *J. Pharm. BioAllied Sci.* 3 (2011) 375 – 383.

- [124] B. Satheesh, S. K. Pulluru, K. Nitin, D. Saravanan: Simultaneous Determination of Eprosartan, Hydrochlorothiazide, and Their Related Compounds in Pharmaceutical Dosage Forms by UPLC, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 1885 – 1900.
- [125] D. Ivanovic, M. Medenica, B. Jancic, N. Knezevic, A. Malenovic, J. Milic: Validation of an Analytical Procedure for Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide, Lisinopril, and Their Impurities, *Acta Chromatogr.* 18 (2007) 143 – 156.
- [126] P. Aparna, S. Rao, K. M. Thomas, K. Mukkanti: Simultaneous Determination of Lisinopril and Hydrochlorothiazide Related Impurities in Lisinopril and Hydrochlorothiazide Combined Tablet Dosage Forms Using HPLC, *Anal. Chem.: Indian J.* 7 (2008) 454 – 461, CAN 150:337789.
- [127] R. J. V. Eranki, G. Inti, V. Jayaraman, S. R. Vidiyala, R. J. Sree: New Stability Indicating Method for Quantification of Impurities in Amlodipine and Atorvastatin Calcium Tablets by Validated HPLC, *Int. J. Pharm. Res. Sch.* 2 (2013) 458 – 471.
- [128] R. J. V. Eranki, G. Inti, V. Jayaraman, R. Pannala, S. R. Vidiyala, R. J. Sree: New Stability Indicating Method for Quantification of Impurities in Amlodipine and Benazepril Capsules by Validated HPLC, *Am. J. Anal. Chem.* 4 (2013) 715 – 724.
- [129] J. Vojta, A. Jedlička, P. Coufal. L. Janečková: A New, Rapid, Stability-Indicating UPLC Method for Separation and Determination of Impurities in Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Their Combined Tablet Dosage Form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 36 – 44.
- [130] R. A. Shaalan, T. S. Belal: Gradient HPLC-DAD Determination of the Antihypertensive Mixture of Amlodipine Besylate, Valsartan, and Hydrochlorothiazide in Combined Pharmaceutical Tablets, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 215 – 230.
- [131] S. E. K. Tekkeli: Development of an HPLC–UV Method for the Analysis of Drugs Used for Combined Hypertension Therapy in Pharmaceutical Preparations and Human Plasma, *J. Anal. Methods Chem.* (2013), Article Number 179627.

- [132] D. Jothieswari, K. Anandakumar, S. D. Vijaya, B. Vijayakumar, D. Priya, R. B. Stephen: Validated RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk and in Pharmaceutical Formulation, *J. Pharm. Biomed. Sci.* 5 (12) (2012).
- [133] B. N. Deepthi, D. N. Rao, M. P. Rao, S. R. Beeravalli, Y. R. Krishna, V. Rao, L. S. Koundilya: Method Development and Validation of Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Pure Drug and Pharmaceutical Formulations by Using RP-HPLC, *Int. J. Univ. Pharm. Biosci.* 2 (2013) 174 – 185.
- [134] S. M. El-Gizawy, O. H. Abdelmageed, M. A. Omar, S. M. Deryea, A. M. Abdel-Megied: Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Determination of Amlodipine, Valsartan, Hydrochlorothiazide in Dosage Form and Spiked Human Plasma, *Am. J. Anal. Chem.* 3 (2012) 422 – 430.
- [135] R. N. Sharma, S. S. Pancholi: Simple RP-HPLC Method for Determination of Triple Drug Combination of Valsartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Human Plasma, *Acta Pharm. (Zagreb)* 62 (2012) 45 – 58.
- [136] K. R. Ulavapally, J. Sriramulu, V. R. Pyreddy, V. Bobbarala: Single RP-HPLC Method for the Determination of Hydrochlorothiazide, Amlodipine Besylate and Valsartan in Pharmaceutical Products, *J. Pharm. Res.* 4 (2011) 894 – 896.
- [137] M. Sharma, C. Kothari, O. Sherikar, P. Mehta: Concurrent Estimation of Amlodipine Besylate, Hydrochlorothiazide and Valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV Spectrophotometry, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 27 – 35.
- [138] C. Vishnuvardhan, P. Radhakrishnanand, S. G. Navalgund, K. R. Atcha, N. Satheshkumar: RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Eight Cardiovascular Drugs, *Chromatographia* 77 (2014) 265 – 275.
- [139] S. E. Vignaduzzo, P. M. Castellano, T. S. Kaufman: Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide, and Valsartan in Tablets of Their Novel Triple Combination and Binary Pharmaceutical Associations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 2383 – 2395.

- [140] S. J. Varghese, T. K. Ravi: Quantitative Simultaneous Determination of Amlodipine, Valsartan, and Hydrochlorothiazide in Exforge HCT Tablets Using High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 981 – 994.
- [141] W. M. Ebeid, E. F. Elkady, A. A. El-Zaher, R. I. El-Bagary, G. Patonay: Synchronized Separation of Seven Medications Representing Most Commonly Prescribed Antihypertensive Classes by Using Reversed-Phase Liquid Chromatography: Application for Analysis in Their Combined Formulations, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 748 – 757.
- [142] R. S. Ch. Phani, K. R. S. Prasad, U. R. Mallu: High Resolution RP-HPLC Method for the Determination of Hypertensive Drug Products, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 440 – 454.
- [143] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany: Rapid and Sensitive TLC and HPLC with On-Line Wavelength Switching Methods for Simultaneous Quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 345 – 356.
- [144] M. Younus, T. K. Reddy, Y. R. Reddy, M. F. Arif: RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage Form, *J. Pharm. Res.* 3 (2010) 2647 – 2650.
- [145] A. Hemke, M. Bhure, V. Anjankar, K. Gupta: Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan in Pharmaceutical Formulation, *Int. J. Pharm. Technol.* 5 (2013) 5383 – 5392.
- [146] M. B. Nikam, H. Dhamane, A. Aligave, M. S. Kondawar: Simultaneous Estimation of Valsartan, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide by First Order Derivative UV Spectrophotometric Method, *Int. J. Pharm. Technol.* 2 (2010) 642 – 650.
- [147] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany: Comparative Study Between Derivative Spectrophotometry and Multivariate Calibration as Analytical Tools Applied for the Simultaneous Quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide, *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 215 – 223.

- [148] V. R. Galande, K. G. Baheti, S. Indraksha, M. H. Dehghan: Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk Mixture and Tablet by UV Spectrophotometry, *Indian J. Pharm. Sci.* 74 (2012) 18 – 23.
- [149] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015. Monography: Codeine phosphate hemihydrate.
- [150] <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/dimethyl-sulfoxide-center.html>, (2. 5. 2015, 19:18).
- [151] L. Hanyšová, P. Kastner, J. Klimeš: Studium stability *p*-aminofenolu jako dominantního rozkladného produktu paracetamolu, *Chem. Listy* 98 (2004) 152 – 156.

## **Publikace I**

Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine  
and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined  
suppository dosage form

Jiří Vojta, Pavel Hanzlík, Aleš Jedlička, Pavel Coufal

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 85 - 92

## **Publikace II**

A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form

Jiří Vojta, Aleš Jedlička, Pavel Coufal, Lucie Janečková

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 109 (2015) 36 - 44

## 2. Příprava monolitických stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii

### 2.1 Teoretický úvod

Monolitické stacionární fáze jsou moderní separační média s všestrannou aplikační oblastí. Na rozdíl od sférických stacionárních fází jsou vytvořeny z jednoho kusu pórovitého materiálu, který zcela vyplňuje tělo kolony či kanálek čipu. Obecné vlastnosti organických i anorganických monolitických stacionárních fází, základní způsoby jejich přípravy a vybrané aplikace jsou popsány v příložené Publikaci III.

Monolitické tenké vrstvy na bázi oxidu křemičitého o tloušťce 10  $\mu\text{m}$  přinesly oproti klasické HPTLC zrychlení analýzy, snížení spotřeby rozpouštědel a zvýšení citlivosti detekce [1, 2]. Ultra tenkovrstvá chromatografie (UTLC) byla tedy využívána především ve spojení s MS detekcí [3 - 9]. Příprava organických monolitů pro tenkovrstvou chromatografii započala až v roce 2004, kdy Švec, Fréchet a kol. představili vzorkovací destičku modifikovanou zpolymerizovanými monolity pro MALDI-TOF detekci [10]. Monolitická fáze oproti klasické matici (2,5-dihydroxybenzoová kyselina) poskytovala méně interferující pozadí pro ionizaci malých molekul a delší trvanlivost vzorkovací destičky v porovnání se silikagelovou maticí [10].

V roce 2007 pak byla popsána příprava monolitické tenké vrstvy na bázi methakrylátu mezi dvěma sklíčky oddělenými teflonovým těsněním [11]. Složení polymerizační směsi (butyl-methakrylát 24 % hm., ethylen-dimethakrylát 16 % hm., dekan-1-ol 40 % hm. a cyklohexanol 20 % hm.) bylo převzato z přípravy kapilárních kolon. Polymerizace byla iniciována UV zářením a vzniklý monolit separoval barviva, proteiny i peptidy. Nicméně, ionizace makromolekul technikou MALDI musela být podpořena přítomností 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoové kyseliny. Monolitická fáze byla přichycena na silanizované mikroskopické sklíčko. Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu však odhalila rozdílnou morfologii svrchní vrstvy monolitu, která byla v kontaktu s nemodifikovaným krycím sklíčkem. Oproti globulární struktuře

v jeho středu byla svrchní vrstva monolitu na pohled kompaktní a méně porézní [11]. Hladký povrch monolitu byl sice vhodný pro separaci a následnou ionizaci molekul [11], ale jeho úhel smáčení vodou byl  $77^\circ$  [12]. Požadovaných superhydrofóbních vlastností povrchu [12] bylo dosaženo při použití silanizovaného krycího sklíčka. V tomto případě byl povrch monolitu hrubý a úhel smáčení byl  $154^\circ$ . Přestože obě sklíčka tvořící formu byla silanizována, monolit byl přednostně přichycen ke sklíčku, které bylo blíže ke zdroji UV záření, zatímco na krycím sklíčku zůstal pouze slabý film monolitu. Povrch monolitu i jeho střed tedy měly shodnou morfologii. Mechanická odolnost  $50\mu\text{m}$  monolitických vrstev však závisela na obsahu dekan-1-olu a cyklohexanolu v polymerizační směsi. Optimální poměr 40 % hm. dekan-1-olu a 20 % hm. cyklohexanolu dal vzniknout monolitu, který byl dostatečně mechanicky stabilní, aby se nerozpadl při rozdělování formy, a zároveň nepřilnul příliš silně ke krycímu sklíčku. Monolit byl dále z části modifikován hydrofilními monomery a použit pro dvoudimenzionální chromatografii peptidů s ionizací technikou DESI a MS detekcí [12].

Obdobný monolit o tloušťce  $125\ \mu\text{m}$ , avšak s poměrem dekan-1-olu a cyklohexanolu 1:1, byl připraven za účelem separace peptidů a oligonukleotidů planární elektroforézou a elektrochromatografií [13]. Nahrazení butyl-methakrylátu reaktivnějším glycidyl-methakrylátem umožnilo přípravu monolitické tenké vrstvy s gradientem hydrofobicity pro dvoudimenzionální chromatografii peptidů s MALDI-TOF-MS detekcí [14]. Methakrylátové monolity hydrofobní i hydrofilní povahy byly připraveny v silanizovaných kanálcích  $200\ \mu\text{m}$  hlubokých, které byly vyleptané do mikroskopického sklíčka. Polymerace byla iniciována UV zářením, monolity byly morfologicky charakterizovány a použity pro separaci polystyrenových standardů v normálním i reverzním chromatografickém módu [15]. Monolitické tenké vrstvy na bázi styrenu a divinylbenzenu byly připraveny tepelnou iniciací [16]. Na rozdíl od UV iniciace, tepelná iniciace v tenké vrstvě je homogenní a muselo být tedy opět použito nesilanizované krycí sklíčko. V opačném případě se monolit rovnoměrně přichytil k nosnému i krycímu sklu. Svrchní hladká vrstva monolitu byla odstraněna lepicí páskou a monolit byl dále modifikován “hypercrosslinking” technikou a byl tak vhodný

pro separaci malých i velkých molekul s MALDI-TOF-MS detekcí [16]. Tenké vrstvy jsou jedním ze směrů stále se rozvíjející chemie a technologie monolitických stacionárních fází [17]. Cílem této části práce bylo zavedení techniky přípravy monolitů v podmínkách laboratoří Katedry analytické chemie PŘF UK, jelikož reprodukovatelnost přípravy je u monolitických stacionárních fází obecným problémem. Složení polymerizačních směsí bylo voleno na základě předpokládané aplikace pro separace látek v normálním chromatografickém módu s MS detekcí a desorpční fotoionizací za atmosférického tlaku (DAPPI). Klasické aluminiové desky pokryté silikagelovými částicemi nejsou pro tyto otevřené ionizační techniky příliš vhodné, jelikož jejich částičky by mohly MS detektor poškodit. DAPPI je měkká ionizační technika, která byla představena v roce 2007 [18] a která je vhodná i pro přímou analýzu léčiv z biologických vzorků [19]. Ionizace pomocí DAPPI z monolitických TLC destiček dosud testována a publikována nebyla.

## **2.2 Experimentální část**

### **2.2.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje**

Monolitické stacionární fáze byly připraveny na broušených mikroskopických sklíčkách o rozměrech 76 x 21 x 1 mm od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika). K silanizaci sklíček byl použit hydroxid sodný (p. a.), kyselina chlorovodíková (p. a.) od společnosti Lachema (Neratovice, Česká republika), voda upravená přístrojem Milli-Q water purification system (Merck-Millipore, USA), 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát (99%) od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika), toluen (99%) a methanol (HPLC gradient grade) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Sklíčka byla sušena v sušárně UE 200 od firmy Memmert (Schwabach, Německo). Druhou část formy na přípravu tenkých vrstev tvořilo extrudované akrylátové plexisklo Plexiglas XT o tloušťce 3 mm od firmy Zenit (Praha, Česká republika) nařezané na destičky o rozměrech 76 x 21 mm. K oddělení sklíčka a plexisklové destičky bylo použito těsnění Teflon FEP o tloušťkách 25, 50, 76 a 127  $\mu\text{m}$  nařezané na proužky o rozměrech 85 x 4 mm od firmy Katco (Hemel Hemstead, UK). Polymerizační směsi byly

připraveny z glycidyl-methakrylátu (99%), 2-hydroxyethyl-methakrylátu (99%), ethylen-dimethakrylátu (99%), propan-1-olu (99%), dekan-1-olu (99%), cyklohexanolu (99%), butan-1,4-diolu (99%) a 2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenonu (99%) od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Chemikálie byly navažovány na analytických vahách XE Series Model 100A od společnosti Denver Instrumentation Company (Bohemia, USA). Směsi byly odplyňovány v ultrazvukové lázni Elmasonic S15H od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika) a probublávány dusíkem (99,999%) od společnosti Linde (Praha, Česká republika). K iniciaci polymerizace byla použita ruční UV lampa se dvěma 15W výbojkovými trubicemi poskytující záření o vlnové délce 254 nm od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika). Destičky byly oplachovány hexanem (99%) od společnosti Merck (Praha, Česká republika). Detekce DAPPI byla testována za použití verapamilu (99%), acetonu (99%) a toluenu (99%) od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific (San Jose, USA). Data byla vyhodnocena pomocí softwaru XCalibur™ od stejného dodavatele. Iontový zdroj DAPPI byl postaven v laboratoři oddělení hmotnosti spektrometrie Ústavu organické chemie a biochemie (Praha, Česká republika). Molekuly byly ionizovány vakuovou UV lampou PKR 106 od firmy Heraeus Noblelight (Hanau, Německo). K porovnání byly použity destičky TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> MS-grade od společnosti Merck (Praha, Česká republika). Rychlost vzlínání hexanu byla testována ve 250mL skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika).

### **2.2.2 Postup přípravy a testování monolitických tenkých vrstev**

V první fázi přípravy bylo mikroskopické podložní sklíčko silanizováno, aby se k němu mohl kovalentně navázat vznikající monolit. Sklíčko bylo nejprve vloženo do 1M roztoku NaOH ve vodě při laboratorní teplotě na dobu 3 hodiny. Poté bylo důkladně opláchnuto vodou, vloženo na 30 minut do vodného roztoku HCl o koncentraci 0,5 mol/L, znovu důkladně opláchnuto vodou a vysušeno při 120 °C po dobu 60 minut. Suché sklíčko bylo ponořeno na 2 hodiny do 20% roztoku 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátu v methanolu. Reakce proběhla při laboratorní teplotě a za nepřístupu

světla. Silanizované sklíčko bylo důkladně opláchnuto methanolem a vodou a vysušeno za nepřístupu světla při laboratorní teplotě po dobu minimálně 16 hodin.

Po provedené modifikaci mikroskopického sklíčka byla sestavena forma na tvorbu monolitických tenkých vrstev. Plexisklová destička byla otřena buničinou namočenou v methanolu a otřena do sucha. Po delších stranách destičky byly přiloženy proužky teflonového těsnění o definované tloušťce. Destička s těsněním byla překryta silanizovaným sklíčkem tak, aby horní okraj sklíčka byl 5 mm pod horním okrajem destičky. Mezi destičkou a sklíčkem tak vznikl prostor pro přípravu monolitických stacionárních fází o známé tloušťce. Části formy byly k sobě upevněny po stranách s těsněním čtyřmi kancelářskými svorkami. Forma byla ve svislé poloze naplněna polymerizační směsí. Směs byla dávkována po kapkách z pipety na horní část formy. Po naplnění formy bylo na okraje přidáno několik dalších kapek směsi pro zabránění vysychání a nahrazení ztrát způsobených smršťováním monolitu během polymerizace. Naplněná forma byla ve vodorovné poloze sklíčkem vzhůru vložena pod UV lampu ve vzdálenosti 5 cm od zdroje záření. Polymerizace typicky probíhala po dobu 25 minut, poté byla forma rozebrána a vzniklý monolit byl promyt methanolem a hexanem. Naplněná forma byla ve vodorovné poloze sklíčkem vzhůru vložena pod UV lampu ve vzdálenosti 5 cm od zdroje záření. Polymerizace typicky probíhala po dobu 25 minut, poté byla forma rozebrána a vzniklý monolit byl promyt methanolem a hexanem.

Polymerizační směs byla připravena do 5,0mL tmavé vialky. Všechny složky směsi byly odvažovány. Iniciátor DMPAP byl nejprve rozpuštěn v monomerech (GMA, HEMA, EDMA) v zastoupení 1 % hm. vůči monomerům a poté byly přidány porogenní složky (cyklohexanol, propan-1-ol, dekan-1-ol, butan-1,4-diol). Směs byla ultrazvukována po dobu 10 minut a probublávána dusíkem po dobu 15 minut. Hotová směs byla uchovávána při 4 °C. V tabulce 6 jsou uvedena složení směsí S1 až S14 připravených a testovaných v rámci této práce.

**Tab. 6** Složení polymerizačních směsí v % hm. pro přípravu monolitických TLC destiček. Iniciátor DMPAP v zastoupení 1 % hm. vůči monomerům (GMA, HEMA, EDMA).

Komponenta/ Směs	GMA (% hm.)	HEMA (% hm.)	EDMA (% hm.)	cyklohexanol (% hm.)	dekan-1-ol (% hm.)	propan-1-ol (% hm.)	butan-1,4-diol (% hm.)
S1	24	-	16	20	40	-	-
S2	24	-	16	-	-	40	20
S3	-	24	16	-	-	40	20
S4	-	24	16	20	40	-	-
S5	-	24	16	-	-	30	30
S6	-	24	16	-	-	20	40
S7	-	32	8	-	-	40	20
S8	-	16	24	-	-	40	20
S9	-	24	16	20	-	40	-
S10	-	24	16	-	40	-	20
S11	-	24	16	-	30	30	-
S12	-	24	16	-	20	40	-
S13	-	24	16	-	10	50	-
S14	-	24	16	30	-	-	30

Mechanická odolnost stacionárních fází byla testována prostým otěrem. Čas potřebný k navzlínání hexanu byl měřen po vložení sklíčka s monolitickou tenkou vrstvou do lahve, ve které byl 1 cm hexanu a která byla 30 minut před měřením ponechána k ekvilibraci nasycení par. K testování ionizace pomocí DAPPI byl použit roztok verapamilu v methanolu o koncentraci 10 mmol/L. Na destičku byl dávkován objem 1,0  $\mu$ l. Výkon na sprejovacím mikročipu byl nastaven na 4,5 W, což odpovídá teplotě spreje 250 °C - 300 °C na povrchu destičky. Sprej byl tvořen průtokem toluenu 10  $\mu$ L/min a dusíkem o průtoku 180 mL/min. Destička byla sprejována pod úhlem 45 ° do kapiláry o teplotě 340 °C s napětím 7,0 V. Napětí ve fragmentační části iontové optiky (Tube lens voltage) bylo nastaveno na 44,9 V. Měření bylo provedeno v pozitivním módu.

## 2.3 Výsledky a diskuze

### 2.3.1 Vývoj postupu přípravy monolitických TLC destiček

Základní princip přípravy monolitických tenkých vrstev mezi dvěma silanizovanými sklíčky, oddělenými teflonovým těsněním pomocí UV iniciace, byl převzat z publikovaných prací [11 – 14]. Prvotní experimenty byly provedeny s polymerizační směsí S1, jejíž složení bylo rovněž převzato z [14]. Nejprve byl aplikován silanizační postup vyvinutý v naší laboratoři pro přípravu styren-divinylbenzenových monolitů v křemenných kapilárách [20]. V tomto případě silanizační reakce probíhala za použití 10% 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátu v toluenu. Monolit o tloušťce 50  $\mu$ m polymerovaný po dobu 45 minut se však nenavázal ani na jedno sklíčko a bylo možné ho smýt i proudem vody ze stříčky. V dalším kroku byl tedy silanizační postup publikovaný pro monolitické TLC [11-14] upraven na postup popsany v kapitole 2.2.2. Silanizace v methanolu byla pro methakrylátové monolity vhodnější. Monolit připravený ze směsi S1 o tloušťce 50  $\mu$ m se po 5, 10, 15, 30, 45, 60 i 120 minutách polymerizace přichytil k vrchnímu i spodnímu sklu tak, že formu nebylo možné ani rozebrat. Při použití nesilanizovaného spodního krycího skla bylo možné formu rozebrat, ale monolitická tenká vrstva se nerovnoměrně přichycovala

ke spodnímu sklu, a nebylo tak možné připravit homogenní vrstvu monolitické fáze pouze na jednom sklu. Podobné chování vykazovaly i monolity připravené ze směsí S2 až S6 (viz tab. 6) s dobou polymerizace 10 a 30 minut a tloušťce 50  $\mu\text{m}$ . Mikroskopické sklíčko tvořící spodní díl formy bylo tedy nahrazeno plexisklovou destičkou. Monolitické vrstvy (50 $\mu\text{m}$ ) připravené ze směsí S1 a S3 se k plexisklové destičce nepřichytily ani po 120 minutách polymerizace, pravděpodobně z důvodu hladšího a inertnějšího povrchu destičky než skla.

Optimální doba polymerizace byla testována na směsích S1 až S4 pro monolitické vrstvy o tloušťce 50  $\mu\text{m}$ . Monolity polymerovaly po dobu 5, 15, 25, 45, 60 a 120 minut a jako univerzální doba polymerizace byla nalezena hodnota 25 minut, po které se vzhled všech připravených monolitů již dále neměnil. Směs S3 byla zvolena pro testování vlivu síly teflonového těsnění. Monolitické vrstvy z této směsi byly připraveny při použití 25, 50, 76 a 127 $\mu\text{m}$  těsnění s dobou polymerizace 10, 25 a 45 minut. Pro vytvoření monolitu o tloušťce 25  $\mu\text{m}$  byl dostačující čas polymerizace 10 minut. Silnější monolity bylo potřeba polymerovat alespoň 25 minut. Vzhled a průhlednost bílých monolitů o tloušťkách 50, 76 a 127  $\mu\text{m}$  byly srovnatelné po 25 i 45 minutách. Pro další experimenty byla vybrána síla těsnění 50  $\mu\text{m}$ , jelikož formu oddělenou 25 $\mu\text{m}$  těsněním bylo velmi obtížné naplnit bez přítomnosti vzduchových bublin (viz dále).

Plnění formy polymerizační směsí bylo od počátku příprav komplikovaným problémem vyskytujícím se u všech složení směsí i druhů forem (silanizované sklo + silanizované sklo; silanizované sklo + sklo; silanizované sklo + plexisklo). Při plnění se ve formě tvořily bubliny vznikající i nepatrným zpomalením čela kapaliny v určitém místě. Na směsích S1 a S3 byl testován vliv ultrazvukování, probublávání dusíkem či teploty směsí (-18, 4 a 23 °C) těsně před vlastním plněním, avšak ani jeden z těchto faktorů neměl přímý vliv na tvorbu bublin ve formě. Dále byl sledován případný vliv rozdílného sevření formy svorkami, které mohlo způsobit větší stlačení obou vrstev v určitých místech formy, a tedy i rozdílné prostředí pro tok kapaliny. Tento jev byl sice při plnění pozorovatelný změnou rychlosti části profilu kapaliny v okolí svorek, ale pouze výjimečně vedl ke tvorbě bublin. Klíčovým faktorem pro tvorbu bublin byla

příprava a mytí skla po silanizaci. Sklíčko muselo být po silanizaci důkladně opláchnuto nejen methanolem jako čistým rozpouštědlem silanizačního činidla, ale také vodou. Při oplachu pouze methanolem zůstávaly na skle zaschlá rezidua z methanolu a silanizačního činidla, která nebylo možné rozleštit buničinou, případně ani nebyla viditelná. Tyto nečistoty způsobovaly zpomalování profilu kapaliny při plnění a tvorbu bublin. Bylo-li sklíčko po methanolu důkladně opláchnuto vodou a ponecháno volnému uschnutí při laboratorní teplotě, žádná rezidua na sklíčku nezůstala, případně bylo možné je snadno setřít buničinou. Formu z takto připraveného skla a plexiskla bylo možné naplnit zcela bez bublin s výjimkou formy oddělené 25 $\mu$ m teflonovým filmem. V takto úzkém prostoru se pravděpodobně významněji projevil vlivy různé adheze polymerizační směsi k různým povrchům (sklo + plexisklo) a nerovnoměrného stlačení formy svorkami, a proto se nepodařilo formu naplnit zcela bez bublin, přestože silanizované sklíčko bylo řádně omyto.

### **2.3.2 Mechanická odolnost a rychlost vztlínání pro monolitické TLC destičky**

Předpokládaná aplikace monolitických TLC destiček pro chromatografii v normálním módu s DAPPI detekcí vyžadovala přípravu mechanicky odolných stacionárních fází, skrze které by dobře vzlínala mobilní fáze na bázi hexanu. Monolitické vrstvy na bázi GMA (směsi S1 a S2, viz tab. 6) byly mechanicky velmi neodolné a jejich povrch bylo možné narušit i proudem methanolu ze stříčky.

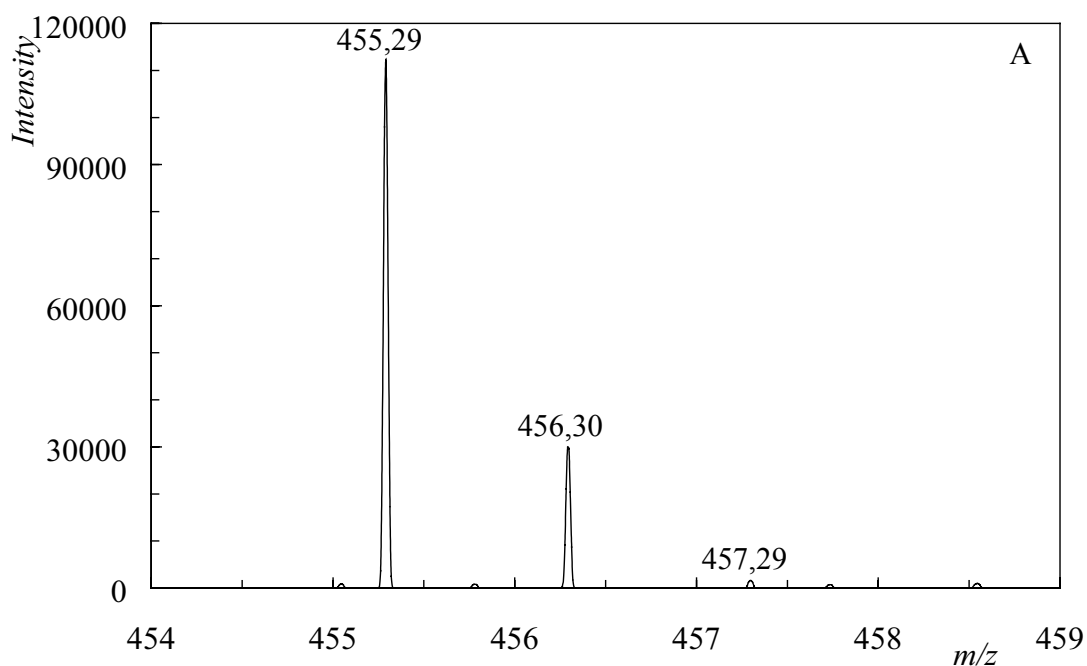
Výrazně mechanicky odolnější byly monolity na bázi HEMA a to především při použití porogenní směsi propan-1-ol/butan-1,4-diol (směs S3). Tento monolit měl velmi pevnou a hladkou strukturu s lesklým povrchem. Negativními vlastnostmi této stacionární fáze bylo pomalé vztlínání hexanu (více než 30 minut), výrazné smršťování monolitu během polymerizace vedoucí k neúplné tvorbě monolitu v rozích destičky a praskání monolitu po jeho promytí methanolem, ethanolem či vodou. Úplnější polymerizace v rozích bylo dosaženo zakápnutím hran formy směsí před vlastní iniciací. Praskání monolitu bylo zabráněno promytím methanolem a následně hexanem. V hexanu monolit pravděpodobně neobtnal tak jako v methanolu, a po vysušení tedy nepraskal. Polymerizací směsi S4 obsahující HEMA a porogenní směs

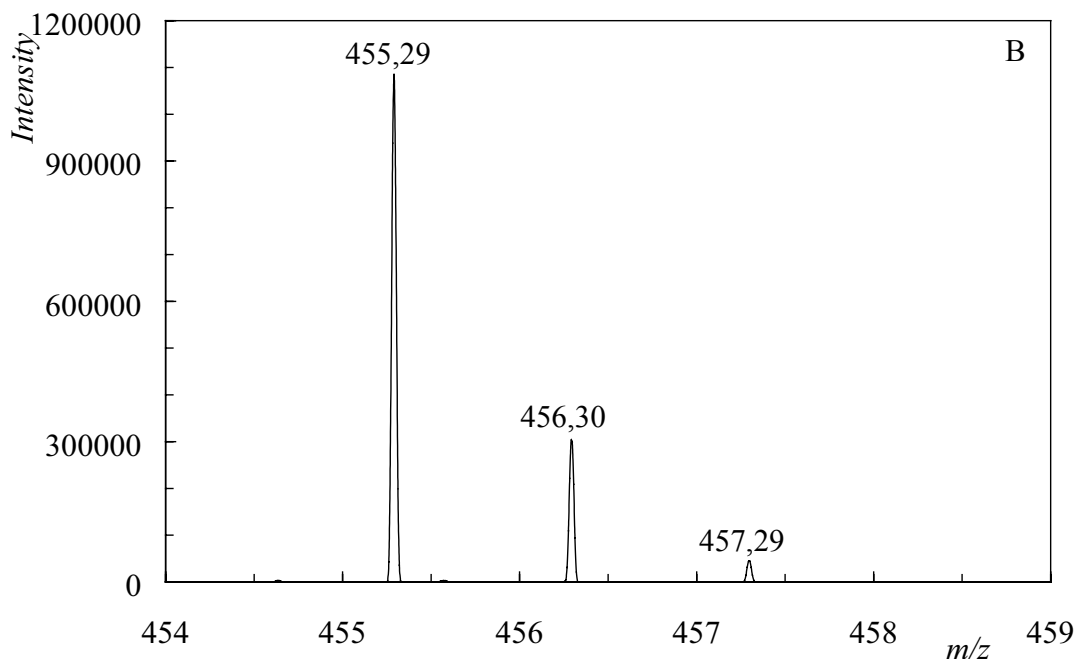
cyklohexanol/dekan-1-ol byl získán monolit mechanicky méně odolný než monolit ze směsi S3, ale více odolný než monolity na bázi GMA. Povrch monolitu nebyl na pohled tak hladký a lesklý jako povrch monolitu vzniklého při použití porogenní směsi propan-1-ol/dekan-1-ol. Monolit (S4) polymeroval zcela i v rozích destičky a po promytí methanolem nepraskal. Hexan monolitickou vrstvou navzlínal během dvou minut a jedinou nevýhodou tohoto monolitu byla mechanická neodolnost, jelikož bylo možné ho narušit otěrem ruky.

Modifikacemi směsi S3 ve složení porogenní směsi (směsi S5 a S6) a v obsahu síťovacího činidla (S7 a S8) byly vytvořeny monolity podobných charakteristik jako monolit S3. Přestože struktura monolitů byla s největší pravděpodobností rozdílná, všechny byly mechanicky velmi odolné, měly hladký a lesklý povrch a trpěly dlouhým vzlínáním hexanu (30 minut a více). Stejně charakteristiky měl i monolit připravený ze směsi S9, ve které byl butan-1,4-diol nahrazen cyklohexanolem. Mechanická odolnost a pravděpodobně nízká porozita, díky které vzlínal hexan velmi pomalu, byla tedy dána přítomností propan-1-olu v porogenní směsi. Naopak mechanicky neodolný monolit, kterým hexan navzlínal během dvou minut, byl získán při nahrazení cyklohexanolu butan-1,4-diolem v porogenní směsi s dekan-1-olem (směs S10). Přítomností dekan-1-olu tedy vznikl monolit se strukturou vhodnou pro chromatografii, avšak nevhodnou pro DAPPI ionizaci. Směsi S11 až S13 kombinující propan-1-ol a dekan-1-ol poskytly monolity, které se zvyšujícím se zastoupením propan-1-olu byly více mechanicky odolné, avšak se snižující se rychlostí vzlínání hexanu (2 minuty pro směs S 11, 15 minut pro směs S 12 a 30 minut pro směs S13). Mechanicky dostatečně odolného monolitu, kterým by hexan vzlínal v řádu jednotek minut, nebylo dosaženo ani přístupem kombinujícím butan-1,4-diol a cyklohexanol, kdy vznikla křehká a málo propustná stacionární fáze.

### 2.3.3 Testování ionizace technikou DAPPI

Monolitickou TLC destičku, která by byla mechanicky odolná a zároveň snadno aplikovatelná pro chromatografii v normálním módu, se nepodařilo připravit (viz kapitola 2.3.2). K testování ionizace technikou DAPPI byla proto použita 50 $\mu$ m stacionární fáze připravená z polymerizační směsi S3 (viz tab. 6). Tato destička vykazovala dobrou mechanickou odolnost, a tak byla minimalizována pravděpodobnost poškození MS detektoru. Na obrázku 20 jsou znázorněna hmotnostní spektra verapamilu získaná ionizací technikou DAPPI z komerčně dostupné silikagelové TLC destičky pro MS a monolitické tenké vrstvy.





**Obr. 20** Hmotnostní spektrum verapamilu ( $M_r = 454$  g/mol). Koncentrace verapamilu: 10 mmol/L. Dávkovaný objem: 1,0  $\mu$ L. Ionizace DAPPI v pozitivním módu z TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> MS-grade destičky (A) a monolitické TLC destičky S3 (B). Experimentální podmínky viz kapitola 2.2.2. Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific).

Ionizací technikou DAPPI bylo z obou stacionárních fází naměřeno hmotnostní spektrum odpovídající molekulovému aduktu [verapamil+H]<sup>+</sup>. Z monolitické tenké vrstvy byl však získán přibližně desetkrát větší signál než ze silikagelové destičky. Účinnější ionizace byla pravděpodobně zapříčiněna menší tloušťkou monolitické stacionární fáze (50  $\mu$ m) oproti silikagelové destičce (cca 195  $\mu$ m). Díky tenčí vrstvě stacionární fáze bylo pro desorpční sprej k dispozici více analytu a byl naměřen větší signál. Vysoká teplota při ionizaci monolitickou stacionární fází nijak viditelně nepoškodila, a byla tak potvrzena její vhodnost pro techniku DAPPI.

## Literatura II

- [1] H. E. Hauck, O. Bund, W. Fischer, M. Schulz: Ultra-Thin Layer Chromatography (UTLC) - A New Dimension in Thin-Layer Chromatography, *J. Plan. Chrom.* 14 (2001) 234 – 236.
- [2] R. B. Patel, M. C. Gopani, M. R. Patel: UTLC: An Advanced Technique in Planar Chromatography, *Chromatographia* 76 (2013) 1225 – 1231.
- [3] P. K. Salo, H. Salomies, K. Harju, R. A. Ketola, T. Kotiaho, J. Y. Kauhaluoma, R. Kostianen: Analysis of Small Molecules by Ultra Thin-Layer Chromatography-Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 906 – 915.
- [4] I. Talian, A. Oriňák, J. Preisler, A. Heile, L. Onofrejšová, D. Kaniansky, H. F. Arlinghaus: Comparative TOF-SIMS and MALDI TOF-MS Analysis on Different Chromatographic Planar Substrates, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2570 – 2582.
- [5] A. Oriňák, H. F. Arlinghaus, G. Vering, R. Oriňáková, S. Hellweg: Introduction to Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Application in Chromatographic Analysis, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 113 – 118.
- [6] A. Oriňák, G. Vering, H. F. Arlinghaus, J. T Andersson, L. Halas, R. Oriňáková, L. Turčániová: New Approaches to Coupling TLC with TOF-SIMS, *J. Plan. Chrom.* 18 (2005) 44 – 50.
- [7] A. Oriňák, R. Oriňáková, H. F. Arlinghaus, G. Vering, S. Hellweg: Post-Chromatographic TOF-SIMS Identification of Diterpens, *Surf. Interface Anal.* 38 (2006) 599 – 603.
- [8] A. Oriňák, R. Oriňáková, H. F. Arlinghaus, G. Vering, S. Hellweg, V. C. Filho: TOF-SIMS Characterisation of Diterpenoic Acids After Chromatographic Separation, *Applied Surf. Sci.* 252 (2006) 6668 – 6671.
- [9] I. Vovk, G. Popovic, B. Simonovska, A. Albreht, D. Agbaba: Ultra-thin-layer Chromatography Mass Spectrometry and Thin-layer Chromatography Mass Spectrometry of Single Peptides of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3089 – 3094.

- [10] D. S. Peterson, Q. Luo, E. F. Hilder, F. Svec, J. M. J. Fréchet: Porous Polymer Monolith for Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Small Molecules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1504 – 1512.
- [11] R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Svec: Monolithic Porous Polymer Layer for the Separation of Peptides and Proteins Using Thin-layer Chromatography Coupled with MALDI-TOF-MS, *Anal. Chem* 79 (2007) 486 – 493.
- [12] Y. Han, P. Levkin, I. Abarientos, H. Liu, F. Svec, J. M. J. Fréchet: Monolithic Superhydrophobic Polymer Layer with Photopatterned Virtual Channel for the Separation of Peptides Using Two-Dimensional Thin Layer Chromatography-Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem* 82 (2010) 2520 – 2528.
- [13] S. D. Woodward, I. Urbanova, D. Nurok, F. Svec: Separation of Peptides and Oligonucleotides Using a Monolithic Polymer Layer and Pressurized Planar Electrophoresis and Electrochromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3445 – 3448.
- [14] I. Urbanova, F. Svec: Monolithic Polymer Layer With Gradient of Hydrophobicity for Separation of Peptides Using Two-Dimensional Thin Layer Chromatography and MALDI-TOF-MS Detection, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2345 – 2351.
- [15] E. F. Maksimova, E. G. Vlakh, T. B. Tennikova: Methacrylate-Based Monolithic Layers for Planar Chromatography of Polymers, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2425 – 2431.
- [16] Y. Lv, Z. Lin, T. Tan, F. Svec: Preparation of Porous Styrenics-based Monolithic Layers for Thin Layer Chromatography Coupled with Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometric Detection, *J. Chromatogr. A* 1316 (2013) 154 – 159.
- [17] F. Svec, Y. Lv: Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 250 – 273.
- [18] M. Haapala, J. Pöl, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, T. J. Kauppila, R. Kostianen: Desorption Atmospheric Pressure Photoionization, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7867 – 7872.

- [19] N. M. Suni, P. Lindfors, O. Laine, P. Östman, I. Ojanperä, T. Kotiaho, T. J. Kaupilla, R. Kostianen: Matrix Effect in the Analysis of Drugs of Abuse from Urine with Desorption Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry (DAPPI-MS) and Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (DESI-MS), *Ana. Chim. Acta* 699 (2011) 73 – 80.
- [20] A. Svobodová, T. Křížek, J. Širc, P. Šálek, E. Tesařová, P. Coufal, K. Štulík: Monolithic Columns Based on a poly(Styrene-Divinylbenzene-Methacrylic Acid) Copolymer for Capillary Liquid Chromatography of Small Organic Molecules, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1544 – 1547.

## **Publikace III**

Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních  
separačních médií

Jiří Vojta, Adéla Musilová-Svobodová, Martin Franc, Pavel Coufal,  
Zuzana Bosáková

Chemické Listy 108 (2014) 127 – 134

### 3. Závěr

V první části práce byly vyvinuty a validovány metody pro stanovení čistoty léčivých přípravků kombinujících více účinných látek. Metoda pro stanovení obsahu nečistot v paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu v přítomnosti fenpiverin bromidu byla založena na iontově párové chromatografii a standardní HPLC instrumentaci. Byl vyvinut postup přípravy vzorku z čípkové lékové formy zajišťující dostatečnou výtěžnost nečistot a stabilitu vzorku. Separace všech nečistot bylo dosaženo i při použití chromatografie v reverzním módu, avšak tato metoda byla potvrzena jako nerobustní s ohledem na změny pH a obsahu methanolu v mobilní fázi. Analýzou vzorku čtyři roky po jeho výrobě byl potvrzen hlavní degradační produkt pitofenon hydrochloridu a aplikovatelnost metody pro analýzu stabilitních vzorků léčivého přípravku Spasmopan®. Obsah nečistot v tabletách kombinujících amlodipin besilát, valsartan a hydrochlorothiazid byl stanoven UHPLC metodou v reverzním separačním módu. Postup přípravy vzorku z potahovaných tablet byl vyvinut s ohledem na dostatečnou výtěžnost nečistot, kompatibilitu s gradientovou elucí a stabilitu vzorku. Cílenou degradační studií byly potvrzeny hlavní degradační produkty všech tří účinných látek a aplikovatelnost metody pro analýzu stabilitních vzorků kombinovaných tablet.

V rámci druhé části práce byly připraveny monolitické TLC destičky. Metodika přípravy monolitických stacionárních fází ve formě tenkých vrstev byla realizována v podmínkách laboratoří Katedry analytické chemie PŘF UK. Po optimalizaci jednotlivých fází přípravy byly získány homogenní stacionární fáze navázané na silanizované mikroskopické sklíčko. Připravené monolitické vrstvy byly na bázi methakrylátových monomerů a polymerizace byla iniciována UV zářením. Byly připraveny mechanicky odolné destičky s hladkým a lesklým povrchem, avšak se špatnou propustností pro mobilní fázi. Stacionární fáze vhodné pro průtok mobilní fáze byly mechanicky velmi neodolné a nevhodné pro ionizaci analytů metodou DAPPI. Z mechanicky odolné monolitické tenké vrstvy byl ionizován verapamil metodikou DAPPI s vyšší účinností než z komerční silikagelové TLC destičky.

## Prohlášení o spoluautorství

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Jiří Vojta podílel na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách:

- I. **J. Vojta**, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 85 – 92. (podíl 85 %)
- II. **J. Vojta**, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková: A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 109 (2015) 36 – 44. (podíl 85 %)
- III. **J. Vojta**, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková: Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií, Chem. Listy 108 (2014) 127 – 134. (podíl 50 %)

.....  
prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

.....  
RNDr. Lucie Janečková, Ph.D.

## Seznam publikací, patentů přednášek a plakátových sdělení

### Publikace

1. M. Franc, **J. Vojta**, J. Sobotníková, P. Coufal, Z. Bosáková: Performance and lifetime of slurry packed capillary columns for high performance liquid chromatography, Chem. Papers 68 (2014) 22 – 28.
2. **J. Vojta**, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková: Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií, Chem. Listy 108 (2014) 127 – 134.
3. **J. Vojta**, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 85 – 92.
4. **J. Vojta**, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková: A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 109 (2015) 36 – 44.

### Patenty

1. P. Coufal, A. Kubíčková, V. Kubíček, M. Franc, J. Vojta, E. Tesařová, Z. Bosáková: Postkolonová derivatizace tuhým derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC, Patent 305127, Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.

### Přednášky

1. **J. Vojta**: Vývoj a testování kapilárních kolon na bázi iontoměniče; Zentiva k.s., Praha, Česká republika, 11. 10. 2011.
2. **J. Vojta**: Monolitické kapilární kolony; Seminář katedry analytické chemie, Chemický ústav PřF UK, Praha, Česká republika, 18. 10. 2011.

3. **J. Vojta**, A. Musilová (Svobodová), P. Coufal: New capillary monolithic column for isocratic separation of small molecules; 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry", Praha, Česká republika, 25. 9. 2012.
4. **J.Vojta**: Monolithic material in separation science; Advances in separation method, Chemický ústav PřF UK, Praha, Česká republika, 15. 4. 2013.

#### **Plakátová sdělení**

1. A. Svobodová, **J. Vojta**, E. Tesařová, P. Coufal: Influence of Methacrylic Acid Addition on the Separation Performance of Polystyrene-based Monolith; 63. Zjazd Chemikov, Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9. 9. 2011.
2. **J. Vojta**, A. Svobodová, P. Coufal: Effect of Increasing Amount of Methacrylic acid in Monolithic columns for CLC and CEC Analysis of Small Molecules; 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Polsko, 9. – 13. 9. 2012.
3. **J. Vojta**, A. Kubíčková, M. Franc, P. Coufal: On-Line Post-Column Derivatization of Amino Acids in Capillary Liquid Chromatography; HPLC 2013, 39th International Symposium of Chromatography and Related Techniques, Amsterdam, Nizozemsko, 16 – 20. 6. 2013.