

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce

Stanovení doprovodných látek v lékových formách na bázi cyklosporinu
metodou HPLC s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.


Konzultant diplomové práce: Ing. Pavel Blatný Ph.D.

Prohlášení společnosti Teva Czech Industries s.r.o. Opava-Komárov, Česká Republika

Teva Czech Industries s.r.o. Ostravská 29, Opava-Komárov, Česká Republika souhlasí se zveřejněním všech dat a údajů obsažených v diplomové práci Zbyňka Mrůzka s názvem „ Stanovení doprovodných látek v lékových formách na bázi cyklosporinu metodou HPLC s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík“, diplomová práce bude zveřejněna na internetu.

Za Teva Czech Industries s.r.o. Ostravská 29, Opava-Komárov, Česká Republika

jméno Miloslav Chudík, PhD, ředitel divize R&D

podpis, datum 14.5.2015 

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

Poděkování: Chtěl bych velmi poděkovat oběma mým školitelům prof. RNDr. Jiřímu Klimeši, CSc a především Ing. Pavlu Blatnému, Ph.D. za jejich vedení, čas, který mi věnovali, a za každou připomínku a radu jak odbornou tak i praktickou. Dále bych chtěl poděkovat zaměstnancům firmy Teva Czech Industries s.r.o., protože bez jejich pomoci by nebylo možné dosáhnout výsledků, které prezentuji v této práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| Seznam použitých zkratk | 7 |
| 1 Úvod | 9 |
| 2 Teoretická část | 10 |
| 2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie | 10 |
| 2.1.1 Historický vývoj chromatografických metod | 10 |
| 2.1.2 Princip kapalinové chromatografie | 11 |
| 2.1.3 Obecné schéma kapalinového chromatografu | 11 |
| 2.2 Chemiluminiscenční detektor specifický pro dusík (NSD) | 14 |
| 2.3 Vysokoteplotní HPLC separace | 15 |
| 2.3.1 Teplotní stabilita HPLC kolon | 16 |
| 2.4 Cyklosporin A..... | 16 |
| 2.4.1 Nečistoty cyklosporinu..... | 18 |
| 2.4.2 Degradanční produkty cyklosporinu | 19 |
| 2.4.3 HPLC stanovení cyklosporinů | 20 |
| 3 Cíl práce | 23 |
| 4 Experimentální část | 24 |
| 4.1 Použitý materiál, pomůcky a technické vybavení..... | 24 |
| 4.1.1 Standardy a vzorky..... | 24 |
| 4.1.2 Použité chemikálie | 25 |
| 4.1.3 Použitý software | 25 |
| 4.1.4 Instrumentace na oddělení RD TAPI | 26 |
| 4.1.5 Instrumentace na oddělení QC Pharma | 26 |
| 4.1.6 Chromatografické kolony..... | 26 |
| 5 Výsledky a diskuse | 27 |
| 5.1 Vývoj metody | 27 |
| 5.1.1 Optimalizace termostatování kolony..... | 27 |
| 5.1.2 Screening HPLC kolon | 31 |
| 5.1.3 Finální optimalizace..... | 37 |
| 5.2 Podrobný popis metody | 51 |
| 5.2.1 Použití | 51 |
| 5.2.2 Referenční standardy | 51 |
| 5.2.3 Chemikálie..... | 51 |
| 5.2.4 Laboratorní sklo a vialky..... | 52 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.5 | Přístrojové vybavení..... | 52 |
| 5.2.6 | Chromatografický systém..... | 52 |
| 5.2.7 | Příprava kolony a termostatu..... | 54 |
| 5.2.8 | Příprava kolony před prvním použitím..... | 55 |
| 5.2.9 | Příprava mobilních fází..... | 56 |
| 5.2.10 | Vliv složení mobilní fáze na separaci..... | 56 |
| 5.2.11 | Příprava standardního roztoku..... | 56 |
| 5.2.12 | Příprava modelové směsi cyklosporinů (test rozlišení)..... | 57 |
| 5.2.13 | Příprava vzorků..... | 58 |
| 5.2.14 | Postup analýz..... | 58 |
| 5.3 | Vyhodnocení..... | 60 |
| 5.3.1 | Testy způsobilosti..... | 60 |
| 5.3.2 | Vyhodnocení vzorků..... | 62 |
| 5.4 | Doporučení pro rutinní použití metody..... | 65 |
| 5.5 | Ověření klíčových parametrů metody..... | 66 |
| 5.5.1 | Specifita..... | 66 |
| 5.5.2 | Linearita..... | 71 |
| 5.5.3 | Citlivost metody..... | 74 |
| 5.5.4 | Přesnost metody..... | 76 |
| 5.5.5 | Správnost metody..... | 78 |
| 5.5.6 | Analýza na přístroji instalovaném na QC Pharma..... | 81 |
| 5.5.7 | Robustnost metody..... | 84 |
| 5.5.8 | Odchyly od předepsaného obsahu TBME..... | 87 |
| 5.5.9 | Robustnost vzhledem ke změně směrnice gradientu..... | 89 |
| 5.5.10 | Robustnost metody vzhledem ke změnám průtoku..... | 91 |
| 5.5.11 | Robustnost vzhledem ke změně dávkovaného objemu..... | 93 |
| 5.5.12 | Robustnost vzhledem ke změně kolony..... | 95 |
| 6 | Závěr..... | 98 |
| | Seznam použitých zdrojů..... | 99 |
| | Abstrakt..... | 101 |
| | Abstract..... | 102 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------------------|---|
| [Abu ⁵]Cs | Cyklosporin Abu5, nečistota cyklosporinu |
| [Leu ⁴]Cs | Cyklosporin Leu4, nečistota cyklosporinu |
| CsA | Cyklosporin (aktivní složka přípravku) |
| CsB | Cyklosporin B, nečistota cyklosporinu |
| CsC | Cyklosporin C, nečistota cyklosporinu |
| CsD | Cyklosporin D, nečistota cyklosporinu |
| CsE | Cyklosporin E, nečistota cyklosporinu |
| CsF | Cyklosporin F, nečistota cyklosporinu |
| CsG | Cyklosporin G, nečistota cyklosporinu |
| CsH | Cyklosporin H, nečistota a degradační produkt cyklosporinu |
| CsL | Cyklosporin L, nečistota cyklosporinu |
| CsT | Cyklosporin T, nečistota cyklosporinu |
| CsU | Cyklosporin U, nečistota cyklosporinu |
| CsV | Cyklosporin V, nečistota cyklosporinu |
| H ₂ CsA | Dihydrocyklosporin A, nečistota cyklosporinu |
| isoA | Isocyklosporin A, degradační produkt cyklosporinu |
| NSD | Nitrogen Specific Detector, Chemiluminiscenční detektor specifický pro dusík |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| UPLC | Ultra Performance Liquid Chromatography, ultra účinná kapalinová chromatografie |
| RT | Retention Time, retenční čas |
| RRT | Relative Retention Time, relativní retenční čas |
| TBME | <i>tert</i> -butyl methyl ether |
| TFA | Trifluoroctová kyselina |
| α | Hladina významnosti |
| <i>v</i> | Počet stupňů volnosti |
| N | Účinnost |
| R | Korelační koeficient |
| EtOH | Ethanol |

| | |
|-------|----------------------------------|
| MeOH | Methanol |
| RF | Response Factor, odezvový faktor |
| MeBmt | Methyl-butenyl-methyl-threonine |
| RL | Reporting Level |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá vývojem analytické metody pro stanovení doprovodných látek v lékových formách cyklosporinu metodou HPLC s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík.

Teoretická část pojednává o principu a historii HPLC, její instrumentaci a všeobecných principech vývoje chromatografické metody. Speciální kapitola je věnována chemiluminiscenčnímu detektoru specifickému pro dusík. Dále jsou uvedeny obecné informace o látce cyklosporin A, jeho nečistotách a degradačních produktech.

V rámci experimentální části byl optimalizován přehřev mobilní fáze, byl proveden screening kolon a na vybrané koloně byla provedena optimalizace metody vzhledem k nečistotám a degradačním produktům cyklosporinu, Byly ověřeny i klíčové parametry metody (validovatelnost metody).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2.1.1 *Historický vývoj chromatografických metod*

Samotná chromatografie byla objevena před více než 110 lety ruským chemikem M. S. Cvětěm, který jako první použil pro dělení složek chlorofylu jeho petrolejový roztok a skleněnou kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým. Zjistil, že roztok se na koloně začal dělit na jednotlivá barviva. Odtud pramení i pojmenování metody chromatografie (z řeckého chróma- barva, graphein- psát). Přesto že kapalinová chromatografie měla velký potenciál, dlouho nedošlo k jejímu prosazení a to hlavně z důvodu chybějících dostatečně citlivých detektorů a vysokotlakých čerpadel bez tlakových rázů. S rozvojem techniky došlo k přeměně sloupcové kapalinové chromatografie na vysokotlakou kapalinovou chromatografii. Tento pojem poprvé použil Prof. Csaba Horváth v roce 1970. Tato metoda pracovala s tlaký okolo 35 bar. Při vylepšování kolon, materiálů a vysokotlakých čerpadel bylo možno zmenšit velikost částic sorbentu. Tím došlo ke zvýšení účinnosti a metoda dostala nový název vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V této diplomové práci byly použity kolony s velikostí částic pod 2 μm . To je další zlomový bod pro tuto techniku, protože implementace stacionárních fází s touto velikostí částic přinesla zvýšení účinnosti chromatografické separace a zároveň významné zvýšení rychlosti chromatografických analýz. Bylo ovšem třeba tomu přizpůsobit i chromatografický hardware (minimalizace mimokolonových objemů, čerpadla s pracovními tlaký až 1000 barů atd.). HPLC na takto upravených chromatografech využívající stacionární fáze s velikostmi částic pod 2 μm se označují jako UHPLC (ultraúčinná kapalinová chromatografie). V dnešní době probíhají experimenty se systémy s velikostí částic pod 1 μm a tlaký přes 6000 bar. Jak už ale bylo zmíněno, v této diplomové práci bylo použito kolon s velikostí částic pod 2 μm . Nejednalo se ale o typickou UHPLC separaci, protože byla provedena na standardním HPLC systému s tlakovým limitem 400 barů (skutečné tlaký dokonce nikdy nepřekonalý hranici 150 barů). Je to proto, že při vysokoteplotních HPLC separacích dochází k významnému snížení viskozity mobilní fáze a zlepšení separace díky vyšší separační účinnosti avšak při tlacích typických pro HPLC [1] [14] [21]

2.1.2 Princip kapalinové chromatografie

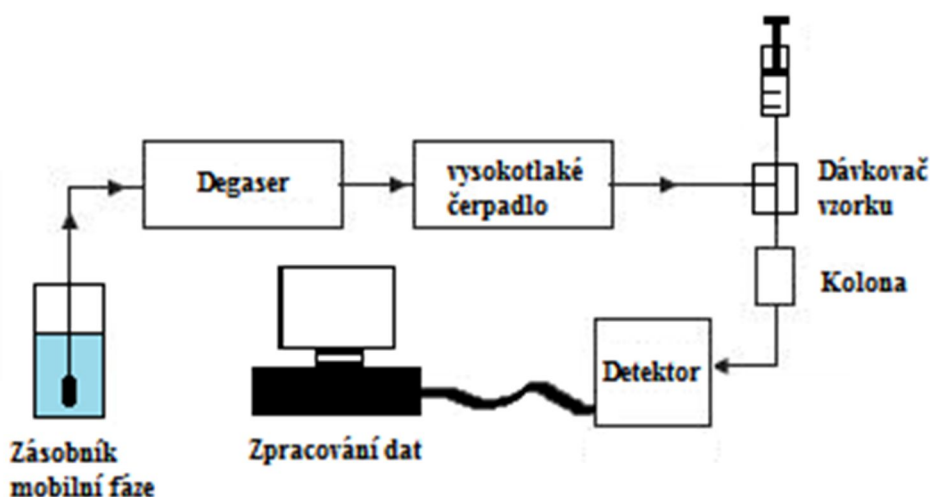
Jak již z názvu vyplývá, jedná se o chromatografický systém ve kterém, je jako mobilní fáze použita kapalina. Stacionární fáze je pevná často na povrchu modifikovaná látka, která působí jako sorbent vzorku. Sorbent je nejčastěji naplněn do nerezové trubičky a označuje se kolona. Do kolony vstupuje směs analytů, které interagují se sorbentem a jsou hnány vpřed protékající mobilní fází. Dochází k distribuce analytu mezi stacionární fází a fází mobilní. Pokud jsou tyto vhodně zvolené, mohou se analyty v daném systému rozdělit. Separované zóny analytů rozpuštěné v mobilní fázi se potom detekují. Časovým záznamem signálu z detektoru je tzv. chromatogram, na kterém jsou jednotlivé zóny analytu zobrazeny jako tzv. píky. Retenční čas píku potom charakterizuje kvalitativní stránku chromatografické separace, zatímco velikost píku (výška, plocha) stránku kvantitativní.

Volba správné stacionární i mobilní fáze je pak pro separaci velice důležitá a někdy i nepatrná změna složení může mít na separaci velký vliv. [1] [2] [3] [21]

2.1.3 Obecné schéma kapalinového chromatografu

Kapalinová chromatografie je rychle se vyvíjející odvětví. Nedochozí jen k zlepšování hardwarového vybavení chromatografů, ale i softwaru pro vyhodnocování dat. Jeden z hlavních směrů ve vývoji analytických metod je snaha o co největší automatizaci. Takový přístroj může po vhodném nastavení pracovat i několik dní nepřetržitě, což značně šetří čas a umožňuje měření velkého počtu vzorků. [1] [3] [17]

Obrázek 1. Schéma kapalinového chromatografu.



Mezi základní části kapalinového chromatografu patří:

Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze jsou většinou skleněné nádoby uzavíratelné inertní zátkou, které zajišťují kontinuální dodávku mobilní fáze. Ze zásobníku je mobilní fáze často vedena pomocí teflonových hadiček opatřenými na vstupu filtrem, aby nedošlo k nasátí pevných nečistot do chromatografického systému a tím k jeho poškození. [1] [3] [4] [6]

Degasser

Dalším prvkem je takzvaný degasser, v němž dochází k odplynění mobilní fáze. To pomáhá udržet systém bez bublin, které by způsobovaly kolísání tlaku mobilní fáze popřípadě nereprodukovatelnost získaných výsledků. [1] [3] [4] [6]

Vysokotlaké čerpadlo

Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje kontinuální průtok mobilní fáze přes kolonu. Čerpadlo je nejčastěji tvořeno soustavou pístů o stavitelné výšce a rychlosti zdvihu. Těmito parametry lze regulovat rychlost průtoku mobilní fáze. Regulace probíhá elektronicky a píst čerpadla pohání elektromotor. Podstatnou částí čerpadla jsou i zpětné ventily. Ty zajišťují správnou funkci čerpadla a jejich porucha způsobuje kolísání tlaku. [1] [3] [4] [6]

Dávkovač vzorku

Dávkování vzorku je pro jeho kvantifikaci a zajištění opakovatelnosti měření velmi důležité. Čím je proces dávkování přesnější a spojitější, tím se zvyšuje míra opakovatelnosti měření. V dnešní době se používají téměř výhradně automatické dávkovače (autosamplery) různé konstrukce. Ty mají velkou výhodu v tom, že dávkovaný objem je stavitelný a proces probíhá automaticky, což umožňuje zpracovat velké počty vzorků bez lidského zásahu. Součástí automatického dávkovače je i zásobník vzorků. Vzorky jsou naplněny do mikro lahviček (vialek), které jsou uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Uzávěr je buď šroubovací, nebo je zalisován hliníkovým kroužkem (tzv. krimpovací vialka). [1] [3] [4] [6]

Kolona

Kolona je nepostradatelnou součástí chromatografického systému. Její volba je zásadní pro úspěšnou separaci. Náplň kolony je označována jako stacionární fáze. Její

složení je variabilní a částice jsou často na povrchu modifikovány. Působí pak jako sorbent vzorku. Nejčastěji je naplněna do nerezové nebo méně často skleněné trubičky o jmenovité světlosti řádově v milimetrech a délce několika centimetrů. Důležitá je i velikost částic stacionární fáze, nejčastěji několik mikrometrů. Čím jsou částice menší, tím bývá i separace analytů účinnější. Základní dělení sorbentů je podle polariry. V základním polárním provedení se nejčastěji jedná o silikagel, na jehož povrchu jsou vystaveny –OH skupiny. Povrch může být modifikovaný uhlíkatými řetězci nejčastěji C8 a C18 (nepolární reverzní fáze). Vzorek s povrchem stacionární fáze interaguje a částečně se zadržuje na povrchu sorbentu. Mobilní fáze hnaná vysokotlakým čerpadlem protéká kolonou a takto zadržené složky vzorku postupně vyplavuje podle jejich afinity k sorbentu. Do kolony tedy vstupuje směs analytů, které jsou interakcemi se sorbentem zadržovány různou měrou, čímž dochází k tomu, že z kolony vychází odděleny. [1] [3] [4] [6]

Detektor

Detektor bývá zařazen za kolonu a slouží k rozpoznání změn obsahu analytu v mobilní fázi. Podle chování k analytu je můžeme rozdělit na destruktivní a nedestruktivní. Nedestruktivní mají tu výhodu, že je možné eluent po průchodu prvním detektorem použít i současně pro jiný typ detekce, čímž lze získat z jedné analýzy více informací.

Ideální detektor by měl mít několik vlastností jako je specifita, linearita ve velkém koncentračním rozpětí, spolehlivost, snadné použití a jiné. Bohužel žádný používaný detektor nemá všechny tyto vlastnosti. Proto je volba detektoru pro vývoj metody zásadní.

Jednotlivé detektory měří specifické vlastnosti vzorků, je proto možné je podle toho rozdělit. Pro tuto práci budou zásadní dvě skupiny detekce a to chemiluminiscenční detekce specifická pro dusík a detekce UV. Bližší popis viz kapitola 2.1.4 [1] [3] [4] [6]

Sběr a zpracování dat

Výstup z detektoru by bez počítačové techniky byl v dnešní době velmi obtížně vyhodnotitelný. Programové vybavení počítače propojeného s detektorem umožňuje nejen účinně zaznamenávat naměřená data, ale také je zpracovat a vyhodnotit. Takovéto programy se stále zlepšují a nabízejí nové lepší a přesnější funkce.

Počítačový systém, také umožňuje téměř absolutní dohled nad chromatografickým systémem a jeho čím dál větší automatizaci. Pomocí softwaru je možno sledovat a

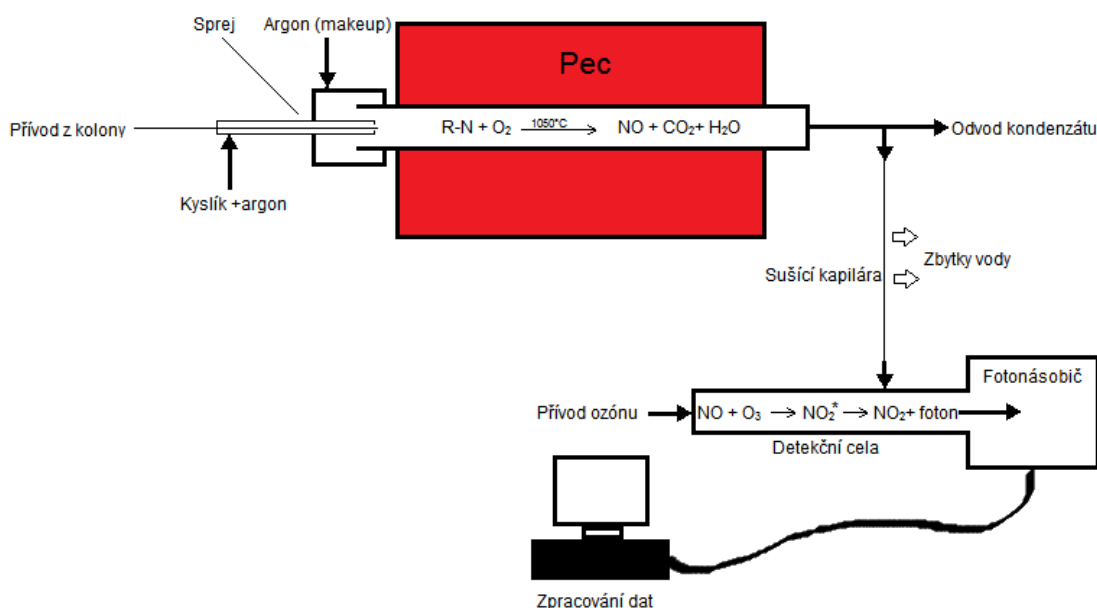
nastavovat teplotu kolonového prostoru, průtok, tlak, složení mobilní fáze a naprogramování autosampleru. [1] [3] [4] [6]

2.2 Chemiluminiscenční detektor specifický pro dusík (NSD)

Jak už bylo zmíněno výše, pro úspěšnou chromatografickou separaci je nezbytná volba vhodné stacionární a mobilní fáze. Aby bylo možné tuto separaci vyhodnotit, je ale nezbytné zvolit i vhodný typ detektoru. V diplomové práci šlo o detekci dusíkatých látek (cyklosporinů) v komplexní, ale bezdusíkaté matrici placebo, pro kterou byl zvolen chemiluminiscenční detektor specifický pro dusík.

Jeho princip je následující: Mobilní fáze se zmlžuje do pyrotrubice, ve které dochází za specifických podmínek (1050°C) k jejímu oxidačnímu spalování. Z jednotlivých atomů tak vznikají jejich oxidační produkty, v případě atomu dusíku je to oxid dusnatý. Spaliny jsou pomocí vakuové pumpy odsáty přes sušící kapiláru. Kapilára je tvořena speciálním polymerem, který umožní vodní páře prostoupit skrz stěnu. Tím dojde k odstranění vlhkosti ze spalín. V detekční cele dochází k vlastní chemiluminiscenční reakci, během které reaguje oxid dusnatý ze spalín s ozonem za vzniku, oxidu dusičitého, který je v excitovaném stavu. Ten pak během přechodu do základního stavu emituje foton, který je detekován fotonásobičem. Jeho odezva je přímo úměrně koncentraci dusíku v mobilní fázi. Schéma detektoru je uvedeno na obrázku 2. [1] [21]

Obrázek 2. Schéma chemiluminiscenčního detektoru specifického pro dusík.



2.3 Vysokoteplotní HPLC separace

V minulosti bylo běžné provádět HPLC analýzy bez kolonového termostatu. I v současné době je v lékopise řada monografií, ve kterých se jako teplota separace uvádí laboratorní teplota. Teplota chromatografické separace ale neovlivňuje pouze viskozitu mobilní fáze, ale v řadě případů ovlivňuje účinnost i selektivitu chromatografické separace. V řadě separací je vysoká teplota dokonce analytickou nutností, bez níž by nebylo možné úspěšné HPLC separace dosáhnout. Týká se to především analýz, u kterých dochází během chromatografické separace k interkonverzi mezi několika formami, ve kterých se složka může v roztoku vyskytovat. V takovém případě je zvýšená teplota parametrem, který tuto interkonverzi urychlí a místo širokého nebo deformovaného píku se dvěma vrcholy je dosaženo dramatického zlepšení chromatografického záznamu. Týká se to například analýz cukrů na katexech ligandovou výměnou, HPLC některých makrolidových imunosupresiv (tacrolimus), případně i v této diplomové práci řešené separace cyklosporinů.

Pojem vysokoteplotní separace není zcela jasně vymezen. V některých pracích jsou takto dokonce označovány i separace při vyšší než laboratorní teplotě. V této diplomové práci jsou za vysokoteplotní separace považovány separace při teplotách nad 50 °C. Teplotní oblast 50 – 60 °C totiž představuje určitou hraniční oblast, ve které je nutné aplikovat určitá opatření, která při nižších teplotách nutná nejsou. Tím základním opatřením je předehřev mobilní fáze. Pokud by totiž předehřev nebyl implementován, protékající mobilní fáze by způsobovala teplotní gradienty na chromatografické koloně a výsledkem by byla znehodnocená separace. Některé moderní UHPLC systémy poskytují zabudované předehřevy mobilních fází, v některých případech dokonce tzv. aktivní předehřevy, které jsou nezávislé na výkonu vlastního kolonového termostatu. Předehřev je ale možné realizovat i jednoduchým a levným způsobem – např. namotáním dostatečně dlouhé ocelové kapiláry na kovový šroub, který se vloží do termostatu spolu s kolonou. Mobilní fáze je pak před vstupem na kolonu termostatem zahřáta na teplotu kolony kolona není tokem mobilní fáze ochlazována. Kromě samotného předehřevu je nutné zabezpečit i co nejdokonalejší přestup tepla z topného média do kolony. Ideálním řešením jsou z tohoto pohledu kolonové termostaty plněné kapalinou. Použitelné jsou ale i termostaty s nuceným oběhem vzduchu a dokonce i termostaty pasivní. Je ale nutné zabezpečit co nejlepší kontakt kolony s jeho topnou plochou. Jelikož se ve

vysokoteplotních separacích pracuje za teplot nad bodem varu rozpouštědel za normálního tlaku, je třeba v neposlední řadě zajistit, aby na výstupu z kolony byla mobilní fáze pod bodem varu. To je zpravidla zajištěno tím, že mobilní fáze se z kolony přivádí do detektoru tenkými kapilárami, takže dochází k rychlému ochlazení mobilní fáze a navíc se mobilní fáze z cely průtočného detektoru odvádí do odpadu také kapilárou, která v cele udržuje vyšší tlak než atmosférický. V některých případech je ale na místě vést v patrnosti, že především u UV detekce může mít existence rozpouštědel blízko bodu varu negativní vliv na šum a drift základní linie. [1] [21] [22] [23]

2.3.1 Teplotní stabilita HPLC kolon

Hlavní parametr, který musí kolona pro vysokoteplotní separace splňovat je teplotní stabilita. U silikagelových kolon je teplotní stabilita zpravidla garantována do 60 °C. Existují ale i modifikace stacionárních fází na bázi silikagelu s maximální deklarovanou teplotou významně vyšší. Populární jsou například stacionární fáze Zorbax Stable Bond (Agilent, USA), které mají díky stérickému odstínění alkylem (diisobutyl v případě C18) nejen výbornou pH stabilitu pro silně kyselé mobilní fáze, ale i teplotní stabilitu garantovanou do 90°C. Velmi rozšířené především v UHPLC aplikacích jsou hybridní kolony BEH (Bridge ethyl hybrid) výrobce Waters s garantovanou teplotní stabilitou až 80 °C (BEH C18). Vynikající teplotní stabilitu pak poskytují kolony na polymerním základu, grafitové, případně zirkoniové kolony s teplotními stabilitami až 200°C. [1] [4] [21] [23]

2.4 Cyklosporin A

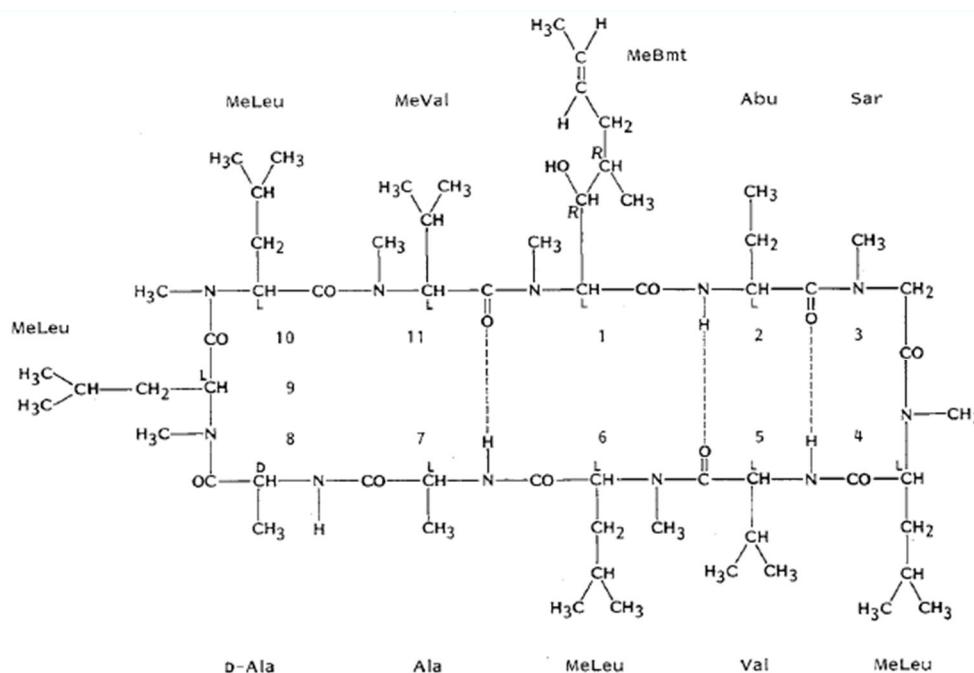
Cyklosporin je cyklický undekapeptid (obrázek 3) připravovaný výhradně biosyntézou. Cyklosporin se podařilo připravit mnoha krokovou syntézou, ale ukázalo se, že tyto postupy jsou v průmyslovém měřítku nepoužitelné. Cyklosporin je první přírodní látkou se selektivním imunosupresivním účinkem. Pro farmaceutické použití je potřeba surový cyklosporin čistit a pro použití k tvorbě lékové formy musí splňovat lékopisné požadavky na čistotu.

- 1972 Objev imunosupresivní aktivity cyklosporinu (Novartis)
- 1980 První použití na pacientovi
- 1983 Registrace přípravku Sandimmune v USA (Novartis)

- 1988 První kilogram CsA vyrobený v Galeně
- 1990 Registrace přípravku Consupren v ČSFR
- 1995 Registrace přípravku Neoral v USA (Novartis)
- 2005 Registrace generické lékové formy (vyvinuté v Opavě) v USA

Pro svou imunosupresivní aktivitu je cyklosporin velmi ceněný. Používá se dnes hlavně při transplantaci imunosupresi ale také pro léčbu autoimunitních onemocnění jako je psoriáza nebo revmatoidní artritida. Své uplatnění nachází i ve veterinárním lékařství. Mechanismem účinku je inhibice antigenem navozené aktivace T-lymfocytů. Cyklosporin způsobuje inhibici kalcineurinu, čímž zabraňuje syntéze cytokinů, jako jsou IL-2, IL-3, INF- γ a TNF α aktivujících T-lymfocyty. Tím dochází k poklesu imunitní odpovědi způsobené T-lymfocyty.

Obrázek 3. Struktura cyklosporinu A. [19]



Jak vyplývá ze struktury a všeobecně známých vlastností cyklosporinu A je téměř nerozpustný ve vodě. Této vlastnosti je přičítán i vliv na poměrně malou biologickou dostupnost. Na biologické dostupnosti se také podílí rychlost gastrointestinální motility a sekrece žlučových kyselin. Placebo lékových forem s cyklosporinem musí tedy zabezpečit, aby léková forma při styku s vodným prostředím vytvořila disperzní systém zaručující biodostupnost molekul cyklosporinu. Složení některých lékových forem je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení některých lékových forem s cyklosporinem

| Název | Výrobce | Složení | Reference |
|-------------------|----------|---|-----------|
| Neoral | Novartis | Bezvodý ethanol čištěný kukuřičný olej glyceromakrogol-hydroxystearát hydrogenricinomakrogol 2000 | [7] |
| Equoral | TEVA | bezvodý ethanol, polyglycerol(3)-monooleát, polyglycerol(10)-monooleát, glyceromakrogol- hydroxystearát, alfa tokoferol | [7] |
| Cyclosporin Mylan | Mylan | Bezvodý etanol Tokoferol-acetát Diethylenglykol-monoethylether Glyceromakrogol-oleát Glyceromakrogol- hydroxystearát | [7] |

Cyklosporin A má proměnlivou biologickou dostupnost a úzký terapeutický index. Při jeho klinickém použití je potřeba u pacientů sledovat jeho sérové koncentrace a tomu přizpůsobovat dávkování. Hlavní metabolická dráha ovlivňující metabolismus cyklosporinu A je jaterní cytochrom P-450. Metabolismem cyklosporinu A vzniká celá řada produktů, které působí toxicky. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří například nefrotoxicita, hepatotoxicita a hypertenze. U většiny pacientů jsou nežádoucí účinky závislé na velikosti dávky, které při jejím snížení většinou mizí. [5] [7] [8] [15] [16] [21] [24] [25]

2.4.1 Nečistoty cyklosporinu

Houba *Tolypocladium inflatum* produkující cyklosporin bohužel nesyntetizuje jen cyklosporin A, ale ve větší nebo menší míře i jiné cyklosporiny. Cyklosporiny jsou v houbových buňkách produkovány komplexem enzymů mimo ribozomálně, tedy netypickou cestou pro tvorbu peptidů. Enzymatická syntéza je ale méně selektivní a to vede k tvorbě celé řady příbuzných cyklosporinů, které se liší jednak změnou pořadí, nebo jinou atypickou aminokyselinou v řetězci. Přesné struktury cyklosporinů se podařilo odhalit, až s nástupem hmotnostní spektrometrie. Vývoj v technologii biosyntézy se stále snaží izolovat kmeny produkující čistější cyklosporin A. Jednotlivé nečistoty cyklosporinu se od cyklosporinu A liší tím, že v jeho cyklické struktuře je nahrazena jedna nebo i více aminokyselin za jiné. Například cyklosporin A s primární strukturou cyklo(-MeBmt¹-Abu²-Sar³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹-) se liší od nečistoty cyklosporin B s primární strukturou cyklo(-MeBmt¹-Ala²-Sar³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹-) v aminokyselině na pozici 2, kde cyklosporin A má vázanou aminomáselnou kyselinu, zatímco cyklosporin B alanin. Zkráceně se tato

skutečnost dá uvést jako [Ala²]Cs. Seznam známých nečistot cyklosporinu je uveden v tabulce 2. [19] [21]

Tabulka 2. Nečistoty cyklosporinu [19]

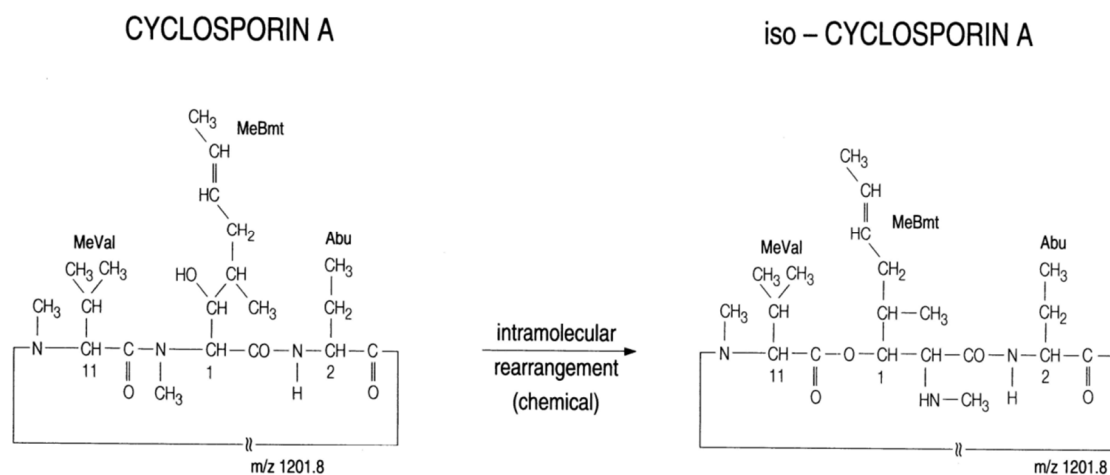
| | | | |
|-----|--|-----|---|
| CsA | | CsN | [Nva ² ,Leu ¹⁰]Cs |
| CsB | [Ala ²]Cs | CsO | [MeLeu ¹ ,Nva ²]Cs |
| CsC | [Thr ²]Cs | CsP | [Bmt ¹]Cs |
| CsD | [Val ²]Cs | CsQ | [Val ⁴]Cs |
| CsE | [Val ¹]Cs | CsR | [Leu ^{6,10}]Cs |
| CsF | [3'-desoxy-MeBmt ¹]Cs | CsS | [Thr ² ,Val ⁴]Cs |
| CsG | [Nva ²]Cs | CsT | [Leu ¹⁰]CS |
| CsH | [D-MeVal ¹¹]Cs | CsU | [Leu ⁶]Cs |
| CsI | [Val ² , Leu ¹⁰]Cs | CsV | [Abu ⁷]Cs |
| CsJ | [MeLeu ¹]Cs | CsW | [Thr ² ,Val ¹¹]Cs |
| CsK | [3'-desoxy-MeBmt ¹ , Val ²]Cs | CsX | [Nva ² ,Leu ⁹]Cs |
| CsL | [Bmt ¹]Cs | CsY | [Nva ² ,Leu ⁶]Cs |
| CsM | [Nva ^{2,5}]Cs | CsZ | [N-methyl-2-aminooktanová kys. ¹]Cs |

2.4.2 Degradční produkty cyklosporinu

Cyklická struktura této molekule poskytuje poměrně velkou stabilitu. Dlouho se soudilo, že jsou cyklosporiny téměř inertní. Pokud je, však cyklosporin rozpuštěn v organických rozpouštědlech dochází v přítomnosti kyselin nebo zásad k intramolekulárním přesmykům. Z pravidla čím jsou podmínky drastičtější je i reakce rychlejší. K přesmykům dochází mezi 1. a 11. aminokyselinou. Tomuto přesmyku však podléhají pouze cyklosporiny obsahující β–hydroxyskupinu. Peptidická vazba se tak mění na esterovou a vznikají tak isocyklosporiny. Například cyklosporiny C a S mající ve své struktuře aminokyselinu threonin, která obsahuje druhou β–hydroxyskupinu, tím poskytují tři různé isocyklosporiny. Další reakcí poskytující degradační produkty je ztráta molekuly vody při vyšších teplotách a to z postranního řetězce aminokyseliny MeBmt. V alkalickém prostředí a to i při laboratorní teplotě, dochází k racemizaci aminokyselin.

Při metabolizaci cyklosporinu A nedochází k narušení cyklické struktury, ale pouze k reakcím na postranních řetězcích. Pro lékovou formu přicházejí ale v úvahu v podstatě čtyři degradační produkty cyklosporin H, ID 005-95 a isocyklosporiny A a H. [5] [9] [19] [21]

Obrázek 4. Tvorba isocyklosporinů [19]



2.4.3 HPLC stanovení cyklosporinů

Většina publikovaných prací se zabývá HPLC stanovením cyklosporinu v biologických matricích.

Tyto metody představují pochopitelně zcela jiný separační problém, než je stanovení doprovodných látek v substanci nebo lékové formě. Důvodem je to, že pro klinické studie, případně klinické praxe je zapotřebí stanovit pouze cyklosporin A, případně jeho metabolity na nízkých koncentračních úrovních a specifita vzhledem k nečistotám cyklosporinu A není relevantním parametrem. V případě stanovení doprovodných látek v aktivních farmaceutických substancích je ale právě specifita vzhledem k doprovodným látkám a degradačním produktům substance naprosto klíčová. U lékových forem s cyklosporinem je třeba počítat navíc ještě se specifitou vzhledem k placebo, které je v případě lékových forem cyklosporinu velmi komplexní.

Publikace zabývající se stanovením doprovodných látek v cyklosporinu nebo jeho lékových formách jsou přehledně uvedeny v tabulce 3.

V případě stanovení doprovodných látek lze obecně konstatovat, že vzhledem ke značnému množství známých cyklosporinů nelze všechny postihnout v jedné univerzální HPLC metodě. Schůdné je ale mít HPLC metodu postihující nečistoty, které přicházejí v úvahu pro konkrétní fermentační proces a následné purifikační technologie sestávající zpravidla z kombinací procesních chromatografií a krystalizací. V případě HPLC metod s UV detekcí aplikovaných na lékové formy je třeba navíc počítat s tím, že nelze nikdy

vyločit koeluci nečistoty cyklosporinu se složkou placebo, případně existenci neznámé nečistoty koeluuující např. s majoritním píkem placebo. [9] [10] [11] [12] [18] [21]

Tabulka 3. HPLC metody pro stanovení doprovodných látek.

| Citace | Kolona | Mobilní fáze | Teplota | Matrice | Nečistoty | poznámka |
|--------|---|--|---------|---------|--|---|
| [9] | LiChrospher 100 RP-18, 4 mm x 250 5 µm | tetrahydrofuran: kyselina fosforečná (0,05 M) (44:56, v / v) | 75 °C | API | ID-005-95, CsB, CsH, CsG, IsoA, IsoH | předehřev 1m kapilára 0,25 mm UV detekce 210 nm |
| [10] | Nucleosil RP-2 | A: kyselina fosforečná: voda 0,8: 1000 B: kyselina fosforečná: acetonitril 0,8: 1000 lineární gradient od 65:35 do 40:60 55 minut | 80 °C | LF | IsoA H ₂ CsA | UV detekce 210 nm |
| [11] | 10 různých kolon definovaných C18 | Acetonitrile: voda: TBME (430: 520: 50) Kyselina fosforečná (0,02 mol/l) SDS (0,01 mol/l) pH 3,5-6,5 | 80 °C | API | [Leu ⁴]Cs, CsC, CsB, CsL, CsU, CsA, CsH, [H ₂ CsA, CsG, CsD, CsF, IsoA. | předehřev 1m kapilára 0,25 mm UV detekce 210 nm |
| [18] | 4,6x250 PrimeSphere C1 | Acetonitril: voda: methanol: kyselina fosforečná 605: 400: 50: 0,5 | 70 °C | API | | předehřev 1m kapilára 0,25 mm UV detekce 210 nm |
| [20] | C18 4 mm x 250 mm 3- 5 µm | Kyselina fosforečná: TBME: acetonitril: voda 0,1:5:43:52 | 80 °C | API | CsA, CsB, CsC, CsD, CsE, CsG, CsH, CsL, CsT, CsU, CsV | předehřev 1m kapilára 0,25 mm UV detekce 210 nm |

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vyvinout HPLC metodu pro stanovení doprovodných látek v lékových formách na bázi cyklosporinu s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík. Metoda by měla postihnout nečistoty pocházející ze substance a degradační produkty CsH a ID 005-95. Stanovení isocyklosporinů není potřebné, protože jejich obsah poskytuje metoda s UV detekcí, kterou se stanovuje obsah cyklosporinu A jako hlavní složky. Metoda by měla v budoucnu nahradit stávající HPLC metodu s chemiluminiscenční detekcí, která pro dosažení dostatečné účinnosti využívá spojení dvou chromatografických kolon o velikosti částic 3 μm . Aplikací kolon s velikostí částic pod 2 μm je předpoklad, že tato stávající metoda by mohla být významně zkrácena a zjednodušena.

Kromě vlastního vývoje metody bude v práci kladen důraz na detailní popis HPLC metody, který by měl umožnit její bezproblémovou implementaci do laboratoře kontroly kvality. Součástí práce je i ověření klíčových parametrů metody (validovatelnost metody). Kompletní validace metody už cílem práce není.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál, pomůcky a technické vybavení

4.1.1 Standardy a vzorky

Standardy jednotlivých cyklosporinů

Obsahový standard cyklosporinu číslo S741410H00AS-2, potence 0,997.

Tabulka 4. Standardy nečistot.

| Cyklosporin | Zkratka | Šarže | Číslo standardu |
|------------------------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| Cyklosporin Abu ⁵ | [Abu ⁵]Cs | VV100504/01 | RD074I-2 |
| Cyklosporin B | CsB | 120893 | RD046I |
| Cyklosporin C | CsC | 251192 | RD047I |
| Cyklosporin D | CsD | MB102/070198/21 | RD082I |
| Cyklosporin E | CsE | HJ150496/1 | RD049I |
| Cyklosporin F | CsF | HJ151297/2 | RD102I |
| Cyklosporin G | CsG | MB126/250697/2 | RD050I |
| Cyklosporin H | CsH | PH120525 | RD051I-2 |
| Dihydrocyklosporin A | H ₂ CsA | SC151096/5 | RD044I |
| Isocyklosporin A | IsoA | PC021/310702/CS2 | RD045I |
| Cyklosporin Leu ⁴ | [Leu ⁴]Cs | HJ0411296/2 | RD445I |
| Cyklosporin T | CsT | PR120607/01 | RD028I-2 |
| Cyklosporin U | CsU | 290994 | RD052I |
| Cyklosporin V | CsV | PH100610 | RD033I |

Modelové směsi

- Modelová směs cyklosporinů pro API, šarže MB358/060202/1 (obsahuje isoA, [Abu⁵]Cs, CsU, CsA, H₂CsA, CsV, CsH, CsD)
- Modelová směs cyklosporinů pro surový cyklosporin, šarže: PH120619/TM, číslo standardu: RD272I-4 (obsahuje isoA, CsC, [Leu⁴]Cs, CsB, [Abu⁵]Cs, CsU, CsA, CsT, H₂CsA, CsV, CsH, CsG, CsD, CsE, CsF)
- Modelová směs cyklosporinů šarže MB317/070700/1 (obsahuje isoA, CsC, CsB, CsL, [Abu⁵]Cs, CsU, CsA, RRT 1,06, CsT, H₂CsA, CsH, CsG, CsD, CsF)

Vzorky cyklosporinů

Šarže: 84142000113, 84142000713, 84142002513

Vzorky lékových forem

- Equoral tobolky, deklarovaný obsah 25 mg cyklosporinu, šarže 4T101012 (exp. 01/2014)
- Equoral tobolky, deklarovaný obsah 100 mg cyklosporinu, šarže 4T303006 (exp. 03/2016), 4T101014 (exp. 01/2014), 4T002008 (exp. 02/2013)
- Equoral orální roztok, deklarovaný obsah cyklosporinu 100 mg/ml, šarže 4R210001
- Neoral tobolky, deklarovaný obsah 100 mg cyklosporinu, šarže SJ7200 (exp. 08/2006)
- Placebo pro Equoral orální roztok, šarže: 4R210001
- Placebo pro Equoral tobolky, šarže: 4T211020

4.1.2 Použité chemikálie

- Aceton (PESTANAL, nebo ekvivalentní, Fluka, katalogové č. 34480)
- *tert.*-butyl methyl ether (TBME, pro HPLC, Sigma – Aldrich, katalogové č. 34875)
- Voda (H₂O, produkovaná zařízením Millipore Gradient Q10)
- Kyselina trifluoroctová (TFA, 99 %, Sigma – Aldrich, katalogové č. T6,220-0)
- Ethanol (EtOH, absolutní, lihovar Kojetice)
- Methanol (MeOH, pro gradientovou eluci, Scharlau, katalogové č. ME03060309)

4.1.3 Použitý software

- Empover Pro, verze 3 (chromatografický software, Waters, Milford, USA)
- Microsoft Word 2010 (Microsoft, Redmont, USA)
- Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmont, USA)
- Microcal Origin Professional, version 6 (Microcal Software, Northampton, USA)

4.1.4 Instrumentace na oddělení RD TAPI

- Kapalinový chromatograf- separační modul 2695, kolonový termostat TCM, analogově digitální převodník SATIN (Waters, Milford, USA).
- Chemiluminiscenční detektor ANTEK 8060 (PAC, Houston, USA)
- Externí termostat Techlab T-1 (Erkerode, Německo)

4.1.5 Instrumentace na oddělení QC Pharma

- Kapalinový chromatograf- separační modul 2695, kolonový termostat TCM, analogově digitální převodník SATIN (Waters, Milford, USA).
- Chemiluminiscenční detektor ANTEK 8060 (PAC, Houston, USA)
- Filtr analogových dat LINK (Antec Leyden, Zoeterwoude, Holandsko)

4.1.6 Chromatografické kolony

Použité chromatografické kolony jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5. Chromatografické kolony použité během experimentů.

| Typ kolony | Katalogové číslo | Výrobce | Šarže | Sériové číslo |
|---|------------------|------------|----------|----------------|
| Luna C-18 3 μ m, 150 x 2,0mm | 00F-4251-BO | Phenomenex | 5292-20 | 195093-16 |
| ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 150 x 2,1mm | 186002353 | Waters | 0205 | 02053209315777 |
| Kinetex C18 1,7 μ m, 150 x 2,1mm | 00F-4475-AN | Phenomenex | 5574-55 | 625730-3 |
| Kinetex XB C18 1,7 μ m, 150 x 2,1mm | 00F-4498-AN | Phenomenex | 5605-115 | 617475-14 |
| ZORBAX SB-C18 1,8 μ m, 150 x 2,1mm | 820700-902 | Agilent | B11314 | USHEE01650 |
| | | | B12144 | USHEE01680 |
| | | | B12212 | USHEE01707 |

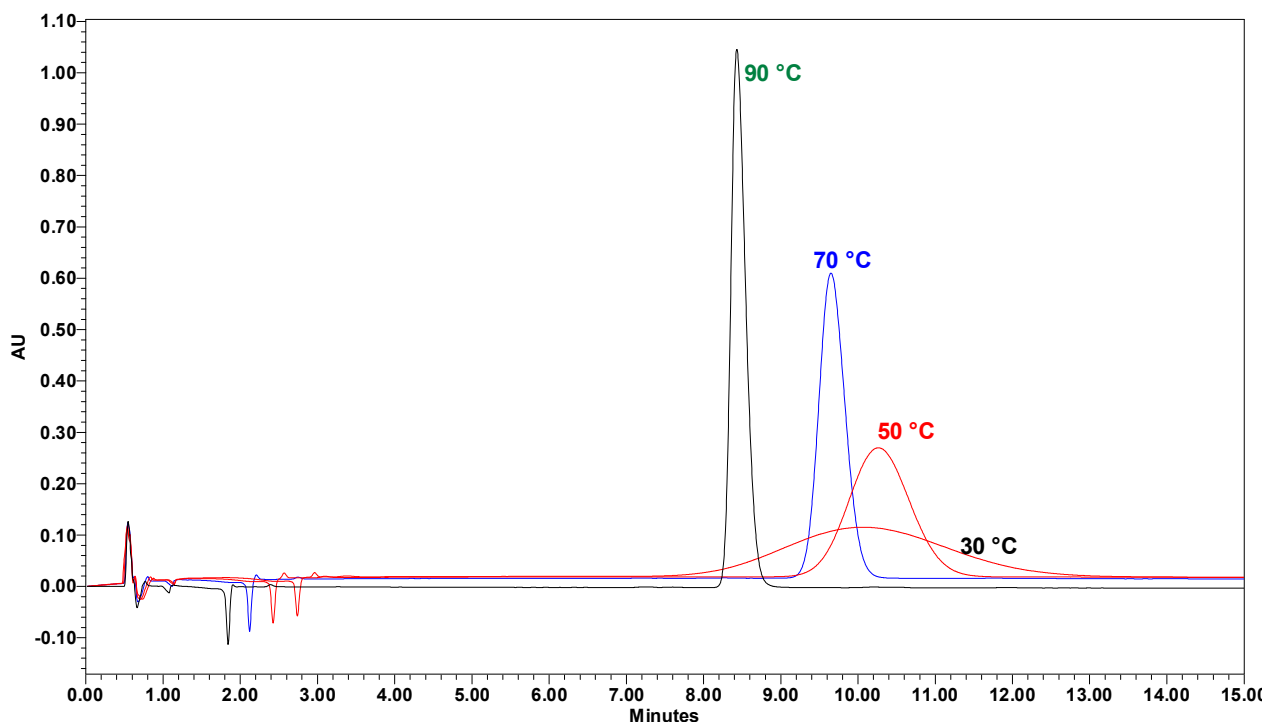
5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vývoj metody

5.1.1 Optimalizace termostatování kolony

Chromatografie cyklosporinů patří do vysokoteplotních separací. S rostoucí teplotou roste účinnost separace a mění se i její selektivita. Nutnost aplikace vysoké teploty je patrná i z obrázku 5, na kterém jsou znázorněny isokratické separace standardu cyklosporinu při rozdílných teplotách kolony. Stávající metoda založená na chemiluminiscenční detekci (AM\RD\LC156\I2) využívá pro termostatování externí termostat Techlab T1 plněný glycerínem. Tento způsob uložení kolony zaručuje vysoce efektivní přestup tepla z média do kolony. Má ale řadu nevýhod, jako je složitá manipulace s kolonou v termostatu, nemožnost softwarového ovládání termostatu, umožňující jeho včasné vypnutí po ukončení sekvence, jakož i nutnost častých oprav termostatu, který není pro plnění kapalinou od výrobce určen.

Obrázek 5. Vliv teploty na účinnost separace cyklosporinů kolona (Kolona: Zorbax SB C8, 1,8 μ m, 100 x 3,0 mm, mobilní fáze: 44,5 % ACN + 7 % TBME+ 48,5 % H₂O + 0,01 % TFA, průtok mobilní fáze: 0,6 ml/min, dávkovaný objem: 4 μ l (1 mg CsA/ml, 75 μ g CsA), detekce: UV 210 nm.








Záměrem bylo pro novou metodu aplikovat jednodušší postup termostatování kolony nejlépe pomocí termostatu, který je možné ovládat chromatografickým softwarem Empower (termostat TCM). Byla provedena sada experimentů, ve kterých se porovnávala různá uložení kolony v termostatu, případně aplikace přehřevu mobilní fáze. Jako přehřev sloužil přibližně 1 m ocelové kapiláry s vnitřním průměrem 0,005“ navinutý na šroub. Pro každé uložení kolony byla provedena analýza, při které byl na kolonu nadávkován etanolický roztok cyklosporinu o koncentraci 1 mg/ml. Jako parametr účinnosti termostatování sloužila hodnota počtu teoretických pater cyklosporinu v konkrétní analýze. Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Chromatografické podmínky pro optimalizaci termostatování.

| | | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------|------|
| Náplň kolony: | Zorbax SB-C18 | Velikost částic [μm] : | 1,8 |
| Rozměr kolony [mm]: | 100x2,1 | Průtok [ml/min] : | 0,15 |
| Teplota kolony [°C]: | 90 | Teplota vzorku [°C] : | 20 |
| Detekce | NSD | Dávkovaný objem [μl] : | 2 |
| Mobilní fáze: | 40 % aceton, 5 % TBME, 55 % vody, 0,01 % TFA | | |

Výsledky experimentů jsou přehledně prezentovány v tabulce 7. Jako reference slouží experiment 1, při kterém je použit termostat splněný glycerínem a je aplikován přehřev mobilní fáze.

Tabulka 7. Výsledky experimentů pro optimalizaci termostatování.

| Exp. č. | Termostat | Předehřev | Uložení kolony v termostatu | N [teor.pater] |
|---------|------------|-----------|---|----------------|
| 1 | Techlab T1 | Ano |  <p>Termostat plněný glycerínem (referenční)</p> | 10960 |
| 2 | Techlab T1 | Ne |  <p>Termostat plněný glycerínem.</p> | 10330 |
| 3 | Waters TCM | Ne |  <p>Kolona uložena na dno termostatu do hliníkových bloků.</p> | 10405 |
| 4 | Waters TCM | Ano |  <p>Kolona uložena na dno termostatu do hliníkových bloků s předehřevem</p> | 10639 |
| 5 | Waters TCM | Ano |  <p>Kolona s předehřevem zabalena těsně do několika vrstev hliníkové fólie.</p> | 10859 |

Diskuze:

I když se účinnosti separace v jednotlivých uspořádáních dramaticky neliší, můžeme konstatovat, že kolona s předehřevem mobilní fáze obalená hliníkovou fólií uložená do termostatu Waters TCM poskytuje srovnatelnou účinnost jako kolona s předehřevem ponořená do termostatu plněného glycerínem. Pro další experimenty proto bude použit tento systém (kolona a předehřev obalené několika vrstvami hliníkové fólie v termostatu TCM) doplněný ještě o několik vrstev hliníkové fólie a drátěnky, které v uzavřeném termostatu tlačí kolonu k topné stěně termostatu. Termostatování kolony je klíčovým parametrem, a proto je mu věnována samostatná kapitola v podrobném popisu metody.

5.1.2 Screening HPLC kolon

Pro screening bylo vybráno několik kolon:

Luna C-18(2), 3 μm , 150 x 2,0 mm

ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 μm , 150 x 2,1 mm

ZORBAX SB-C18, 1,8 μm , 150 x 2,1 mm

Phenomenex Kinetex C18, 1,7 μm , 150 x 2,0 mm

Phenomenex Kinetex XB C18, 1,7 μm , 150 x 2,1 mm

Stacionární fáze kolon byly vybrány s přihlédnutím k faktu, že analýzy bude nutno provádět při teplotách až 100 °C. Průměr kolony 2 mm odpovídal průtokovým požadavkům chemiluminiscenčního detektoru (150 $\mu\text{l}/\text{min}$), velikost částic a délka kolony 150 mm pak komplikovanosti separačního problému (dosažení separace jednotlivých cyklosporinů). Během této fáze byly testovány gradientové separace modelových směsí cyklosporinů v mobilních fázích obsahujících aceton, vodu, TFA (0,01 %) a TBME (v rozsahu 4 – 6 %). Byly testovány separace při teplotách 90 a 100 °C. Pro tuto screeningovou fázi byl plně využit potenciál kvarternární nízkotlaké gradientové pumpy. Konkrétní provedení screeningové fáze vývoje je patrné z tabulky 8 - 10. Výsledky screeningové fáze jsou prezentovány na obrázcích 6 – 11.

Tabulka 8. Pohyblivé parametry screeningu.

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Stacionární fáze | |
| Teplota kolony | 90 °C, 100 °C |
| Obsah TBME v mobilní fázi | |

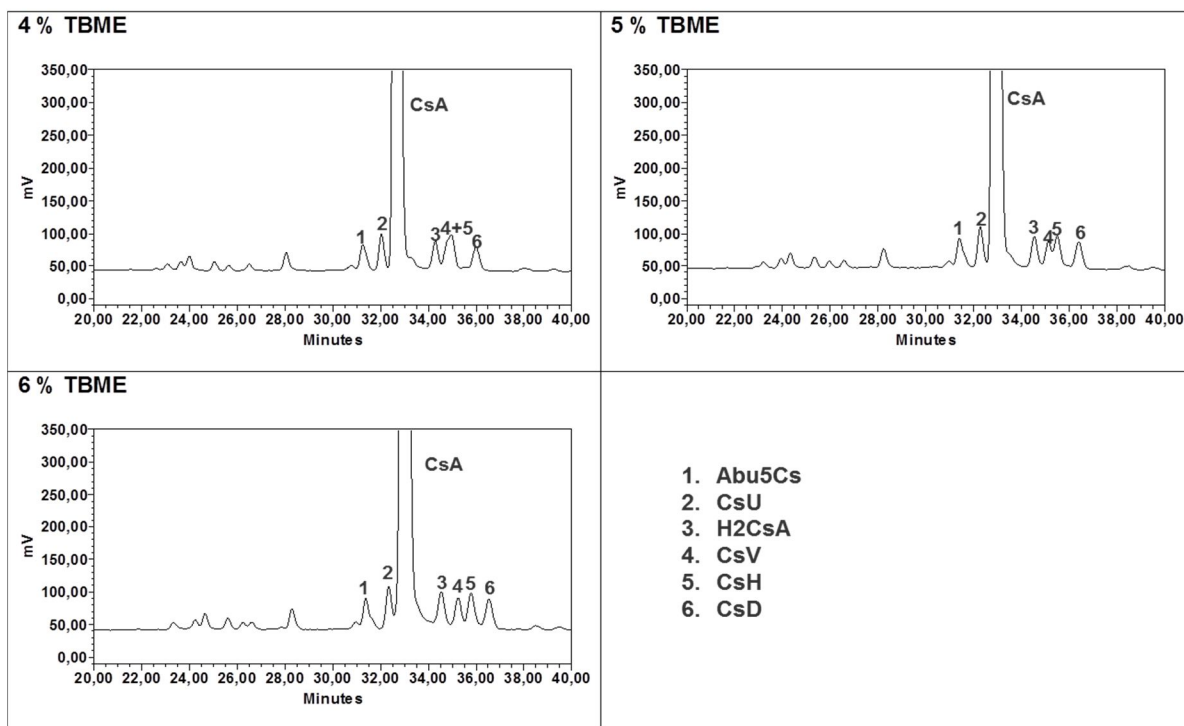
Tabulka 9. Složení mobilních fází v jednotlivých kanálech.

| Kanály | Aceton | TBME | W | TFA |
|---------------|---------------|-------------|----------|------------|
| | [%] | | | |
| A | 32 | 4 | 64 | 0,01 |
| B | 26 | 7 | 67 | 0,01 |
| C | 52 | 4 | 44 | 0,01 |
| D | 46 | 7 | 47 | 0,01 |

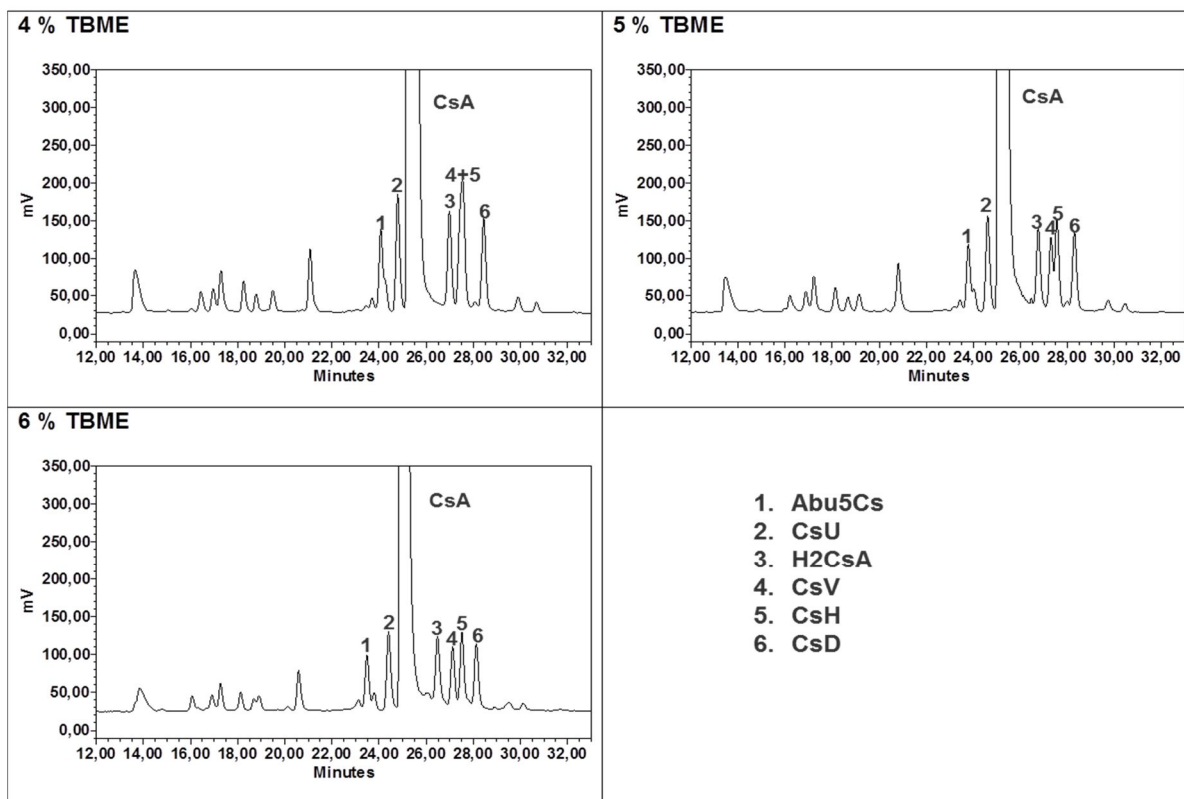
Tabulka 10. Programování gradientového ventilu v jednotlivých instrumentových metodách.

| Gradient | | Směšovací poměr | | | | Složení mobilní fáze | | |
|----------|--------|-----------------|-------|-------|-------|----------------------|------|------|
| | | A | B | C | D | Aceton | TBME | voda |
| | Minuty | [%] | | | | | | |
| 1 | 0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 32,0 | 4,0 | 64,0 |
| | 30 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 52,0 | 4,0 | 44,0 |
| | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 52,0 | 4,0 | 44,0 |
| | 50,1 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 32,0 | 4,0 | 64,0 |
| | 60 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 32,0 | 4,0 | 64,0 |
| 2 | 0 | 67,0 | 33,0 | 0,0 | 0,0 | 30,0 | 5,0 | 65,0 |
| | 30 | 0,00,0 | 0,0 | 67,0 | 33,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| | 50 | 0,0 | 0,0 | 67,0 | 33,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| | 50,1 | 67,0 | 33,0 | 0,0 | 0,0 | 30,0 | 5,0 | 65,0 |
| | 60 | 67,0 | 33,0 | 0,0 | 0,0 | 30,0 | 5,0 | 65,0 |
| 3 | 0 | 33,5 | 66,5 | 0,0 | 0,0 | 28,0 | 6,0 | 66,0 |
| | 30 | 0,0 | 0,0 | 33,5 | 66,5 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |
| | 50 | 0,0 | 0,0 | 33,5 | 65,5 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |
| | 50,1 | 33,5 | 66,5 | 0,0 | 0,0 | 28,0 | 6,0 | 66,0 |
| | 60 | 33,5 | 66,5 | 0,0 | 0,0 | 28,0 | 6,0 | 66,0 |
| 4 | 0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 26,0 | 7,0 | 67,0 |
| | 30 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 46,0 | 7,0 | 47,0 |
| | 50 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 46,0 | 7,0 | 47,0 |
| | 50,1 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 26,0 | 7,0 | 67,0 |
| | 60 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 26,0 | 7,0 | 67,0 |

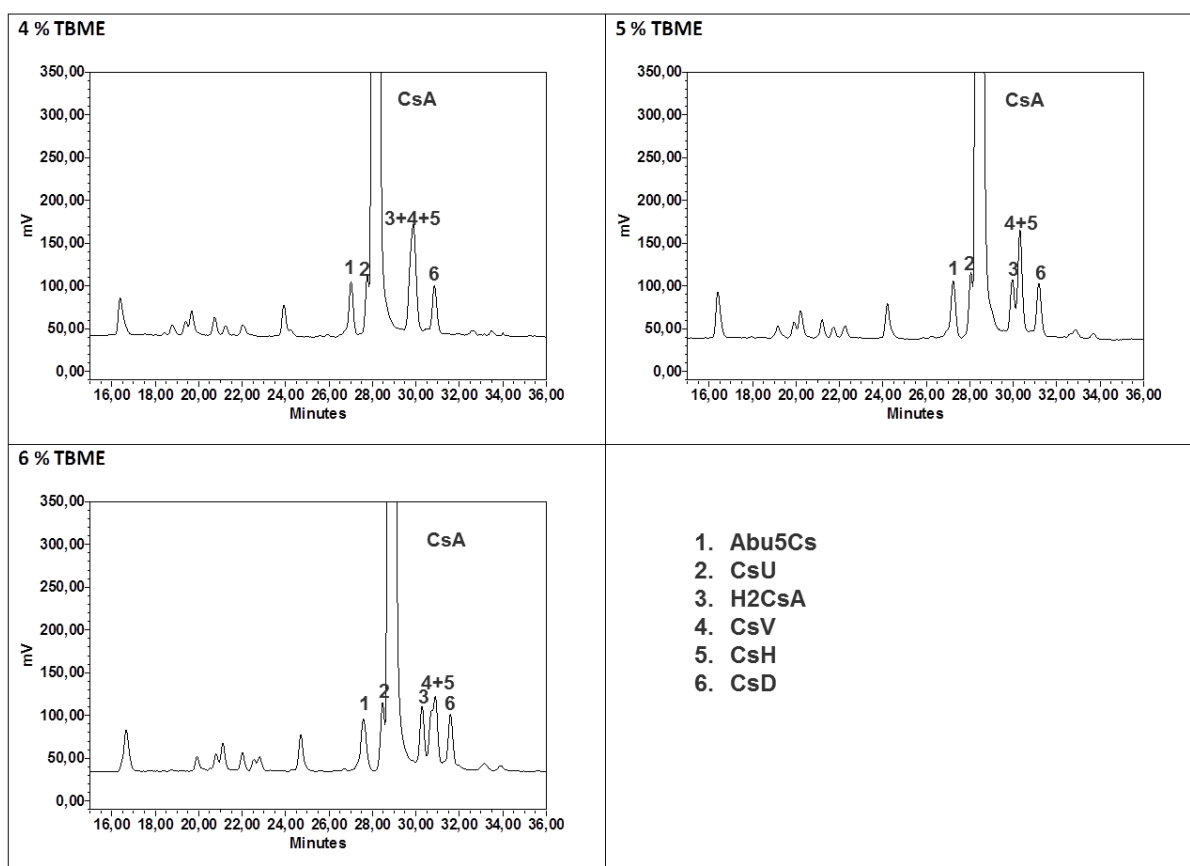
Obrázek 6. Výsledky screeningové fáze na koloně LUNA C18(2) při 100 °C.



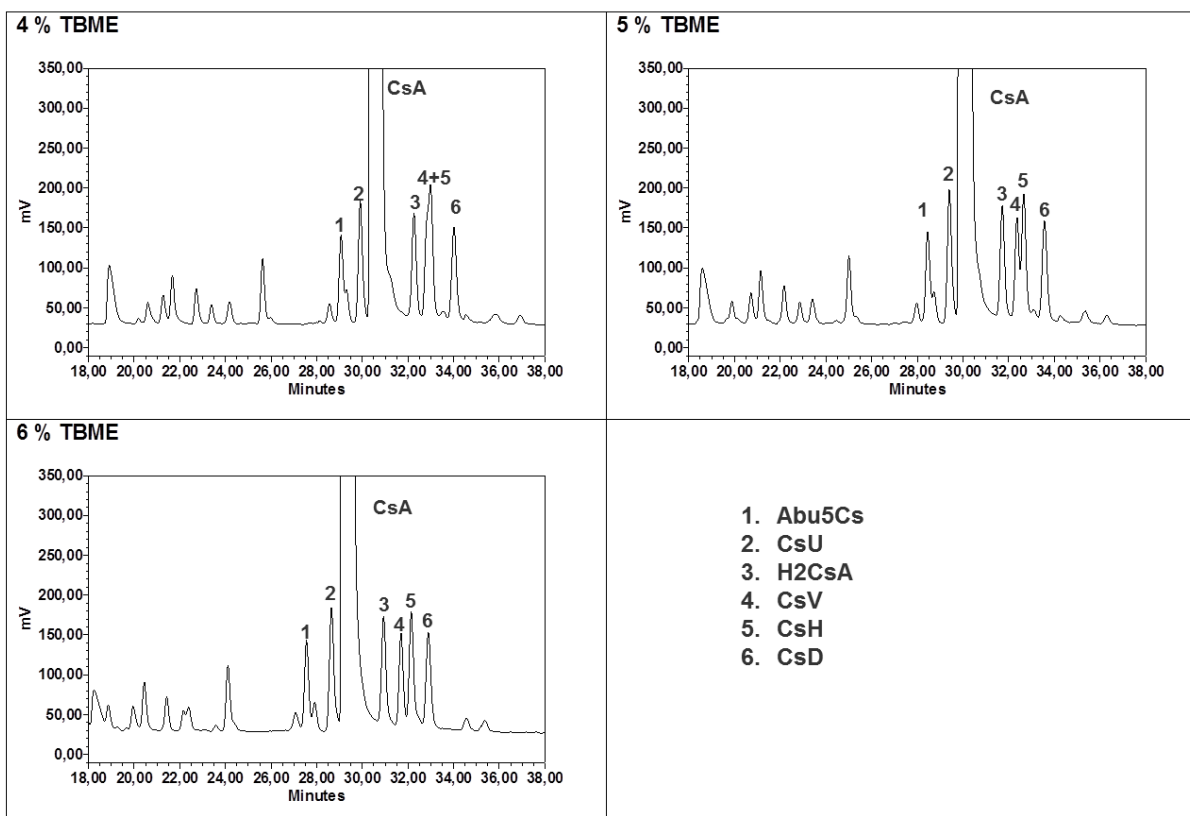
Obrázek 7. Výsledky screeningové fáze na koloně Kinetex C18 při 100 °C.



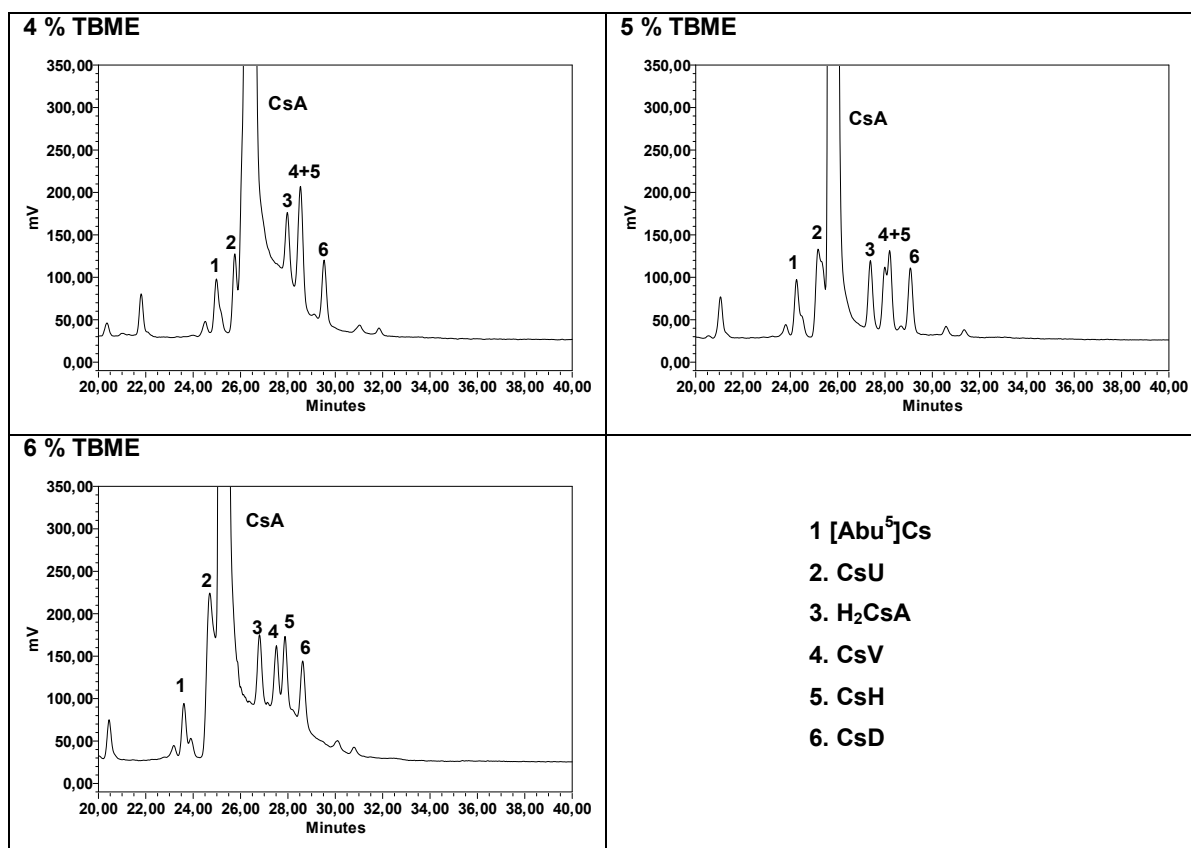
Obrázek 8. Výsledky screeningové fáze na koloně Acquity BEH C18 při 100 °C.



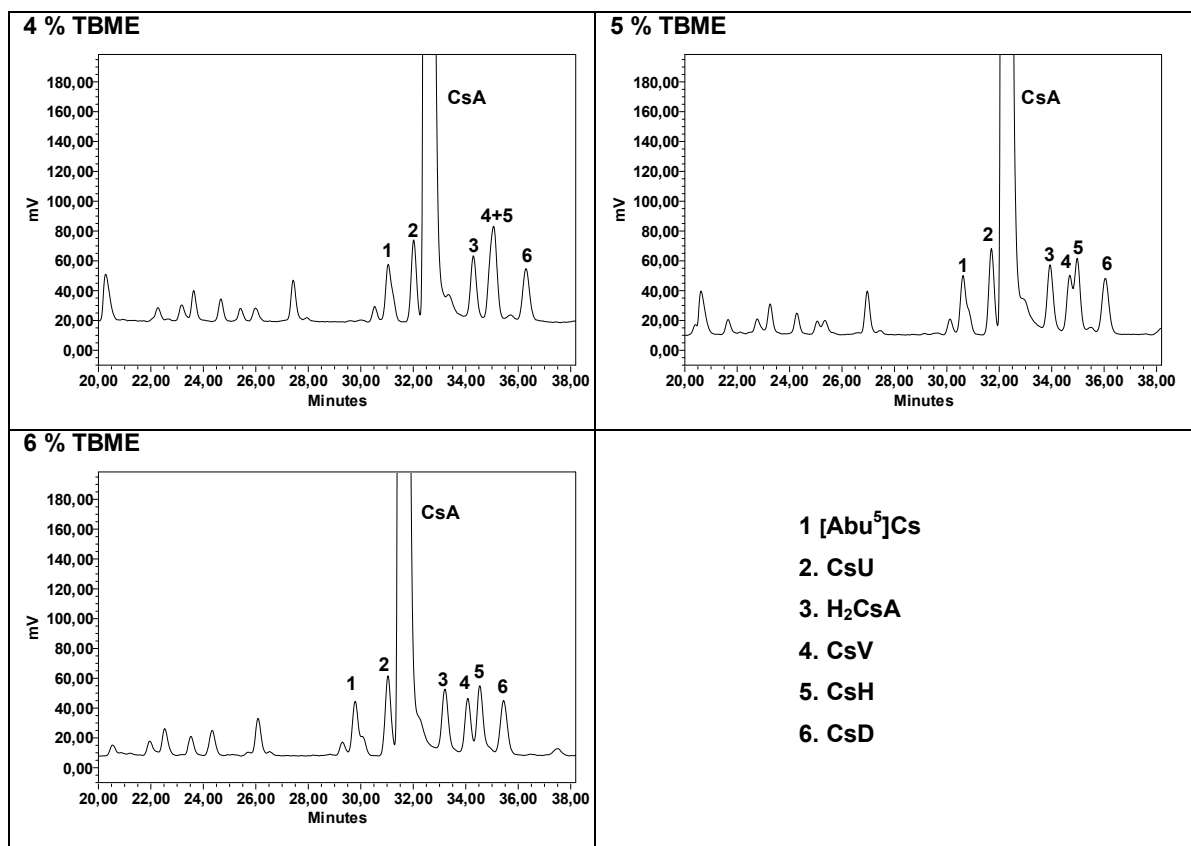
Obrázek 9. Výsledky screeningové fáze na koloně Zorbax SB C18 při 100 °C.



Obrázek 10. Výsledky screeningové fáze na koloně Kinetex XB C18 při 100 °C.



Obrázek 11. Výsledky screeningové fáze na koloně Zorbax SB C18 při 90 °C.



Diskuze:

Z prezentovaných chromatogramů separací při 100 °C je zřejmé, že z původních pěti kolon se pouze dvě (Zorbax SB C18, 1,8 μm a Kinetex C18 ukázaly jako perspektivní pro další optimalizaci. Z těchto dvou kolon byla nakonec pro finální optimalizace vybrána kolona Zorbax.

Důvod výběru této kolony byla dlouhodobá dobrá zkušenost s její teplotní stabilitou, která je výrobcem deklarována na 90°C. Kolona Kinetex SB C18 byla nakonec z dalších experimentů vyloučena jednak proto, že chyběla zkušenost s jejím dlouhodobým použitím za vysoké teploty a jednak proto, že se dalo předpokládat, že dávkované množství cyklosporinu v řádu desítek mikrogramů bude pro kolonu Kinetex jakožto stacionární fázi s pevným jádrem hraniční.

Ukázalo se, že teplota kolony 90 °C neposkytuje dostatečnou účinnost separace. Na všech kolonách bylo při 90 °C dosaženo horší separace, než při 100 °C. Prezentovány jsou tedy pouze separace na vybrané koloně Zorbax SB C18 viz. obrázek 11. Z obrázku je jasně vidět že rozlišení je při 90 °C výrazně horší než při 100 °C.

5.1.3 Finální optimalizace

Optimalizace obsahu TBME a gradientu

Na vybrané koloně Zorbax SB C18 byla provedena finální optimalizace obsahu TBME a směrnice gradientu. Také v této fázi vývoje byl využit potenciál kvaternární gradientové pumpy, jak je prezentováno v tabulce 11 - 14 níže. Byly testovány lineární gradienty, z počátečního na konečné složení za 30 (30 min. lineární gradient a 10 min. setrvání na konečných podmínkách gradientu) a 50 minut (50 min. lineární gradient a 10 min. setrvání na konečných podmínkách gradientu), i doba ekvibrace byla 10 minut. Ze screeningové fáze vývoje metody vyplynul rozsah obsahu pro finální optimalizaci TBME 5 – 6 %. Byl testován i vliv počátečních podmínek gradientu na separaci.

Tabulka 11. Pevné parametry finální optimalizace.

| | |
|--------------------------|--|
| Průtok | 0,15 ml/min. |
| Dávkovaný objem: | 1 μ l |
| Stacionární fáze: | Zorbax SB C18, 1,8 μ m, 150 x 2,1 mm |
| Teplota kolony: | 100 °C |
| Detekce: | NSD |

Tabulka 12. Pohyblivé parametry finální optimalizace.

| |
|--|
| Obsah TBME v mobilní fázi |
| Gradient (počáteční podmínky a směrnice) |

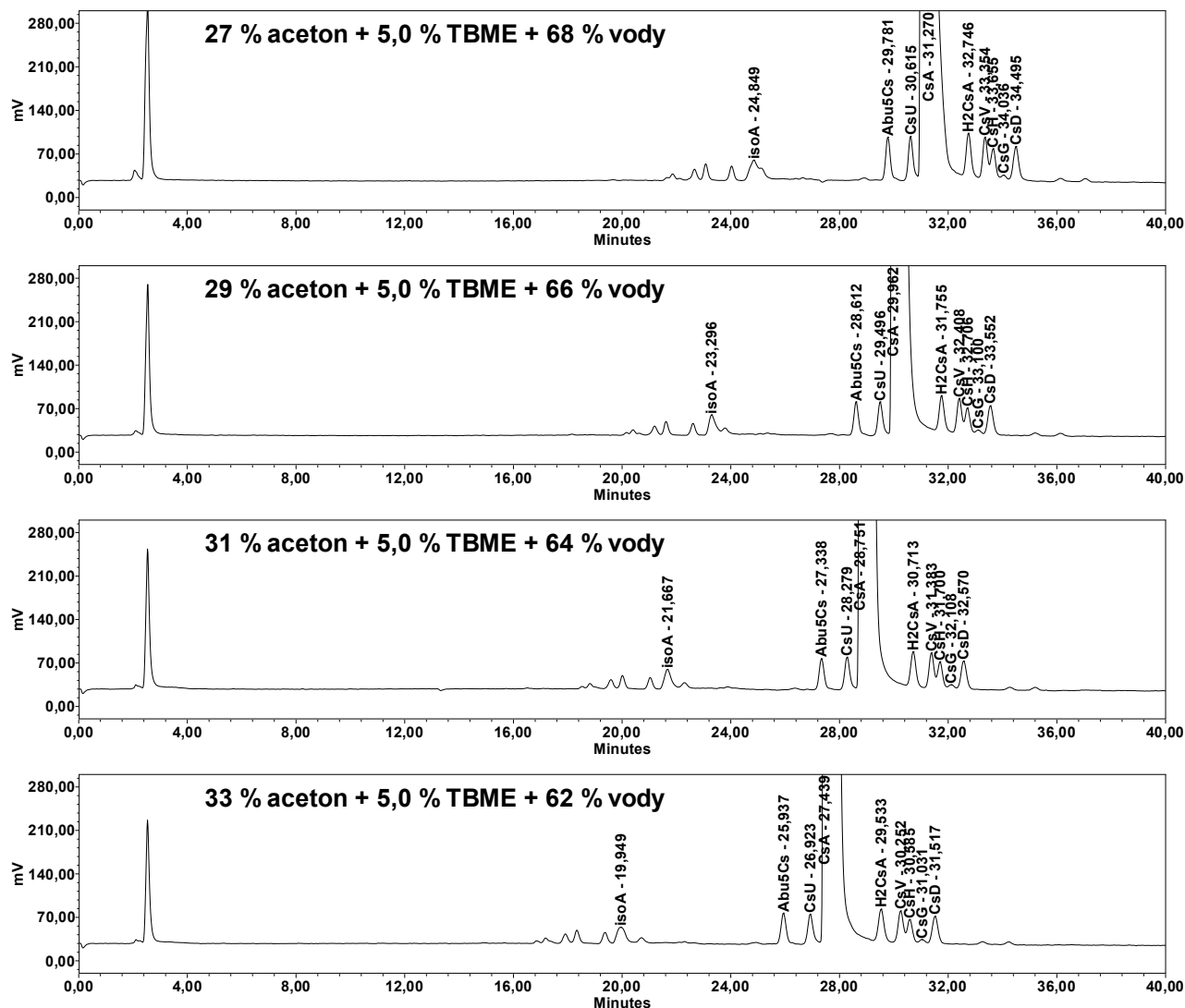
Tabulka 13. Složení mobilních fází v jednotlivých kanálech.

| Kanály | Aceton | TBME | W | TFA |
|--------|--------|------|----|------|
| | [%] | | | |
| A | 27 | 5 | 68 | 0,01 |
| B | 25 | 6 | 69 | 0,01 |
| C | 50 | 5 | 45 | 0,01 |
| D | 48 | 6 | 46 | 0,01 |

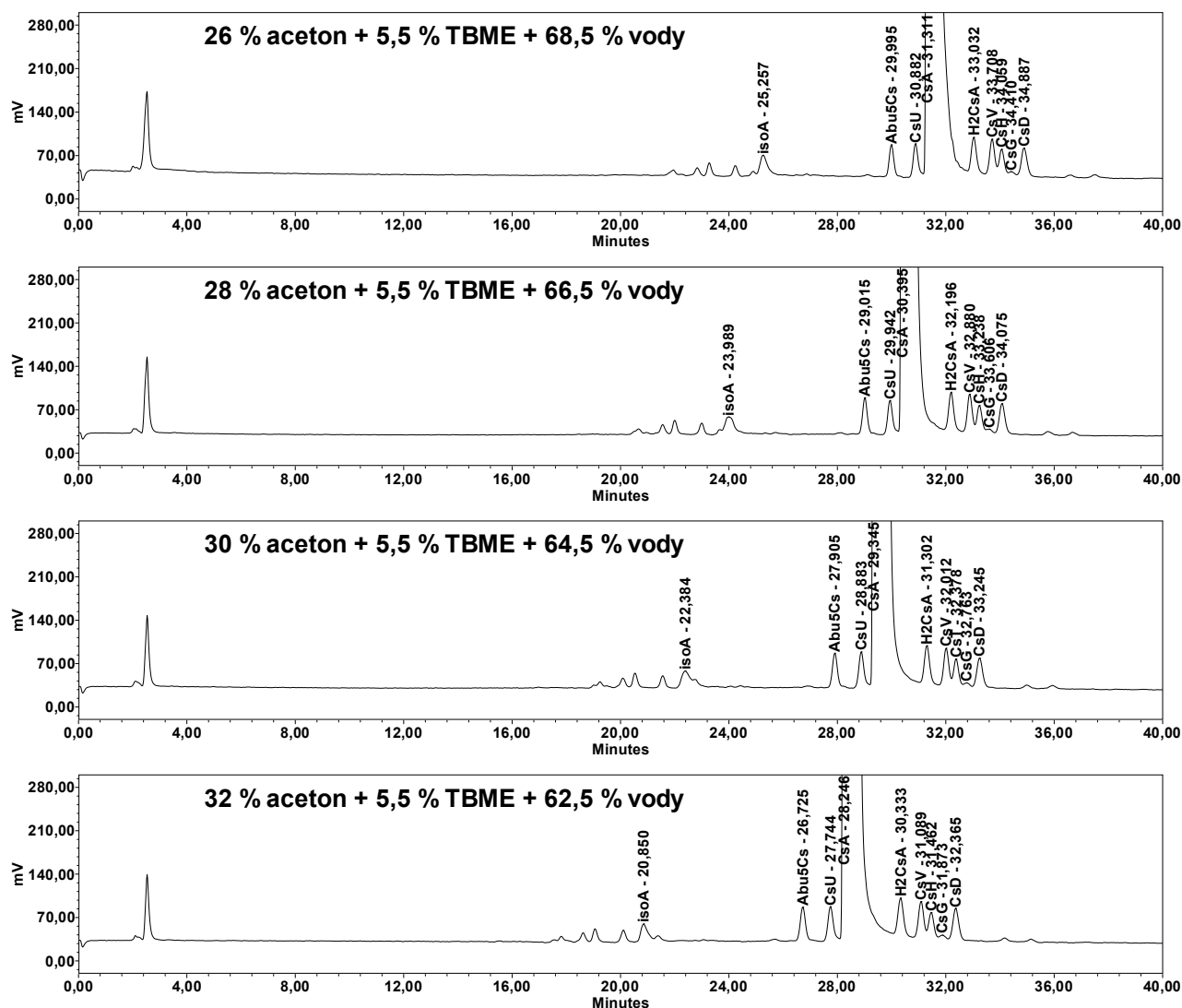
Tabulka 14. Programování gradientového ventilu v jednotlivých metodách.

| Gradient | Směšovací poměr | | | | Složení mobilní fáze | | |
|----------|-----------------|-------|-------|-------|----------------------|------|------|
| | A | B | C | D | Aceton | TBME | voda |
| | [%] | | | | | | |
| začátek | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 27,0 | 5,0 | 68,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| začátek | 91,5 | 0,0 | 8,5 | 0,0 | 29,0 | 5,0 | 66,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| začátek | 82,5 | 0,0 | 17,5 | 0,0 | 31,0 | 5,0 | 64,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| začátek | 74,0 | 0,0 | 26,0 | 0,0 | 33,0 | 5,0 | 62,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 50,0 | 5,0 | 45,0 |
| začátek | 50,0 | 50,0 | 0,0 | 0,0 | 26,0 | 5,5 | 68,5 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 50,0 | 50,0 | 49,0 | 5,5 | 45,5 |
| začátek | 41,5 | 50,0 | 8,5 | 0,0 | 28,0 | 5,5 | 66,5 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 50,0 | 50,0 | 49,0 | 5,5 | 45,5 |
| začátek | 32,5 | 50,0 | 17,5 | 0,0 | 30,0 | 5,5 | 64,5 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 50,0 | 50,0 | 49,0 | 5,5 | 45,5 |
| začátek | 24,0 | 50,0 | 26,0 | 0,0 | 32,0 | 5,5 | 62,5 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 50,0 | 50,0 | 49,0 | 5,5 | 45,5 |
| začátek | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 25,0 | 6,0 | 69,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |
| začátek | 0,0 | 91,5 | 0,0 | 8,5 | 27,0 | 6,0 | 67,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |
| začátek | 0,0 | 82,5 | 0,0 | 17,5 | 29,0 | 6,0 | 65,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |
| začátek | 0,0 | 74,0 | 0,0 | 26,0 | 31,0 | 6,0 | 63,0 |
| konec | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 48,0 | 6,0 | 46,0 |

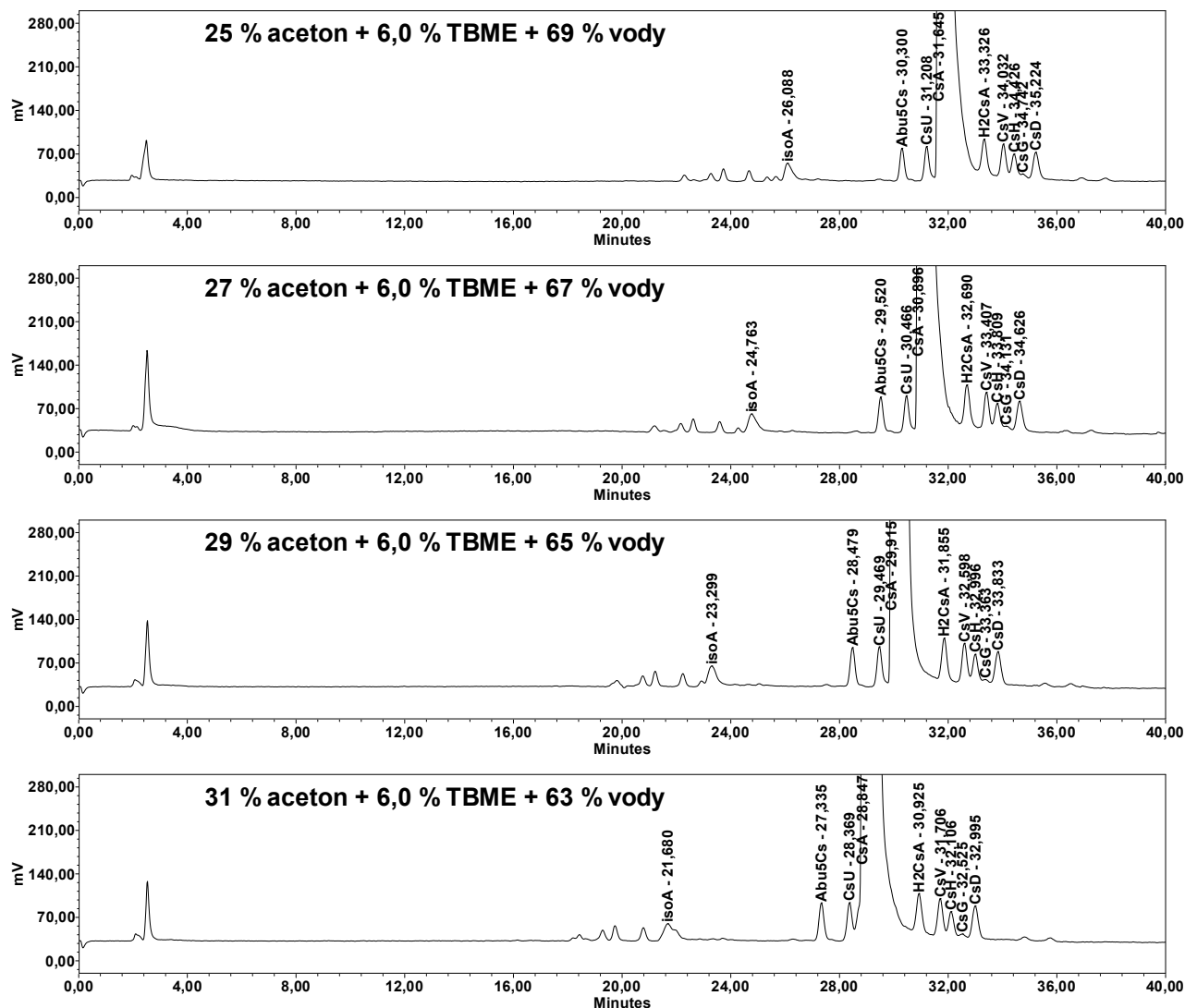
Obrázek 12. Optimalizace obsahu TBME (5,0 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 30 min.



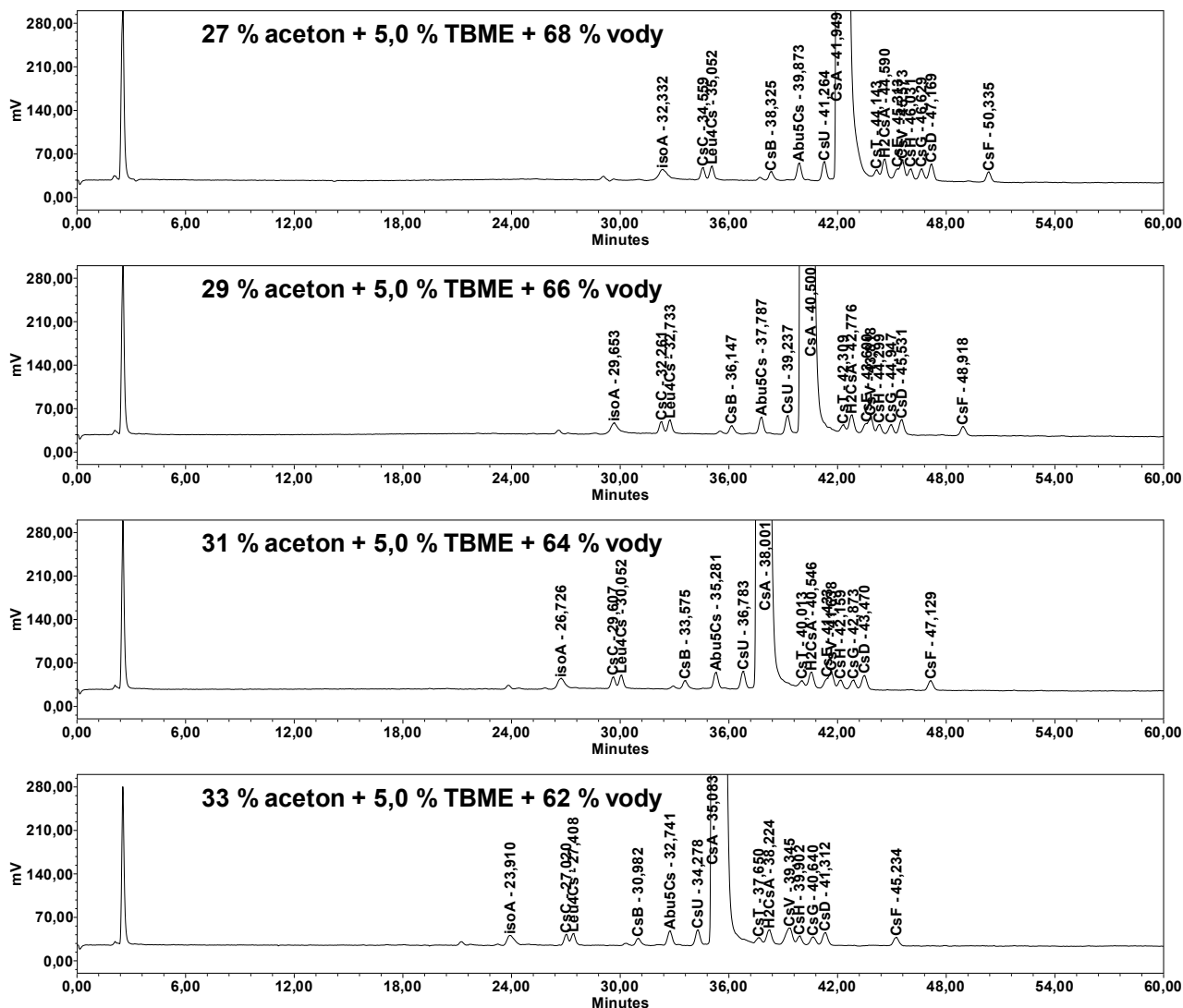
Obrázek 13. Optimalizace obsahu TBME (5,5 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 30 min.



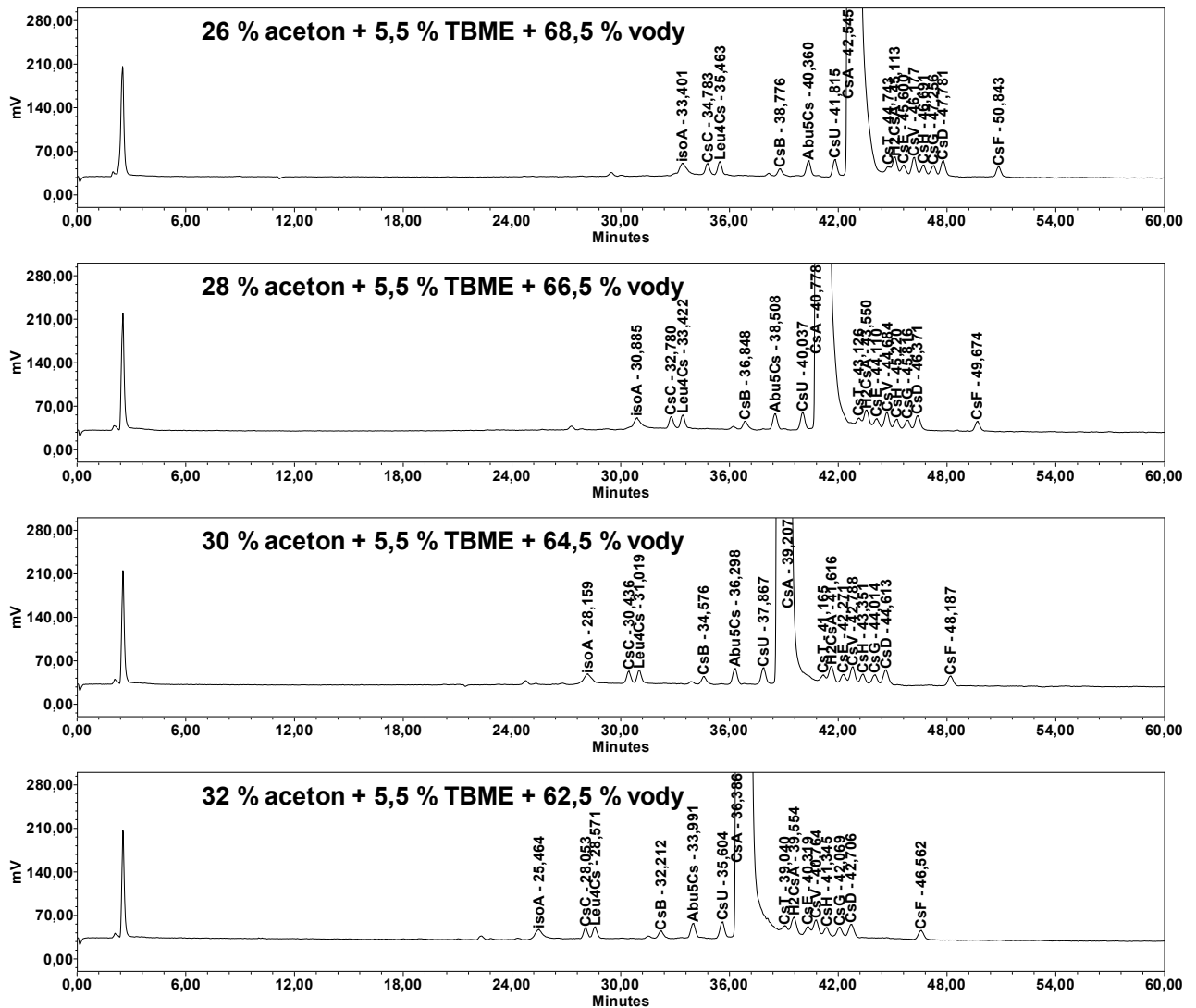
Obrázek 14. Optimalizace obsahu TBME (6,0 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 30 min.



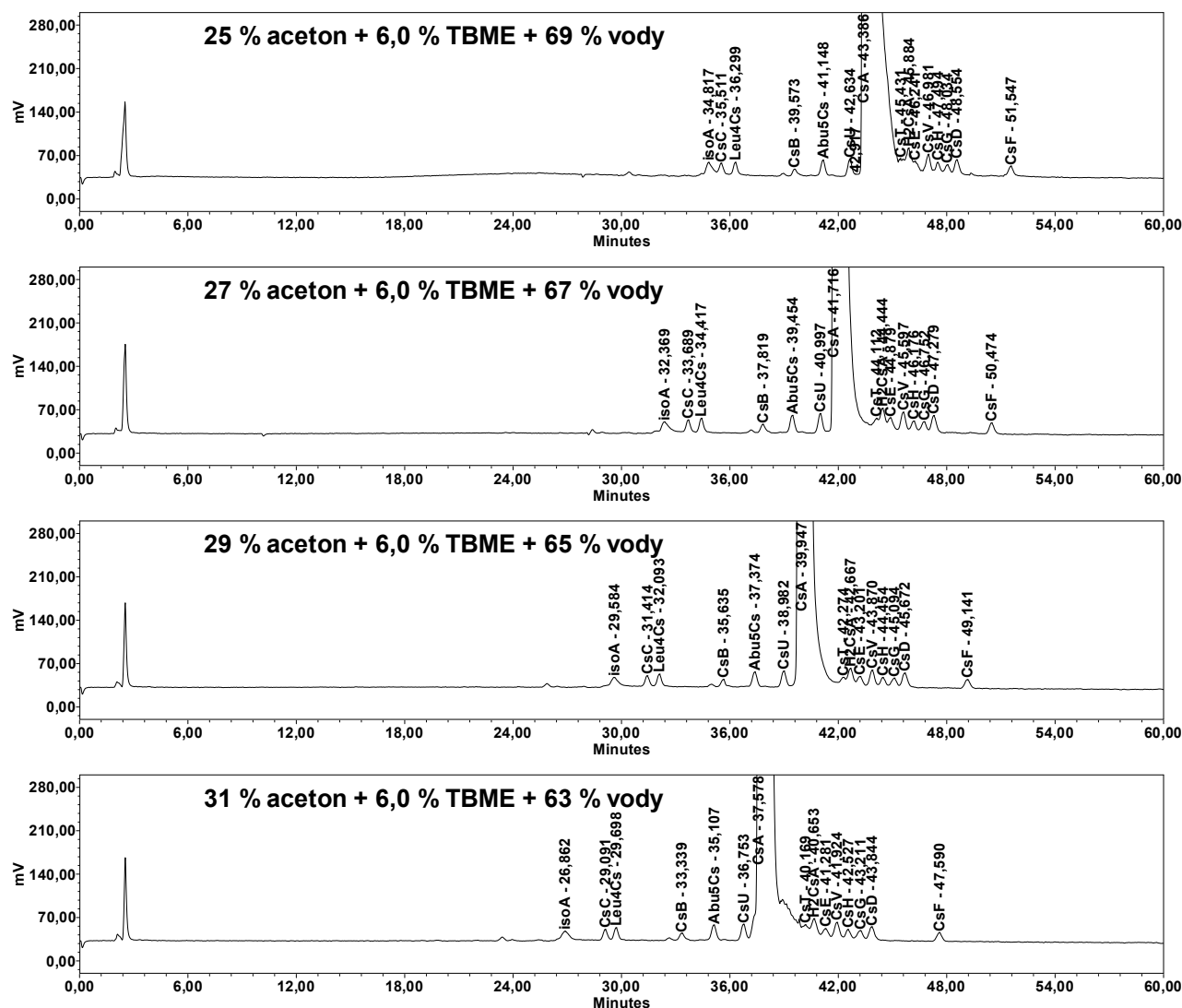
Obrázek 15. Optimalizace obsahu TBME (5,0 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 50 min.



Obrázek 16. Optimalizace obsahu TBME (5,5 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 50 min.



Obrázek 17. Optimalizace obsahu TBME (6,0 %) a lineárního gradientu z počátečních na koncové podmínky za 50 min.



Diskuze:

Z testu optimalizace byly následně vybrány dvě metody. První pracovně pojmenovaná jako QC metoda (optimalizovaná na nečistotní profil substance vyráběné divizí TAPI) a druhá pojmenovaná pracovně jako RD metoda poskytující dostatečnou selektivitu pro podstatně širší okruh substancí (substance různých výrobců se liší kvalitativním i kvantitativním zastoupením jednotlivých cyklosporinů). Obě metody jsou ve zkratce prezentovány níže na obrázcích 18 a 19. Z optimalizace je také patrné, že vliv počátečních podmínek gradientu je významně nižší než se očekávalo. V testovaných rozsazích byl vliv zanedbatelný, takže vybrané metody odpovídaly podmínkám s vyšším obsahem acetonu na počátku gradientu, což mělo pozitivní dopad na rychlost analýzy.

Obrázek 18. Podmínky a specifita „QC“ metody vybrané z optimalizace.

Kolona Zorbax SB C18, 1,8 µm, 150x2,1 mm

Mobilní fáze A: 33 % aceton + 5 % TBME + 62 % vody + 0,01 % TFA

B: 50 % aceton + 5 % TBME + 45 % vody + 0,01 % TFA

Průtok 0,15 ml/min.

Gradient

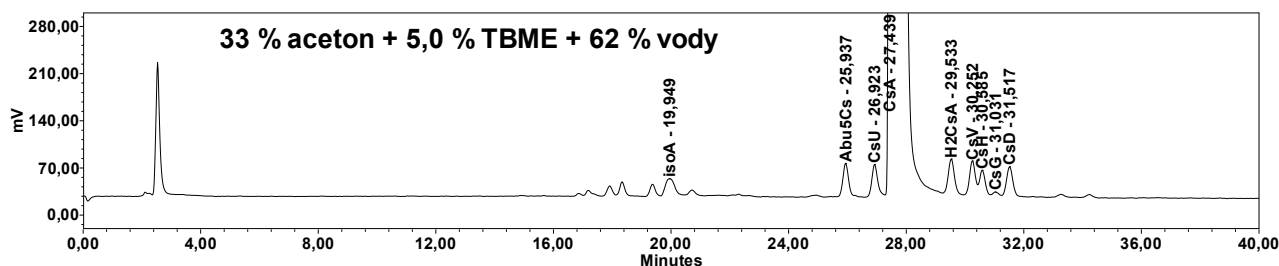
| Čas [min.] | A [%] | B [%] |
|---------------|----------|----------|
| 0 | 100 | 0 |
| 30 | 0 | 100 |
| 35 | 0 | 100 |
| 35,1 | 100 | 0 |
| 45 | 100 | 0 |

Teplota kolony 100 °C

Dávkovaný objem 1 µl

Detekce: NSD

Vzorek: 10 mg/ml v EtOH



Obrázek 19. Podmínky a specifita „RD“ metody vybrané z optimalizace.

Kolona Zorbax SB C18, 1,8 µm, 150x2,1 mm

Mobilní fáze A: 30 % aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % vody + 0,01 % TFA

B: 49 % aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % vody + 0,01 % TFA

Průtok 0,15 ml/min.

Gradient

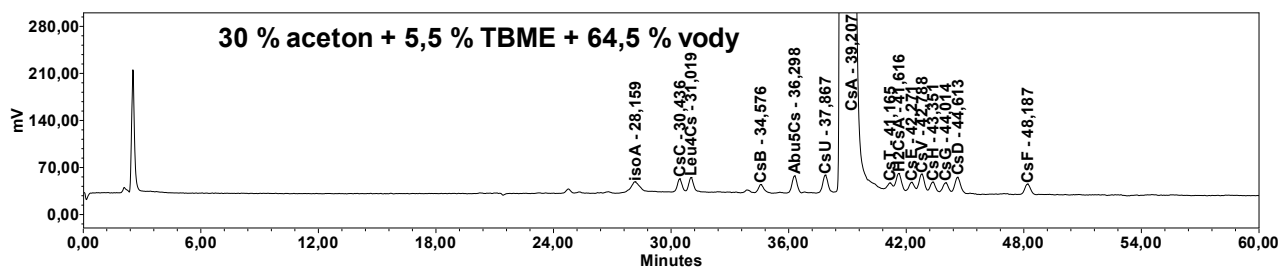
| Čas [min.] | A [%] | B [%] |
|---------------|----------|----------|
| 0 | 100 | 0 |
| 50 | 0 | 100 |
| 50,1 | 100 | 0 |
| 60 | 100 | 0 |

Teplota kolony 100 °C

Dávkovaný objem 1 µl

Detekce: NSD

Vzorek: 10 mg/ml v EtOH



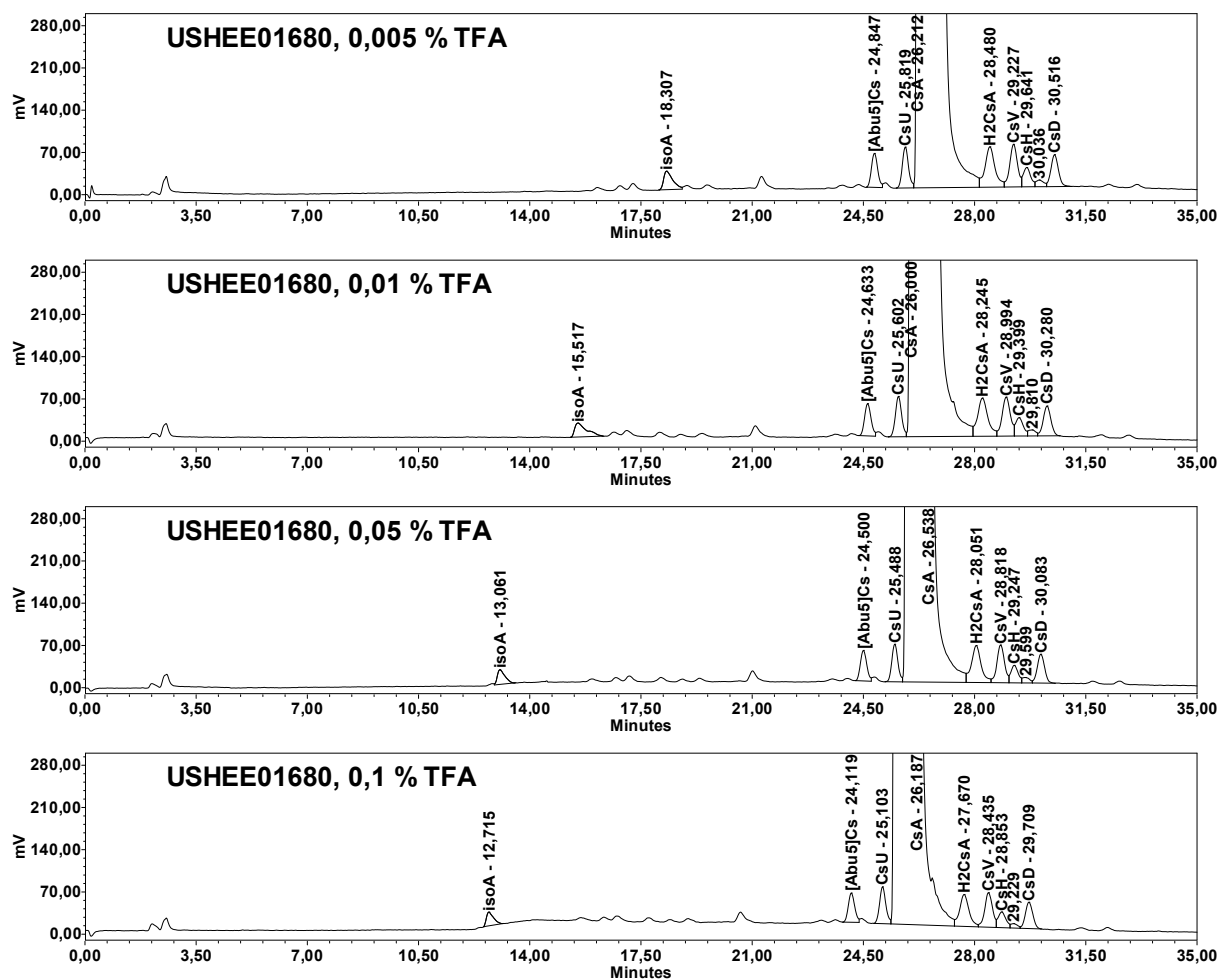
Optimalizace obsahu TFA v mobilní fázi

V této kapitole byla sledována závislost retenčního času isocyklosporinu A na koncentraci TFA v mobilní fázi a taky na míře opotřebení (stáří) kolony. Testovány byly koncentrace 0,005 %, 0,01 %, 0,05 % a 0,1 %. Použité kolony byly různě opotřebený, SN: USHEE01650 (asi tisíc analýz), USHEE01680 (asi sto analýz), USHEE01707 (nová kolona). Cyklosporin a jeho nečistoty nají jako cyklické undekapeptidy neutrální molekuly, takže jejich retence není závislá na pH. Výjimku tvoří isocyklosporiny (viz kapitola 2.4.1), které mají místo jedné peptidické vazby, vazbu esterovou. V molekule se takto objeví sekundární amin, který obsahuje ionizovatelný dusík, následkem čehož je jeho retence závislá na pH mobilní fáze. V případě Equoralu je třeba počítat s degradačním produktem isocyklosporinem A. Ten ve stávající nečistotní metodě s chemiluminiscenční detekcí není kvantifikován, protože vzniká za podmínek metody (mobilní fáze aceton – TBME - TFA, pH 2,8 a 100 °C). Vznik isocyklosporinu A z cyklosporinu A je na chromatogramu patrný, jako zvýšení základní linie mezi píky isocyklosporinu A a majoritním píkem cyklosporinu. Jelikož toto zvýšení základní linie vykazuje mírné změny podle míry opotřebení stacionární fáze, je zřejmé že na mechanismu vzniku cyklosporinu během chromatografické separace se nějakým způsobem podílí i samotný povrch stacionární fáze. Stejný fenomén byl pozorován i v případě nově vyvíjené metody. Na tomto místě je třeba ale uvést, že tento jev nijak nenarušuje probíhající chromatografickou separaci, ani následné bezproblémové vyhodnocení chromatogramu. Retenční čas isocyklosporinu A, jakožto ionizovatelné molekuly, je tedy závislý na koncentraci TFA v mobilní fázi (s rostoucí koncentrací TFA se retence isocyklosporinu A snižuje). Optimalizace obsahu TFA tedy měla za cíl ovlivnit retenci cyklosporinu A tak, aby nedošlo k jeho koeluci s nečistotou substance nebo případným degradačním produktem lékové formy. Během vývoje metody bylo zjištěno, že při stejném obsahu TFA v mobilní fázi, může docházet ke změně retence v závislosti na stáří kolony. Bylo pozorováno, že čím je kolona starší (opotřebená větším počtem analýz) tím je retenční čas isocyklosporinu A větší. Této problematice bylo věnováno několik cílených experimentů.

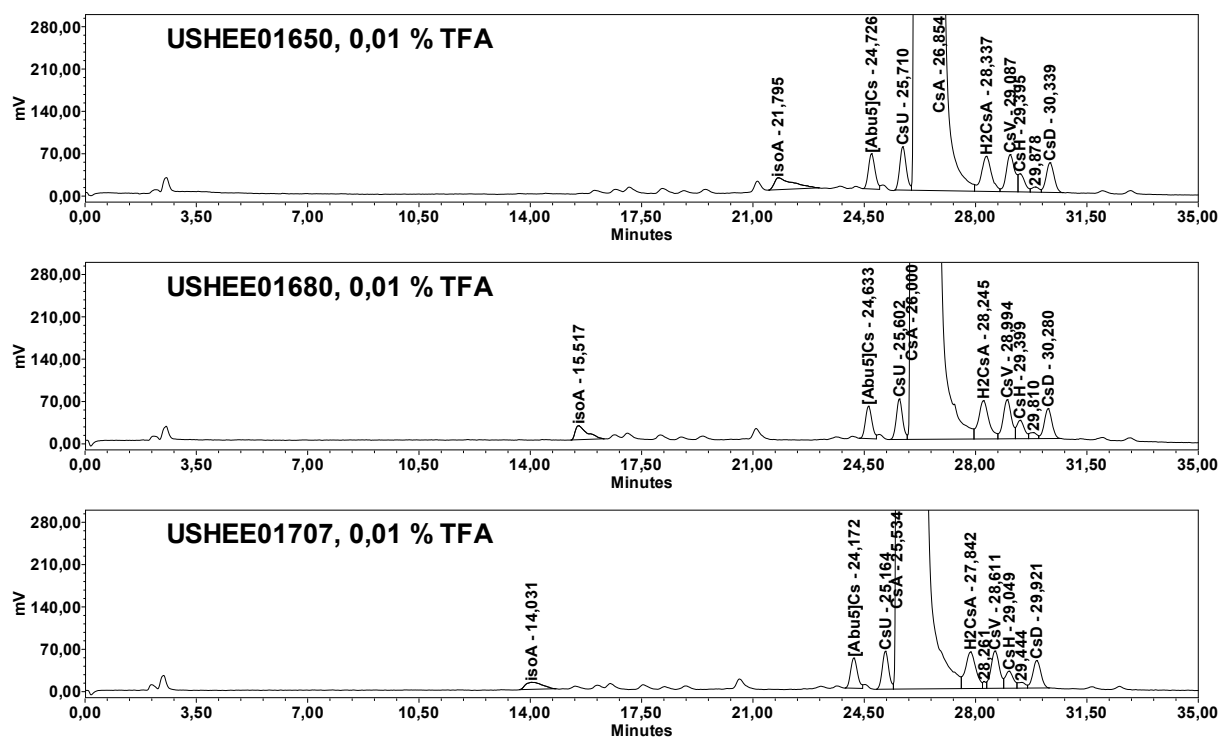
Tabulka 15. Chromatografické podmínky.

| HPLC podmínky | | | | | |
|---------------------------------------|--|---------------------------------|--------------|----------------------------|-------|
| Náplň kolony: | ZORBAX SB-C18 | Velikost částic [μm] : | 1,8 | | |
| Rozměr kolony [mm]: | 150 x 2,1 | Průtok [ml/min] : | 0,15 | | |
| Teplota kolony [°C]: | 100 | Teplota vzorku [°C] : | 20 | | |
| Detekce | NSD | Dávkovaný objem [μl] : | 4 | | |
| Mobilní fáze: | A: 32 Aceton : 5,5 TBME : 62,5 voda : 0,005 – 0,1 TFA B: 49 Aceton : 5,5 TBME : 45,5 voda : 0,005 – 0,1 TFA | | | | |
| Gradient: | | Čas [min.] | A [%] | B [%] | |
| | | 1 | 0,01 | 100,0 | 0,0 |
| | | 2 | 30,00 | 0,0 | 100,0 |
| | | 3 | 35,00 | 100,0 | 0,0 |
| | | 4 | 35,10 | 100,0 | 0,0 |
| Doba ekvilibrace: | 10 minut | | | | |
| Koncentrace vzorku: | 10 mg/ml | | | | |
| Diluent: | Absolutní EtOH | | | | |
| Nastavení dusíkového detektoru | | | | | |
| Průtok O2 [ml]: | 200 | Průtok Make up: [ml]: | 50 | Napětí na HVPS [V]: | -750 |
| Průtok Ar [ml]: | 100 | Teplota pece [°C]: | 1050 | Sensitivity: | High |
| Průtok O3 [ml]: | 25 | Chlazení detektoru [°C]: | 5 | Vakuum [Torr]: | +15 |

Obrázek 20. Závislost retenčního času isocyklosporinu A na koncentraci TFA v mobilní fázi.



Obrázek 21. Závislost retenčního času isocyklosporinu A na opotřebení kolony.



Diskuze:

Už z vývoje metody bylo patrné, že stáří kolony má vliv na retenční čas isocyklosporinu A. starší kolona (s větším počtem anlyz) poskytuje vyšší retenci isocyklosporinu A, než kolona s menším množstvím anlyz. Pro rutinní používání metody bude nutné akceptovat variabilní obsah TFA v mobilní fázi a to v rozsahu jednoho řádu od 0,005 % do 0,05 %.

Tabulka 16. Návrh chromatografických podmínek.

| HPLC podmínky | | | | | |
|--------------------------------|--|---------------------------------|--------------|----------------------------|-------|
| Náplň kolony: | ZORBAX SB-C18 | Velikost částic [μm] : | 1,8 | | |
| Rozměr kolony [mm]: | 150 x 2,1 | Průtok [ml/min] : | 0,15 | | |
| Teplota kolony [°C]: | 100 | Teplota vzorku [°C] : | 20 | | |
| Detekce | NSD | Dávkovaný objem [μl] : | 4 | | |
| Mobilní fáze: | A: 30 Aceton : 5,5 TBME : 64,5 voda : 0,005 – 0,05 TFA B: 49 Aceton : 5,5 TBME : 45,5 voda : 0,005 – 0,05 TFA | | | | |
| Gradient: | | Čas [min.] | A [%] | B [%] | |
| | | 1 | 0,0 | 100,0 | 0,0 |
| | | 2 | 44,0 | 22,0 | 78,0 |
| | | 3 | 47,0 | 0,0 | 100,0 |
| | | 4 | 50,0 | 0,0 | 100,0 |
| | | 5 | 50,1 | 100,0 | 0,0 |
| | | 60,0 | 00,0 | 0,0 | |
| Doba ekvilibrace: | 10 minut | | | | |
| Koncentrace vzorku: | 10 mg/ml | | | | |
| Diluent: | Absolutní EtOH | | | | |
| Nastavení dusíkového detektoru | | | | | |
| Průtok O2 [ml]: | 200 | Průtok Make up: [ml]: | 50 | Napětí na HVPS [V]: | -750 |
| Průtok Ar [ml]: | 100 | Teplota pece [°C]: | 1050 | Sensitivity: | High |
| Průtok O3 [ml]: | 25 | Chlazení detektoru [°C]: | 5 | Vakuum [Torr]: | +15 |

Diskuze:

V druhé fázi vývoje šlo o optimalizace směrnice gradientu, obsahu TBME a koncentrace TFA v mobilní fázi. Jak už bylo zmíněno, původní záměr byl vyvinout metody dvě. Jednu s ostřejší směrnici gradientu, která bude i s ekvilibrací trvat maximálně 40 minut a druhou, trvajícím maximálně hodinu. První z uvedených metod by byla rutinní pro QC použití a poskytovala by separaci specifikovaných nečistot, degradačních produktů (specifikovaných i potenciálních) a nespecifikované nečistoty CsG, která se vždy v substanci (cyklosporin TEVA) vyskytuje. Druhá z metod měla být směřována spíše pro RD účely a měla poskytovat maximální separační potenciál a tím umožnit stanovení nečistot v podstatě v jakékoliv lékové formě včetně lékových forem konkurenčních výrobců. Nakonec tato delší metoda byla zvolena i pro QC účely. Důvodem pro její volbu byl fakt, že tato metoda má vyšší potenciál postihnout i možnou variabilitu substance z hlediska obsahu neznámých doprovodných látek, které mohou být v substanci obsaženy jednotlivě až do 0,10 %. I tak je ale metoda významně kratší, jednodušší a uživatelsky příznivější, než metoda stávající (AM\RD\LC156, V2), kterou by tato metoda měla nahradit. V případě TFA jako modifikátoru retence isocyklosporinu A bylo zjištěno, že obsah TFA v mobilní fázi nemůže být konstantní, ale je třeba ho

přizpůsobit stavu HPLC kolony. Zatím co na nové koloně postačí obsah TFA 0,005%, na kolonách starších je potřeba obsah TFA zvýšit. I když tato metoda s NSD detekcí není určena ke stanovení isocyklosporinu A bude potřeba obsah TFA vždy uzpůsobit stáří kolony a to tak, aby nedocházelo ke koeluci s ostatními stanovovanými píky. V tabulce 16 je uveden zkrácený popis nové metody, která je výsledkem výše uvedeného vývoje metody.

5.2 Podrobný popis metody

5.2.1 Použití

Metoda slouží ke stanovení nečistot a degradačních produktů cyklosporinu v jeho lékových formách. Principem metody je HPLC separace s pyrochemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík (NSD). Podmínky metody jsou optimalizovány pro nečistotní profil substance vyráběné v závodě TEVA Czech Industries s.r.o. Metoda by měla být dostatečně specifická pro nečistotní profily i jiných výrobců. Metoda neumožňuje kvantifikovat specifikovaný degradační produkt isocyklosporin A, protože ten částečně vzniká při samotné analýze vlivem vysoké teploty a velké koncentraci acetonu v mobilní fázi jako hlavní degradační produkt cyklosporinu A.

5.2.2 Referenční standardy

Modelová směs cyklosporinů

Směsný standard cyklosporinů obsahující cyklosporiny isoCsA, [Abu]⁵Cs, CsU, CsA (hlavní složka), H₂CsA, CsV, CsH a CsD. Směsný standard je používán pro přípravu testu rozlišení a pro identifikaci nečistot cyklosporinu.

Obsahový standard CsA

Lékopisný referenční standard nebo Teva sekundární standard kvalifikovaný na standard lékopisný. Obsahový standard se používá pro kvantifikaci obsahu nečistot.

5.2.3 Chemikálie

- Aceton PESTANAL, nebo ekvivalentní
- *tert.*-butyl methyl ether (TBME) pro HPLC nebo ekvivalentní

- Voda (H₂O) kvalita pro gradientovou eluci
- Kyselina trifluoroctová (TFA) 99,0 % nebo lepší
- Ethanol (EtOH) absolutní
- Methanol (MeOH) pro HPLC (pokud se zvolí jako solvent pro promytí kolony)

5.2.4 Laboratorní sklo a vialky

Pro přípravu mobilních fází je vhodné vyčlenit odměrné nádoby tak, aby nedocházelo k jejich kontaminaci acetonitrilem. To by způsobilo zvýšení šumu základní linie a snížení citlivosti stanovení. Ostatní sklo použité pro přípravu diluentu a vzorků není nutné dedikovat. Doporučený typ vialek: Pertlovací vialky s víčky s gumo-teflonovými septy

5.2.5 Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf v minimální konfiguraci gradientová pumpa, autosampler, termostat kolon s pracovní teplotou do 100 °C vybavený přehřevem mobilní fáze (viz kapitola *Příprava kolony a termostatu*).
- Pyrochemiluminescenční detektor selektivní pro dusík, typ ANTEK 8060.
- Analogově digitální převodník Satin (při použití řídicího a vyhodnocovacího software Empower)
- Filtr analogových dat (není nutný, pokud systém sám o sobě poskytuje dostatečnou citlivost stanovení, tj. vyhovující test citlivosti)
- Ultrazvuková lázeň s časovačem.
- Analytické váhy (citlivost 0,01 mg).
- Vodní lázeň (temperovaná na 20 °C).

5.2.6 Chromatografický systém

- Kolona: ZORBAX SB-C18, 1,8 µm, 150 x 2,1 mm
- Mobilní fáze: A: 30 Aceton : 5,5 TBME : 64,5 voda : 0,005 – 0,05¹ TFA
B: 49 Aceton : 5,5 TBME : 45,5 voda : 0,005 – 0,05¹ TFA
- Průtok mobilní fáze: 0,15 ml/min

Tabulka 17. Program gradientu.²

| | Čas [min.] | A [%] | B [%] |
|---|-----------------------|------------------|------------------|
| 1 | 0,0 | 100,0 | 0,0 |
| 2 | 44,0 | 22,0 | 78,0 |
| 3 | 47,0 | 0,0 | 100,0 |
| 4 | 50,0 | 0,0 | 100,0 |
| 5 | 50,1 | 100,0 | 0,0 |
| 6 | 60,0 | 100,0 | 0,0 |

- Teplota termostatování: 100 °C (způsob přípravy termostatu viz kapitola *Příprava kolony a termostatu*)
- Dávkovaný objem: 4 µl
- Diluent: EtOH
- Teplota autosampleru: 20 °C
- Kapalina oplachu jehly: EtOH
- Nastavení doby trvání oplachu: Extended
- Nastavení NSD detektoru:
Teplota pece: 1050 °C
Průtok kyslíku: 200 ± 5 ml/min
Průtok argonu: 100 ± 5 ml/min
Průtok ozonu: 25 ± 1 ml/min
Make up: 50 ± 2 ml/min
Vacuum: 15-20 Torr nad hodnotu uzavřeného ventilu „Flow restrictoru“
Napětí na fotonásobiči -750± 30 V
Teplota chlazení fotonásobiče: 5 °C
- Frekvence sběru dat A/D převodníku 1 – 2 Hz
- Nastavení filtru analogových dat³
Peak with: 40 s
- Typ kapilár ocelové kapiláry s vnitřním průměrem 0,005“

¹Obsah TFA je nutno přizpůsobit stavu opotřebení kolony. Bližší informace viz. *Příprava mobilních fází.*

²V případě použití separačního modulu 2690 (2695) nastavit hodnotu „Pre column volume“ na 650 µl.

³Platí pro model Antec Leyden Link

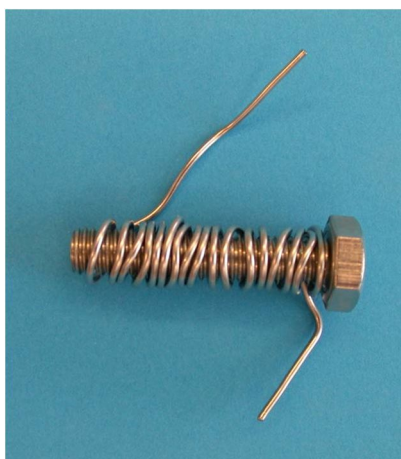
5.2.7 Příprava kolony a termostatu.

Separace cyklosporinů je vysokoteplotní separací. Teplota kolony významně ovlivňuje účinnost separace a selektivitu. Příprava kolony a termostatu má tedy klíčový význam na výslednou separaci cyklosporinů.

Přehřev mobilní fáze

Mobilní fázi je třeba na kolonu přivádět přes přibližně 1 m ocelové kapiláry I.D. 0,005", která je umístěna v termostatu spolu s kolonou. Ocelová kapilára je navinuta na šroubu o dostatečné tloušťce (např. M10/60mm, viz obrázek 22). Šroub s kapilárou je těsně obalen několika vrstvami hliníkové fólie, která kryje šroub včetně jeho hlavy.

Obrázek 22. Přehřev mobilní fáze realizovaný 1 m ocelové kapiláry (vnitřní průměr 0,005") navinutým na šroubu.



Uložení kolony v termostatu

Kolonu je třeba těsně obalit několika vrstvami hliníkové fólie. Kolona s přehřevem musí být přitlačována k topné stěně termostatu. Toho se dosáhne např. jejich překrytím několika vrstvami hliníkové fólie, která je ke koloně s přehřevem po uzavření přitlačována několika kovovými drátěnkami (viz obrázek 23 a 24).

Obrázek 23. Uložení přehřevu mobilní fáze a kolony (obojí obalené hliníkovou fólií) v termostatu.



Obrázek 24. Překrytí kolony s přehřevem hliníkovou fólií a drátěnkami.



5.2.8 Příprava kolony před prvním použitím

Pokud by se nová kolona použila bez předchozí přípravy, s vysokou pravděpodobností by byl signál na dusíkovém detektoru za podmínek metody mimo jeho rozsah. Kolonu je tedy nutné nejdříve důkladně promýt. Kolona se promývá methanolem nebo acetonem při průtoku 0,15 ml/min. nejdříve několik hodin při laboratorní teplotě a následně přibližně 1 den při 100 °C. Je nezbytné, aby promývání kolony probíhalo na HPLC dedikovaném pro chemiluminiscenční detektor pomocí rozpouštědel stejné kvality z jakých se připravují pro tento detektor mobilní fáze. Během fáze promývání kolony je výhodné vést efluent mimo chemiluminiscenční detektor.

5.2.9 Příprava mobilních fází

Pro přípravu 250 ml mobilní fáze A se smísí 75 ml acetonu, 13,8 ml TBME, 161,2 ml H₂O a 0,0125-0,125 ml TFA.

Pro přípravu 250 ml mobilní fáze B se smísí 122,5 ml acetonu, 13,8 ml TBME, 113,7 ml H₂O a 0,0125-0,125 ml TFA.

Přesně odměřované složky mobilní fáze se míchají ve výše uvedeném pořadí. Po smíchání všech složek se láhve s mobilními fázemi umístí na minimálně 10 minut do ultrazvukové lázně. Během této doby je vhodné láhve několikrát promístit i ručně. Lahve s mobilními fázemi musejí být dobře uzavřeny, aby nedocházelo k odpařování TBME a nesnižovala se tak jeho koncentrace v roztoku. Množství připravovaných mobilních fází se přizpůsobí počtu analýz. Je vhodné, aby i po skončení sekvence zbylo v lahvích určité množství mobilních fází (minimálně 20 % objemu láhví), protože TBME v mobilní fázi se odpařuje do prostoru nad hladinou mobilní fáze v lahvi, což se projeví prodlužováním retencí cyklosporinů a mírnou změnou separace nečistot cyklosporinu.

5.2.10 Vliv složení mobilní fáze na separaci

Složení mobilních fází spolu s termostatováním ovlivňují zásadním způsobem kvalitu separace cyklosporinů. Obsah TBME silně ovlivňuje selektivitu cyklosporinů eluujících za cyklosporinem A a už poměrně malé změny v obsahu TBMA mohou mít poměrně velký vliv na separaci. Obsah TFA ovlivňuje separaci isocyklosporinu A. Ten není metodou kvantifikován, nicméně je nutné zajistit, aby jeho pík byl dostatečně oddělen od ostatních kvantifikovaných nečistot. Tohoto kritéria je dosaženo, pokud je relativní retenční čas isocyklosporinu A vzhledem k cyklosporinu A v rozsahu RRT 0,55 – 0,80.

5.2.11 Příprava standardního roztoku

Příprava zásobního standardního roztoku

Do hliníkové váženky se naváží 47,00 – 53,00 mg standardu cyklosporinu A (vysušen při 60°C za vakua nejméně 0,67 kPa po dobu 3 hodin). Váženka se poté vnese do suché 50ml odměrné baňky, baňka se uzavře a navážka se lehkým protřepáním vypudí do baňky. Poté se do baňky přidá diluent (ethanol) asi 0,5 cm pod rysku a navážka se rozpustí působením ultrazvuku po dobu 5 minut. Poté se baňka s roztokem

umístí na vodní lázeň k teplotě (20°C/10 minut). Po teplotě se baňka doplní diluentem (temperovaným při shodné teplotě) po rysku a roztok se důkladně promíchá. Připraví se dva zásobní standardní roztoky (dvě navážky). Expirace zásobních standardních roztoků je nejméně 2 měsíce, pokud jsou uchovávány v lednici při teplotě 2 – 8°C. Pro tento typ skladování se doporučuje utěsnit zátky odměrných baněk parafilmem. Před použitím takto skladovaných zásobních standardních roztoků je nutno umístit odměrné baňky s roztoky na několik minut do ultrazvuku.

Příprava finálního kalibračního roztoku

Pro účely kalibrace se připraví finální kalibrační roztoky ředěním zásobních standardních roztoků. Do 10ml odměrné baňky se odměří 700 µl zásobního standardního roztoku, přidá se diluent přibližně 2 – 3 mm pod značku a baňka se umístí na minimálně 10 minut do vodní lázně s teplotou 20 °C. Po této době je baňka doplněna po značku diluentem, temperovaným na tutéž teplotu a důkladně zamíchána. Připraví se dva kalibrační roztoky (C1 a C2) ředěním dvou zásobních standardních roztoků. Roztoky se naplní do vialek a umístí se do autosampleru přístroje. Vialky se plní roztoky vzorků mírně nad polovinu.

5.2.12 Příprava modelové směsi cyklosporinů (test rozlišení)

Modelová směs reprezentuje substanci cyklosporin, která obsahuje přibližně po 1 % všech nečistot a degradačních produktů podle rostoucího retenčního času isocyklosporin A (isoA), cyklosporin Abu⁵ ([Abu⁵]Cs), cyklosporin U (CsU), cyklosporin A (CsA), dihydrocyklosporin A (H₂CsA), cyklosporin V (CsV), cyklosporin H (CsH) a cyklosporin D (CsD). Pro účely metody se z této modelové směsi připravuje směs s obsahem nečistot a degradačních produktů na úrovni přibližně 0,2 – 0,4 % následujícím způsobem: Do 4ml vialky se odváží 34 – 38 mg standardu cyklosporinu a 4 – 6 mg modelové směsi. K navážce se přidají 4 ml ethanolu a směs se rozpustí v ultrazvukové lázni. Vialky se plní roztoky vzorků mírně nad polovinu.

5.2.13 Příprava vzorků

Cyklosporin orální roztok

Do 10ml odměrné baňky se pomoci injekční stříkačky s jehlou (1,2 x 40 mm) diferenčně odváží 900-1100 mg přípravku. Vzorek se doplní diluentem (EtOH) několik milimetrů pod značku a nechá se rozpouštět v ultrazvukové lázni po dobu nejméně 10 minut. Po této době se baňka ručně promíchá, aby došlo k rozptýlení zbytku navážky. Po nejméně desetiminutové temperaci (vodní lázeň 20 °C) se baňka doplní po značku diluentem vytemperovaným na 20 °C a důkladně se promíchá. Připraví se dva roztoky z každé šarže. Vialky se plní roztoky vzorků mírně nad polovinu.

Cyklosporin tobolky s deklarovaným obsahem 25 mg cyklosporinu

Z blistru se vyjme 20 tobolek a po jejich opatrném propíchnutí injekční jehlou (1,2 x 40 mm) se obsah tobolek vymačká do vhodné nádoby. Další postup přípravy se shoduje s přípravou vzorku orálního roztoku.

Cyklosporin tobolky s deklarovaným obsahem 50 mg cyklosporinu

Z blistru se vyjme 10 tobolek a po jejich opatrném propíchnutí injekční jehlou (1,2 x 40 mm) se obsah tobolek vymačká do vhodné nádoby. Další postup přípravy se shoduje s přípravou vzorku orálního roztoku.

Cyklosporin tobolky s deklarovaným obsahem 100 mg cyklosporinu

Z blistru se vyjme 5 tobolek a po jejich opatrném propíchnutí injekční jehlou (1,2 x 40 mm) se obsah tobolek vymačká do vhodné nádoby. Další postup přípravy se shoduje s přípravou vzorku orálního roztoku.

5.2.14 Postup analýz

- 1x kondicionace kolony, slepý vzorek, nebo ekvilibrace 10 minut po předchozím promývání 100 % mobilní fáze B
- 1x modelová směs
- 1x slepý vzorek (diluent)
- 3x první kalibrační roztok (použit pro test opakovatelnosti, třetí nadávkování i pro kalibraci)
- 1x každý roztok vzorku (maximálně 2 analýzy)

- 1x druhý kalibrační roztok
- 1x každý roztok vzorku (maximálně 2 analýzy)
- 1x první kalibrační roztok
- atd.
- 1x modelová směs (po každém čtvrtém vzorku, tedy po 8 analýzách vzorku, je vhodné vložit jednu analýzu modelové směsi)

Diskuze:

V kapitole podrobný popis metody, jsou shrnuty veškeré informace potřebné pro její reprodukování. Jedná se zde o kompletní nastavení přístrojového vybavení a přípravu vzorků, pro zajištění přesnosti i správnosti metody.

5.3 Vyhodnocení

5.3.1 Testy způsobilosti

Test rozlišení (vyhodnocení chromatogramu modelové směsi)

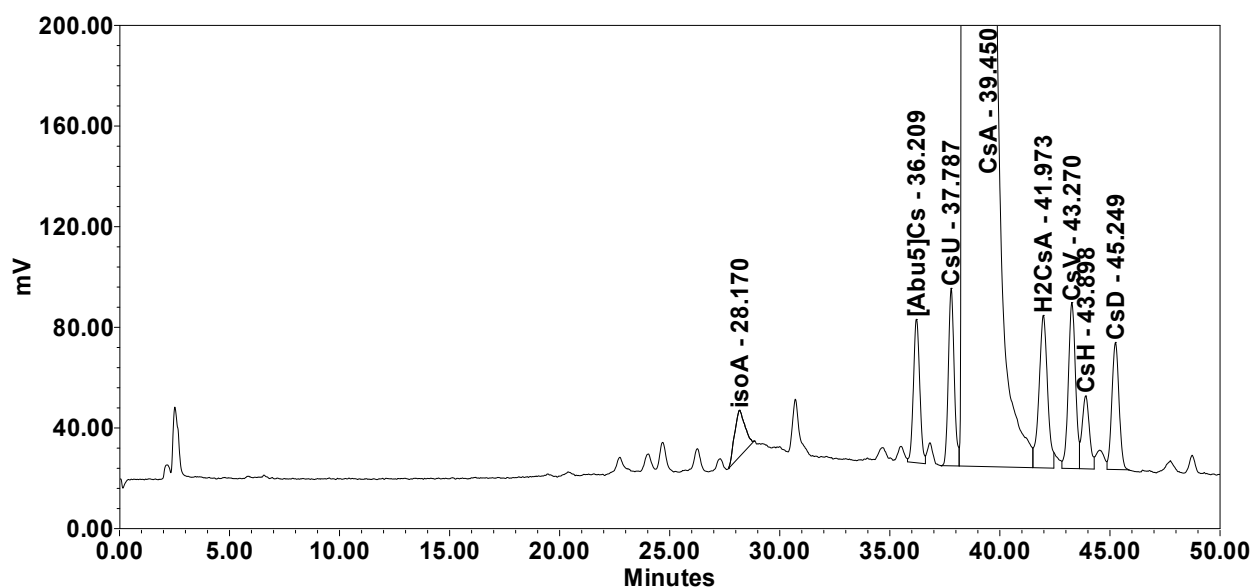
Na chromatogramu modelové směsi se integrují dominantní pík cyklosporinu A a ostatních cyklosporinů v elučním pořadí viz tabulka 18.

Tabulka 18. Eluční pořadí cyklosporinů.

| RRT | Identifikace látky |
|--------------|--------------------|
| 0,55 – 0,802 | isoCsA |
| 0,91 | Cs[Abu]5 |
| 0,96 | CsU |
| 1,00 | CsA |
| 1,07 | H ₂ CsA |
| 1,10 | CsV |
| 1,12 | CsH |
| 1,16 | CsD |

Zvýšení obsahu TFA vede ke snížení RT píku isoCsA a naopak. Obsah TFA by měl být v obou mobilních fázích shodný. Separace ostatních cyklosporinů není na obsahu TFA závislá. Na chromatogramu testu rozlišení se integrují pouze specifikované nečistoty. Způsob integrace je patrný z obrázku 25.

Obrázek 25. Typický chromatogram testu rozlišení a způsob jeho integrace.



Kritéria přijatelnosti pro test rozlišení:

Retenční čas cyklosporinu A musí být v intervalu 32 – 43 minut. RRT isocyklosporinu A by mělo být v rozsahu 0,55 – 0,80. Jeho pík bývá často deformován a má zpravidla trojúhelníkový tvar.

Rozlišení je kvantifikováno pomocí faktoru p/v (Peak-to-Valley Ratio, lékopisný parametr pro alternativní výpočet rozlišení). Parametr se vypočítá podle vztahu

$$p/v = H_p/H_v$$

kde

H_p je výška píku

H_v je výška údolí

Test rozlišení musí vyhovět následujícím kritériím

$$p/v_{(CsU/CsA)} \geq 2,0$$

$$p/v_{(CsV/CsH)} < 1,5 - 10,0 >$$

Pro výpočet faktoru $p/v_{(CsV/CsH)}$ je použit pík s menší výškou.

Blank

Na chromatogramu nesmí být patrný žádný pík s výškou převyšující dvojnásobek šumu, který by koeluoval s píkem známé nečistoty nebo známého degradačního produktu.

Test opakovatelnosti

Vyhodnotí se RSD souboru retenčních časů (RSD_{RT}) a ploch píků (RSD_{AREA}) CsA u třech analýz testu opakovatelnosti. Musí platit, že

$$RSD_{RT} \leq 3,0 \%$$

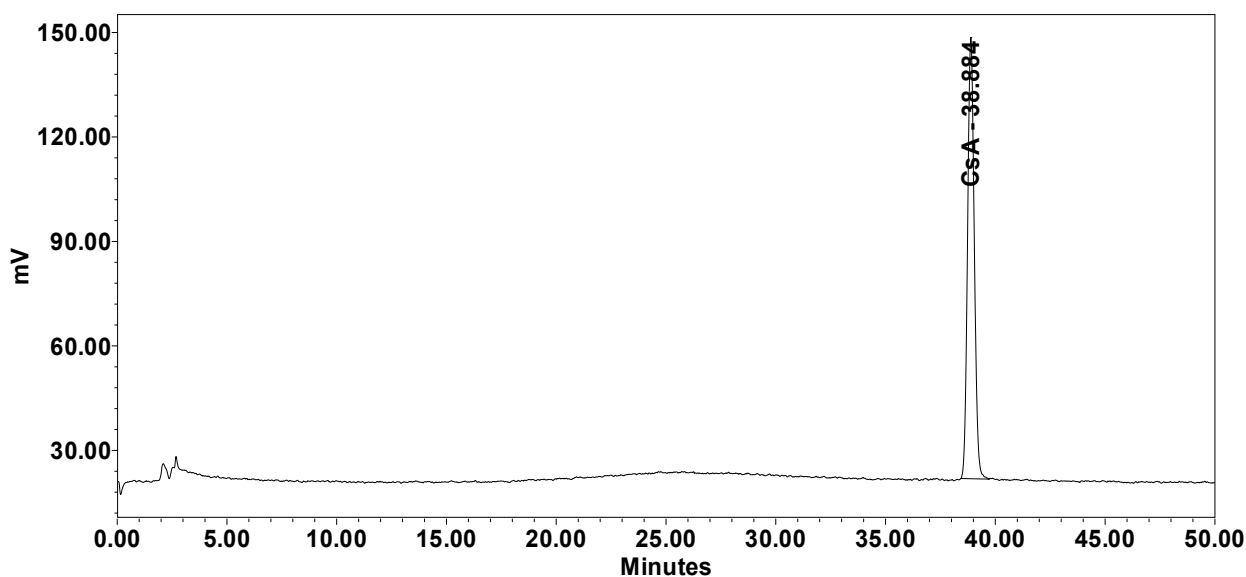
$$RSD_{AREA} \leq 5,0 \%$$

Všechny analýzy testu opakovatelnosti musí navíc vyhovět následujícím kritériím:

$$\text{účinnost} \geq 40000 \text{ TP}$$

$$\text{USP tailing} \leq 1,5$$

Obrázek 26. Typický chromatogram testu opakovatelnosti (kalibrační roztok).



Test citlivosti

Vyhodnotí se odstup signálu od šumu u všech tří analýz testu opakovatelnosti. Výpočet se provede podle lékopisné metodiky pomocí vztahu:

$$S/N = 2 H/h$$

Kde

H je výška píku

h je šum základní linie v jeho okolí vypočtený jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou šumu v oblasti ≥ 5 tinásobku šířky píku v polovině jeho výšky

Kritérium přijatelnosti pro test citlivosti: $S/N \geq 140$

5.3.2 Vyhodnocení vzorků

Integrují se všechny píky s $S/N \geq 3$, které nebyly nalezeny na chromatogramu analýzy diluentu. Jednotlivé píky se identifikují srovnáním s analýzou modelové směsi. Typický chromatogram analýzy vzorku je uveden na obrázku 27. Na obrázku 28 je detailně prezentován způsob integrace nečistoty H_2CsA .

Hmotnostní procenta nečistoty X (známá nebo neznámá nečistota, vyjádřená symbolem CsX) vztážená na obsah CsA ($\%/CsA$) se vypočtou podle vztahu

$$\overline{W}_{CsX} (\%/CsA) = \frac{100 \times w_{CsX}}{w_{CsA}}$$

kde

w_{CsX} obsah nečistoty v testované lékové formě [%; w/w]

w_{CsA} obsah cyklosporinu v testované lékové formě [%; w/w] stanoven jinou metodou.

Obsah nečistoty v testované lékové formě se vypočítá podle vztahu

$$w_{CsX} = \frac{r_{CsX} \times V \times 100}{RF_{CsA} \times m}$$

kde

r_{CsX} plocha píku CsX v analýze vzorku

V objem odměrné baňky použité pro přípravu vzorku [ml]

m navážka vzorku [mg]

RF_{CsA} odezvoový faktor cyklosporinu A vypočtený podle vztahu

$$RF_{CsA} = \frac{100 \times D \times V}{2 \times P} \left(\frac{r_{S1}}{m_{S1}} + \frac{r_{S2}}{m_{S2}} \right)$$

kde

P potence použitého standardu cyklosporinu A [%]

r_{S1} r_{S2} plochy píků cyklosporinu v analýzách roztoků standardu při kalibračních analýzách

m_{S1} a m_{S2} navážky prvního a druhého kalibračního roztoku [mg]

V objem odměrné baňky použité pro přípravu zásobního kalibračního roztoku (50 ml)

D ředící faktor přípravy finálního kalibračního roztoku ($D = 100/7$)

Kalibrace se akceptuje, je-li hodnota kalibrační odchylky (d_{CAL}) menší nebo rovna 6 %:

$$d_{CAL} = 100 \times \left| 1 - \frac{100 \times C_{CAL;1}}{P \times C_1} \right| \leq 6$$

kde

$C_{CAL;1}$ odpovídá koncentraci kalibračního roztoku C_1 , vypočtené na základě aktuální kalibrace [mg/ml]

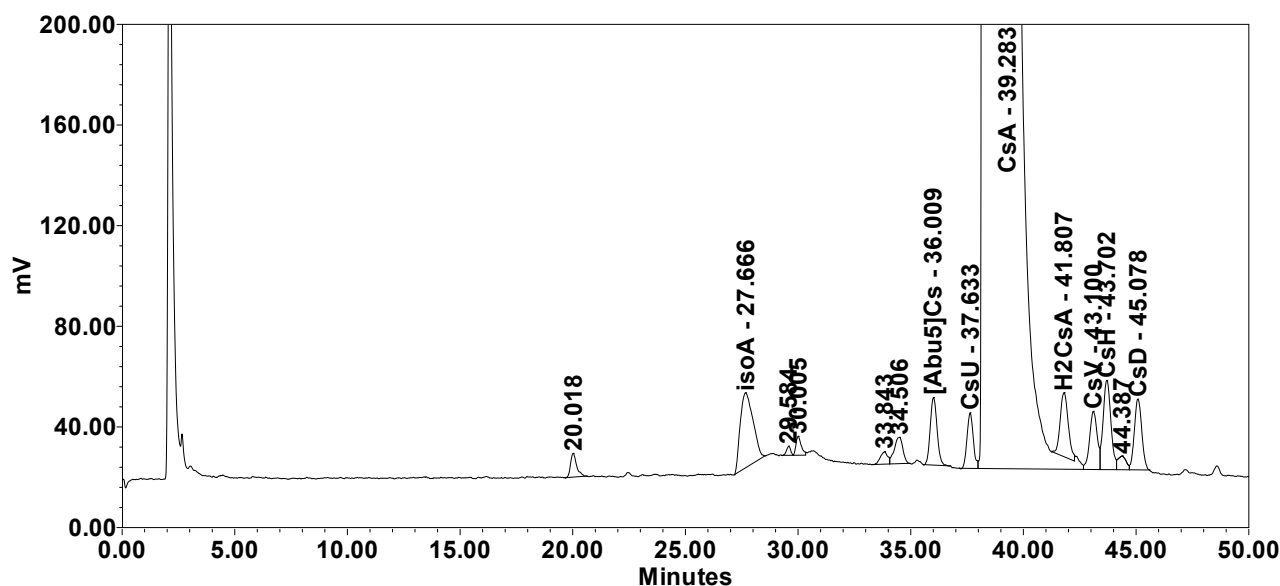
C_1 koncentrace kalibračního roztoku C_1 vypočteného podle vztahu

$$C_1 = \frac{m}{V \times D}$$

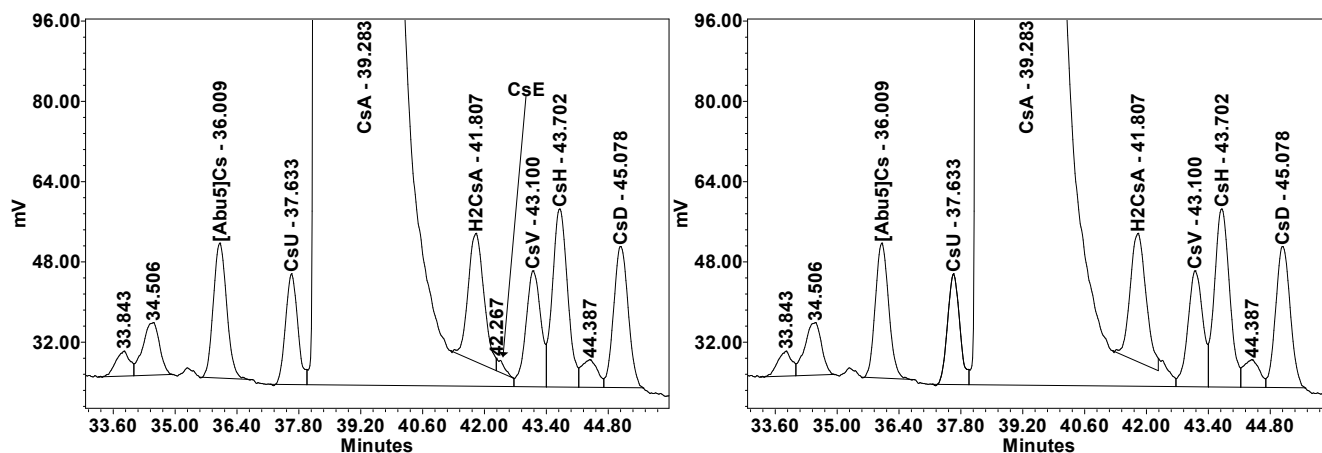
Parametr d_{CAL} odpovídá parametru % *Deviation* v řídicím a vyhodnocovacím softwaru Empower. Ostatní symboly jsou vysvětleny výše (viz vztah pro výpočet odezvového faktoru).

Výsledek stanovení obsahu nečistot je průměrem ze dvou stanovení. Dílčí výsledky (obsah nečistoty vztážen na obsah aktivní látky) se mohou lišit maximálně o 0,05 %. Reportují se všechny známé a neznámé nečistoty a degradační produkty s průměrným obsahem vyšším, než 0,05 %. Do součtu nečistot se uvedou všechny známé a neznámé nečistoty a degradační produkty s průměrným obsahem 0,05 % a vyšším.

Obrázek 27. Typický chromatogram vzorku a způsob jeho integrace.



Obrázek 28. Detail integrace nečistoty H₂CsA.



5.4 Doporučení pro rutinní použití metody

Testy způsobilosti, musí splňovat všechna kritéria. Pokud jsou testy způsobilosti vyhovující, je provedení analýzy v pořádku z hlediska rutinního používání metody a pro usnadnění řešení problémů při jejím používání se doporučuje

- Sběr dat tlakového kanálu.
- Testování kvality rozpouštědel použitých pro přípravu mobilních fází.
- Kontrola kvality spreje před každou sekvencí.
- Kontrola chromatogramu modelové směsi (první analýza sekvence) umožňující včasný zásah a nápravu.
- Používání předepsaného typu vialek a víček (spolu s předepsaným solventem pro oplach jehly a dobou oplachu je zaručen carry-over pod limitem detekce.
- Promytí Sealpacku manuálním pohybem jehlou za průtoku mobilní fáze (100 % EtOH nebo aceton) před každou sekvencí.
- Vyhodnotit retenci isocyklosporinu A v aktuálně vyhodnocované sekvenci a navrhnout (za předpokladu použití stejné kolony) obsah TFA pro příští sekvenci.

5.5 Ověření klíčových parametrů metody

Za účelem potvrzení validovatelnosti metody bylo provedeno ověření klíčových parametrů metody.

5.5.1 Specifita

Specifita metody byla ověřena analýzami jednotlivých nečistot cyklosporinu, analýzou modelové směsi a analýzou lékových forem včetně jejich placeb. Důraz byl kladen i na specifitu vůči nespecifikovanému degradačnímu produktu (v literatuře nazýván 005-95), který bývá nacházen v tobolkách Equoralu po 3 letech skladování na úrovni nad 0,05 % (obsah ale nikdy nepřevyšší 0,1 %). Tato nečistota je hlavním degradačním produktem lékových forem s placebem Neoralu.

Příprava vzorků:

Nečistoty cyklosporinu

Příprava vzorků pro ověření specifity proti nečistotám a degradačním produktům substance spočívala v desetinasobném ředění zásobních roztoků jednotlivých nečistot o koncentraci 1 mg/ml (diluent etanol). Ze zásobního roztoku bylo odebráno 200 µl a k roztoku bylo přidáno 1,8 ml etanolu. Po zamíchání byl roztok převeden do vialky a analyzován. Koncentrace roztoku odpovídá 1 % nečistoty vzhledem k cyklosporinu.

Vzorek Equoral tobolky, Equoral orální roztok a jejich placebo

Příprava vzorků odpovídala přípravě uvedené v metodě. V případě placeb bylo do 10ml odměrné baňky odváženo přibližně o 10 % vzorku méně, tedy přibližně 900 mg.

Modelové směsi

Modelová směs byla připravena podle metody. Modelová směs 13 nečistot cyklosporinu byla připravena odvážením 2 mg modelové směsi a rozpuštěním navážky v 200 µl EtOH.

Vzorek s přídavkem nespecifikovaného degradačního produktu (005-95)

Vzorek byl připraven z proexpirovaného vzorku Neoralu (obsahuje signifikantní podíl degradačního produktu 005-95) a vzorku Equoralu tobolek. Z obou vzorků byly připraveny vzorky k analýze podle metody. Z takto připravených vzorků bylo potom smícháno 150 µl vzorku Neoralu a 1350 µl vzorku Equoralu.

Provedení a vyhodnocení

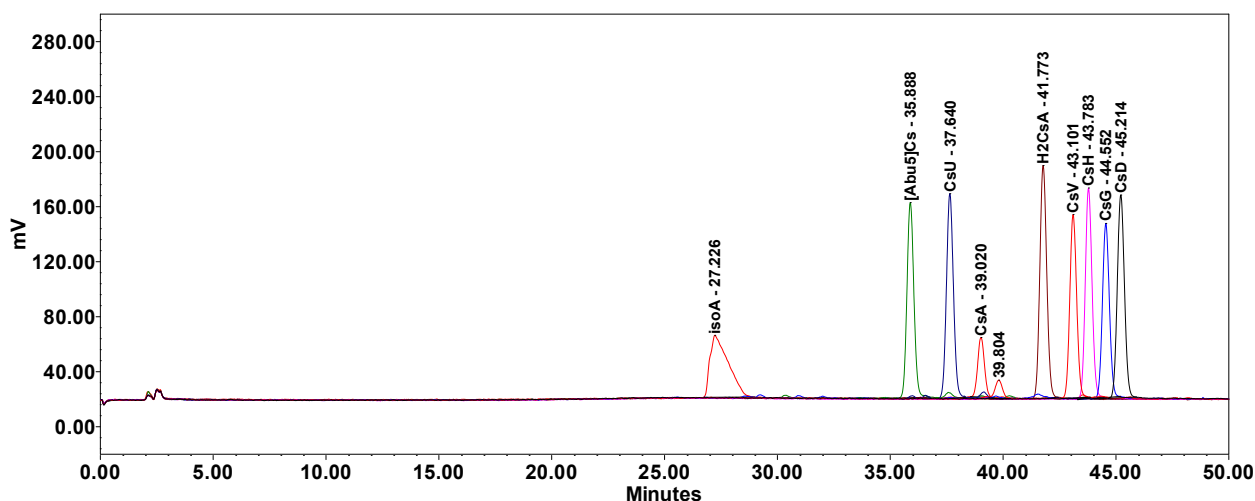
Tabulka 19. Podmínky analýzy.

| | |
|----------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01680 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,01 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,01 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

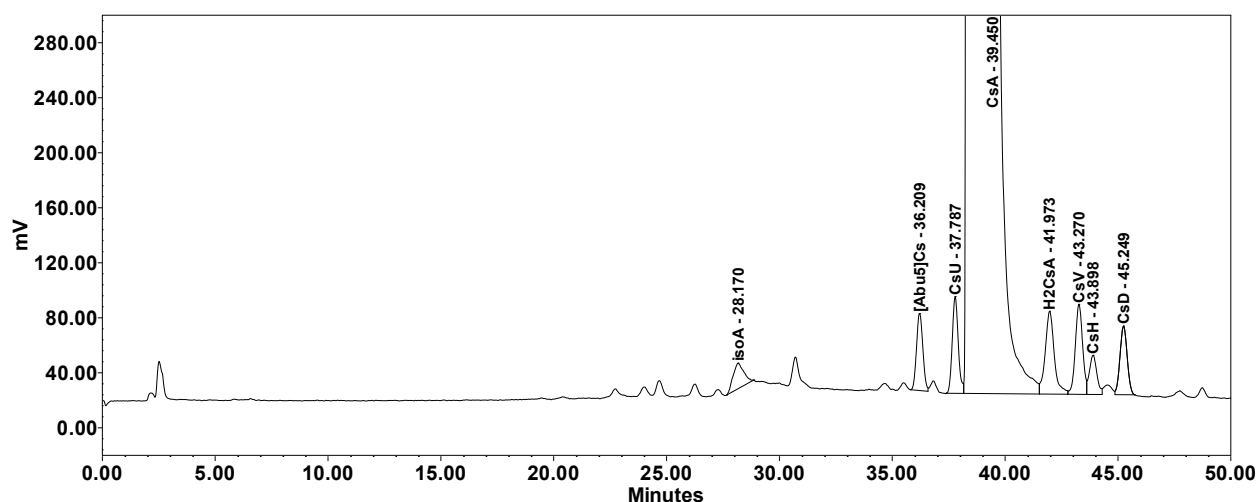
Specifita je prezentována formou chromatogramů na obrázcích 29 – 36.

Obrázek 29. Překryv chromatogramů specifikovaných nečistot [Abu⁵]Cs, CsU, H₂CsA, CsV, CsD, nespecifikované nečistoty CsG a cyklosporinu A.

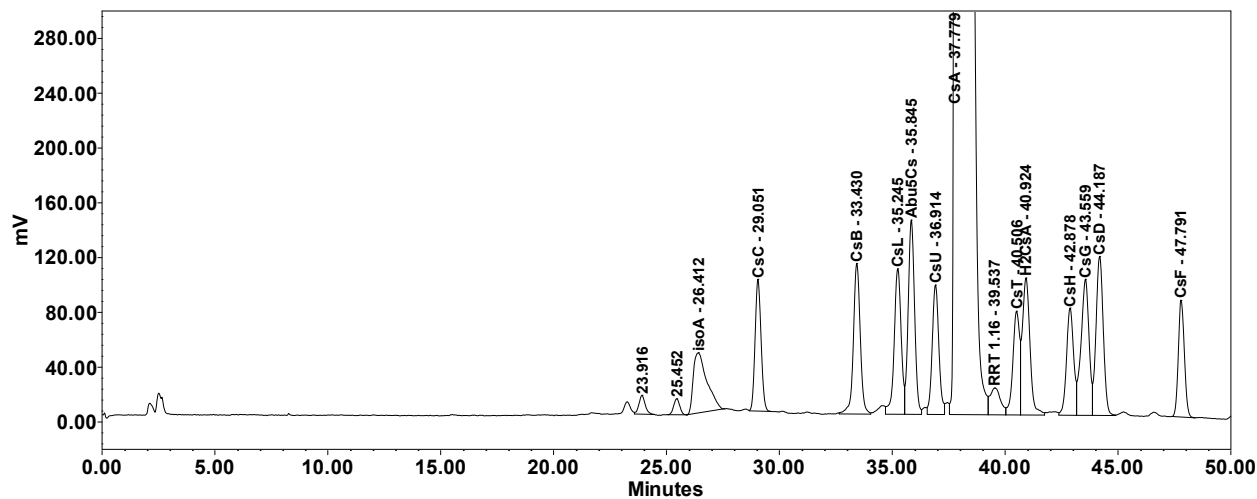
Nespecifikovaná nečistota CsG je nejpravděpodobnější nespecifikovanou nečistotou substance, kterou je možné v lékové formě očekávat nad RL (RL=0,05 %).



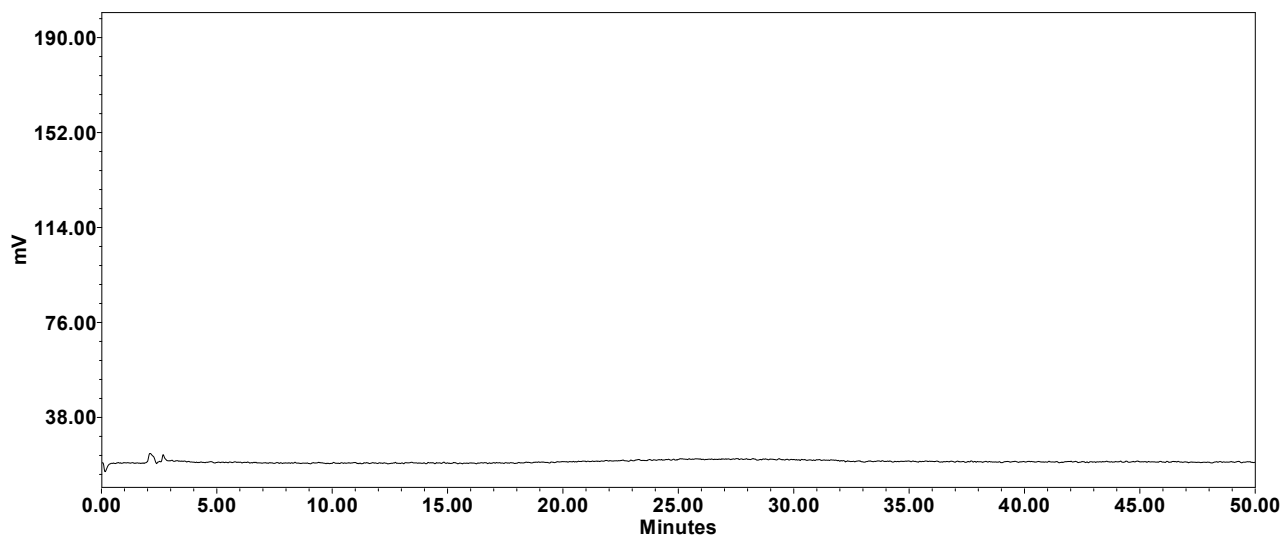
Obrázek 30. Analýza modelové směsi specifikovaných nečistot.



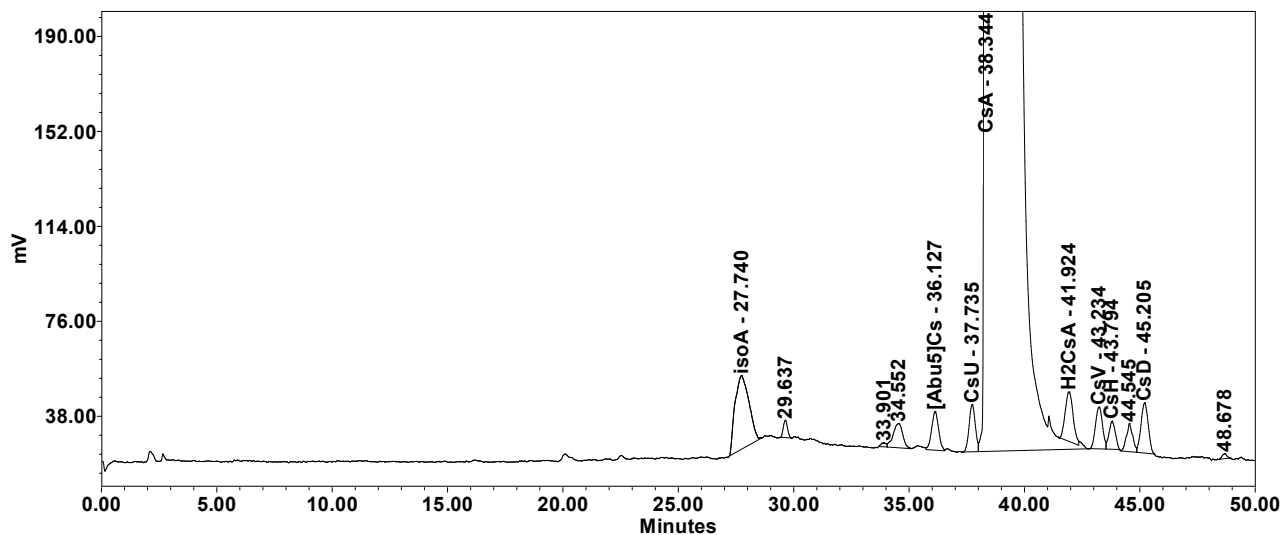
Obrázek 31. Analýza modelové směsi 13 nečistot surového cyklosporinu (prezentuje schopnost metody postihnout a separovat i nspecifikované nečistoty substance). Některé nspecifikované nečistoty se mohou vyskytovat i ve finálním cyklosporinu a tím i v lékové formě. Obsah nspecifikované nečistoty CsG může být i mezi 0,05 % a 0,10 %). Modelová směs neobsahuje specifikovanou nečistotu CsV (je součástí standardní modelové směsi) a CsE (CsE eluuje za H₂CsA).



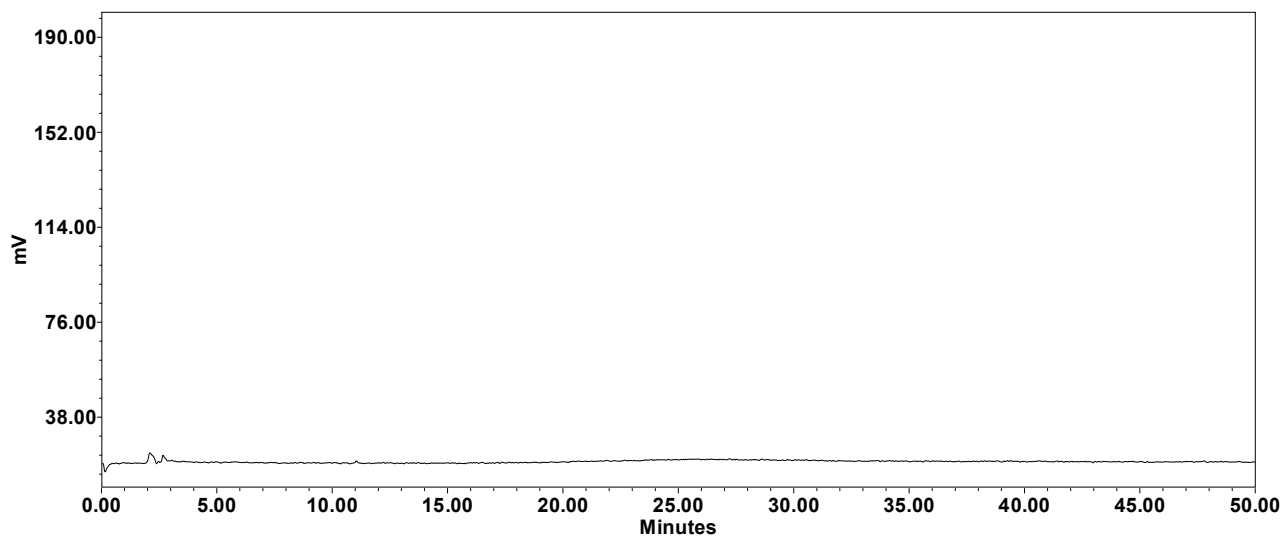
Obrázek 32. Specifita proti placebo. Chromatogram placebo orálního roztoku.



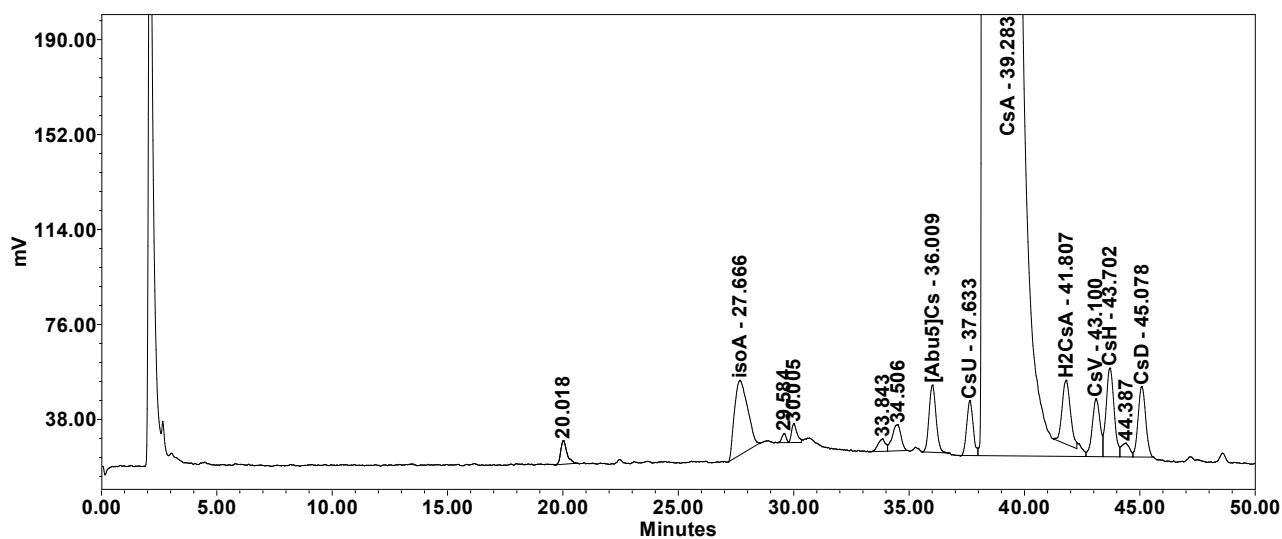
Obrázek 33. Equoral orální roztok.



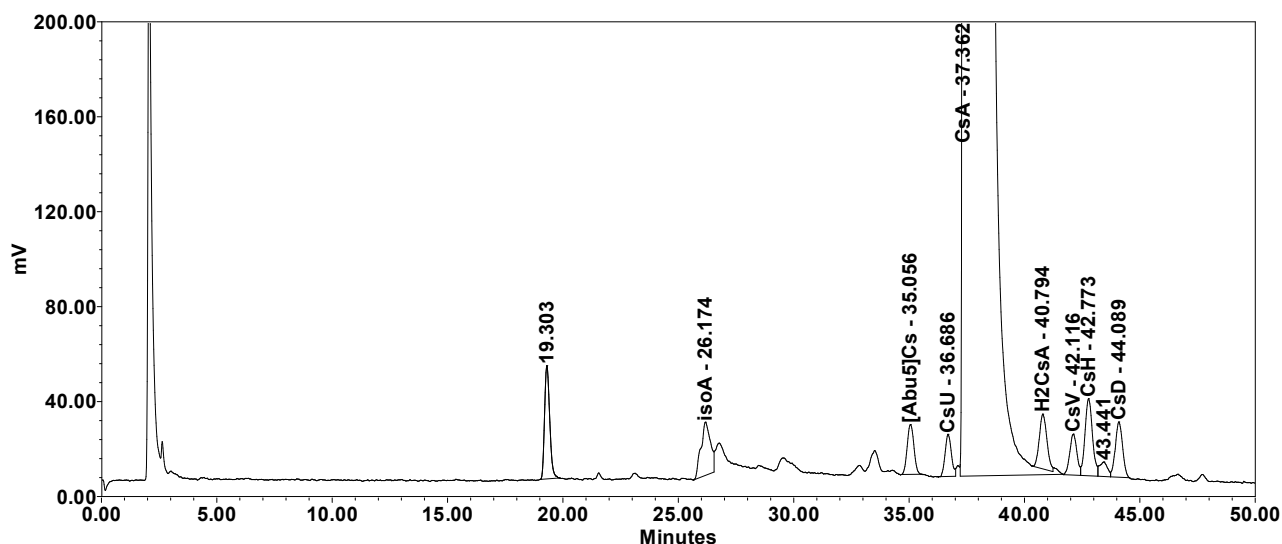
Obrázek 34. Chromatogram placebo tobolk.



Obrázek 35. Chromatogram produktu Equoral tobolky.



Obrázek 36. Specifita proti nespecifikovanému degradačnímu produktu 005-95 (RT 19,3 minuty).



Diskuze:

Z hlediska specifity metoda vyhovuje všem požadavkům. Poskytuje separaci jak specifikovaných nečistot a degradačních produktů, tak nečistot nespecifikovaných, které mají původ v surovém cyklosporinu. Vzhledem k povaze placebo (neobsahuje dusík) je specifita metody proti placebo vyhovující.

5.5.2 Linearita

Linearita byla testována pomocí standardních roztoků cyklosporinu v rozsahu 0,025 % - 1,2 % (kalibrace je prováděna na úrovni 0,7 % specifikované obsahy nečistot leží v rozsahu 0,1 - 0,4 %) CsA. Test byl proveden ve stejné sekvenci jako specifita.

Příprava roztoků pro linearitu

Roztoky byly připraveny ředěním zásobních standardních roztoků na koncentrační úrovni 1 mg/ml. Konkrétní příprava roztoků je patrná z tabulek 20 a 21.

Tabulka 20. Příprava zásobních standardních roztoků.

| | m | V | Potence | c | c_{cor.} |
|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|-------------------------|
| | [mg] | [ml] | [%] | [mg/ml] | [mg/ml] |
| CsA_stock_1 | 50,76 | 50 | 99,2 | 1,0152 | 1,0071 |
| CsA_stock_2 | 50,02 | | | 1,0004 | 0,9924 |

Tabulka 21. Příprava roztoků pro linearitu.

| | úroveň | CsA stock | V | V_{baňky} |
|-------------|---------------|------------------|----------------------------|--------------------------|
| | [%] | | [μl] | [ml] |
| CsA-1-0,025 | 0,025 | 1 | 25 | 10 |
| CsA-2-0,025 | | 2 | 25 | 10 |
| CsA-1-0,05 | 0,05 | 1 | 50 | 10 |
| CsA-2-0,05 | | 2 | 50 | 10 |
| CsA-1-0,10 | 0,1 | 1 | 100 | 10 |
| CsA-2-0,10 | | 2 | 100 | 10 |
| CsA-1-0,25 | 0,25 | 1 | 250 | 10 |
| CsA-2-0,25 | | 2 | 250 | 10 |
| CsA-1-0,5 | 0,5 | 1 | 500 | 10 |
| CsA-2-0,5 | | 2 | 500 | 10 |
| CsA-1-0,7 | 0,7 | 1 | 700 | 10 |
| CsA-2-0,7 | | 2 | 700 | 10 |
| CsA-1-1,0 | 1 | 1 | 1000 | 10 |
| CsA-2-1,0 | | 2 | 1000 | 10 |
| CsA-1-1,2 | 1,2 | 1 | 1200 | 10 |
| CsA-2-1,2 | | 2 | 1200 | 10 |

Provedení a vyhodnocení

Jednotlivé roztoky byly analyzovány navrhovanou metodou. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 22.

Tabulka 22. Sumarizace koncentrací cyklosporinu a ploch píků.

| | c | Area |
|-------------|----------------|-------------|
| | [µg/ml] | |
| CsA-1-0,025 | 2,52 | 93438 |
| CsA-2-0,025 | 2,48 | 91149 |
| CsA-1-0,05 | 5,04 | 201400 |
| CsA-2-0,05 | 4,96 | 205284 |
| CsA-1-0,10 | 10,07 | 386281 |
| CsA-2-0,10 | 9,92 | 361911 |
| CsA-1-0,25 | 25,18 | 977388 |
| CsA-2-0,25 | 24,81 | 961206 |
| CsA-1-0,5 | 50,35 | 1945723 |
| CsA-2-0,5 | 49,62 | 1893844 |
| CsA-1-0,7 | 70,50 | 2756565 |
| CsA-2-0,7 | 69,47 | 2677051 |
| CsA-1-1,0 | 100,71 | 3948316 |
| CsA-2-1,0 | 99,24 | 3844250 |
| CsA-1-1,2 | 120,85 | 4715824 |
| CsA-2-1,2 | 119,09 | 4357611 |

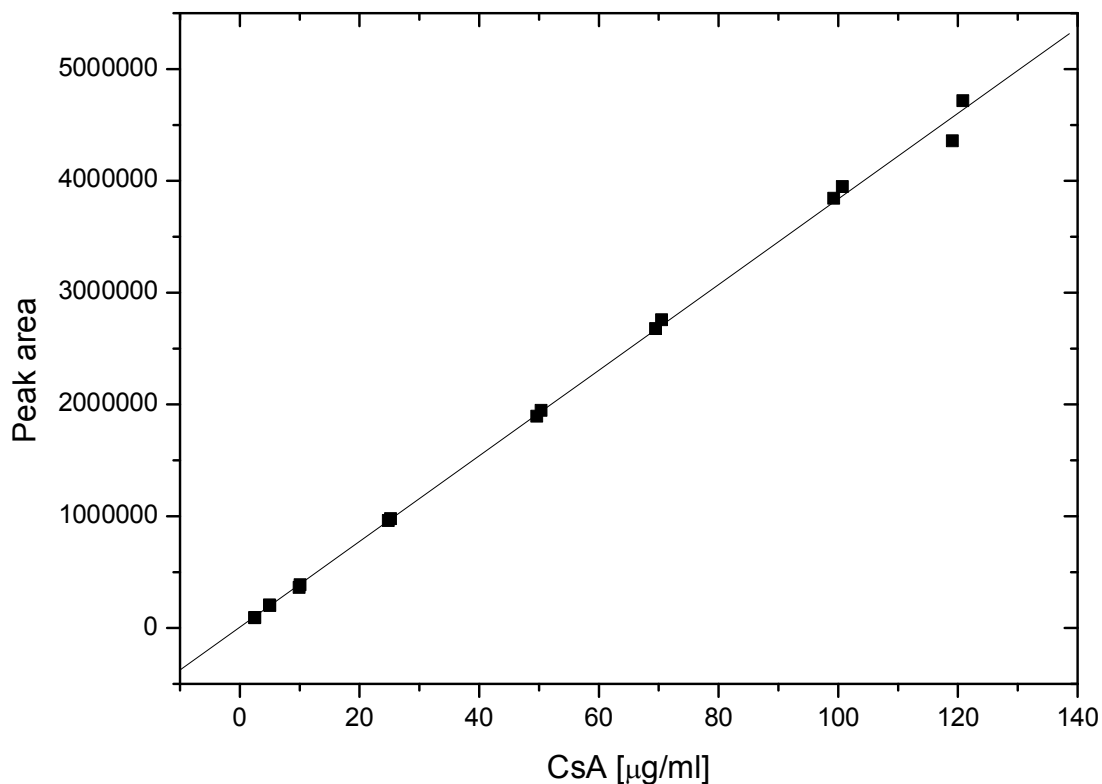
Naměřenými body byla proložena přímka metodou nejmenších čtverců. Grafické znázornění linearity je prezentováno na obrázku 37. Parametry přímky jsou prezentovány v tabulce 23.

Tabulka 23. Sumární tabulka parametrů přímky proložené naměřenými body.

| R² | n | B | | A | | *t-value | t_α |
|----------------------|----------|----------|-------|----------|---------|-----------------|------------------------------|
| | | Hodnota | SD | Hodnota | SD | | |
| 0,99925 | 16 | 38299,9 | 397,1 | 7819,5 | 25329,1 | 0,3087 | (α = 0,05, v = n-2) 2,145 |

$$*t = \frac{|A - 0|}{SD}$$

Obrázek 37. Grafické znázornění lineární odezvy detektoru na koncentraci cyklosporinu.



Diskuze:

Byla prokázána linearita metody v rozsahu obsahů nečistot 0,025 % – 1,2 %. Reporting level (RL) metody je 0,05 %, kalibrace se provádí standardním roztokem cyklosporinu na úrovni 0,7 %. Naměřenými body byla metodou nejmenších čtverců proložena přímka. Úsek na ose Y není staticky významně odlišný od 0. Korelační koeficient (R^2) 0,99925.

5.5.3 Citlivost metody

Metoda je vyvinuta tak, aby umožňovala reportovat výsledky od hodnoty 0,05 % RL. Během testů způsobilosti je RL ověřován testem citlivosti. Ten se provádí pomocí kalibračního roztoku, který je připraven na úrovni 0,7 %. Aby bylo dosaženo kritéria přijatelnosti pro citlivost, musí být odstup signálu od šumu na koncentrační úrovni 0,05 % minimálně 10. Na koncentrační úrovni odpovídající kalibračnímu roztoku je tedy požadován odstup signálu od šumu minimálně 140. Kromě RL byla testována i koncentrace poloviční 0,025 %.

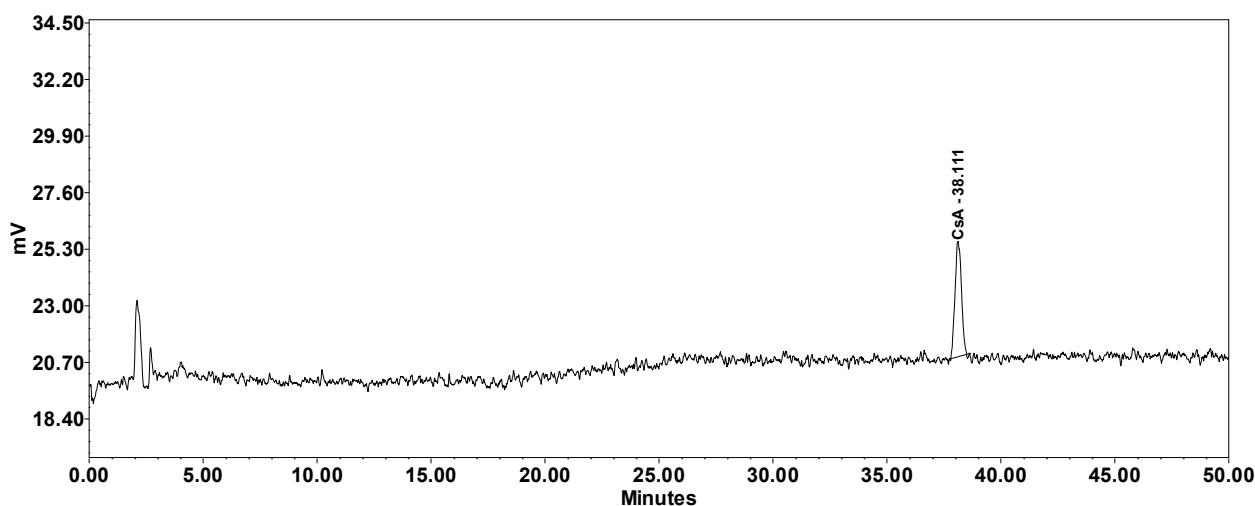
Příprava vzorků

Všechny vzorky byly připraveny a analyzovány v rámci linearity.

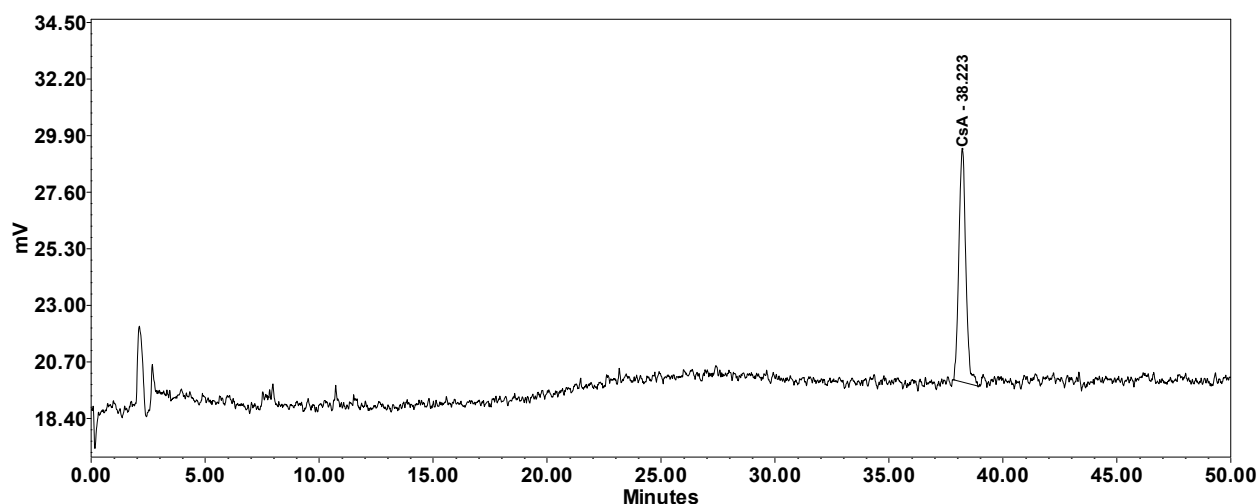
- Provedení a vyhodnocení

Chromatogramy roztoků o koncentraci standardu cyklosporinu na úrovni 0,025 % a 0,05 % jsou prezentovány na obrázcích 38 a 39. Dosažené odstupy signálu od šumu jsou prezentovány v tabulce 24.

Obrázek 38. Chromatogram standardního roztoku odpovídající obsahu 0,025 %.



Obrázek 39. Chromatogram standardního roztoku odpovídající obsahu 0,05 % (RL).



Tabulka 24. Sumární tabulka prezentující odstup signálu od šumu pro vybrané koncentrační úrovně.

| | C | Úroveň | | Area | Výška | Šum | S/N |
|-------------|----------------------|---------|----|--------|-------|-----|-----|
| | [$\mu\text{g/ml}$] | [%/CsA] | | | | | |
| CsA-1-0,025 | 2,52 | 0,025 | #1 | 93438 | 7787 | 12 | |
| | | | #2 | 84166 | 5611 | 15 | |
| | | | #3 | 95505 | 6367 | 15 | |
| CsA-2-0,025 | 2,48 | 0,025 | #1 | 91149 | 7011 | 13 | |
| CsA-1-0,05 | 5,04 | 0,05 | #1 | 201400 | 9155 | 22 | |
| | | | #2 | 190219 | 6794 | 28 | |
| | | | #3 | 187363 | 7495 | 25 | |
| CsA-2-0,05 | 4,96 | 0,05 | #1 | 205284 | 7332 | 28 | |

Diskuze:

Bylo prokázáno, že metoda je dostatečně citlivá pro stanovení nečistot a degradačních produktů cyklosporinu v lékových formách. Na požadovaném RL metody (0,05 %) bylo dosaženo $S/N > 20$. Pro účel analytické metody je na hodnotě RL odstup signálu od šumu minimálně 10.

5.5.4 Přesnost metody

Přesnost metody byla stanovena jako systémová přesnost a jako opakovatelnost.

Tabulka 25. Podmínky analýzy.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01707 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,005 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,005 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

Tabulka 26. Vyhodnocení testu způsobilosti (přesnost metody)

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|--------------|------------------|
| RT_{CsA} | RT _{CsA} | 34 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT_{isoA} | | 0,64 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 10,1 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 4,0 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test opakovatelnosti | RSD _{RT} | 0,2 | ≤ 3,0 | Vyhovuje |
| | RSD _{AREA} | 2,6 | ≤ 5,0 | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 338 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 69460 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USP tailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Systemová přesnost

Tento parametr byl stanoven jako RSD šesti opakovaných nadávkování kalibračního roztoku (roztok standardu cyklosporinu na úrovni odpovídající 0,7 % nečistot). Výsledek systémové přesnosti je prezentován v tabulce 27.

Tabulka 27. Systemová přesnost metody vyjádřená jako RSD šesti opakovaných analýz kalibračního roztoku cyklosporinu na úrovni 0,7 % nečistot.

| | RT | Plocha píku |
|--------|---------------|--------------------|
| | [min.] | |
| 1 | 36,42 | 2657944 |
| 2 | 36,44 | 2756270 |
| 3 | 36,47 | 2655583 |
| 4 | 36,50 | 2737608 |
| 5 | 36,54 | 2797884 |
| 6 | 36,57 | 2827285 |
| Průměr | 36,5 | 2738762 |
| RSD(%) | 0,1 | 2,6 |

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla vyhodnocena ze šesti nezávislých analýz jedné šarže vzorku (Equoral orální roztok, šarže 4R10001).

Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny podle metody.

Provedení a vyhodnocení

Pořadí analýz odpovídalo schématu z kapitoly *Postup analýz*. Výsledky jsou prezentovány v tabulce 28.

Tabulka 28. Výsledky šesti analýz vzorku Equoral orální roztok šarže 4R10002. Obsahy jednotlivých nečistot jsou vztaženy k teoretickému obsahu cyklosporinu v této lékové formě, což je 10,0 %.

| | RRT 0,9 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|----------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%] | | | | | | | |
| 1 | 0,0749 | 0,0854 | 0,0945 | 0,1372 | 0,1265 | 0,1020 | 0,0871 | 0,1270 |
| 2 | 0,0809 | 0,0854 | 0,0962 | 0,1313 | 0,1234 | 0,0981 | 0,0903 | 0,1405 |
| 3 | 0,0711 | 0,0784 | 0,0883 | 0,1156 | 0,1113 | 0,0925 | 0,0821 | 0,1179 |
| 4 | 0,0704 | 0,0728 | 0,0933 | 0,1177 | 0,1196 | 0,0963 | 0,0833 | 0,1217 |
| 5 | 0,0744 | 0,0785 | 0,0962 | 0,1217 | 0,1385 | 0,1086 | 0,0940 | 0,1292 |
| 6 | 0,0797 | 0,0882 | 0,0943 | 0,1219 | 0,1270 | 0,0953 | 0,0850 | 0,1219 |
| Průměr | 0,0752 | 0,0815 | 0,0938 | 0,1242 | 0,1244 | 0,0988 | 0,0870 | 0,1264 |
| RSD (%) | 5,7 | 7,2 | 3,1 | 6,7 | 7,2 | 5,8 | 5,2 | 6,3 |

Diskuze:

Metoda z hlediska opakovatelnosti splňuje nároky na metodu pro stanovení doprovodných látek (všechny RSD jsou nižší, než 10,0 %). Všechny specifikované nečistoty i nspecifikované nečistoty RRT 0,89 a 1,18 (CsG) byly nalezeny přibližně na dvojnásobku RL (0,05 %).

5.5.5 *Správnost metody*

Stanovení správnosti nebylo provedeno klasickou metodou přidavků nečistot k placebo a standardu cyklosporinu, ale alternativním postupem, který je nicméně pro stanovení správnosti zmíněn i lékopisem. Bylo vybráno několik šarží substance cyklosporinu, které se lišily obsahy jednotlivých nečistot. Tyto šarže byly analyzovány referenční metodou validovanou metodou pro stanovení doprovodných látek s UV detekcí a navrženou metodou s NSD detekcí. Dosažené výsledky byly vztaheny k referenční metodě a výtěžnost byla vypočtena jako stonásobek podílu obsahu nalezeného k obsahu stanovenému referenční metodou.

Příprava vzorků

Příprava vzorků pro referenční metodu odpovídala přesně popisu této metody. V případě metody pro NSD bylo do 10ml odměrné baňky odváženo 100 mg substance, navážka byla rozpuštěna v etanolu a baňka byla doplněna po značku.

Provedení a vyhodnocení

Tabulka 29. Podmínky analýzy.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01680 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,01 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,01 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

Výsledky stanovení obsahů doprovodných látek oběma metodami a vypočtené hodnoty výtěžností jsou přehledně prezentovány v tabulkách 31- 34. Už z vývoje metody a také z rutinního používání v současnosti platné metody je zřejmé, že nejproblematictějším píkem z hlediska správnosti i přesnosti je H₂CsA. Tento pík se eluuje za hlavním píkem cyklosporinu A, který se ve vzorku nachází v téměř tisícinásobném přebytku. Z tohoto důvodu byla pro porovnání provedena integrace píku H₂CsA dvojím způsobem. První způsob integrace je integrace tangentou z údolí mezi píky CsA a H₂CsA do údolí mezi píky H₂CsA a CsV. Lze se domnívat, že tento způsob integrace bude výsledky mírně podhodnocovat, nicméně míra podhodnocení bude více méně konstantní. Druhý způsob integrace je kolmice z už zmíněných údolí na základní linii, která ovšem ohraničí i plochu, která evidentně odpovídá hlavnímu píku a tím lze

očekávat, že nalezené výsledky H₂CsA budou v tomto případě nadhodnocené. V tomto případě lze dokonce předpokládat, že míra nadhodnocení konstantní nebude.

Tabulka 30. Vyhodnocení testu způsobilosti (správnost metody)

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|----------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | RT _{CsA} | 38 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,69 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 9,0 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 4,3 | <1,5; 10,0> | |
| Test opakovatelnosti | RSD _{RT} | 0,1 | ≤ 3,0 | Vyhovuje |
| | RSD _{AREA} | 0,3 | ≤ 5,0 | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 308 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 78208 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Tabulka 31. Správnost metody testovaná proti validované referenční metodě pro substanci šarže 8414200900113. Pík H₂CsA integrován tangentou.

| | NSD detekce | | | Referenční metoda | | | Výtěžnost |
|-----------------------|-------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|-----------|
| | #1 | #2 | průměr | #1 | #2 | průměr | |
| | [%] | | | | | | |
| [Abu ⁵]Cs | 0,156 | 0,154 | 0,155 | 0,156 | 0,156 | 0,156 | 99,4 |
| CsU | 0,198 | 0,202 | 0,200 | 0,176 | 0,188 | 0,182 | 109,9 |
| H ₂ CsA | 0,127 | 0,156 | 0,142 | 0,161 | 0,160 | 0,161 | 88,2 |
| CsV | 0,160 | 0,155 | 0,158 | 0,142 | 0,145 | 0,144 | 109,8 |
| CsG | 0,076 | 0,079 | 0,078 | 0,080 | 0,078 | 0,079 | 98,1 |
| CsD | 0,118 | 0,121 | 0,120 | 0,127 | 0,124 | 0,126 | 95,2 |

Tabulka 32. Správnost metody testovaná proti validované referenční metodě pro substanci šarže 8414200900713. Pík H₂CsA integrován tangentou.

| | NSD detekce | | | Referenční metoda | | | Výtěžnost |
|-----------------------|-------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|-----------|
| | #1 | #2 | průměr | #1 | #2 | průměr | |
| | [%] | | | | | | |
| [Abu ⁵]Cs | 0,043 | 0,035 | 0,039 | 0,039 | 0,040 | 0,040 | 98,7 |
| CsU | 0,040 | 0,043 | 0,042 | 0,030 | 0,031 | 0,031 | 136,1 |
| H ₂ CsA | 0,123 | 0,126 | 0,125 | 0,139 | 0,138 | 0,139 | 89,9 |
| CsV | 0,067 | 0,065 | 0,066 | 0,054 | 0,054 | 0,054 | 122,2 |
| CsG | 0,082 | 0,079 | 0,081 | 0,083 | 0,085 | 0,084 | 95,8 |
| CsD | 0,134 | 0,133 | 0,134 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 94,7 |

Tabulka 33. Správnost metody testovaná proti validované referenční metodě pro substanci šarže 8414200902513. Pík H₂CsA integrován tangentou.

| | NSD detekce | | | Referenční metoda | | | Výtěžnost |
|-----------------------|-------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|--------------|
| | #1 | #2 | průměr | #1 | #2 | průměr | |
| | [%] | | | | | | |
| [Abu ⁵]Cs | 0,074 | 0,076 | 0,075 | 0,070 | 0,069 | 0,070 | 107,9 |
| CsU | 0,109 | 0,110 | 0,110 | 0,091 | 0,090 | 0,091 | 121,0 |
| H ₂ CsA | 0,136 | 0,136 | 0,136 | 0,151 | 0,152 | 0,152 | 89,8 |
| CsV | 0,205 | 0,198 | 0,202 | 0,189 | 0,192 | 0,191 | 105,8 |
| CsG | 0,071 | 0,064 | 0,068 | 0,064 | 0,067 | 0,066 | 103,1 |
| CsD | 0,081 | 0,080 | 0,081 | 0,082 | 0,083 | 0,083 | 97,6 |

Tabulka 34. Výsledky správnosti pro nečistotu H₂CsA. Pík integrován kolmicí na základní linii.

| | NSD detekce | | | Referenční metoda | | | Výtěžnost |
|---------------|-------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|--------------|
| | #1 | #2 | průměr | #1 | #2 | průměr | |
| | [%] | | | | | | |
| 8414200900113 | 0,229 | 0,213 | 0,221 | 0,161 | 0,160 | 0,161 | 137,7 |
| 8414200900713 | 0,181 | 0,170 | 0,176 | 0,139 | 0,138 | 0,139 | 126,7 |
| 8414200902513 | 0,193 | 0,187 | 0,190 | 0,151 | 0,152 | 0,152 | 125,4 |

Diskuze:

Správnost metody byla otestována porovnáním výsledků naměřených navrhovanou metodou s výsledky získanými referenční metodou. Výsledky byly v dobré shodě. Pík H₂CsA umožňuje dvojí integraci. Pro rutinní metodu lze doporučit integraci tangentou, která poskytuje výtěžnost 90 %. Na základě validace se lze rozhodnout, zda tato výtěžnost bude tolerována, či zda budou výsledky obsahu H₂CsA přepočteny pomocí vhodného korekčního faktoru (pravděpodobně faktorem 10/9). Mírně nadhodnocené výsledky jsou u CsU. Na úrovni RL je výtěžnost 136 %, na úrovni 0,1 % 120 % a na úrovni 0,2 % pak 110 %. Jinými slovy s rostoucím obsahem nečistoty CsU se výtěžnost jeho stanovení blíží teoretickým 100 %.

5.5.6 Analýza na přístroji instalovaném na QC Pharma

Na QC Pharma jako pracovišti, kde by měla být v budoucnu metoda rutinně používána, byly provedeny analýzy stejných vzorků, jaké byly použity pro správnost metody. Jedná se tedy o vzorky substancí cyklosporinu, které byly cíleně vybrány tak, aby reprezentovaly vzorky značně se lišící v obsahu jednotlivých nečistot.

Tabulka 35. Podmínky analýzy.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01680 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,01 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,01 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 50 |
| Nastavení filtru šumu Link | Peak with: 40 |

Provedení a vyhodnocení

Vzorky byly analyzovány na QC Pharma. Výsledky analýz jsou porovnány s výsledky dosaženými na instrumentaci RD (viz tabulky 37– 39).

Tabulka 36. Vyhodnocení testu způsobilosti (QC Pharma)

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|--------------|------------------|
| RT_{CsA} | | 39 min. | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT_{isoA} | | 0,72 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 5,6 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 2,7 | <1,5; 10,0> | |
| Test opakovatelnosti | RSD _{RT} | 0,0 | ≤ 3,0 | Vyhovuje |
| | RSD _{AREA} | 0,8 % | ≤ 5,0 | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | Min. 387 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | Min. 60170 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USP tailing | | max: 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Tabulka 37. Výsledky analýz substance cyklosporinu šarže 84142009001113 analyzované na přístroji na oddělení QC. Porovnání s výsledky dosaženými na přístroji na oddělení RD. Pík H₂CsA integrován tangентou.

| | RRT 0,88 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,14 | CsD |
|---------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| | [%] | | | | | | | |
| RD;#1 | 0,080 | 0,156 | 0,198 | 0,127 | 0,160 | <0,05 | 0,076 | 0,118 |
| RD;#2 | 0,079 | 0,154 | 0,202 | 0,156 | 0,155 | <0,05 | 0,079 | 0,121 |
| Průměr | 0,080 | 0,155 | 0,200 | 0,142 | 0,158 | <0,05 | 0,078 | 0,120 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,01 | N/A | 0,00 | 0,00 |
| QC;#1 | 0,082 | 0,159 | 0,200 | 0,152 | 0,142 | <0,05 | 0,081 | 0,123 |
| QC;#2 | 0,075 | 0,147 | 0,189 | 0,142 | 0,138 | <0,05 | 0,072 | 0,113 |
| Průměr | 0,079 | 0,153 | 0,195 | 0,147 | 0,140 | <0,05 | 0,077 | 0,118 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | N/A | 0,01 | 0,01 |
| Rel.dif.(%) | 1,3 | 1,3 | 2,8 | 3,8 | 11,8 | N/A | 1,3 | 1,3 |

Tabulka 38. Výsledky analýz substance cyklosporinu šarže 8414200900713 analyzované na přístroji na oddělení QC. Porovnání s výsledky dosaženými na přístroji na oddělení RD. Pík H₂CsA integrován tangентou.

| | RRT 0,88 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,14 | CsD |
|---------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| | [%] | | | | | | | |
| RD;#1 | 0,051 | 0,043 | 0,040 | 0,123 | 0,067 | <0,05 | 0,082 | 0,134 |
| RD;#2 | 0,053 | 0,035 | 0,043 | 0,126 | 0,065 | <0,05 | 0,079 | 0,133 |
| Průměr | 0,052 | 0,039 | 0,042 | 0,125 | 0,066 | <0,05 | 0,081 | 0,134 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | N/A | 0,00 | 0,00 |
| QC;#1 | 0,051 | 0,044 | 0,038 | 0,127 | 0,057 | <0,05 | 0,080 | 0,140 |
| QC;#2 | 0,052 | 0,041 | 0,038 | 0,119 | 0,055 | <0,05 | 0,077 | 0,129 |
| Průměr | 0,052 | 0,043 | 0,038 | 0,123 | 0,056 | <0,05 | 0,079 | 0,135 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | N/A | 0,00 | 0,01 |
| Rel.dif.(%) | 1,0 | 8,6 | 8,8 | 1,2 | 16,4 | N/A | 2,5 | 0,7 |

Tabulka 39. Výsledky analýz substance cyklosporinu šarže 8414200902513 analyzované na přístroji na oddělení QC. Porovnání s výsledky dosaženými na přístroji na oddělení RD. Pík H₂CsA integrován tangentou.

| | RRT 0,88 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,14 | CsD |
|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
| | [%] | | | | | | | |
| RD;#1 | 0,087 | 0,074 | 0,109 | 0,136 | 0,205 | <0,05 | 0,071 | 0,081 |
| RD;#2 | 0,09 | 0,076 | 0,110 | 0,136 | 0,198 | <0,05 | 0,064 | 0,080 |
| Průměr | 0,089 | 0,075 | 0,110 | 0,136 | 0,202 | <0,05 | 0,068 | 0,081 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | N/A | 0,01 | 0,00 |
| QC;#1 | 0,088 | 0,071 | 0,105 | 0,133 | 0,190 | <0,05 | 0,064 | 0,081 |
| QC;#2 | 0,09 | 0,073 | 0,109 | 0,137 | 0,182 | <0,05 | 0,065 | 0,079 |
| Průměr | 0,089 | 0,072 | 0,107 | 0,135 | 0,186 | <0,05 | 0,065 | 0,080 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | N/A | 0,00 | 0,00 |
| Rel.dif.(%) | 0,6 | 4,1 | 2,3 | 0,7 | 8,0 | N/A | 4,5 | 0,6 |

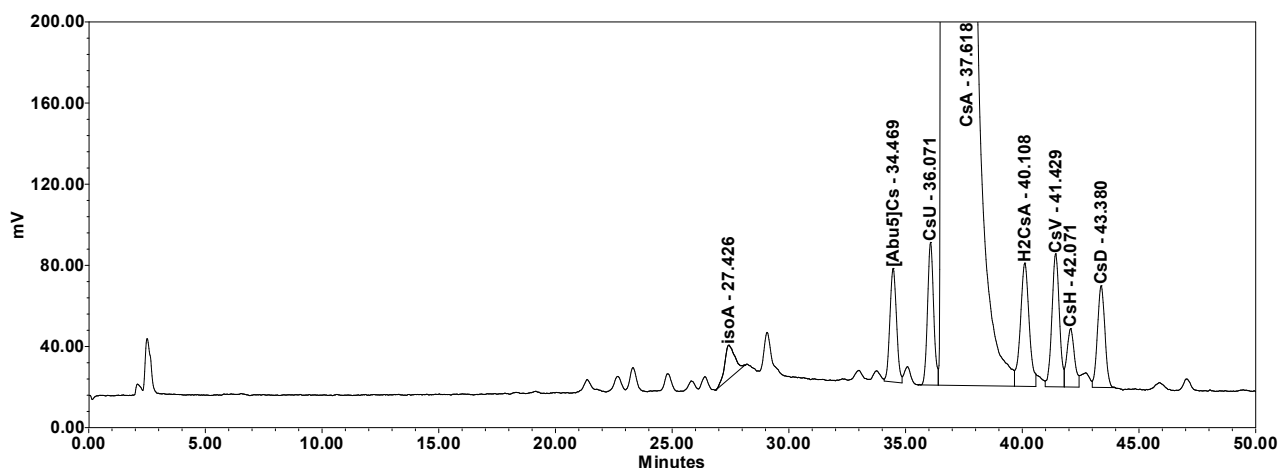
Diskuze:

Byly provedeny analýzy na instrumentaci QC Pharma. Detektor na tomto pracovišti poskytuje menší odstup signálu od šumu, než přístroj na oddělení RD. Z tohoto důvodu je přístroj vybaven filtrací šumu. Výsledky obou přístrojů jsou proto na obou pracovištích v dobré shodě.

5.5.7 Robustnost metody

V rámci ověřování klíčových parametrů metody byla ověřena i její robustnost. Bylo provedeno několik experimentů, ve kterých se prováděly záměrné odchylky parametrů metody. Za těchto podmínek byly provedeny analýzy produktu Equoral orální roztok šarže 4R210001 (v tabulkách označován jako produkt). Dosažené výsledky byly porovnány s referenčními výsledky (výsledek dosažený za standardních podmínek metody). Všechny analýzy v rámci robustnosti byly prováděny s kolonou USHEE01680 (šarže stacionární fáze B12144). Obsah TFA v mobilních fázích byl 0,01 %. Obsah nečistot byl přepočítán na teoretický obsah cyklosporinu 10,0 %. Referenční výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce 40.

Obrázek 40. Chromatogram modelové směsi (výchozí stav).



Tabulka 40. Referenční obsahy nečistot v produktu.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|---------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| 1 | 0,0867 | 0,0840 | 0,0976 | 0,1315 | 0,1259 | 0,0923 | 0,0898 | 0,1248 |
| 2 | 0,0808 | 0,0893 | 0,0966 | 0,1221 | 0,1265 | 0,0935 | 0,0880 | 0,1262 |
| Průměr | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Odchyly od teploty kolony

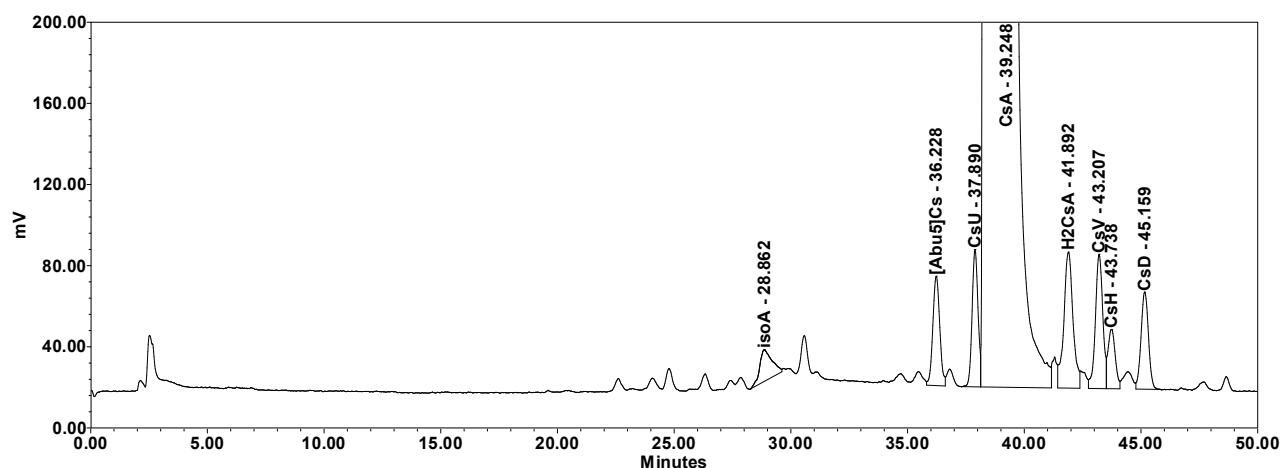
Předepsaná teplota kolony je 100 °C. Byly testovány odchyly ± 3 °C. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 43.

Provedení a vyhodnocení

Tabulka 41. Vyhodnocení testů způsobilosti (97°C, redukovaný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 39 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,74 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/V _(CsU/CsA) | 4,3 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/V _(CsV/CsH) | 1,9 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 284 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 86151 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

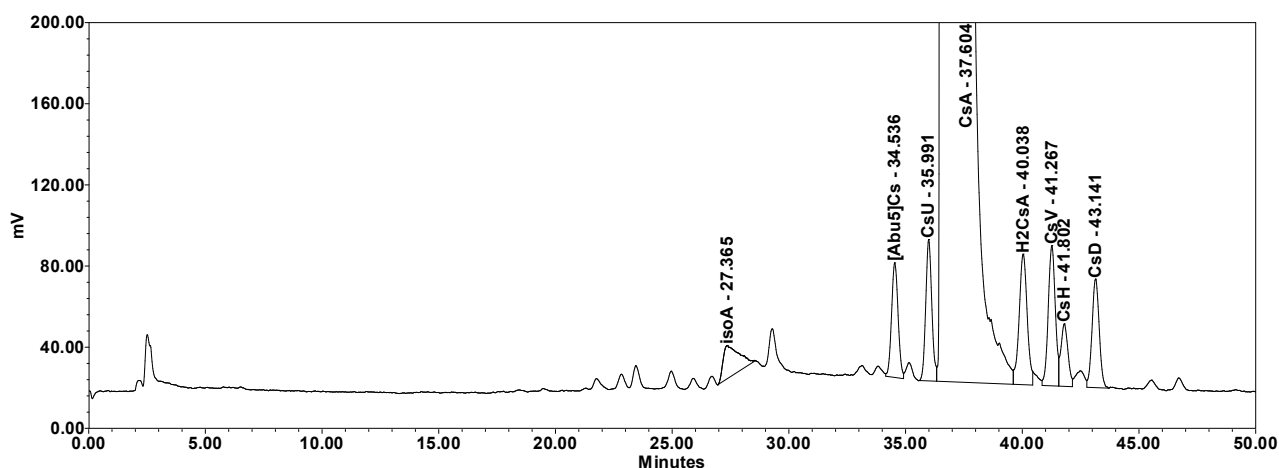
Obrázek 41. Chromatogram modelové směsi (97°C).



Tabulka 42. Vyhodnocení testů způsobilosti (103°C, redukovaný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 37 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,73 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/V _(CsU/CsA) | 10,1 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/V _(CsV/CsH) | 2,2 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 305 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 79532 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 3 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 42. Chromatogram modelové směsi (103°C).



Tabulka 43. Výsledky obsahů nečistot při změnách teploty $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|--------------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| -3 °C | | | | | | | | |
| 1 | 0,0735 | 0,0798 | 0,0962 | 0,1089 | 0,1336 | 0,0971 | 0,0972 | 0,1340 |
| 2 | 0,0740 | 0,0803 | 0,1011 | 0,1411 | 0,1287 | 0,0953 | 0,0903 | 0,1259 |
| Průměr | 0,0738 | 0,0801 | 0,0987 | 0,1250 | 0,1312 | 0,0962 | 0,0938 | 0,1300 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 12,7 | 7,9 | 1,6 | 1,4 | 3,8 | 3,5 | 5,3 | 3,5 |
| + 3 °C | | | | | | | | |
| 1 | 0,0695 | 0,0869 | 0,0992 | 0,1342 | 0,1040 | 0,0787 | 0,0938 | 0,1260 |
| 2 | 0,0722 | 0,0837 | 0,0914 | 0,1356 | 0,1097 | 0,0844 | 0,0883 | 0,1247 |
| Průměr | 0,0709 | 0,0853 | 0,0953 | 0,1349 | 0,1069 | 0,0816 | 0,0911 | 0,1254 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 16,7 | 1,6 | 1,9 | 6,2 | 16,6 | 13,0 | 2,4 | 0,1 |

Diskuze:

Teplota kolony je jeden z klíčových parametrů metody. Bylo ověřeno, že změna teploty kolony v rozsahu $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá negativní vliv na separaci. Je patrné, že snížení teploty vedlo ke zhoršení separace mezi CsU a CsA, protože selektivita separace CsU/CsA je teplotně závislá. Separace splňuje kritéria testu způsobilosti. Vzhledem k faktu, že povolená tolerance teploty kolonového termostatu je $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, lze metodu považovat v parametru teploty za robustní.

5.5.8 Odchyly od předepsaného obsahu TBME

Předepsaný obsah modifikátoru selektivity TBME v mobilních fázích je 5,5 %. Cílem experimentu je prokázat, že odchyly v jeho obsahu v rozsahu $\pm 0,5$ % nemají negativní vliv na separaci nebo kvantitativní výsledky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 47.

Provedení a vyhodnocení

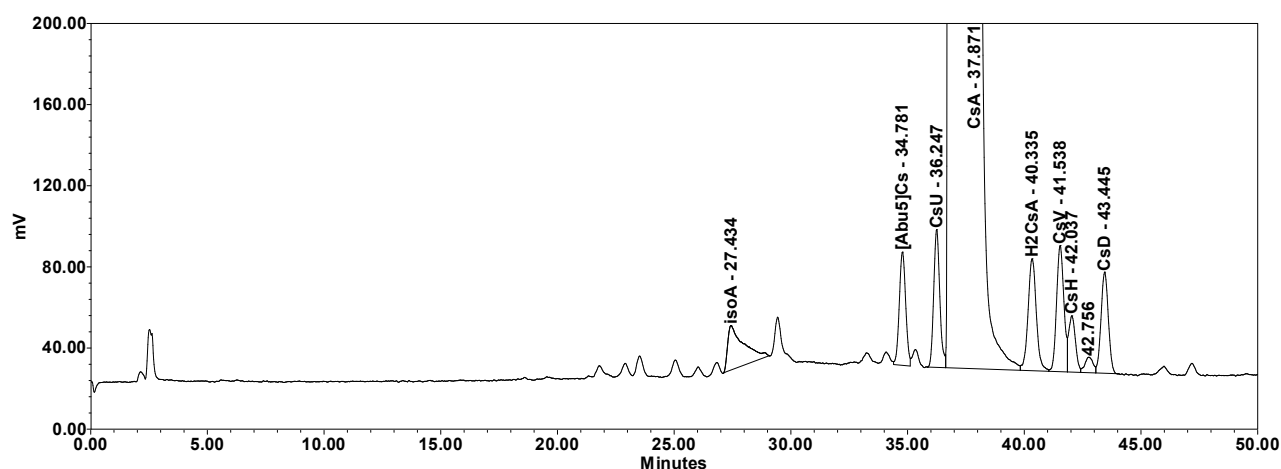
Tabulka 44. Podmínky analýzy.

| | |
|----------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01680 |
| Mobilní fáze: | A: 31,0 % Aceton + 5,0 % TBME + 64,0 % voda + 0,01 % TFA B: 50,0 % Aceton + 5,0 % TBME + 45,0 % voda + 0,01 % TFA C: 29,0 % Aceton + 6,0 % TBME + 65,0 % voda + 0,01 % TFA D: 48,0 % Aceton + 6,0 % TBME + 46,0 % voda + 0,01 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

Tabulka 45. Vyhodnocení testů způsobilosti (5,0 % TBME).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|----------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 38 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,72 | 0,55 - 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 10,6 | $\geq 2,0$ | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 1,6 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test opakovatelnosti | RSD _{RT} | 0,1 | $\leq 3,0$ | Vyhovuje |
| | RSD _{AREA} | 3,4 | $\leq 5,0$ | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 278 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 77816 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USP tailing | | 1,1 | $\leq 1,5$ | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 2 | ≤ 6 | Vyhovuje |

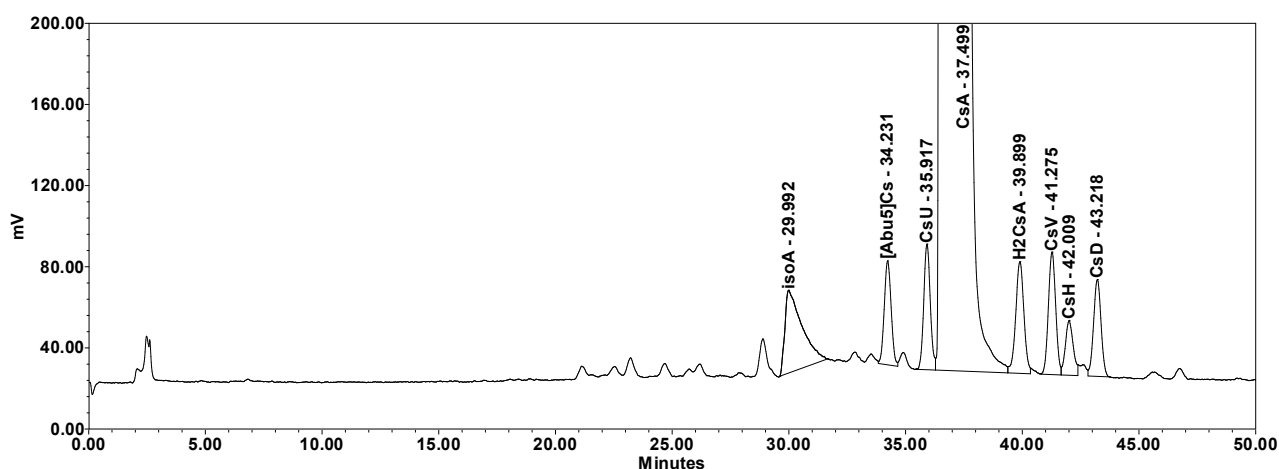
Obrázek 43. Chromatogram modelové směsi (5,0 % TBME).



Tabulka 46. Vyhodnocení testů způsobilosti (6,0 % TBME, redukovaný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 39 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,80 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/V _(CsU/CsA) | 10,6 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/V _(CsV/CsH) | 7,2 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 262 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 71728 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 1 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 44. Chromatogram modelové směsi (6,0 % TBME).



Tabulka 47. Výsledky obsahů nečistot při změnách obsahu TBME.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|---------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| | -0,5 % TBME | | | | | | | |
| 1 | 0,0769 | 0,0859 | 0,0993 | 0,1421 | 0,1066 | 0,0841 | 0,0899 | 0,1366 |
| 2 | 0,0759 | 0,0839 | 0,0995 | 0,1385 | 0,1108 | 0,0790 | 0,0873 | 0,1250 |
| Průměr | 0,0764 | 0,0849 | 0,0994 | 0,1403 | 0,1087 | 0,0816 | 0,0886 | 0,1308 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Reference | 0,0752 | 0,0815 | 0,0938 | 0,1242 | 0,1244 | 0,0988 | 0,0870 | 0,1264 |
| Rel.dif.(%) | 1,5 | 4,1 | 5,8 | 12,1 | 13,5 | 19,1 | 1,9 | 3,4 |
| | +0,5 % TBME | | | | | | | |
| 1 | 0,0666 | 0,0839 | 0,1038 | 0,1452 | 0,1205 | 0,0966 | 0,0852 | 0,1369 |
| 2 | 0,0647 | 0,0844 | 0,1031 | 0,1428 | 0,1165 | 0,0935 | 0,0786 | 0,1354 |
| Průměr | 0,0657 | 0,0842 | 0,1035 | 0,1440 | 0,1185 | 0,0951 | 0,0819 | 0,1362 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| Reference | 0,0752 | 0,0815 | 0,0938 | 0,1242 | 0,1244 | 0,0988 | 0,0870 | 0,1264 |
| Rel.dif.(%) | 24,2 | 2,9 | 6,3 | 12,7 | 6,3 | 2,3 | 8,2 | 8,1 |

Diskuze:

TBME je silný modifikátor selektivity. Bylo prokázáno, že změna jeho obsahu v rozsahu $\pm 0,5$ % sice ovlivní separaci (zvýšený obsah TBME poskytne lepší rozlišení mezi CsV a CsH a horší separaci mezi CsH a nespecifikovaným CsG, snížený obsah poskytne opačné trendy). Parametry separace jsou ale v mezích testů způsobilosti u obou změn.

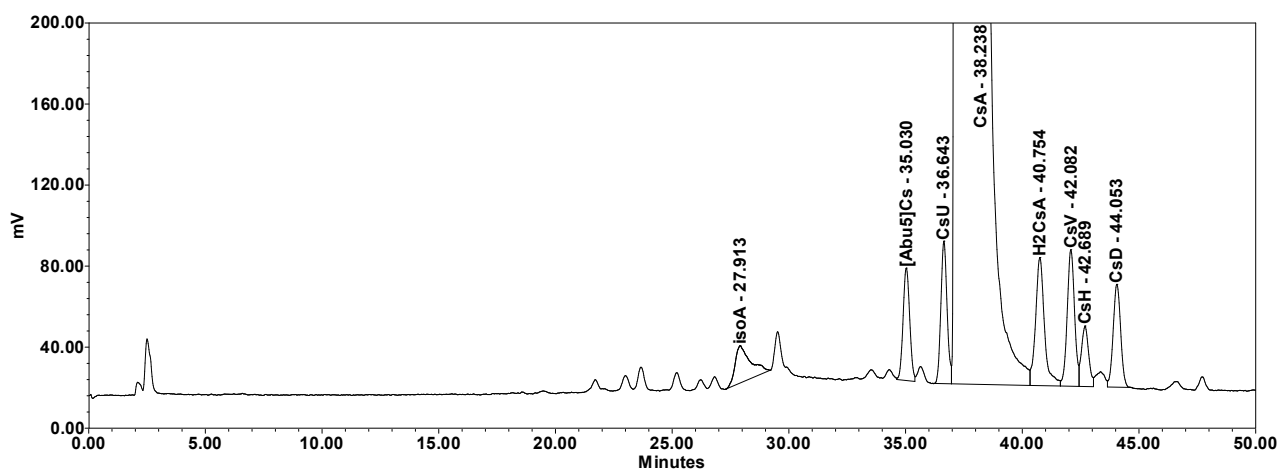
5.5.9 Robustnost vzhledem ke změně směrnice gradientu

Směrnice separační části gradientu je 1,77 % mobilní fáze B za minutu (78 % mobilní fáze B za 44 minut). Byly testovány separace se směrnici 1,73 % mobilní fáze B za minutu (76 % mobilní fáze B za 44 minut) a 1,82 % mobilní fáze B za minutu (80 % mobilní fáze B za 44 minut). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 50.

Tabulka 48. Vyhodnocení testů způsobilosti (-2 % mobilní fáze B, redukováný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------------|-------------------|----------|---------------|-----------|
| RT_{CsA} | | 38 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT_{isoA} | | 0,73 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | $p/v_{(CsU/CsA)}$ | 8,1 | $\geq 2,0$ | Vyhovuje |
| | $p/v_{(CsV/CsH)}$ | 2,9 | $<1,5; 10,0>$ | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 378 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 77448 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | $\leq 1,5$ | Vyhovuje |
| Kalibrace | d_{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

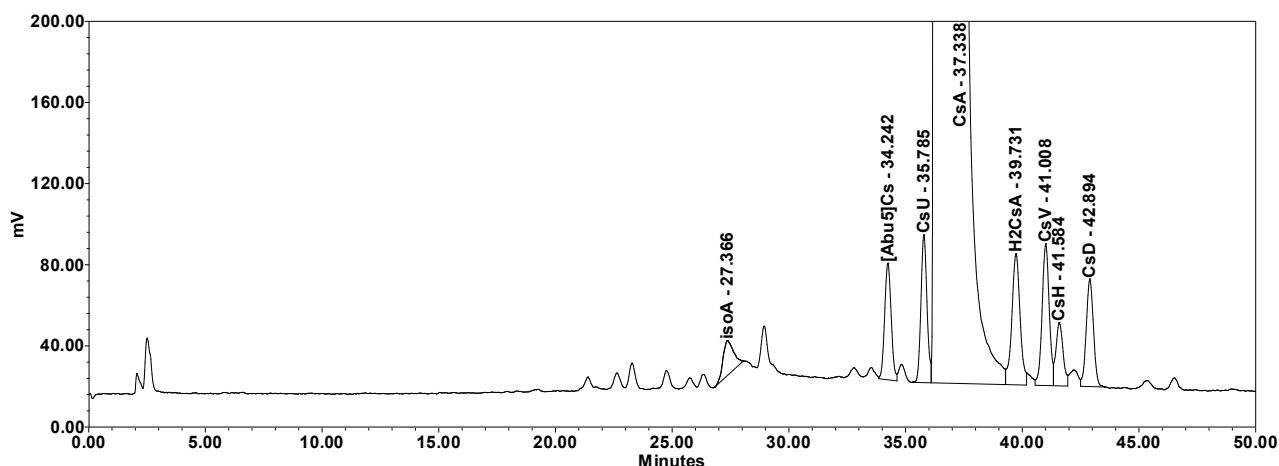
Obrázek 45. Chromatogram modelové směsi (-2 % mobilní fáze B).



Tabulka 49. Vyhodnocení testů způsobilosti (+ 2 % mobilní fáze B, redukováný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 37 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 073 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 7,5 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 2,9 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 407 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 77807 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 1 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 46. Chromatogram modelové směsi (+ 2 % mobilní fáze B).



Tabulka 50. Výsledky obsahů nečistot při změnách směrnice separační části gradientu.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|-------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| -2 % M.F.B | | | | | | | | |
| 1 | 0,0699 | 0,0821 | 0,0979 | 0,1305 | 0,1246 | 0,0969 | 0,0930 | 0,1280 |
| 2 | 0,0682 | 0,0847 | 0,0942 | 0,1277 | 0,1269 | 0,0975 | 0,0963 | 0,1306 |
| Průměr | 0,0691 | 0,0834 | 0,0961 | 0,1291 | 0,1258 | 0,0972 | 0,0947 | 0,1293 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 19,2 | 3,8 | 1,1 | 1,8 | 0,4 | 4,5 | 6,3 | 3,0 |
| +2 % M.F.B | | | | | | | | |
| 1 | 0,0737 | 0,0863 | 0,0976 | 0,1278 | 0,1273 | 0,0896 | 0,0942 | 0,1254 |
| 2 | 0,0726 | 0,0767 | 0,0951 | 0,1392 | 0,1222 | 0,0875 | 0,0893 | 0,1245 |
| Průměr | 0,0732 | 0,0815 | 0,0964 | 0,1335 | 0,1248 | 0,0886 | 0,0918 | 0,1250 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 13,5 | 6,1 | 0,8 | 5,1 | 1,2 | 4,8 | 3,2 | 0,4 |

Diskuze:

Změna směrnice gradientu se projevila jen na retenčních časech. Separace byla prakticky nezměněna.

5.5.10 Robustnost metody vzhledem ke změnám průtoku

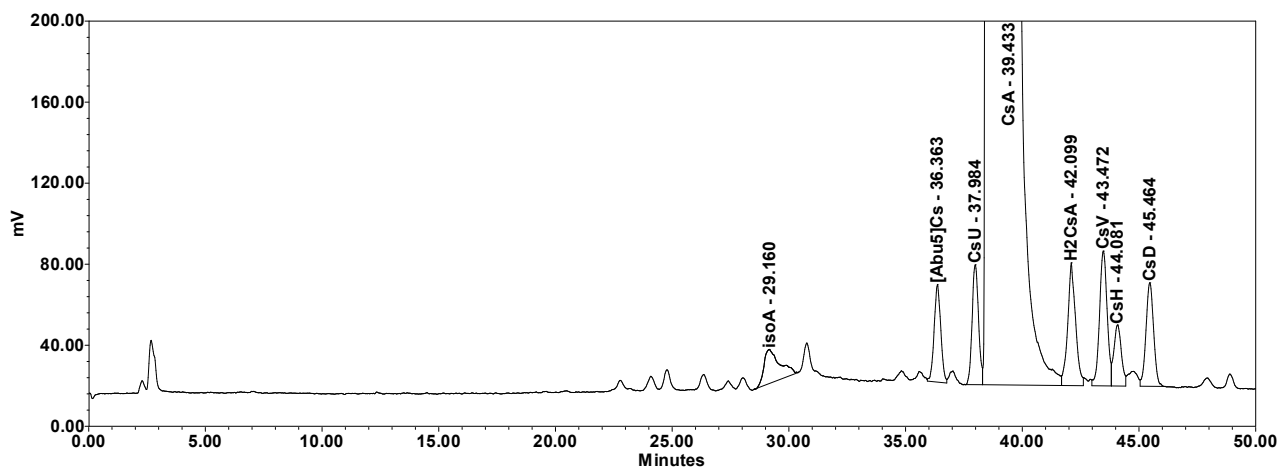
Průtok mobilní fáze je 0,15 ml/min. Byly testovány separace při průtocích 0,14 a 0,16 ml/min. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 53.

Provedení a vyhodnocení

Tabulka 51. Vyhodnocení testů způsobilosti (0,14 ml/min, redukováný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 39 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,74 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/V _(CsU/CsA) | 7,2 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/V _(CsV/CsH) | 2,7 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 248 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 78378 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USP tailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 1 | ≤ 6 | Vyhovuje |

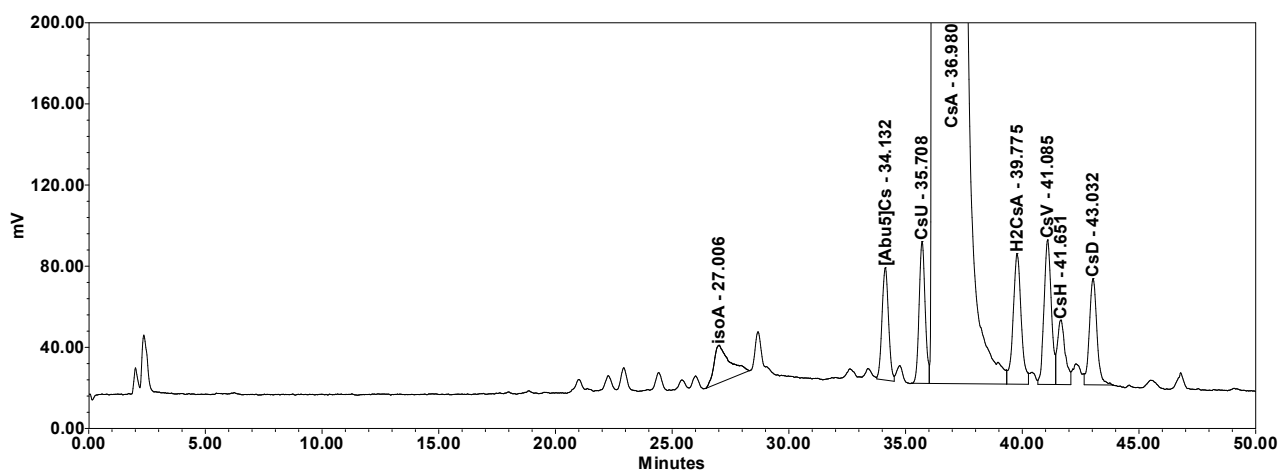
Obrázek 47. Chromatogram modelové směsi (průtok 0,14 ml/min).



Tabulka 52. Vyhodnocení testů způsobilosti (0,16 ml/min, redukováný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 37 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{ISOA} | | 0,73 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/V _(CsU/CsA) | 7,6 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/V _(CsV/CsH) | 2,1 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 254 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 77897 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 48. Chromatogram modelové směsi (průtok 0,16 ml/min).



Tabulka 53. Výsledky obsahů nečistot při změnách průtoku.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|---------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| [%; w/wCsA] | | | | | | | | |
| -0,01 ml/min | | | | | | | | |
| 1 | 0,0725 | 0,0786 | 0,0915 | 0,1140 | 0,1434 | 0,0959 | 0,1022 | 0,1290 |
| 2 | 0,0807 | 0,0839 | 0,0959 | 0,1182 | 0,1281 | 0,1002 | 0,0931 | 0,1313 |
| Průměr | 0,0766 | 0,0813 | 0,0937 | 0,1161 | 0,1358 | 0,0981 | 0,0977 | 0,1302 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 8,9 | 6,4 | 3,6 | 8,8 | 7,3 | 5,4 | 9,4 | 3,6 |
| +0,01 ml/min | | | | | | | | |
| 1 | 0,0798 | 0,0871 | 0,0962 | 0,1298 | 0,1314 | 0,0945 | 0,0959 | 0,1287 |
| 2 | 0,0759 | 0,0847 | 0,0949 | 0,1347 | 0,1322 | 0,0945 | 0,0956 | 0,1289 |
| Průměr | 0,0779 | 0,0859 | 0,0956 | 0,1323 | 0,1318 | 0,0945 | 0,0958 | 0,1288 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 7,3 | 0,9 | 1,6 | 4,2 | 4,3 | 1,7 | 7,4 | 2,6 |

Diskuze:

Změna průtoku se projevila jen na retenčních časech. Separace byla prakticky nezměněna.

5.5.11 Robustnost vzhledem ke změně dávkovaného objemu

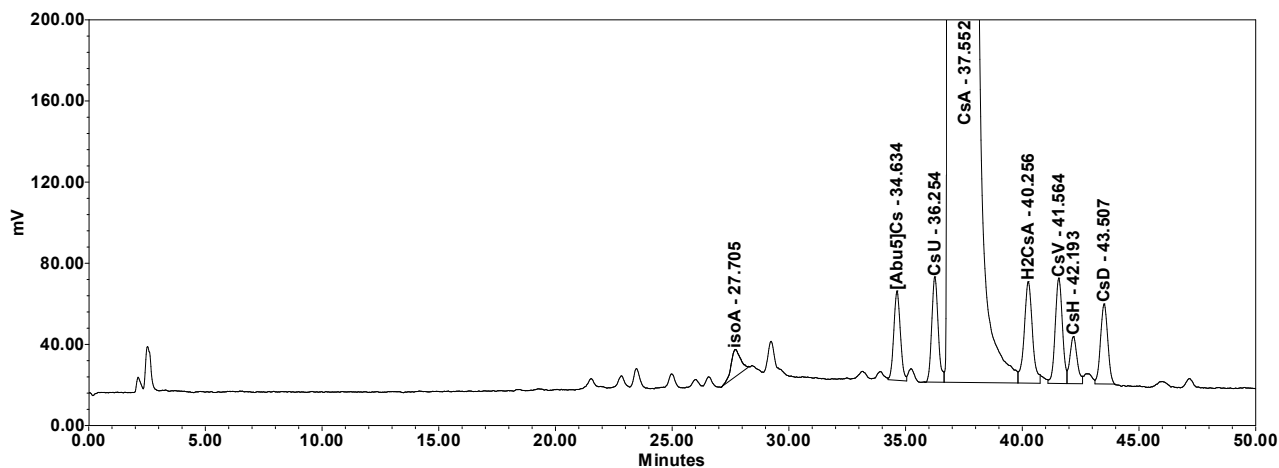
Předepsaný dávkovaný objem vzorku jsou 4 μ l. Byly testovány separace se změněným dávkovaným objemem (3 μ l a 5 μ l). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 56.

Provedení a vyhodnocení

Tabulka 54. Vyhodnocení testů způsobilosti (dávkovaný objem 3 μ l, redukovaný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|-------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 38 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,74 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | $p/V_{(CsU/CsA)}$ | 10,4 | $\geq 2,0$ | Vyhovuje |
| | $p/V_{(CsV/CsH)}$ | 3,7 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 315 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 78476 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | $\leq 1,5$ | Vyhovuje |
| Kalibrace | d_{CAL} | 2 | ≤ 6 | Vyhovuje |

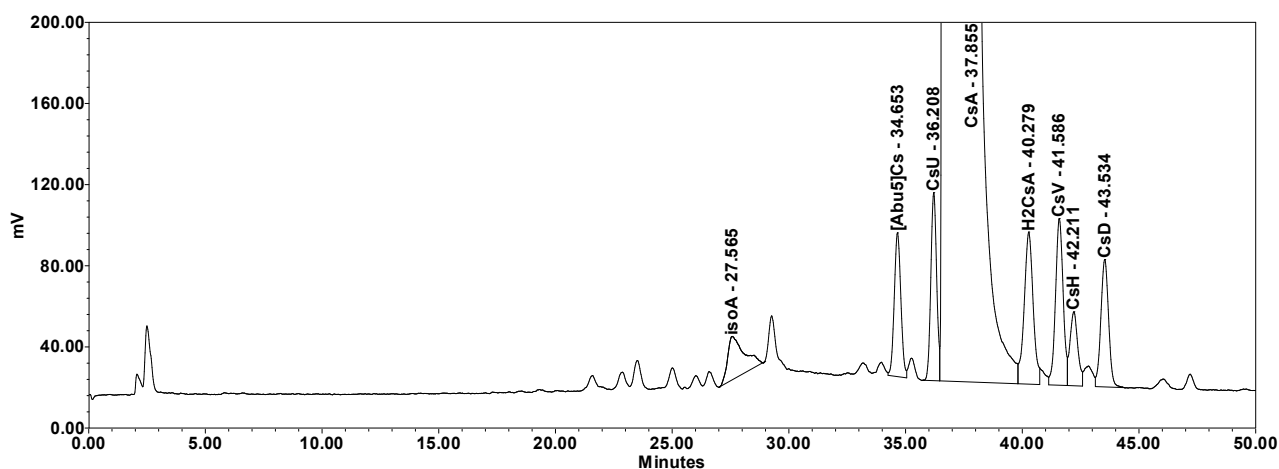
Obrázek 49. Chromatogram modelové směsi (dávkovaný objem 3 μ l).



Tabulka 55. Vyhodnocení testů způsobilosti (dávkový objem 5 µl, redukovaný rozsah).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------|--------------------------|----------|--------------|-----------|
| RT _{CsA} | | 38 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT _{isoA} | | 0,73 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | p/v _(CsU/CsA) | 5,9 | ≥ 2,0 | Vyhovuje |
| | p/v _(CsV/CsH) | 2,6 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 381 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 73147 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | ≤ 1,5 | Vyhovuje |
| Kalibrace | d _{CAL} | 1 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 50. Chromatogram modelové směsi (dávkový objem 5 µl).



Tabulka 56. Výsledky obsahů nečistot při změnách dávkového objemu.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|-------------|------------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| | - 1 ul inj. Vol. | | | | | | | |
| 1 | 0,0746 | 0,0798 | 0,0926 | 0,1301 | 0,1173 | 0,0864 | 0,0904 | 0,1258 |
| 2 | 0,0802 | 0,0878 | 0,0967 | 0,1275 | 0,1195 | 0,0905 | 0,0881 | 0,1271 |
| Průměr | 0,0774 | 0,0838 | 0,0947 | 0,1288 | 0,1184 | 0,0885 | 0,0893 | 0,1265 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 7,9 | 3,3 | 2,6 | 1,6 | 6,4 | 4,9 | 0,4 | 0,8 |
| | + 1 ul inj. Vol. | | | | | | | |
| 1 | 0,0709 | 0,0841 | 0,0964 | 0,1327 | 0,1269 | 0,0934 | 0,0897 | 0,1314 |
| 2 | 0,0793 | 0,0895 | 0,0961 | 0,1260 | 0,1224 | 0,0863 | 0,0860 | 0,1246 |
| Průměr | 0,0751 | 0,0868 | 0,0963 | 0,1294 | 0,1247 | 0,0899 | 0,0879 | 0,1280 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 10,9 | 0,2 | 0,9 | 2,0 | 1,2 | 3,3 | 1,2 | 2,0 |

Diskuze:

Změna dávkovaného objemu neměla negativní vliv na separaci.

5.5.12 Robustnost vzhledem ke změně kolony

V průběhu vývoje a ověření metody byly použity celkem tři kolony Zorbax SB C18 lišící se šarží stacionární fáze (viz kapitola 4.1.6). Zatímco ověření klíčových parametrů metody proběhlo na koloně s SN USHEEO1680, ověření robustnosti vzhledem ke změnám kolony proběhlo s kolonou s SN USHEEO1650 (nejstarší kolona používaná od roku 2012, velký počet nástřiků) a s kolonou s SN USHEEO1707 (nejnovější kolona, několik desítek nástřiků). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 61.

Provedení a vyhodnocení

Kolona USHEEO1650

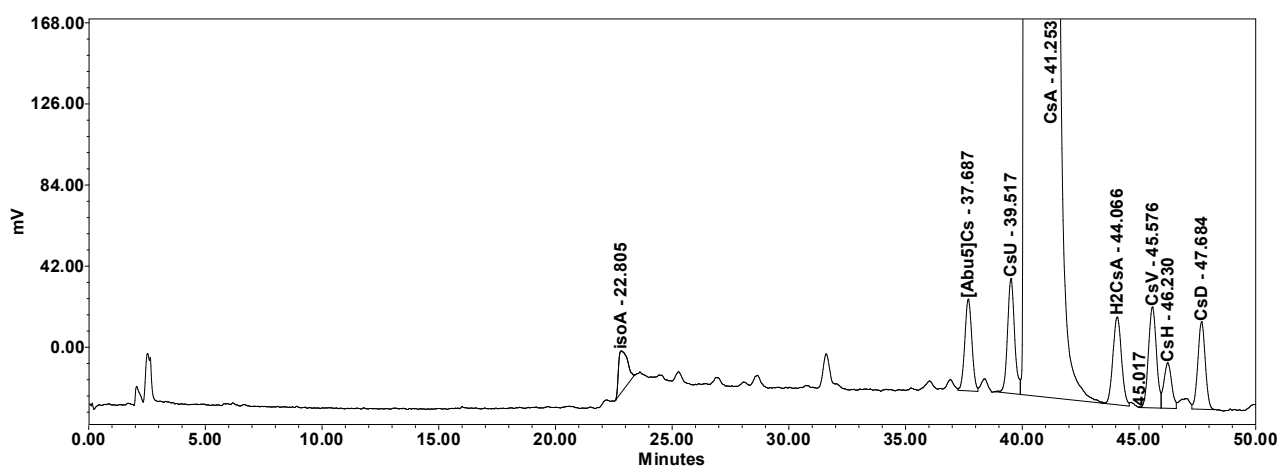
Tabulka 57. Podmínky analýzy.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEEO1650 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,05 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,05 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

Tabulka 58. Vyhodnocení testů způsobilosti (kolona USHEEO1650).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------------|-------------------|----------|--------------|-----------|
| RT_{CsA} | | 41 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT_{isoA} | | 0,55 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | $p/V_{(CsU/CsA)}$ | 7,8 | $\geq 2,0$ | Vyhovuje |
| | $p/V_{(CsV/CsH)}$ | 3,0 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 250 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 76490 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | $\leq 1,5$ | Vyhovuje |
| Kalibrace | d_{CAL} | 1 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 51. Chromatogram modelové směsi (kolona SN USHEE01650).



Provedení a vyhodnocení

Kolona USHEE01707

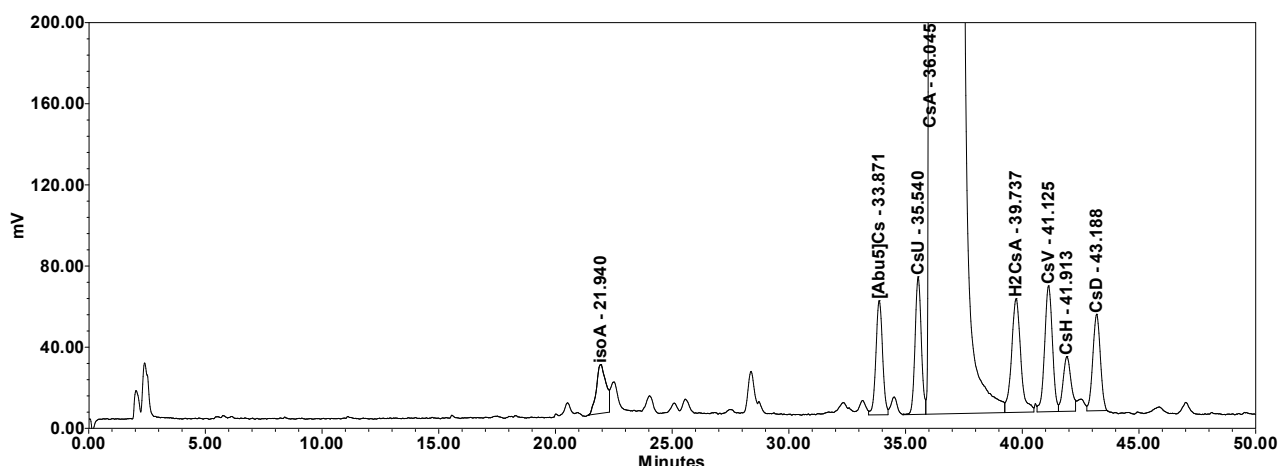
Tabulka 59. Podmínky analýzy.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Použitá kolona | SN: USHEE01707 |
| Mobilní fáze: | A: 30 % Aceton + 5,5 % TBME + 64,5 % voda + 0,005 % TFA B: 49 % Aceton + 5,5 % TBME + 45,5 % voda + 0,005 % TFA |
| Nastavení NSD | „Sensitivity“: „high“ „Gain (Select)“: 10 |
| Nastavení filtru šumu Link | N/A, použit přístroj na R&D |

Tabulka 60. Vyhodnocení testů způsobilosti (kolona USHEE01707).

| | | Výsledek | Limit | Hodnocení |
|---------------------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|
| RT_{CsA} | | 36,0 | 32 - 43 min. | Vyhovuje |
| RRT_{ISOA} | | 0,61 | 0,55 – 0,80 | Vyhovuje |
| Test rozlišení | $p/V_{(CsU/CsA)}$ | 9,6 | $\geq 2,0$ | Vyhovuje |
| | $p/V_{(CsV/CsH)}$ | 8,3 | <1,5; 10,0> | Vyhovuje |
| Test citlivosti | S/N | 158 | ≥ 140 | Vyhovuje |
| Účinnost | N | 71539 | ≥ 40000 | Vyhovuje |
| USPtailing | | 1,1 | $\leq 1,5$ | Vyhovuje |
| Kalibrace | d_{CAL} | 0 | ≤ 6 | Vyhovuje |

Obrázek 52. Chromatogram modelové směsi (kolona SN USHEE01707).



Tabulka 61. Výsledky obsahů nečistot při změnách kolony.

| | RRT 0,89 | [Abu ⁵]Cs | CsU | H ₂ CsA | CsV | CsH | RRT 1,18 | CsD |
|---|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | [%; w/wCsA] | | | | | | | |
| Kolona SN USHEE1650 (šarže stacionární fáze B11314) | | | | | | | | |
| 1 | 0,0719 | 0,0812 | 0,1163 | 0,1379 | 0,1136 | 0,0882 | 0,0934 | 0,1378 |
| 2 | 0,0809 | 0,0841 | 0,1208 | 0,1441 | 0,1157 | 0,0926 | 0,0926 | 0,1356 |
| Průměr | 0,0764 | 0,0827 | 0,1186 | 0,1410 | 0,1147 | 0,0904 | 0,0930 | 0,1367 |
| Δ (%) | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 9,2 | 4,7 | 19,9 | 10,6 | 9,6 | 2,7 | 4,5 | 8,5 |
| Kolona SN USHEE1707 (šarže stacionární fáze B12212) | | | | | | | | |
| 1 | 0,0790 | 0,0887 | 0,0964 | 0,1294 | 0,1369 | 0,0967 | 0,0984 | 0,1333 |
| 2 | 0,0778 | 0,0900 | 0,1044 | 0,1265 | 0,1428 | 0,0990 | 0,0923 | 0,1327 |
| Průměr | 0,0784 | 0,0894 | 0,1004 | 0,1280 | 0,1399 | 0,0979 | 0,0954 | 0,1330 |
| Δ (%) | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| Reference | 0,0838 | 0,0867 | 0,0971 | 0,1268 | 0,1262 | 0,0929 | 0,0889 | 0,1255 |
| Rel.dif.(%) | 6,6 | 3,1 | 3,3 | 0,9 | 10,3 | 5,2 | 7,0 | 5,8 |

Diskuze:

Bylo prokázáno, že metoda je robustní i ke změnám kolony. Všechny tři kolony, které byly během ověření robustnosti metody použity, se liší jak šarží stacionární fáze, tak mírou opotřebení. Obsah TFA v mobilní fázi musel být pro každou kolonu rozdílný aby vyhověl test způsobilosti RRT isocyclosporinu A. Tato problematika je blíže popsána v kapitole 5.2.10.

6 ZÁVĚR

Podařilo se splnit cíle této diplomové práce. Byla vyvinuta metoda pro stanovení doprovodných látek v lékových formách na bázi cyklosporinu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík. Vývoj metody zahrnuje optimalizaci termostatování chromatografické kolony, screening chromatografických kolon (do screeningu byly zahrnuty především moderní typy kolon s velikostí částic pod 2 μm), optimalizací gradientové eluce s modifikátorem selektivity *tert*-butyl methyl etherem na vybrané koloně a optimalizaci obsahu kyseliny trifluoroctové pro kontrolu eluce isocyklosporinu A (ten není metodou stanovován, jeho obsah ale poskytuje metoda s UV detekcí používaná pro stanovení hlavní složky – cyklosporinu A. U vyvinuté metody byly ověřeny její klíčové parametry- specifická, linearita, citlivost, správnost, přesnost a robustnost. Rozsah ověření metody prokazuje její validovatelnost. Součástí diplomové práce je i detailní popis vyvinuté analytické metody, který zahrnuje veškeré potřebné informace pro bezproblémové rutinní použití. Popis této metody lze bez větších změn převést do rutinního testování lékových forem na bázi cyklosporinu, kde může nahradit stávající metodu s chemiluminiscenční detekcí, kterou předčí v několika parametrech, jak je uvedeno v tabulce 62.

Tabulka 62. Porovnání metod s chemiluminiscenční detekcí.

| Parametr | Nová metoda | Původní metoda |
|--|---|---|
| Kolonový termostat | Softwarově ovládaný horkovzdušný termostat | Kolonový termostat plněný glycerinem, bez možnosti softwarového ovládání |
| Chromatografická kolona | Použita jedna kolona s velikostí částic 1,8 μm | Použity dvě kolony naplněny stacionární fází s velikostí částic 3 μm |
| Křížová kontaminace přes jehlu autosampleru | Použití vybraného druhu uzávěru vialek a ethanolu jako diluentu zabránilo křížové kontaminaci | Nutnost aplikovat speciální promývací proceduru před každou kalibrací. |
| Diluent | Ethanol- kompatibilní se všemi lékovými formami | Směs acetonu, TBME a vody- Vzorek Neoralu zpravidla po jednom dni stání v autosampleru gelovatí |
| Časové nároky na analýzu | Analýza jedné šarže včetně testu způsobilosti | |
| | 8 hodin | 25 hodin |
| | Analýza čtyř šarží včetně testu způsobilosti | |
| | 14 hodin | 50 hodin |
| | Analýza sedmi šarží včetně testu způsobilosti | |
| 27 hodin | 73 hodin | |

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Nováková L., Douša M. a kolektiv, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Praha 2013, ISBN 978-80-260-4243-3
- [2] Nováková L., Douša M. a kolektiv, Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., Praha 2013, ISBN 978-80-260-4244-0
- [3] Klimeš J. a kolektiv, Kontrola léčiv II, nakladatelství Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0818-9
- [4] Klouda P., Moderní analytické metody, 1. vydání, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 1996, ISBN 80-902155-0-5
- [5] Katzung B. G., Základní a klinická farmakologie, nakladatelství H&H Praha 1994, ISBN 80-85787-35-0
- [6] McMurry J., Organická chemie, nakladatelství VITIUM Brno 2007, ISBN 978-80-214-3291-8
- [7] AISLP, mikro-verze 2009.3.CD ROM. Praha : Aura-Pont, 2010.
- [8] Český lékopis 2009 (1. - 3. díl). Praha : Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [9] F. N. Bonifacio, M. Giocantib, J.P. Reyniera, Lacarelle, A. Nicolay, Development and validation of HPLC method for the determination of Cyclosporin A and its impurities in Neoral® capsules and its generic versions, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2009) 540–546.
- [10] Manish Kumar, Sushil K. Singhal, Amarjit Singh, Development and validation of a stability indicating HPLC assay method for cyclosporine in cyclosporine oral solution USP, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 25 (2001) 9–14
- [11] Aleš Husek, High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A and its oral solutions, Journal of Chromatography A, 759 (1997) 217-224
- [12] Gotti, Roberto, Furlanetto, Sandra, Santagati, Natale Alfredo, Analysis of Cyclosporin A and Main Degradation Impurities by Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography, Analytical Letters (2012), 45(7), 665-676.
- [13] Validační program pro statistické zpracování analytických dat [online]. [cit. 27.9.2014]. Dostupné z WWW:
< http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_1._Druhy_validací>
- [14] Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [online]. [cit. 22.12.2014]. Dostupné z WWW:
<<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>>

- [15] Ciclosporin [online]. [cit. 27.11.2014]. Dostupné z WWW:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Ciclosporin>>
- [16] Český lékopis 1997 [online]. [cit. 27.11.2014]. Dostupné z WWW:
<<http://www.lekopis.cz/>>
- [17] Samostatný projekt RP-HPLC Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi [online]. [cit. 28.11.2014]. Dostupné z WWW:<http://is.muni.cz/th/195604/prif_b/Samostatny_projekt_HPLC.pdf>
- [18] United States Pharmacopeia-National Formulary, USP38-NF 33, Rockville, 2015.
- [19] Mařha V. a kolektiv, Cyklosporin A, nakladatelství Grada Publishing Praha 1994, ISBN 80-7169-134-8
- [20] European Pharmacopoeia, Ciclosporin Monograph no. 07/2012:0994, 8th ed., EDQM, Strasbourg.
- [21] Ing. Pavel Blatný Ph.D. osobní sdělení.
- [22] Takashi Nishikawa, Hideyo Hasumi, Satomi Suzuki, Hiroaki Kubo, Hideki Ohtami, Kinetic Analysis of Molecular interconversion of Immunosuppressant FK506 by High-Performance Liquid Chromatography, *Pharmaceutical Research*, Vol. 10, No. 12, 1993
- [23] Cuiru Zhu, David M. Goodall, Stephen A.C. Wren, Elevated Temperature HPLC: Principles and Applications to Small Molecules and Biomolecules, *LCGC ASIA PACIFIC* Vol. 8, No. 1, March 2005
- [24] Dario Cattaneo, Norberto Perico and Giuseppe Remuzzi, Generic cyclosporine formulations: more open questions than answers, *Transplant International* 18 (2005) 371–378 © 2005 European Society for Organ Transplantation
- [25] Andryšek Tomáš, Excipients and their role in absorption: Influencing bioavailability of cyclosporine by triglycerides and polyglycerol esters, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, 150(2):227–233.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Zbyněk Mrůzek

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc

Konzultant diplomové práce: Ing. Pavel Blatný, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení doprovodných látek v lékových formách na bázi cyklosporinu metodou HPLC s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík.

V této práci je popsán vývoj HPLC metody s chemiluminiscenční detekcí specifickou pro dusík, stanovující doprovodné látky v lékových formách cyklosporinu. Tato metoda je schopna stanovit nečistoty cyklosporinu a rozkladné produkty kromě isocyklosporinů.

Metoda využívá stacionární fázi Zorbax SB-C18, velikost částic 1,8 μm , 150x2.1 mm a gradientovou eluci při průtoku 0,15 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplotě kolony 100 °C. Mobilní fáze jsou Aceton: TBME: voda: TFA (30: 5,5: 64,5: 0,01) a Aceton: TBME: voda: TFA (49: 5,5: 45,5: 0,01).

Práce zahrnuje ověření validovatelnosti metody, z pohledu specifity, linearity, limitu kvantifikace, přesnosti, správnosti a robustnosti tak, aby mohla sloužit k rutinnímu stanovení ve farmaceutickém průmyslu. Tato metoda může být použita pro stanovení nečistot cyklosporinu ve finálních lékových formách v laboratořích kontroly kvality.

Klíčová slova: cyklosporin, cyklosporin A, doprovodné látky cyklosporinu, degradační produkty cyklosporinu, chemiluminiscenční detektor, dusíkový detektor

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Zbyněk Mrůzek

Supervisor: prof. RNDr. Jiří Klimeš. CSc

Consultant thesis: Ing. Pavel Blatný. Ph.D.

Title of thesis: Determination of related substances in the dosage forms based on cyclosporine by HPLC with nitrogen specific chemiluminescence detection.

Development of an HPLC method with chemiluminescent detection specific for nitrogen for related substances determination in cyclosporine final dosage forms is described in this work. The method is capable to determine cyclosporine impurities originated from cyclosporine substance and relevant degradation products except isocyclosporines.

The method utilizes the stationary phase Zorbax SB-C18, particle size 1.8 μm , 150x2.1 mm and gradient elution at flow rate 0.15 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ at column temperature 100°C. Mobile phases are Acetone: TBME: water: TFA (30: 5.5: 64.5: 0.01) and Acetone: TBME: water: TFA (49: 5.5: 45.5: 0.01).

The work includes the verification of method validity in terms of specificity, linearity, limit of quantitation, accuracy, precision and robustness. The method can be used for determination of cyclosporine impurities in final dosage forms in pharmaceutical QC laboratories.

Keywords: cyclosporine. Cyclosporine A. cyclosporine related substances. cyclosporine degradation compounds. chemiluminescent detector. nitrogen detector.