

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Jiří Vojta

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

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

Disertační práce

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

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, 1. 7. 2015

Podpis

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

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

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

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

Poděkování:

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

Předmětová hesla:

Analytická chemie, separační metody, farmaceutická analýza

Klíčová slova:

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

Subject words:

Analytical chemistry, separation science, pharmaceutical analysis

Key words:

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

Abstrakt (CZ)

V rámci první části této práce byly vyvinuty analytické metody pro stanovení nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích. Vývoj metod zahrnoval optimalizaci přípravy vzorků i jejich chromatografického stanovení. Metody byly zvalidovány dle platné mezinárodní směrnice International Conference on Harmonization (ICH) a byla potvrzena jejich aplikovatelnost pro stanovení nečistot ve stabilitních vzorcích léčivých přípravků. Nečistoty paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu v přítomnosti čtvrté účinné látky fempiverin bromidu byly separovány iontově párovou reverzní chromatografií s gradientovou elucí. Byla použita kolona Symmetry C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 μm vyhřátá na teplotu 35 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 220 nm pro nečistotu K paracetamolu, 245 nm pro paracetamol a jeho ostatní nečistoty a 285 nm pro kodein, pitofenon a jejich nečistoty. Pro separaci a stanovení nečistot valsartanu, amlodipin besilátu a hydrochlorothiazidu byla vyvinuta UHPLC metoda v reverzním chromatografickém módu s gradientovou elucí. Byla použita kolona Zorbax Eclipse C₈ RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm vyhřátá na teplotu 30 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 225 nm pro valsartan, jeho nečistoty a nečistotu D amlodipin besilátu, 360 nm a 271 nm pro amlodipin, respektive hydrochlorothiazid a jejich nečistoty.

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

Abstract (EN)

In the first part of this work, analytical methods for determination of impurities of active pharmaceutical ingredients (API) in combined pharmaceutical dosage forms were developed and validated. Development of the methods covered both the optimization of sample preparation procedure and chromatographic conditions. The methods were validated according to International Conference on Harmonization guideline and both of them were confirmed to be able to analyze stability samples. Impurities in paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride in the presence of fourth API fenpiverinium bromide were separated by using ion-pair reversed phase chromatography with gradient elution. Symmetry C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 μm heated to 35 °C was used as a separation column. A diode array detector was used. The detection wavelengths were set as follows: 220 nm for paracetamol impurity K, 245 nm for paracetamol and its other impurities and 285 nm for codeine, pitophenone and their impurities. Impurities in valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide were separated by reversed phase UHPLC method with gradient elution. Chromatographic column Zorbax Eclipse C₈ RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm heated to 30 °C and spectrophotometric detection were used. The detection wavelengths were set as follows: 225 nm for valsartan, its impurities and for impurity D of amlodipine besylate, 360 nm and 271 nm for amlodipine, respectively hydrochlorothiazide and their impurities.

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

Obsah

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

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

Seznam zkratek a symbolů

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

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

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

Cíle práce

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

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

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

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

1. Stanovení obsahu nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích

1.1 Teoretický úvod

1.1.1 HPLC a UHPLC ve farmaceutické analýze

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

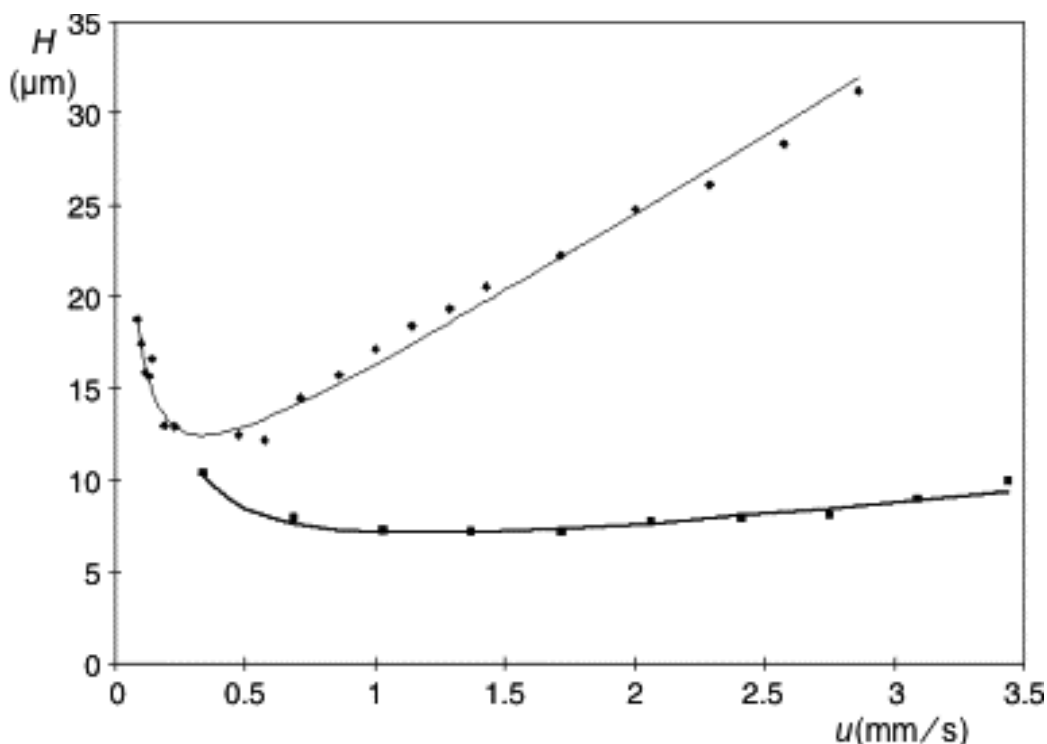
Technologický vývoj LC prakticky kopíruje neustálou snahu o dosažení vyšší separační účinnosti při kratším čase analýzy. Z van Deemterovy rovnice (1) ve zjednodušeném tvaru [3] je patrné, že zvýšení účinnosti separačního systému lze dosáhnout snížením velikosti částic a optimalizací lineární průtokové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

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

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

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

analýzy nedochází k výrazné ztrátě účinnosti jako u HPLC. Tato vlastnost se dle rovnice (1) projevuje u částic menších než 2,5 μm [4].



Obr. 1 Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti (u) pro analýzu propranololu (0,025 mg/mL) za podmínek HPLC (diamanty): kolona Hypersil Advance 150 x 4,6 mm, 5 μm , mobilní fáze: 25 % acetonitrilu a 75 % vodného 50mmol/L octanamonného pufru o pH 4 a za podmínek UHPLC (čtverce): kolona Acquity BEH C₁₈ 100 x 2,1 mm, 1,7 μm , mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % vodného 10mM octanamonného pufru o pH 4. Převzato z [3].

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

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

kde ΔP je tlakový spád, l délka kolny, η viskozita mobilní fáze, Φ faktor odporu kolony, u a d_P mají stejný význam jako v rovnici (1).

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

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

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

V roce 2004 společnost Waters představila první komerční UHPLC systém Acquity UPLC®. Základem systému bylo binární čerpadlo s vysokotlakým gradientem, inovativní injektor, kolonový termostat s aktivním předehřevem mobilní fáze a spektrofotometrický detektor. Systém byl optimalizovaný pro analýzy při tlaku 1000 barů. Současně byly uvedeny nové UHPLC stacionární fáze z porézních částic o průměru 1,7 μm . Částice byly vyrobeny ze silikagelu, jehož vnitřní struktura byla modifikována ethylenovými můstky (BEH technologie™). Acquity UPLC BEH C₁₈ separační kolony tedy byly dostatečně mechanicky odolné a zároveň stabilní v rozsahu hodnot pH mobilní fáze 1 - 12 [11, 12]. Stacionární fáze byla naplněna do kolon o průměru 2,1 mm, u kterých frikční teplo nemá významný vliv na separační účinnost [13]. Vysoký tlak a frikční teplo však mají vzájemně opačné efekty na retenci analytů v reverzní chromatografii a chromatografické systémy tedy musí být schopny udržovat konstantní podmínky separace i za podmínek UHPLC [13, 14].

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

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

Parametr	HPLC	UHPLC
maximální tlak (bar)	345	1034
průtok (mL/min)	0,5 - 2,0	0,2 - 0,5
rozměr kolony (mm)	250 x 4,6	100 x 2,1
průměr částic (μm)	2,7 ^a - 5,0	1,6 ^a - 1,8
objem nástřiku (μL)	5 - 100	1 - 10
minimální objem vzorku pro nástřik (μL)	650	360
mrtvý objem systému (μL)	900	350
objem detekční cely (μL)	8,4	0,5
frekvence sběru dat (Hz)	1 - 2	10 - 40

^a částice s pevným jádrem

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

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

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

1.1.2 Stanovení obsahu nečistot v léčivých přípravcích

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

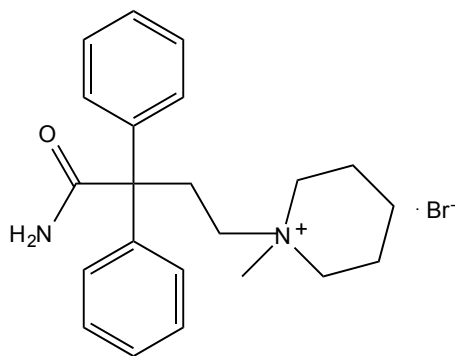
1.1.3 Stanovení obsahu nečistot ve Spasmopanu®

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

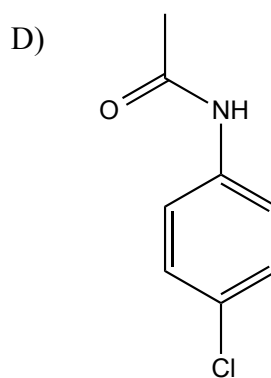
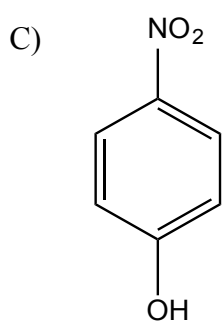
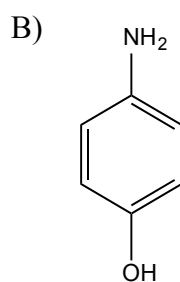
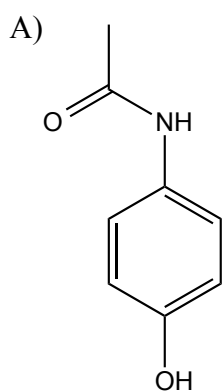
Paracetamol je obecně používán ve vysokých dávkách a může být hepatotoxický [60]. Lékopisné limity pro jeho nečistoty 4-aminofenol, 4-nitrofenol a 4-chloracetanilid jsou tedy velmi nízké (0,005 %, 0,05 % a 0,001 %) [36 - 40]. V lékových formách musí být kontrolován především obsah nefrotoxického 4-aminofenolu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

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

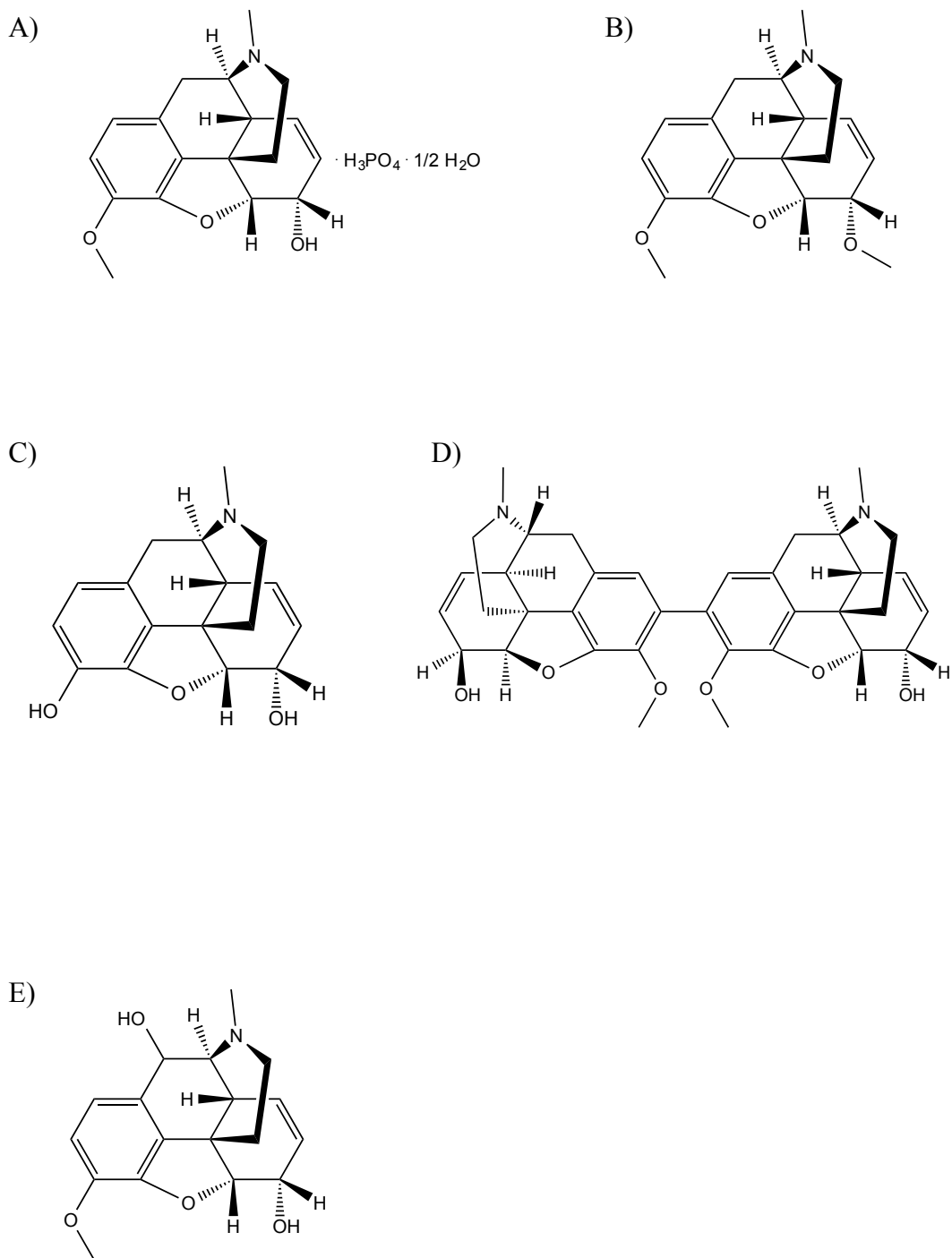
Přestože Spasmopan[®] je dostupný na trhu od roku 1987, metoda na stanovení obsahu nečistot podle současné legislativy musela být vyvinuta a validována [97]. Struktury všech API a nečistot paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu jsou znázorněny na obrázcích 2 až 5. Nečistoty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



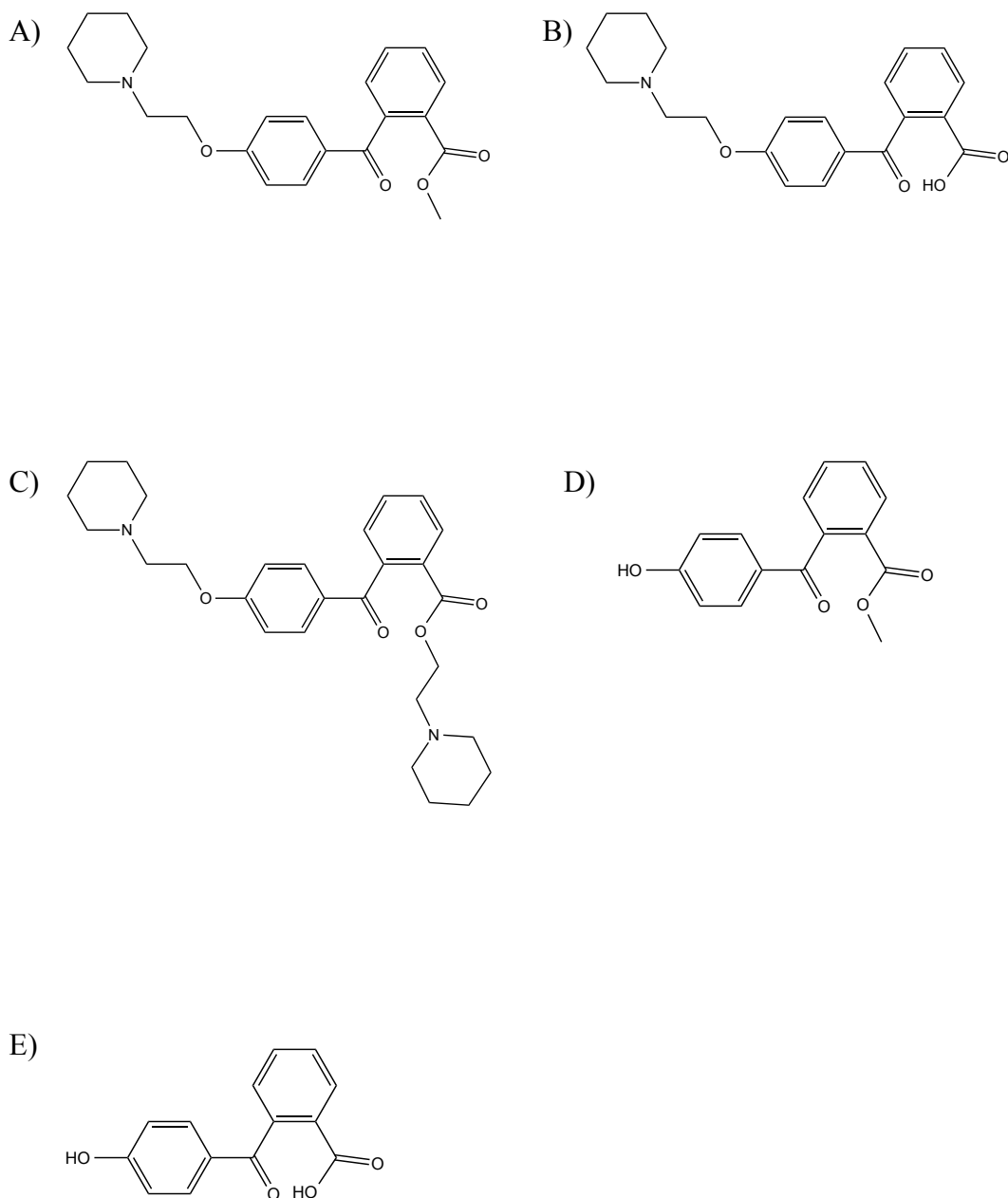
Obr. 2 *Struktura fenpiverin bromidu*



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



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



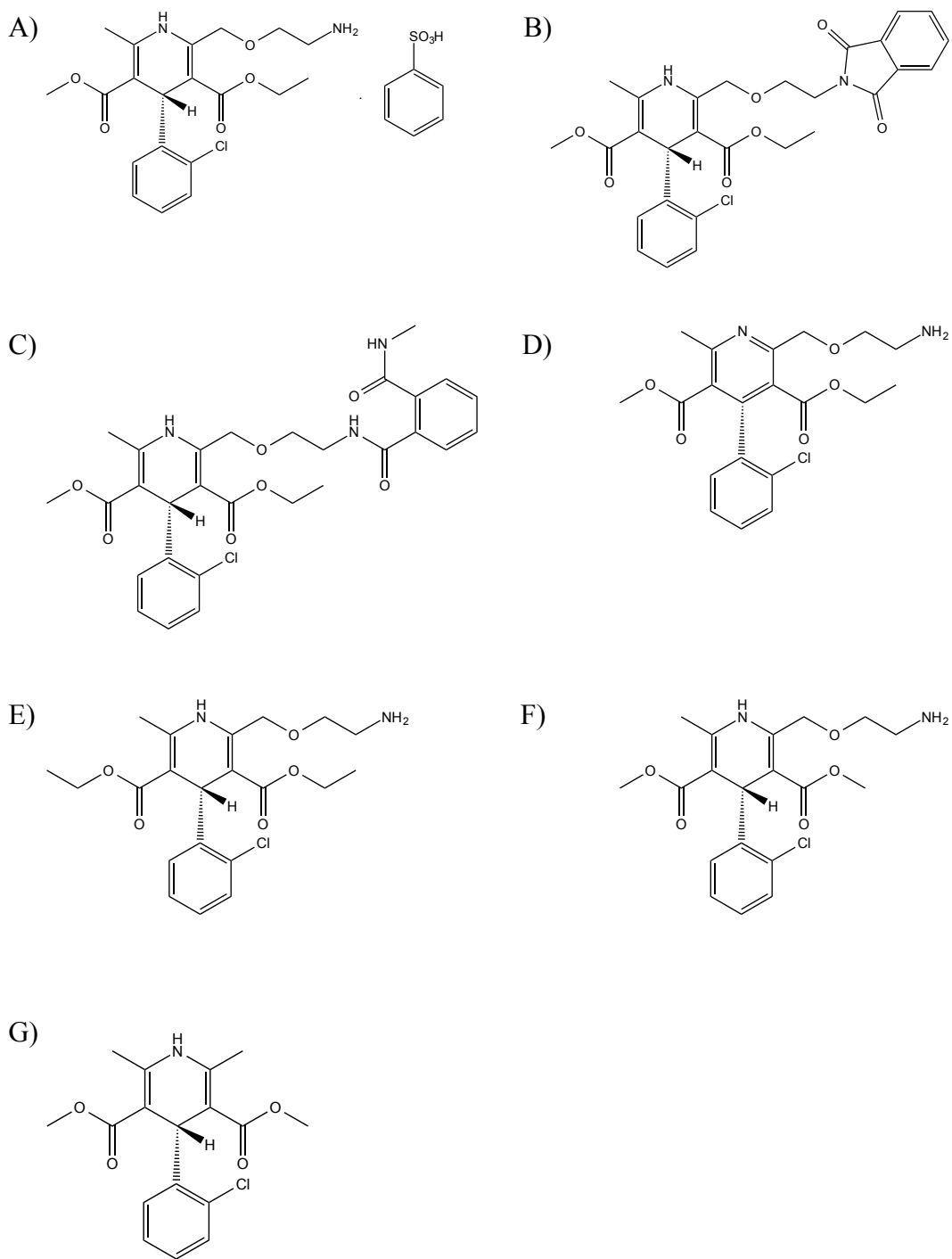
Obr. 5 *Struktury pitofenonu a jeho nečistot. A) pitofenon: methyl ester 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl] benzoové kyseliny, B) nečistota X: 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl] benzoová kyselina, C) nečistota PEE: 2-(1-piperidinyl)-ethyl ester 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl]benzoové kyseliny,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

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

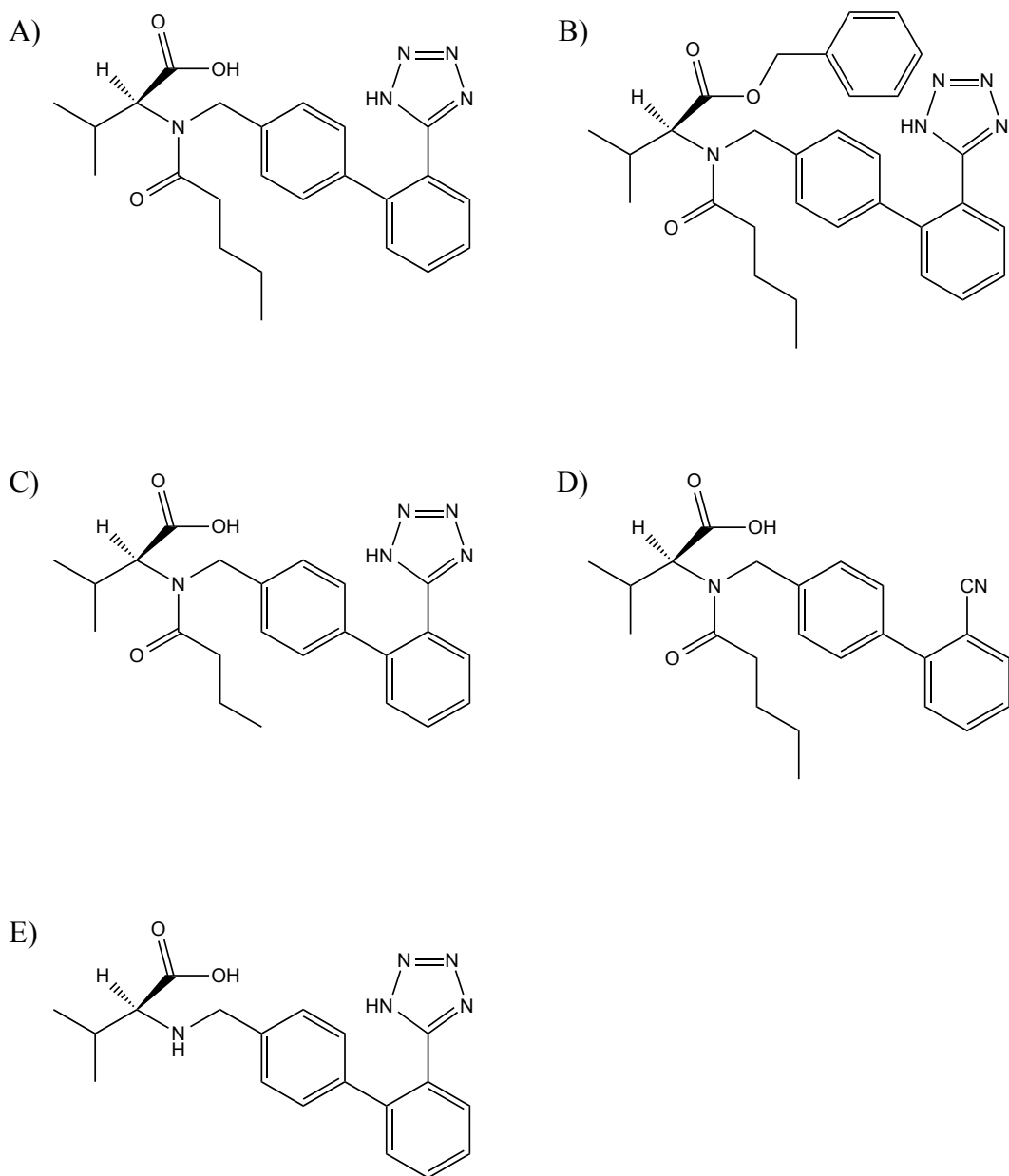
Vysoký krevní tlak je jedním z globálních zdravotních problémů dnešní doby. Je klíčovým faktorem způsobujícím infarkt myokardu a mozkovou mrtvici, a nepřímo tak způsobuje úmrtí 9,4 milionu lidí ročně po celém světě [98]. U většiny pacientů léčba kombinující více přístupů ke snížení hypertenze přináší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

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

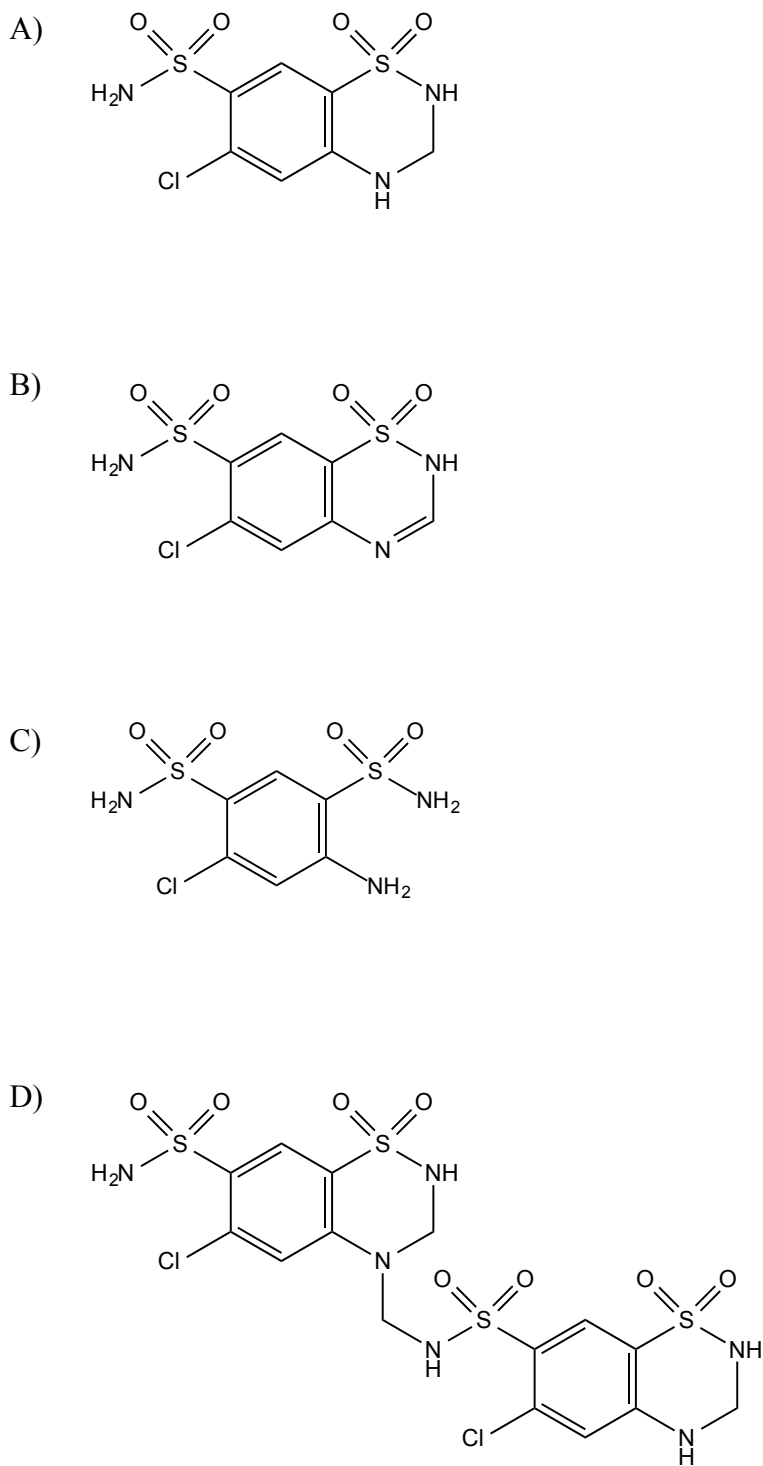
Pro léčivé přípravky kombinující valsartan, amlodipin a hydrochlorothiazid byly dosud publikovány pouze HPLC metody na stanovení obsahu účinných látek [129]. Retenční pořadí těchto tří API v reverzní chromatografii závisí na pH pufru v mobilní fázi. V silně kyselém pH hydrochlorothiazid eluuje jako první,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



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



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

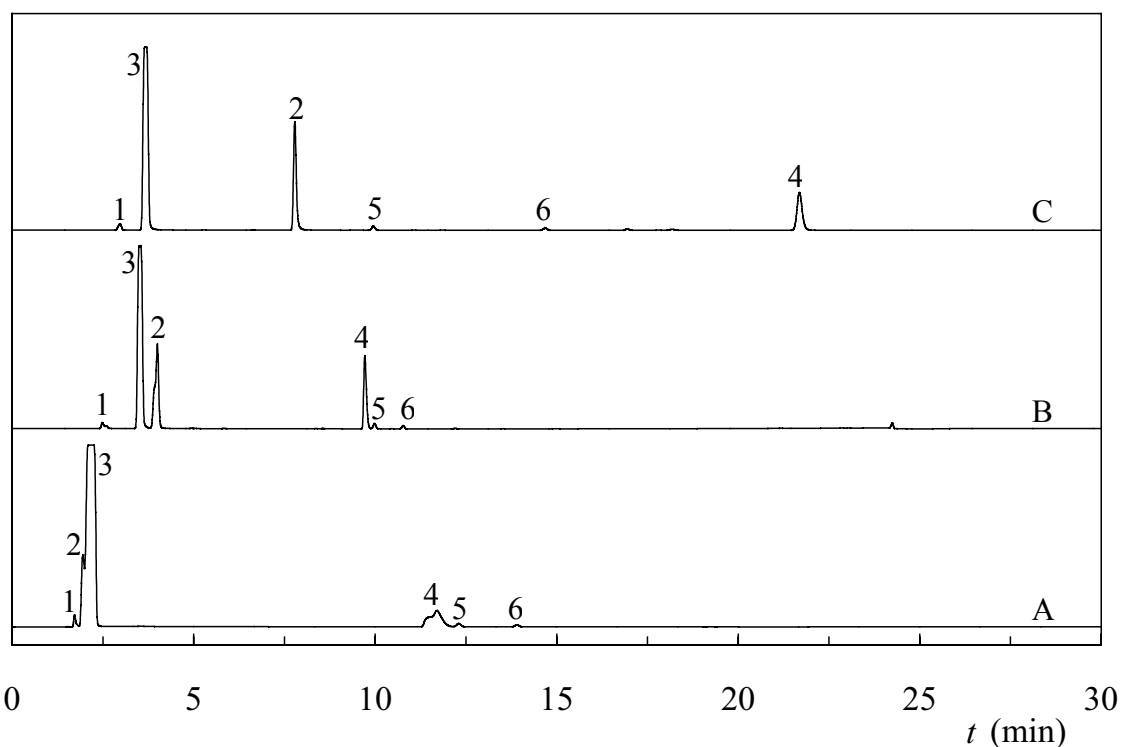


Obr. 8 *Struktury hydrochlorothiazidu a jeho nečistot dle Ph. Eur. [37].
A) hydrochlorothiazid, B) nečistota A, C) nečistota B, D) nečistota C.*

1.2 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci I

1.2.1 Data a komentář k vývoji RP-HPLC metody

Prvním cílem pro separaci API a nečistot ve Spasmopanu[®] byl vývoj RP-HPLC metody založené na porézních částicích o průměru 3 μm nebo 2,7 μm částicích s pevným jádrem. Zvolené stacionární fáze s nižším zrněním než 5 μm umožnily použití 150mm a 100mm kolon, a tedy vývoj rychlých a přitom dostatečně účinných metod. Vývoj UHPLC metody nebyl realizován z důvodu přístrojového vybavení cílové laboratoře kontroly kvality a potenciálního ucpávání UHPLC kolon zbytkovými složkami placebo. Vzhledem k polaritě paracetamolu, kodeinu a jejich nečistot jsou lékopisné metody založeny na iontově párové chromatografii [37, 38]. Iniciační experimenty v chromatografickém módu RP-HPLC tedy byly zaměřeny na orientační testování kolon a hodnot pH při sledování retence zejména kodeinu, paracetamolu a jeho nečistot. Na obrázku 9 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami v 50% acetonitrilu (viz kapitola 1.2.3) na koloně ACE 3 (C₁₈), 150 x 4,6 mm, velikost částic 3 μm (Advanced chromatography technologies; Aberdeen, Skotsko), při použití 10mmol/L fosforečnanového pufru o hodnotách pH 3,0, 5,5 a 7,0. Vzhledem k předpokládané slabé retenci polárních látek byl zvolen pozvolný gradient začínající na 15 % acetonitrilu (gradient 1) pro hodnoty pH pufru 3,0 a 7,0 a na základě těchto analýz byl gradient zrychlen pro analýzu s puftrem o hodnotě pH 5,5 (gradient 2). Znázorněno je prvních 30 minut měření, během kterých eluovaly všechny cílové analyty. Analýzy byly provedeny na systému Acquity UPLC H-Class (viz Publikace II) převedeného do módu pro měření s HPLC kolonami.



Obr. 9 Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J, a K na hladině 0,1 %. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: ACE 3 (C₁₈) 150 x 4,6 mm, 3 μm. Teplota kolony: 25 °C. Objem nástřiku: 5 μL. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10mmol/L NH₄H₂PO₄/(NH₄)₂HPO₄ pufr o pH 3,0 (A), 5,5 (B) a 7,0 (C). Průtok: 0,8 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)] chromatogramy A, C (gradient 1): 0/15, 8/30, 40/60, 45/60, 46/15, 60/15 a chromatogram B (gradient 2): 0/15, 22/85, 23/15, 30/15. Identifikace píků: 1 - nečistota K, 2 - kodein, 3 - paracetamol, 4 - pitofenon, 5 - nečistota F, 6 - nečistota J.

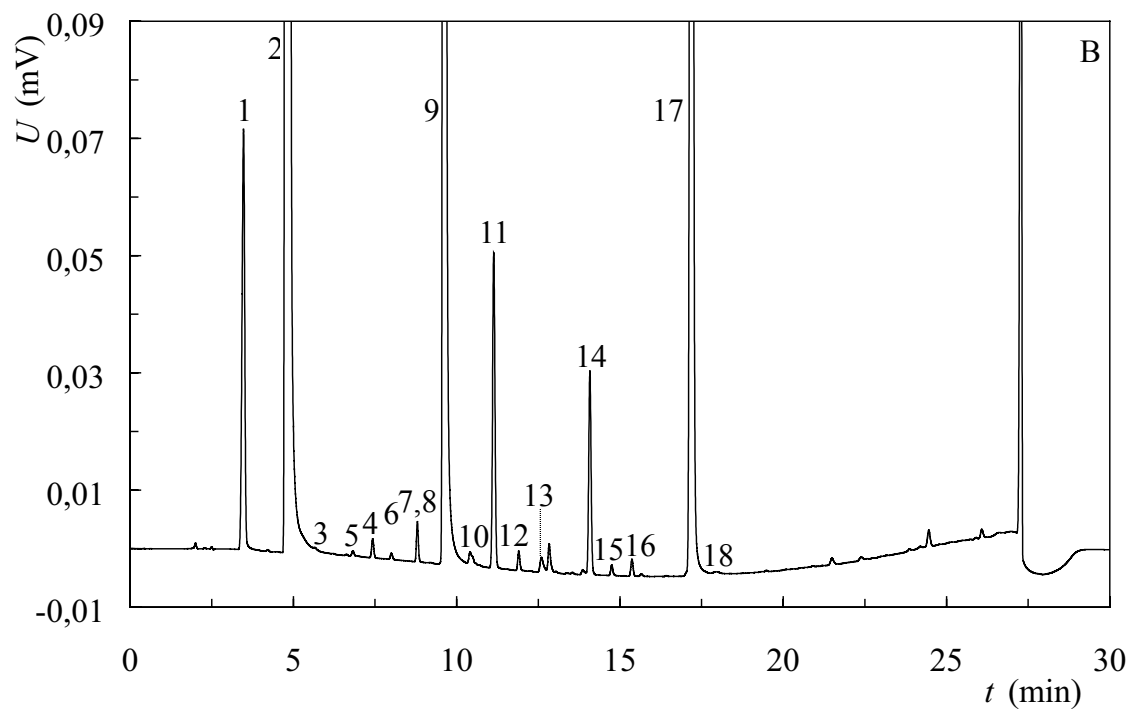
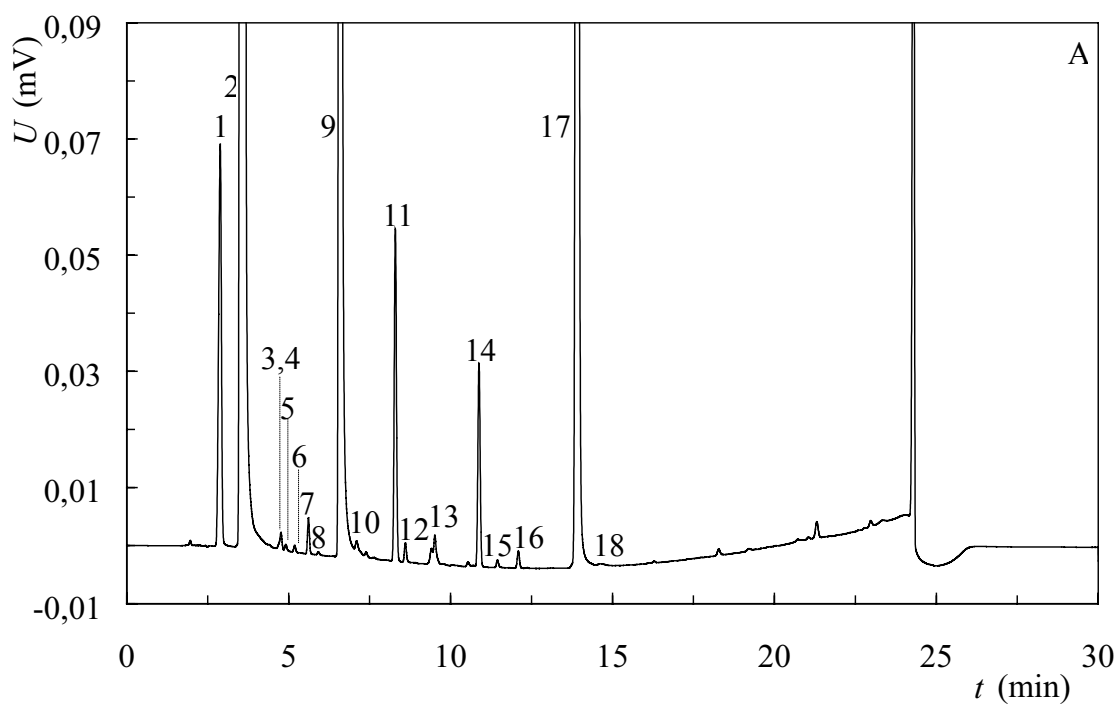
Z obrázku 9 je patrný významný vliv pH pufru především na retenci kodeinu. Při použití pufru o pH 3,0 kodein prakticky koeluoval s paracetamolem, zatímco při pH 7,0 byly všechny API dostatečně odděleny v pořadí paracetamol, kodein a pitofenon. V neutrálním pH rovněž došlo ke změně retenčního pořadí pitofenonu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

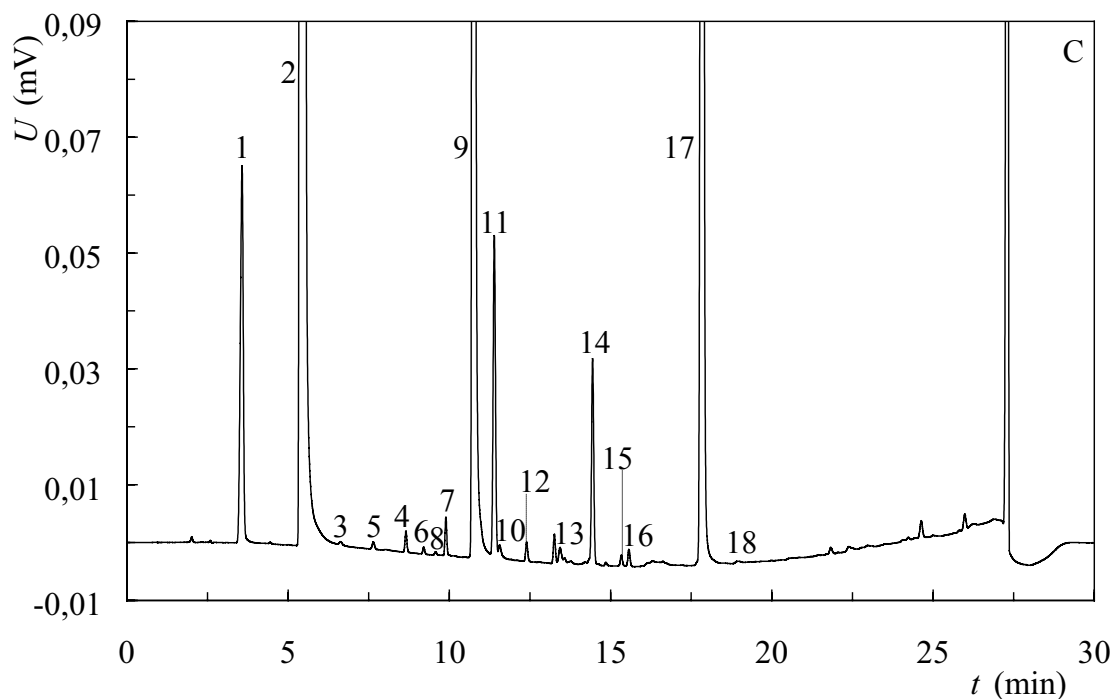
Nejvhodnějšími podmínkami pro další vývoj metody na koloně ACE 3 tedy bylo použití pufru o pH 7,0 a gradientu 2 odpovídajícího chromatogramu B, který významně zkrátí dobu analýzy. Druhou uvažovanou možností bylo použití kolony využívající stacionární fázi s částicemi s pevným jádrem. Byla testována kolona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

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

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

ACE 3 (C₁₈), 150 x 4,6 mm, 3 μm při použití 10mmol/L fosforečnanového pufru o pH 7,0 s gradientovou elucí acetonitrilu, případně methanolu (gradienty 2, 4 a 5).

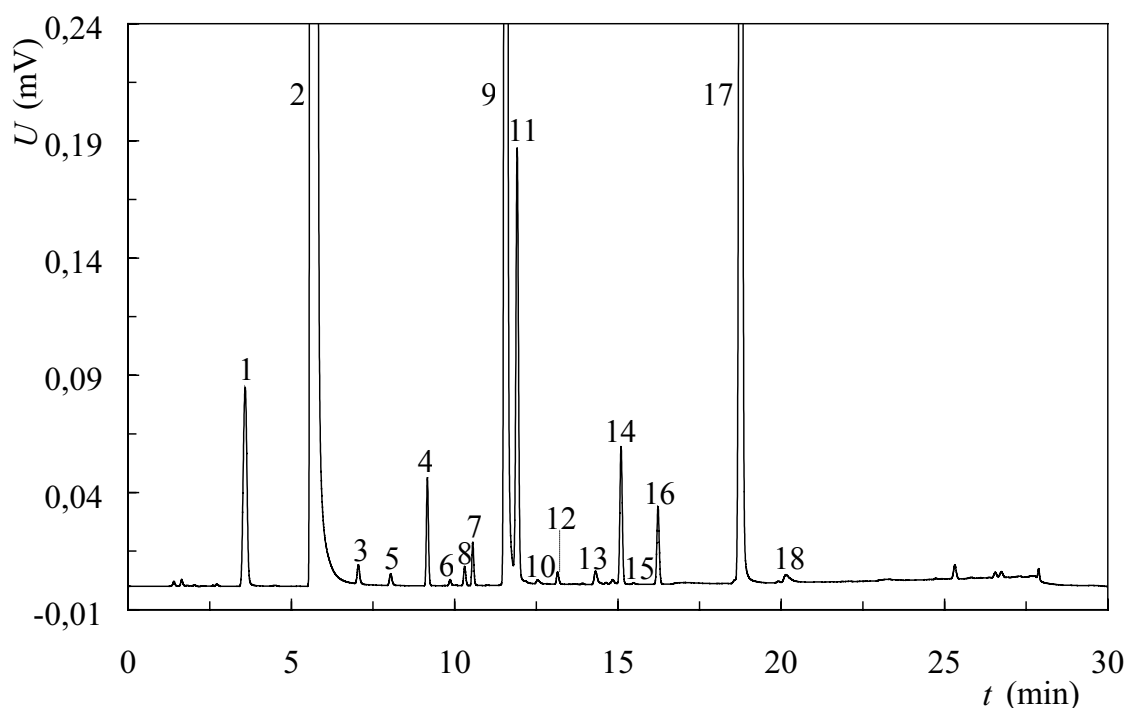




Obr. 10 Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J, K na hladině 0,1 % na systému Waters UPLC H-Class. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: ACE 3 C₁₈ 150 x 4,6 mm, 3 μm. Teplota kolony: 25 °C. Objem nástřiku: 5 μL. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10mmol/L NH₄H₂PO₄/(NH₄)₂HPO₄ pufr o pH 7,0. Průtok: 0,8 mL/min. A) Gradient 2: [t(min)/acetonitril(%)] 0/15, 22/85, 23/15, 30/15. B) Gradient 4:[t(min)/acetonitril(%)] 0/10, 5/20, 25/85, 26/10, 35/10. C) Gradient 5:[t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)] 0/5/5, 5/15/5, 25/85/0, 26/5/5, 35/5/5. Identifikace píků: 1 - nečistota K, 2 - paracetamol, 3, 5, 8 - neznámé nečistoty paracetamolu, 4 - nečistota KHBB, 6 - nečistota E, 7 - nečistota X, 9 - kodein, 10 - nečistota C, 11 - nečistota F, 12 - fempiverin, 13 - nečistota A, 14 - nečistota J, 15 - neznámá nečistota kodeinu, 16 - nečistota MeKHBB, 17 - pitofenon, 18 - nečistota PEE.

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

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



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

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

paracetamolu. V lékové formě by tedy pravděpodobně byla přítomna na hladině nižší než reportovací limit [45] a hraniční rozlišení 1,0 tak bylo akceptovatelné. Nečistota C se pak vydělila od nečistoty F ($R = 1,8$) a separace všech ostatních píků zůstala zachována, jak je znázorněno výše na obrázku 11. Metoda využívající kolonu ACE 3 C₁₈, 150 x 4,6 mm a velikosti částic 3 μm, a gradientovou eluci 10mmol/L fosforečnanového pufru o pH 7,0, acetonitrilu a methanolu (dle programu gradient 5, viz obr. 10) dostatečně separovala všechny zjištěné nečistoty a v další fázi byla testována její robustnost.

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

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

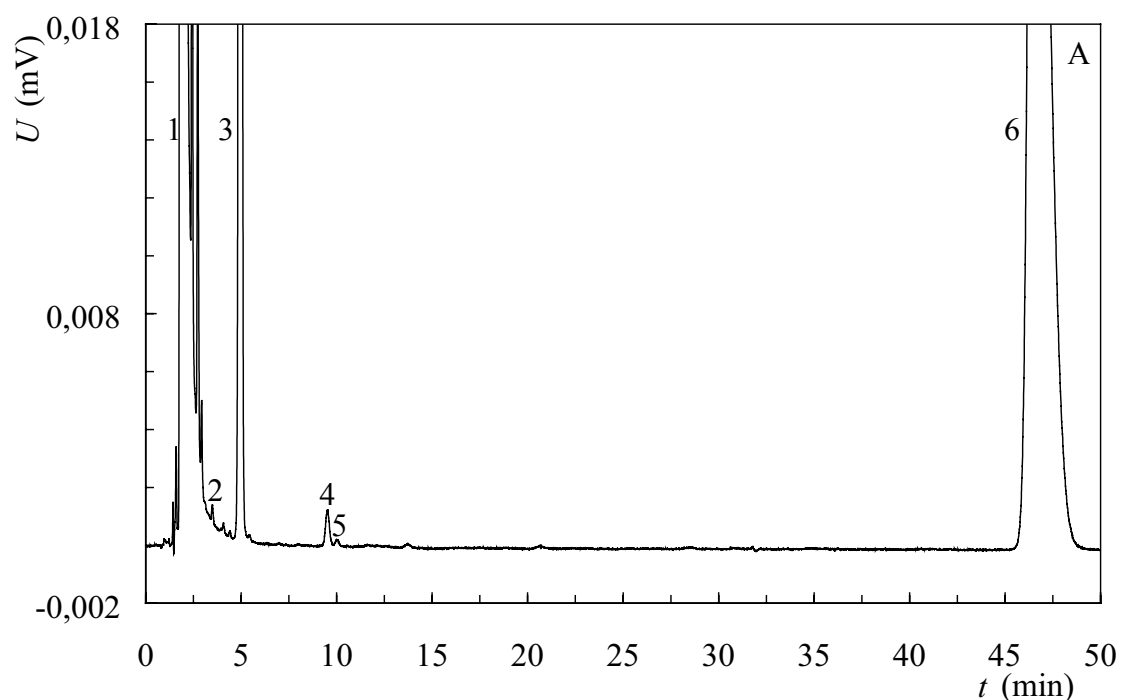
Parametr: (pH; % methanol)	pH 7,0		pH 6,5		pH 6,9		pH 7,2		pH 7,0	
	5 %	7 %	5 %	7 %	5 %	7 %	5 %	7 %	3 %	7 %
nečistota K (1)	3,59	3,59	3,54	3,59	3,59	3,59	3,69	3,69	3,57	3,79
paracetamol (2)	5,63	5,63	5,67	5,70	5,70	5,70	5,81	5,81	5,40	6,25
nezn. nečistota paracetamolu (3)	7,07	7,07	7,68	7,24	7,24	7,24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

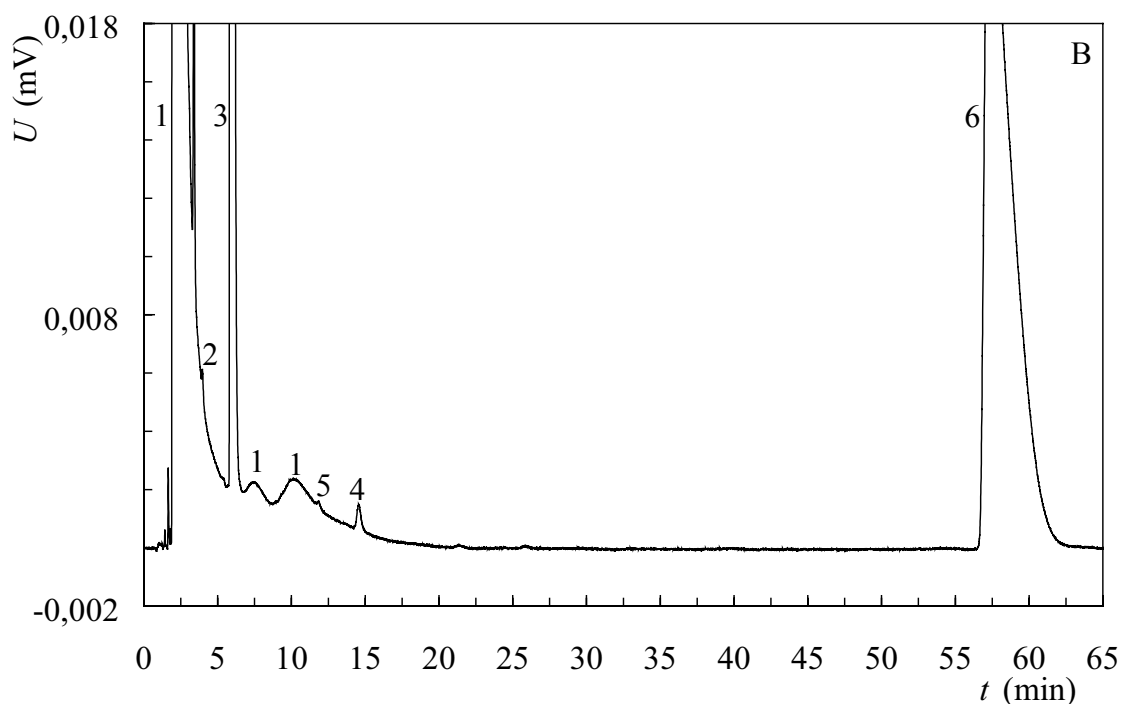
Změna pH pufru o 0,5 na hodnotu 6,5 zapříčinila částečnou koeluci kodeinové nečistoty E s nečistotou KHBB pitofenonu a koeluci nečistoty X pitofenonu a neznámé nečistoty paracetamolu (pík 8, obr. 11) s kodeinem. Dále zapříčinila úplnou změnu retenčního pořadí, jelikož nečistota A kodeinu eluovala před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

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

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

Vzhledem k problematické dostupnosti nečistot kodeinu, jakožto omamné a psychotropní látky, byla aplikace Ph. Eur. metody na stanovení čistoty kodeinu [149] jedním z prvních přístupů pro analýzu Spasmopanu[®]. Metoda je založena na iontové párové chromatografii na koloně se silikagelem modifikovaným řetězcem C₈. Definované relativní retence kodeinových nečistot umožnily jejich identifikaci ve vzorku a posouzení vhodnosti metody pro stanovení čistoty Spasmopanu[®] či případně pouze kodeinu, přičemž nečistoty ostatních dvou API by byly stanoveny jinou metodou. Na obrázku 12 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu[®] v 25% acetonitrilu (viz kapitola 1.2.3) na kolonách Symmetry C₈ a Spherisorb C₈ (obě od Waters; Praha, Česká republika) Ph. Eur. metodou na stanovení obsahu nečistot v kodein fosfát hemihydrátu [149].



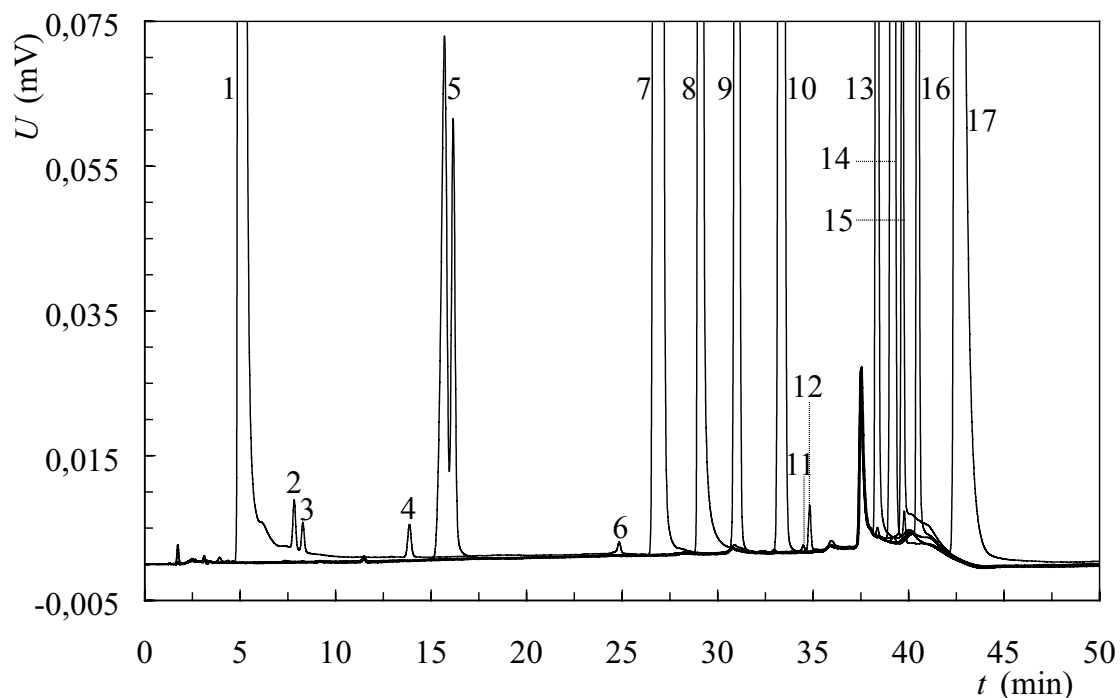


Obr. 12 Analýza vzorku *Spasmopanu*[®] Ph. Eur. metodou na stanovení obsahu nečistot kodeinu. Rozpouštědlo vzorku: 25% acetonitril. Mobilní fáze: oktansulfonát sodný (1,08 g)/kyselina octová (20 mL)/acetonitril (250 mL)/voda (730 mL). Teplota kolony: 25 °C. Průtok: 2,0 mL/min. Detekce: UV, $\lambda = 245$ nm. Objem nástřiku: 15 μ L. A) Kolona Symmetry C₈, 250 x 4,6 mm, 5 μ m. B) Kolona Spherisorb C₈, 250 x 4,6 mm, 5 μ m. Identifikace píků: 1 - paracetamol a jeho neznámé nečistoty, 2 - nečistota E, 3 - kodein, 4 - nečistota C, 5 - nečistota A, 6 - pitofenon.

Z porovnání obou kolon je patrné zejména opačné retenční pořadí nečistot A a C kodeinu. Evropský lékopis předepisuje kolonu Spherisorb C₈ a relativní retenční časy nečistoty A 2,0 a nečistoty C 2,3 [149]. Na této koloně však dochází ke značné deformaci píku paracetamolu a kodein i jeho nečistoty prakticky eluují v jeho zóně. Nečistota E byla integrována ve strmě klesající části eluční křivky, což by mohlo vést k nepřesné a nepřesné kvantifikaci. Metoda neseparuje nečistoty kodeinu B a E a identifikace píku 2 jako nečistoty E byla odvozena zpětně po analýze vzorku finální metodou. Kolona Symmetry C₈ poskytla výrazně lepší separaci kodeinu a jeho nečistot od paracetamolu. V případě nedostupnosti referenčních standardů by však nemohla být použita z důvodu rozdílné selektivity pro nečistoty A a C. Analýza byla provedena i na dalších kolonách stejných parametrů (C₈, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μ m). Kolony Intersil, ZorbaxSB, ZorbaxRX a Luna poskytovaly selektivitu obdobnou koloně

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

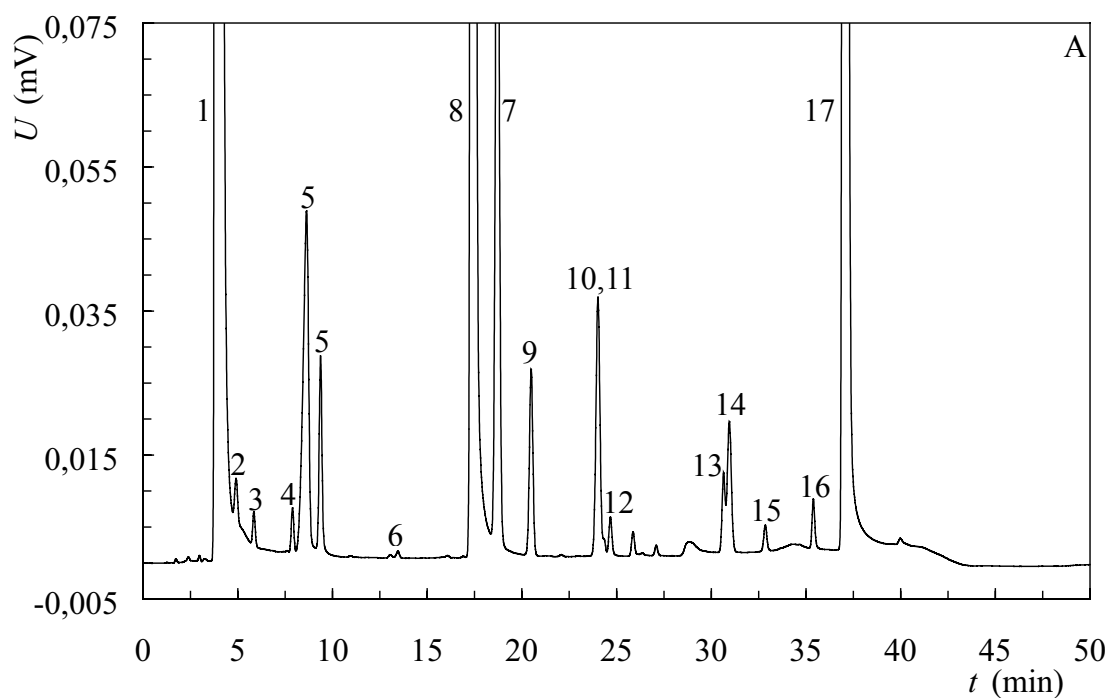
V následující části vývoje již byly dostupné referenční standardy kodeinových nečistot A, C a E. Výchozí podmínky byly převzaty z interní analytické metody na stanovení čistoty léčivého přípravku obsahujícího kodein a paracetamol. Metoda, shodně s výše zmíněnou lékopisnou metodou [149], využívala pro separaci iontové párové činidlo oktansulfonát sodný v kyselém prostředí. Separační kolona však byla Symmetry C₁₈ (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm) při teplotě 35 °C a eluce byla řízena gradientovým programem obsahujícím acetonitril a methanol. Na obrázku 13 jsou znázorněny přeložené chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu® v 50% acetonitrilu a roztoků standardů nečistot paracetamolu a pitofenonu. Píky nečistot kodeinu byly identifikovány na základě validace a tyto nečistoty tedy nemusely být spikovány. Paracetamol zpravidla neobsahoval nečistoty podobně jako kodein, a proto byly jeho nečistoty spikovány, přestože jejich relativní retence byly rovněž známy.

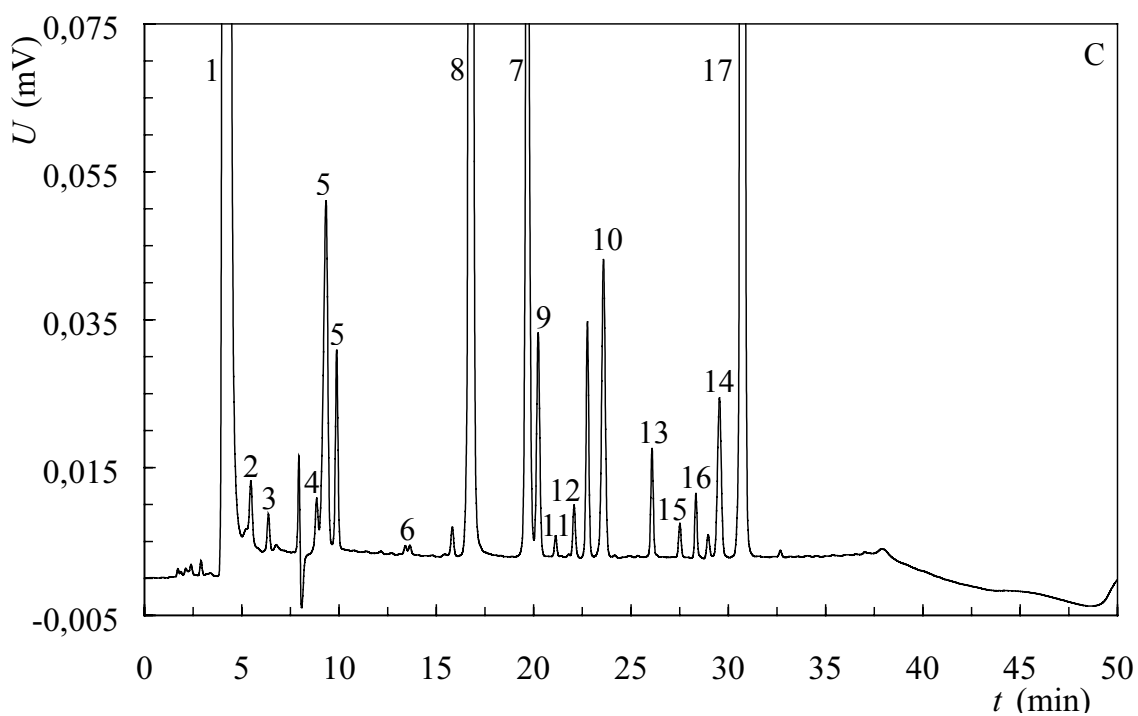
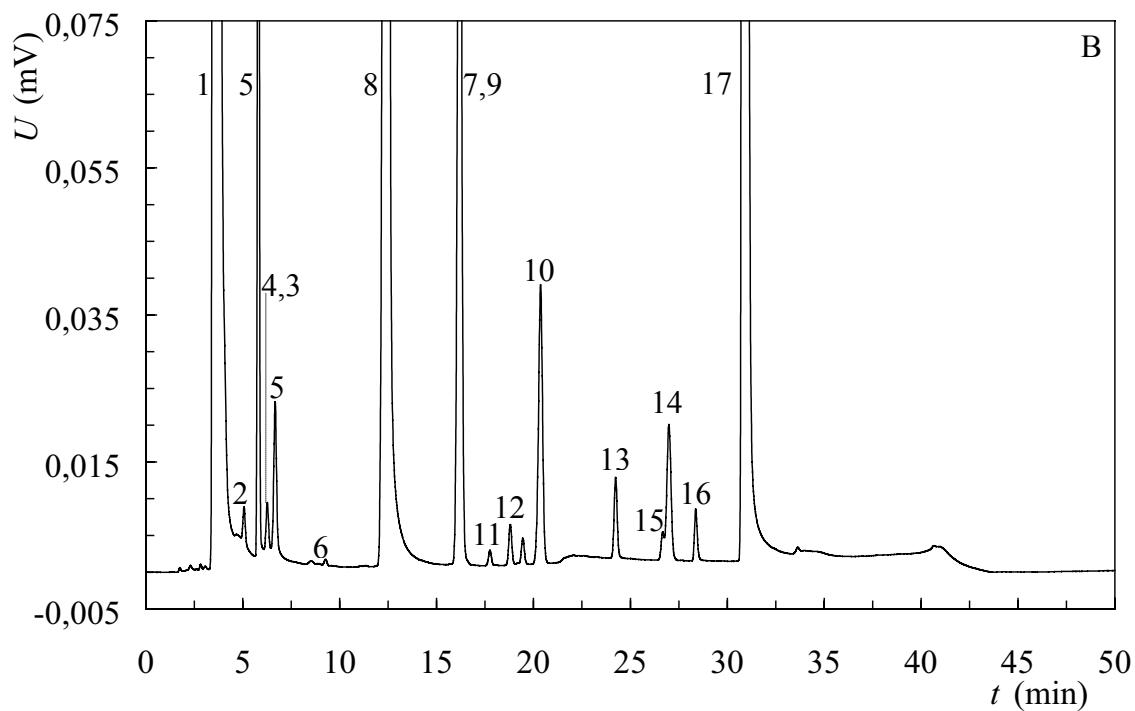


Obr. 13 Přeložené chromatogramy analýz vzorku Spasmopanu[®], referenčních standardů fenpiverinu, nečistot paracetamolu F, J a K a nečistot pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE. Rozpouštědlo vzorků: 50% acetonitril. Kolona: Symmetry C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 μm. Teplota kolony: 35 °C. Objem nástřiku: 10 μL. Detekce: UV, λ = 220 nm. Mobilní fáze: složka A - pufr: oktansulfonát sodný monohydrát (1,44 g/L), pH 2,5 upraveno 85% H₃PO₄; složka B - acetonitril; složka C - methanol. Průtok: 1,0 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. Identifikace píků: 1 - paracetamol, 2, 3, 4 - neznámé nečistoty paracetamolu, 5 - nečistota K, 6 - nečistota E, 7 - nečistota F, 8 - kodein, 9 - nečistota KHBB, 10 - nečistota J, 11 - nečistota C, 12 - nečistota A, 13 - nečistota X, 14 - nečistota MeKHBB, 15 - fenpiverin, 16 - nečistota PEE, 17 - pitofenon.

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

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

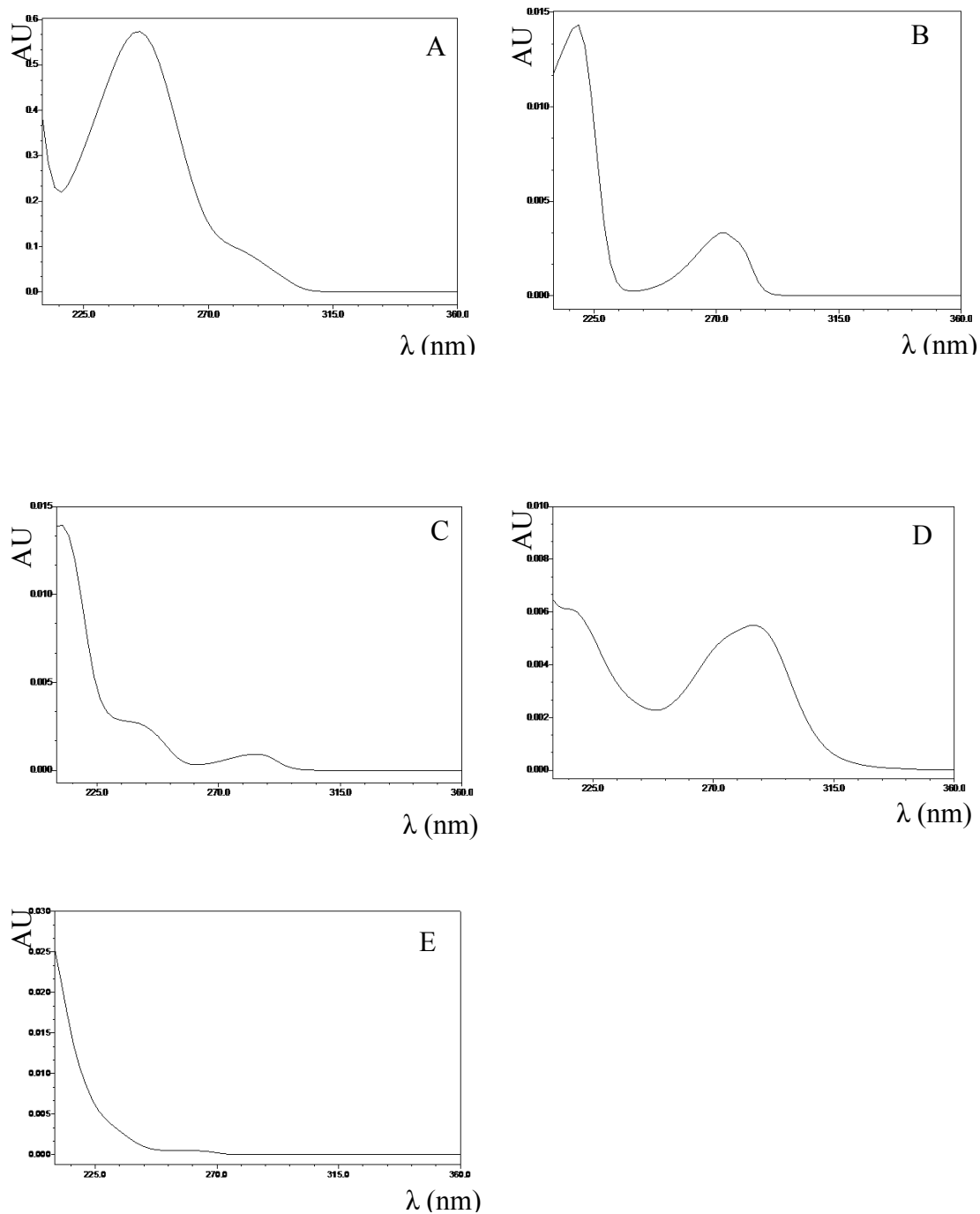




Obr. 14 Analýza vzorku Spasmopanu[®] spikovaného nečistotami paracetamolu F, J a K a pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE na hladině 0,2 %. Instrumentální podmínky a identifikace píků viz obr. 13. Gradientová eluce: [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: A) 0/15/5, 38/35/5, 40/15/5, 50/15/5 B) 0/20/0, 38/40/0,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

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

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



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

1.2.3 Vývoj postupu přípravy vzorku

Čípkovina Spasmopanu® obsahuje nepolární čípkový základ H 15 a W 35 a ethoxylované alkoholy C₁₂ - C₁₆. Tyto složky placebo musely být v rámci přípravy vzorku odstraněny z důvodu možného zanášení a degradace separačních kolon. Prvotní experimenty byly zaměřeny na rozpuštění čípku ve vhodném rozpouštědle pomocí ultrazvukové lázně a následném vysrážení nepolární čípkoviny snížením teploty vzorku či náhlou změnou polarit rozpouštědla naředěním vodou. V tabulce 3 jsou shrnuty závěry z rozpuštění jednoho čípku Spasmopanu® v 25 mL acetonitrilu, methanolu, vodě, isopropanolu, dimethylsulfoxidu a acetonu. Vzorky byly rozpouštěny v ultrazvukové lázni za občasného protřepávání při 25 °C a 37 °C po dobu 25 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly vzorky filtrovány přes 0,22µm PVDF filtr a vzorky rozpuštěné v acetonitrilu, methanolu a isopropanolu byly naředěny vodou v poměru 1:1.

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

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

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

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

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

50% acetonitrilu. Píky byly deformovány i při snížení nástřiku objemu vzorku na 5 μL či snížení teploty kolony na 25 $^{\circ}\text{C}$ i při zvýšení obsahu organické složky v mobilní fázi na počátku gradientu (obr. 14 A a B). Pík nečistoty E byl symetrický již při použití 40% acetonitrilu jako rozpouštědla vzorku. Pík nečistoty K byl však stále deformován, navíc výtěžnost této nečistoty ve 40% acetonitrilu byla pouze 76 %. Obsah acetonitrilu v rozpouštědle vzorku byl postupně snižován na 30 %, 25 % a 20 % a zároveň byla pro přípravu použita voda okyselená kyselinou fosforečnou (0,5 mL 85% H_3PO_4 na 1000 mL vody) pro zvýšení výtěžnosti nečistoty K (4-aminofenol). Zcela symetrického píku ($S_f = 1,0$) nečistoty K a její dostatečné výtěžnosti (92 %, hladina 0,1 %) bylo dosaženo až při použití okyseleného rozpouštědla vzorku obsahujícího 20 % acetonitrilu. Kvantitativní vysrážení složek placebo v tomto rozpouštědle však vyžadovalo minimálně 2,5 hodiny při 4 $^{\circ}\text{C}$ a následnou filtraci přes 0,22 μm PVDF filtr.

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

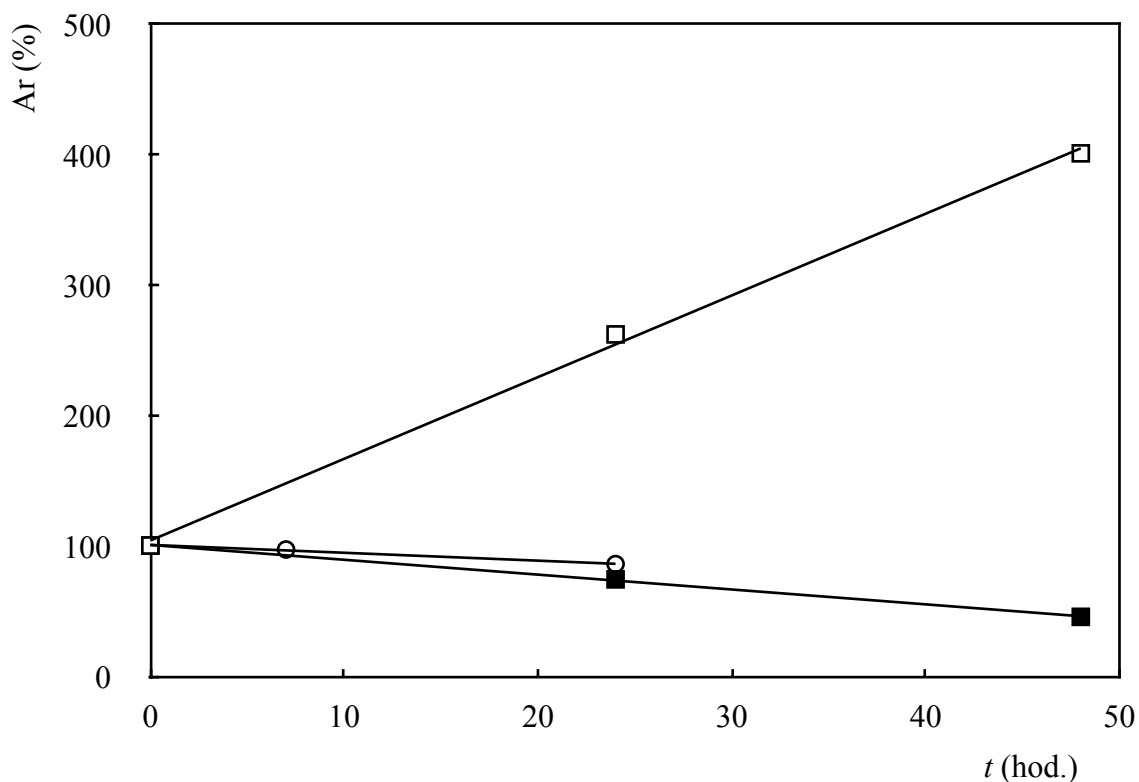
Tab. 4 Výška (*h*), plocha (*Ar*) a normalizovaná plocha (*Ar*, norm.) pro píky analytů ze vzorků připravených dvěma metodikami pro odstranění složek placeba. Rozpouštědlo vzorku: 20% acetonitril připravený z okyselené vody (0,5 mL 85% H₃PO₄ na 1000 mL vody). Kolona: Symmetry C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 μm. Teplota kolony: 35 °C. Objem nástřiku: 10 μL. Detekce: UV, λ = 220 nm. Mobilní fáze: složka A - pufr: oktansulfonát sodný monohydrát (1,44 g/L), pH 2,5 upraveno 85% H₃PO₄; složka B - acetonitril. Průtok: 1,0 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)]: 0/15, 35/40, 40/15, 50/15.

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

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

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

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



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

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

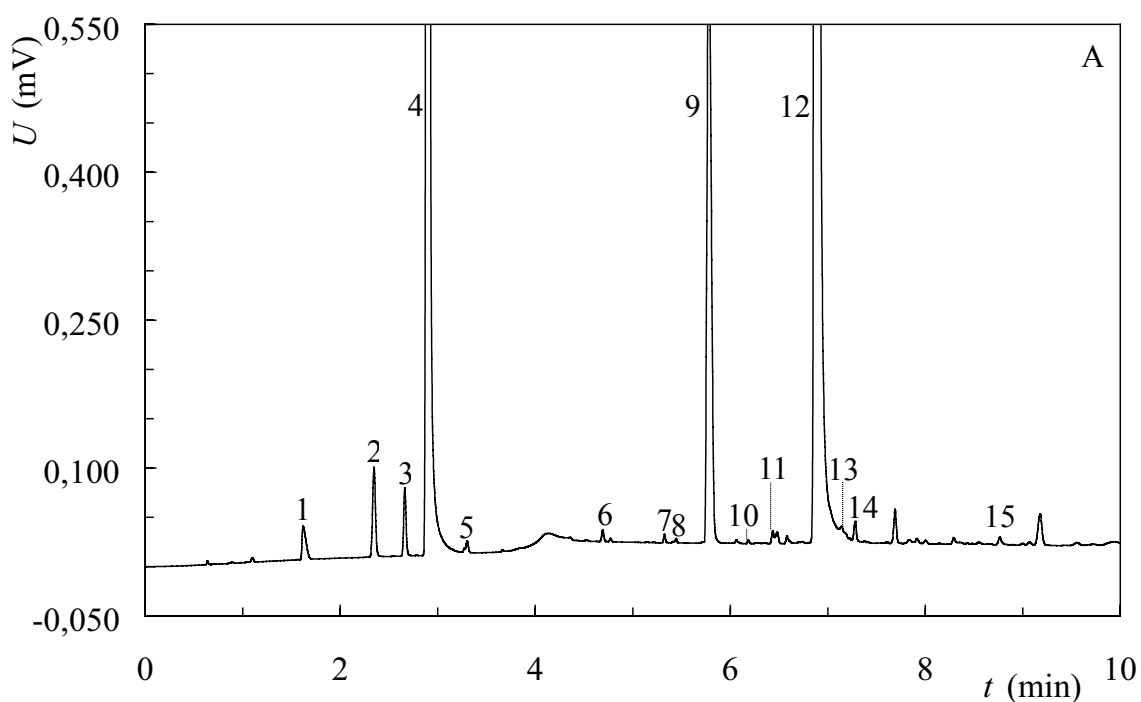
Nevyhovující byl i vzorek připravený při použití pufru o pH 3,5, kdy naopak docházelo k degradaci naspikované nečistoty K [151] a její obsah klesl za 24 hodin o 25 %. Podobné hodnoty byly naměřeny i u vzorků připravených při použití čisté vody a pufru o pH 6,3 v rozpouštědle vzorku. Méně strmý pokles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

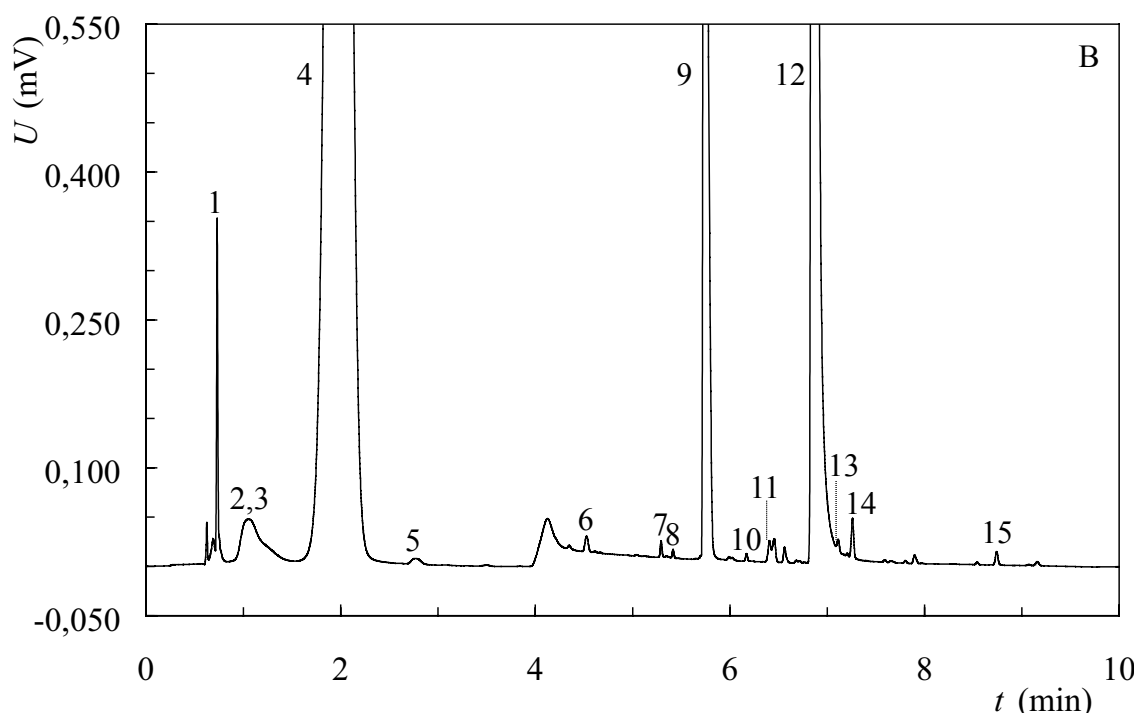
vzorku vyhověl stabilitním kritériím (viz Publikace I). Pokles obsahu nečistoty K pouze o 3,5 % za 24 hodin byl naměřen při použití 50% methanolu jako rozpouštědla vzorku, avšak kodein byl v tomto rozpouštědle nestabilní a obsah jeho nečistoty C narostl o 73 % za stejnou dobu. Konečným rozpouštědlem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

1.3 Výsledky a diskuze - komentář k publikaci II

1.3.1 Data a komentář k vývoji UHPLC metody

Vývoj metody na stanovení obsahu nečistot amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu byl založen na separačním mechanismu v reverzní fázi. Byla zvolena gradientová eluce pufru v kyselé oblasti pH a acetonitrilu. Metody pro stanovení jednotlivých API v této kombinaci byly publikovány při použití pufrů z celé škály hodnot pH, v kyselé oblasti však bylo dosaženo píků s nejlepší symetrií. Na obrázku 17 jsou znázorněny chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami amlodipinu a hydrochlorothiazidu výchozí metodou s objemy nástřiků vzorku 1,0 μ L a 2,0 μ L. Byla použita kolona Acquity UPLC BEH C₈ (100 x 2,1 mm, velikost částic 1,7 μ m) a 10 mmol/L fosforečnanový pufr o pH 2,5 s gradientem začínajícím na 5 % acetonitrilu (gradient 1), aby bylo dosaženo retence polárního hydrochlorothiazidu a jeho nečistot.



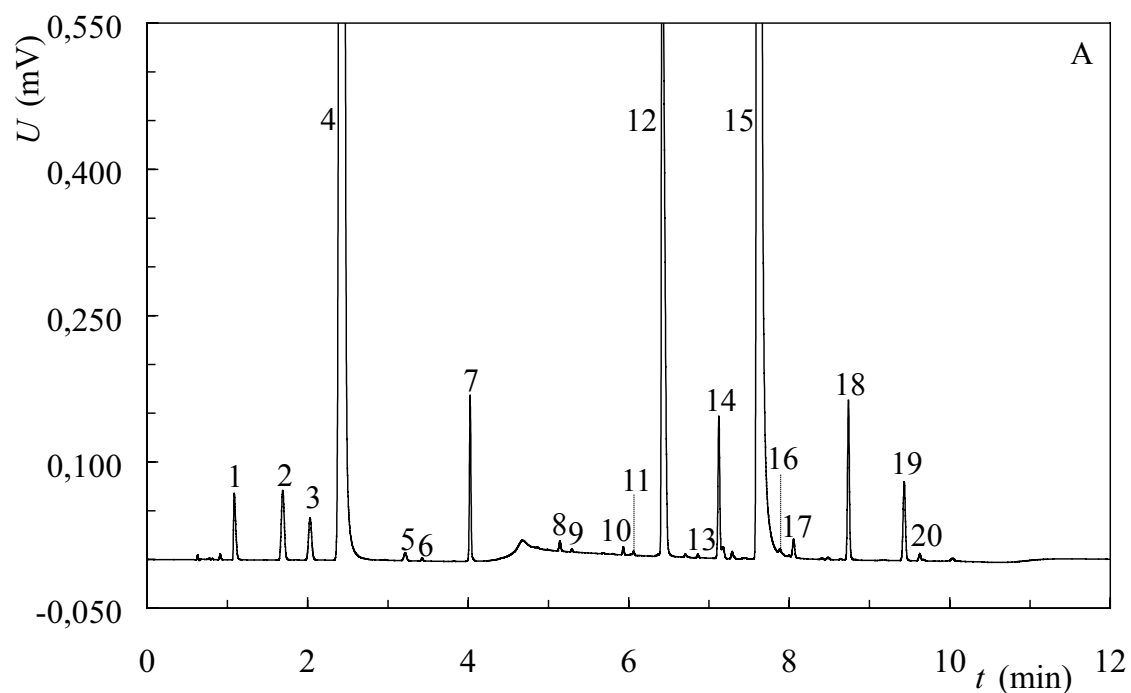


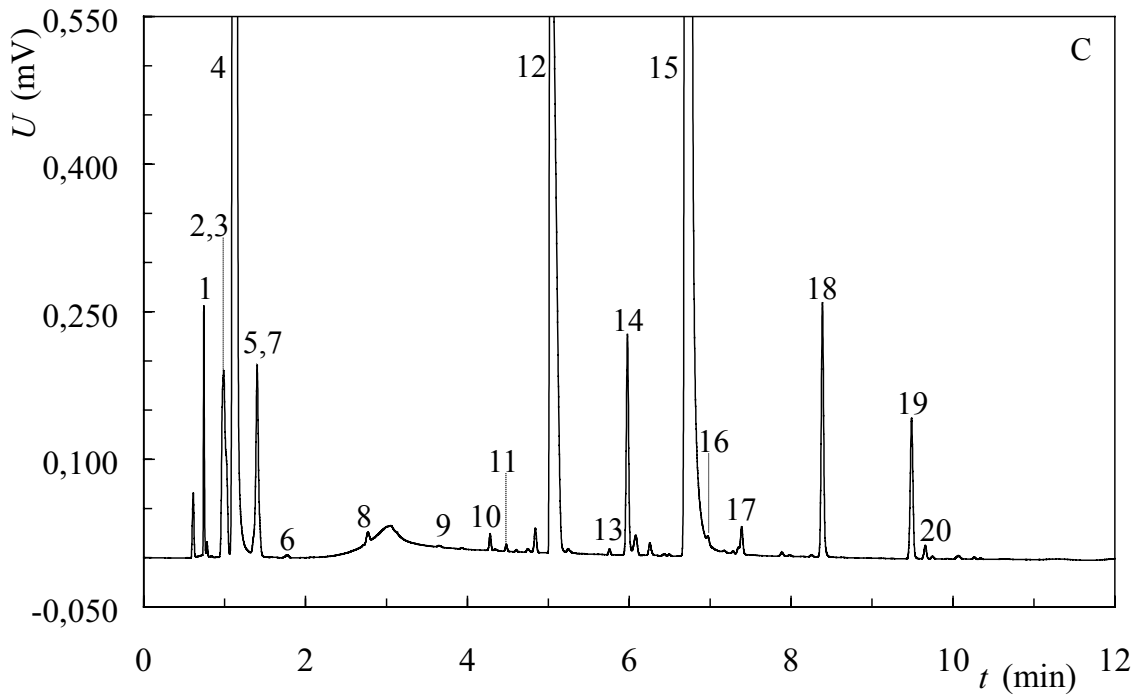
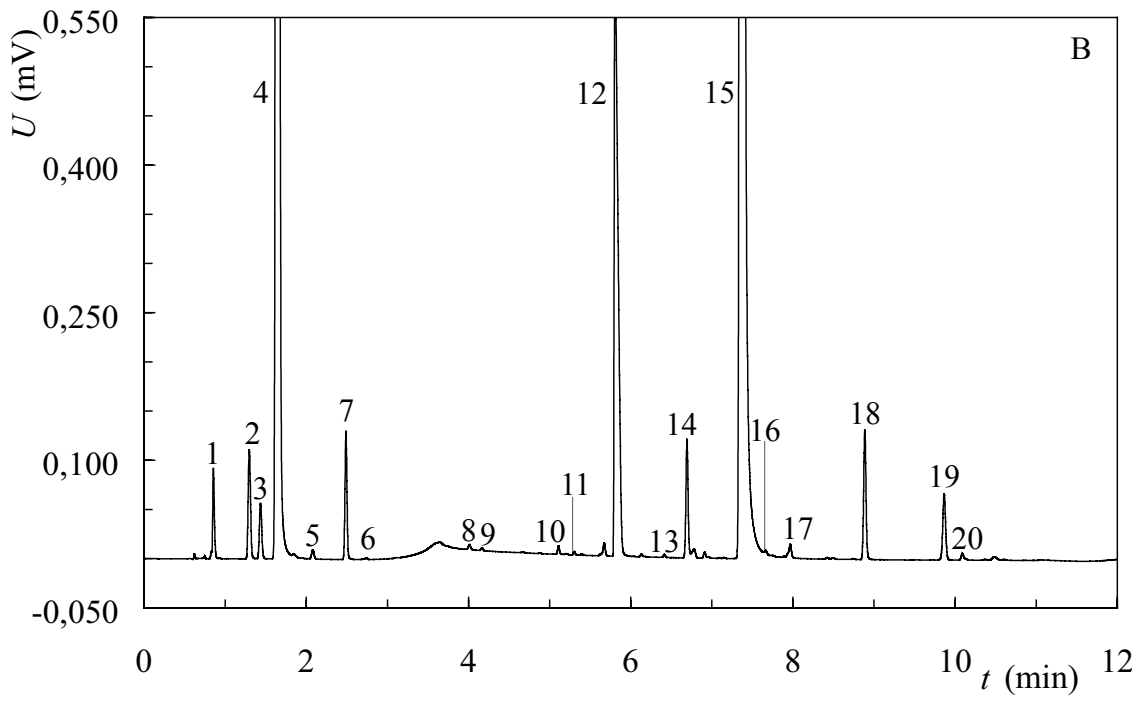
Obr. 17 Analýza vzorku spikovaného nečistotami A a B hydrochlorothiazidu na hladině 1,0 % a A, B, E, F, G amlodipinu na hladině 0,2 % a nečistoty D amlodipinu na hladině 0,5 %. Rozpouštědlo vzorku: 60% methanol. Kolona: Acquity UPLC BEH C₈ 100 x 2,1 mm, 1,7 μm. Teplota kolony: 25 °C. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10 mmol/L NH₄H₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,5 a acetonitril dle gradientového programu [t(min)/acetonitril(%)]: 0/5, 7/65, 8/65, 10/5. Průtok: 0,4 mL/min. A) objem nástřiku 1,0 μL; B) objem nástřiku 2,0 μL. Identifikace píků: 1 - besilát, 2 - nečistota B (HCTZ), 3 - nečistota A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5 - neznámá nečistota HCTZ, 6 - nečistota C (HCTZ), 7 - nečistota D (AMLO), 8 - nečistota F (AMLO), 9 - AMLO, 10 - nečistota E (AMLO), 11 - nečistota C (VALS), 12 - VALS, 13 - nečistota B (AMLO), 14 - nečistota G (AMLO), 15 - nečistota A (AMLO).

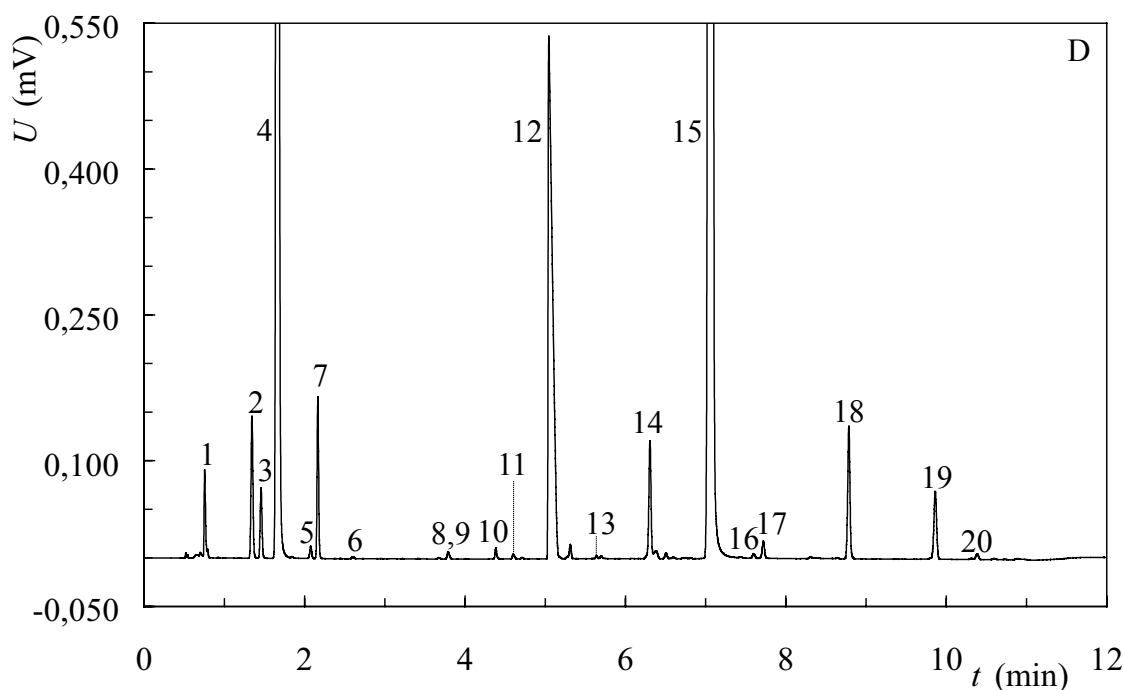
Neidentifikované píky jsou minoritními neznámými nečistotami valsartanu nebo pocházejí z rozpouštědla vzorku a změn v gradientu (poslední pík v záznamu). Z porovnání chromatogramů je patrné, že při objemu nástřiku 2,0 μL došlo k předávkování separačního systému, což se projevilo deformací, koelucí a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

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

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







Obr. 18 Chromatogramy analýz vzorku spikovaného nečistotami A, B (HCTZ) na hladině 1,0 %, A, B, D, E, F, G (AMLO) na hladině 0,2 %, respektive 0,5 % pro nečistotu D a nečistotami B, C, 07, 09 (VALS) na hladině 0,2 %, respektive 0,3 % pro nečistotu C. Rozpouštědlo vzorku: 60% methanol. Kolony: A, B, C) Acquity UPLC BEH C₈ 100 x 2,1 mm, 1,7 μm; D) Zorbax Eclipse C₈ RRHD 100 x 3,0 mm, velikost částic 1,8 μm. Teplota kolony: 25 °C. Detekce: UV, 225 nm. Mobilní fáze: 10 mmol/L NH₄H₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,5 a acetonitril dle gradientového programu [t(min)/acetonitril(%): A) 0/10, 1/10, 8/65, 9/65, 9,5/10, 12/10 (gradient 2); B, D) 0/15, 9/65, 10/65, 10,5/15, 12/15 (gradient 3); C) 0/20, 9/65, 10/65, 10,5/20, 12/20 (gradient 4). Průtok: A, B, C) 0,4 mL/min; D) 0,8 ml/min. Objem nástřiku A, B) 1,0 μL; C, D) 2,0 μL. Identifikace píků: 1 - besilát, 2 - nečistota B (HCTZ), 3 - nečistota A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5, 6 - neznámé nečistoty HCTZ, 7 - nečistota 09 (VALS), 8 - nečistota C (HCTZ), 9 - neznámá nečistota VALS, 10 - nečistota D (AMLO), 11 - nečistota F (AMLO), 12 - AMLO, 13 - nečistota E (AMLO), 14 - nečistota C (VALS), 15 - VALS, 16 - nečistota B (AMLO), 17 - nečistota G (AMLO), 18 - nečistota 07 (VALS), 19 - nečistota B (VALS), 20 - nečistota A (AMLO).

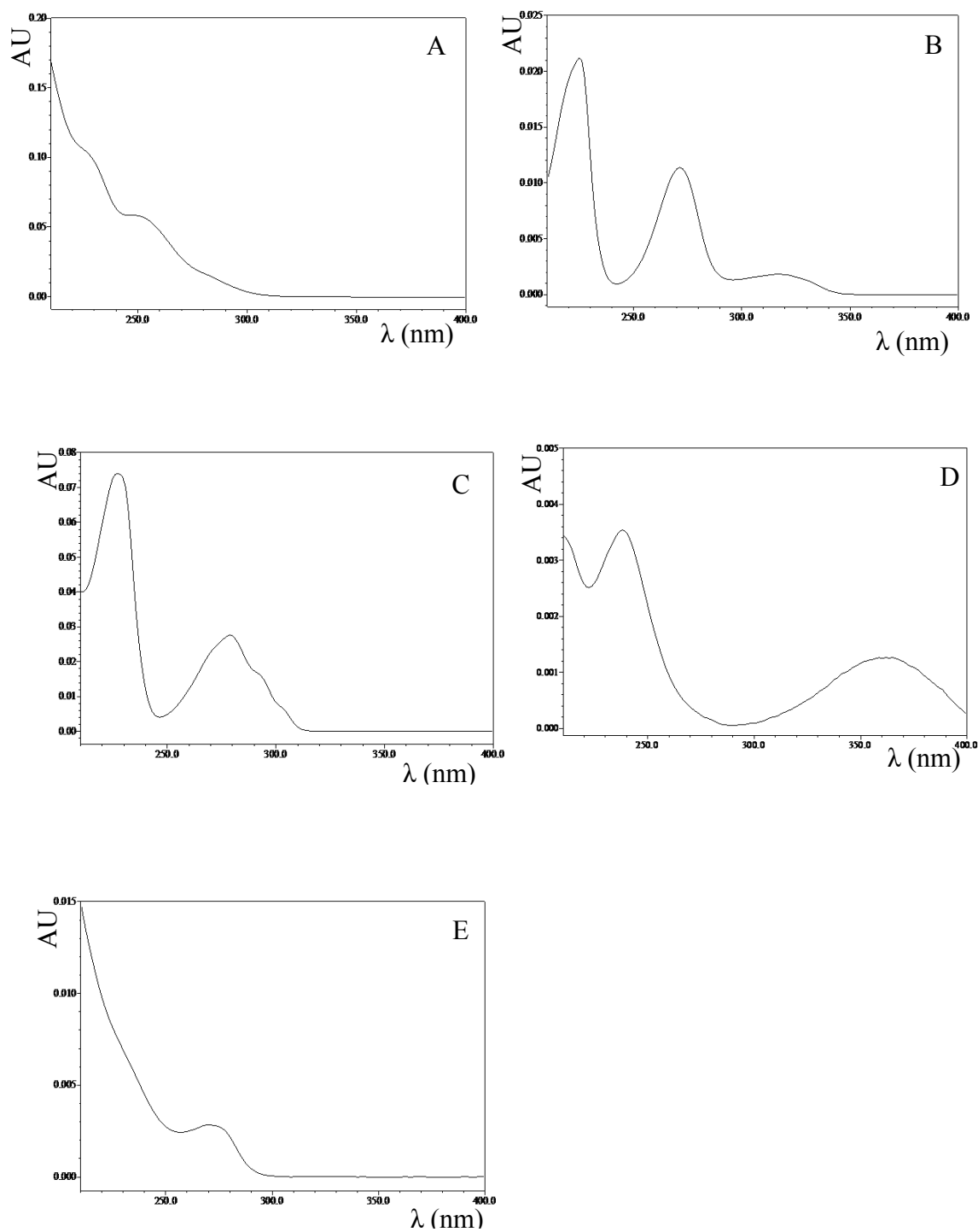
Zvýšení obsahu acetonitrilu na 10 % v počátečních podmínkách gradientu a vložený jednodominutový izokratický úsek neměly pozitivní vliv na deformaci píků hydrochlorothiazidu a jeho nečistot A a B při nástřikovém objemu 2,0 μL (neznázorněno). Selektivita při použití gradientu 2 (obr. 18 A) při porovnání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

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

Separace všech analytů bylo dosaženo použitím gradientu 3 začínajícího na 15 % acetonitrilu (obr. 18 B). S tímto gradientem byly dále testovány objemy nástřiku vzorku 1,5 μL , 1,8 μL a 2,0 μL . Za těchto podmínek se píky hydrochlorothiazidu a jeho nečistot deformovaly již při objemu nástřiku 1,5 μL . Srovnatelně s výchozí metodou však objem nástřiku 1,0 μL nepostačoval k dostatečné citlivosti i s ohledem na vývoj tablet obsahujících ještě menší množství amlodipin besilátu. Metoda byla přenesena na kolonu Zorbax Eclipse C₈ RRHD 100 x 3,0 mm, velikost částic 1,8 μm , na které díky většímu objemu kolony bylo možné aplikovat nástřiky až 3,0 μL bez vlivu na symetrii píků. Z obrázku 18 D je patrné, že na této koloně došlo k úplnému oddělení nečistoty B amlodipinu od valsartanu, změně retenčního pořadí pro amlodipin a neznámou nečistotu valsartanu a výrazně hladšímu průběhu základní linie. Zároveň však neznámá nečistota valsartanu koeluovala s nečistotou C hydrochlorothiazidu (píky 8 a 9) a znemožnila tak její kvantifikaci. Částečné separace těchto dvou píků ($R = 0,9$) bylo dosaženo aplikací finálního gradientového programu [$t(\text{min})/\text{acetonitril}(\%)$]: 0/15, 11/75, 12/75, 12,5/15, 15/15 a úplné separace ($R = 2,3$) zvýšením teploty kolony na 30 °C (viz Publikace II). Částečná koeluce neznámé nečistoty valsartanu a jeho nečistoty C zůstala zachována za všech podmínek. Neznámá nečistota však byla vždy minoritní (obsah < 0,05 %) i ve stresovaných vzorcích a vývojových stabilitních studiích a díky rozlišení 1,0 byla nečistota C precizně a přesně kvantifikována (viz Publikace II).

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

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



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

1.3.2 Vývoj přípravy vzorku

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

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

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

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

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

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

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

Literatura I

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Publikace I

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

Jiří Vojta, Pavel Hanzlík, Aleš Jedlička, Pavel Coufal

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



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



Jiří Vojta^{a,b}, Pavel Hanzlík^a, Aleš Jedlička^a, Pavel Coufal^{b,*}

^a Zentiva, k.s., Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2014

Received in revised form 27 August 2014

Accepted 1 September 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Impurity
Paracetamol
Codeine
Pitophenone
HPLC

ABSTRACT

A new HPLC method for separation and determination of impurities in paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride in the presence of fempiverinium bromide in combined suppository dosage form was developed and validated. The separation of paracetamol and its impurities 4-aminophenol, 4-nitrophenol, 4-chloracetanilid; codeine and its impurities methylcodeine, morphine, codeine dimer and 10-hydroxycodeine; pitophenone and its impurities 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl] benzoic acid, 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl]benzoic acid 2-(1-piperidinyl)-ethyl ester, methyl ester of 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoic acid and fempiverinium was achieved by using ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. Validation parameters such as the precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and robustness were verified for all the mentioned impurities of codeine phosphate hemihydrate and 4-aminophenol and 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl] benzoic acid as the main degradation products of paracetamol and pitophenone hydrochloride, respectively. The described method was found to be useful for analysis of the stability samples and therefore suitable for routine testing of the drug product.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Spasmopan[®] is a suppository dosage form which combines four active pharmaceutical ingredients: paracetamol, codeine phosphate hemihydrate, pitophenone hydrochloride and fempiverinium bromide. Paracetamol is a widely used analgesic and antipyretic substance [1]. In combination with the analgesic and antitumor effect of codeine [2] and with the spasmolytic effect of pitophenone hydrochloride and fempiverinium bromide [3], paracetamol is used for treating pain and spasms in the gastrointestinal system or bladder. A purity testing method is required by the registration authorities and is therefore an important part of the development of a drug product. Monographs are devoted to paracetamol and codeine in European Pharmacopoeia [4]. As paracetamol is generally used in high doses and could be hepatotoxic [5], the limits for the content of its main related substances 4-aminophenol, 4-nitrophenol and 4-chloracetanilid are not more than 0.005%, 0.05%

and 0.001%, respectively. In dosage form, especially 4-aminophenol needs to be monitored because it is the main degradation product of paracetamol [6] and could be nephrotoxic [7]. Micellar electrokinetic chromatography [8], micro emulsion liquid and micro emulsion electrokinetic chromatography [9] were used for analysis of paracetamol in dosage forms. 4-aminophenol could also be determined by a fluorimetric method [10,11] and by NMR spectroscopy alone [12] or as a detection method coupled with capillary isotachopheresis separation [13]. Although TLC methods have been published recently [14,15], HPLC methods with UV detection for determination of paracetamol and its impurities have probably been most widely used [16–21]. Amperometric detection coupled with HPLC separation was also employed for determination of 4-aminophenol in tablets and capsules [22]. Codeine phosphate and paracetamol in combined dosage forms were determined by stability-indicating HPLC methods [23,24] and the micellar electrokinetic chromatography method was validated for a combination of ibuprofen, codeine and their impurities [25]. A stability-indicating reversed phase HPLC method for estimation of codeine phosphate and chlorpheniramine maleate in combined liquid dosage form was also validated [26]. However, analytical

* Corresponding author. Tel.: +420 221951 238; fax: +420 224 913 538.
E-mail address: pcoufal@natur.cuni.cz (P. Coufal).

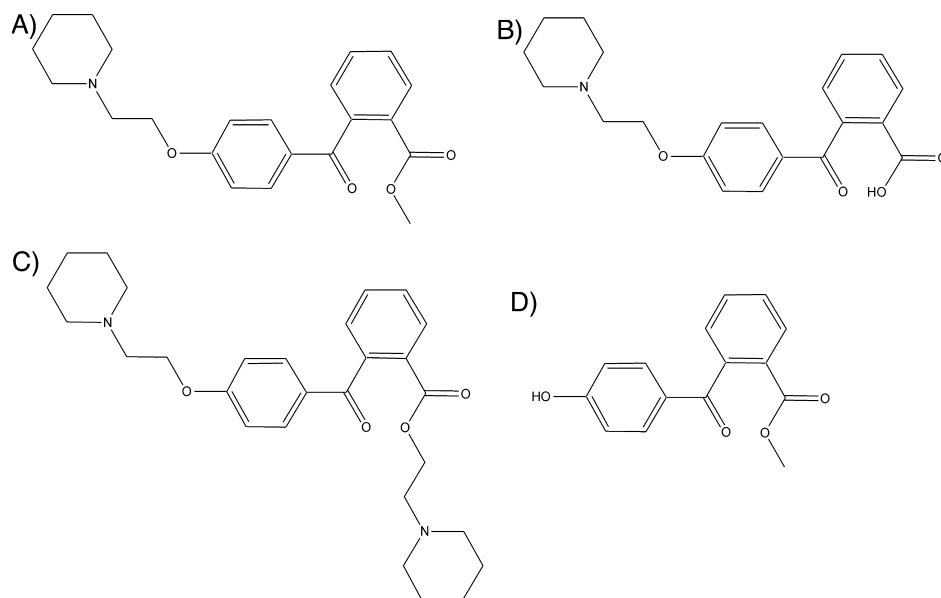


Fig. 1. Pitophenone and its impurities. (A) Methyl ester of 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl] benzoic acid (pitophenone), (B) 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl] benzoic acid (Imp. X), (C) 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl]benzoic acid 2-(1-piperidinyl)-ethyl ester (Imp. PEE), (D) methyl ester of 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoic acid (Imp. MeKHBB).

methods have been focused rather on determination of codeine itself, especially in mixtures of opium alkaloids [27–31], than on its impurities, as the related substances method is defined by European Pharmacopoeia [4]. This method, however, does not separate morphine and 10-hydroxycodone and the limit for these impurities is set as the sum of the two [4]. Determination of pitophenone hydrochloride in combined dosage form was performed by derivative spectrophotometry [32,33], ion-pair liquid chromatography [34] and TLC [35–37]. Pitophenone hydrochloride was also part of the screening tests for drugs [38–41]. Unlike paracetamol and codeine and according to our best knowledge, no method has been published to date for the determination of pitophenone hydrochloride impurities. The structures of pitophenone and its potential impurities from the synthesis [42,43] are shown in Fig. 1.

Although all the mentioned active pharmaceutical ingredients have been available on the market for decades, new methods for determination of their impurities in dosage forms, following the current legislation, still need to be developed to ensure the safety of drug products. The aim of this study was to develop and validate an analytical method for quantitative purity testing of Spasmopan[®], as no method for such a combination of drugs and their impurities in any dosage form was found in the literature. Impurities of fentanyl bromide were not taken into account in this study due to its small content in one suppository (0.02% of the paracetamol content).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Reference materials of paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and its impurity morphine (Imp. B, according to Ph. Eur. [4]), pitophenone hydrochloride and its impurities 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl] benzoic acid (Imp. X), 2-[4-(2-(1-piperidinyl)ethoxy)benzoyl]benzoic acid 2-(1-piperidinyl)-ethyl

ester (Imp. PEE), methyl ester of 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoic acid (Imp. MeKHBB), fentanyl bromide and samples of Spasmopan[®] and its placebo were supplied by Zentiva (Prague, Czech Republic). Paracetamol impurities 4-aminophenol (Imp. K, according to Ph. Eur. [4]), 4-chloroacetanilid (Imp. J, according to Ph. Eur. [4]) and 4-nitrophenol (Imp. F, according to Ph. Eur. [4]) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Codeine impurity methylcodeine (Imp. A, according to Ph. Eur. [4]) was purchased from European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Strasbourg, France). Other codeine impurities such as the codeine dimer (Imp. C, according to Ph. Eur. [4]) and 10-hydroxycodone (Imp. E, according to Ph. Eur. [4]) were supplied by Saneca Pharmaceuticals (Hlohovec, Slovak Republic). HPLC gradient grade acetonitrile, methanol, isopropanol and hexane were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, USA). The mobile phase and solvents were prepared using sodium 1-octanesulfonate (98%) from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic), *ortho*-phosphoric acid (85%) Ph. Eur. grade from Merck (Darmstadt, Germany) and water for chromatography treated by the Mili-Q system from Merck Milipore (Billerica, USA). Filters used for sample preparation were PVDF 0.45 μ m, diameter 33 mm Target syringe filters from Fisher Scientific (Pardubice, Czech Republic).

2.2. Chromatographic conditions

The HPLC experiments were performed on the Alliance 2695 chromatographic system with column thermostat and PDA detector 2998 from Waters (Milford, USA). Data were collected and evaluated by Empower3 software from Waters. HPLC column Symmetry C18, 250 \times 4.6 mm, 5 μ m particle size, from Waters, heated to 35 $^{\circ}$ C was used for the separation. The mobile phase was a gradient mixture of component A: 1.33 g/l solution of sodium 1-octanesulfonate adjusted to pH 2.5 with *ortho*-phosphoric acid, and component B, which was acetonitrile. The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min. The final gradient programme [(min)/% B]

Table 1
Composition of Spasmopan suppository.

Compound	Amount (mg)	Concentration in the sample solution (mg/ml)	Impurity	Ph. Eur. name [4]	Limit (%)
Paracetamol	500	40.00	4-Aminophenol	Impurity K	0.01
			4-Nitrophenol ^a	Impurity F	–
			4-Chloracetanilid ^a	Impurity J	–
Codeine phosphate hemihydrate	19.2	1.54	Methylcodeine	Impurity A	1.2
			Morphine	Impurity B	0.5
			Codeine dimer	Impurity C	0.3
			10-Hydroxycodeine	Impurity E	0.5
Pitophenone hydrochloride	10	0.80	Impurity X	–	0.5
			Impurity MeKHBB ^{a,b}	–	–
			Impurity PEE ^{a,b}	–	–
Fenpiverinium bromide	0.1	0.008	–	–	–
Placebo					
Suppository base H 15	–	–	–	–	–
Suppository base W 35	–	–	–	–	–
Ethoxylated alcohols C ₁₂ –C ₁₆	–	–	–	–	–

^a Process-related impurity, selectivity only.^b For the structure see Fig. 1.

was 0/15, 35/40, 40/15, 52/15. The sample temperature was set at 10 °C and the injection volume was 10 µl. Data for impurities of paracetamol were evaluated at 220 nm and a wavelength of 285 nm was used for detection and evaluation of impurities of codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride.

2.3. Preparation of solutions

2.3.1. Sample solvent preparation

Sample solvent 1: 1.33 g of sodium 1-octanesulfonate was dissolved in 900 ml of water, the pH was adjusted to 3.0 with *ortho*-phosphoric acid and this solution was diluted to 1000 ml with water. Sample solvent 2: sample solvent 1 mixed with acetonitrile (1:1, v/v). Sample solvent 3: sample solvent 1 mixed with acetonitrile (8:2, v/v).

2.3.2. Sample solution preparation

Twenty suppositories of Spasmopan® were put in a freezer for 30 min. They were then grated on a grater and thoroughly homogenized by gentle stirring. An amount of 4.20 g of homogenized sample (corresponding to two suppositories) was weighed into a 100 ml volumetric flask and 10.0 ml of sample solvent 2 were added. The volumetric flask was put in an ultrasonic bath where the water temperature was set to 37 °C (sonication was not applied yet). After complete disintegration of the suppositories, heating was stopped and the sample was sonicated for 10 min. In the next step, 20 ml of hexane was added and the sample was shaken intensely for 10 min on a laboratory shaker. Then 15.0 ml of sample solvent 1 was added. The sample was mixed gently and transferred to a separatory funnel. The funnel was left to rest until the layers were well separated (about 30 min). Then the stopcock was opened and approximately 1 ml of the lower layer was allowed to drain into the waste; then 4 ml were transferred to a syringe and filtered through a suitable PVDF 0.45 µm filter. The final concentrations of the drug substances were 40.00 mg/ml of paracetamol, 1.54 mg/ml of codeine phosphate hemihydrate and 0.80 mg/ml of pitophenone hydrochloride calculated with respect to their declared contents in Spasmopan® (Table 1).

2.3.3. Standard solution preparation

Paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride reference materials were dissolved in sample

solvent 3 at a concentration level which corresponded to 0.2% of the concentration of the sample solution for all the drug substances.

2.3.4. Placebo solution preparation

Placebo was put in a freezer for 30 min, after that grated on a grater and thoroughly homogenized by gentle stirring. An amount of 3.14 g of homogenized sample (corresponding to two suppositories) was weighed into a 100 ml volumetric flask and then the placebo solution was prepared in the same way as the sample solution (Section 2.3.2).

2.4. Method validation

The method was validated according to the ICH Q2 guideline [44] for 4-aminophenol as the main degradation product of paracetamol, available codeine impurities A, B, C, E (according to Ph. Eur. [4]) and for impurity X as the main degradation product of pitophenone hydrochloride (based on our preliminary experiments). The selectivity of the method was confirmed for all the above impurities with addition of other process-related substances of paracetamol (4-nitrophenol, 4-chloracetanilid) and pitophenone hydrochloride (PEE and MeKHBB).

2.4.1. Precision

Repeatability of the method was verified by analysis of six replicate samples of an actual production batch of Spasmopan®. The % RSD values of the contents of the detected impurities were calculated. The intermediate precision was determined by analysing six replicate samples of Spasmopan® by a different analyst in a different laboratory on a different day using a different column (same type, different batch). The absolute difference in the contents of the impurities between the first and the second analyst was calculated.

2.4.2. Linearity and accuracy

The linearity and accuracy of the method were examined by analyzing spiked samples of Spasmopan®. Reference materials of 4-aminophenol and impurities A, B, C, E and X were dissolved in sample solvent 2 and spiked into the weighed sample of Spasmopan® at five concentration levels, three samples per level. These samples were treated according to the procedure of the sample solution preparation (Section 2.3.2) with respect to the volume of spikes in the first step. An unspiked sample of Spasmopan® was

also prepared to correct the amount of impurities which were originally present. The linearity was calculated for each impurity from the whole range of concentrations. Samples for evaluation of the linearity and accuracy were prepared corresponding to the concentrations of the related drugs in the sample solution (Section 2.3.2) at concentration levels: 0.003–0.017% for 4-aminophenol, 0.39–1.50% for impurity A, 0.10–0.40% for impurity C and 0.10–0.65% for impurities B, E and X. The accuracy was calculated for each impurity as the percent recovery of the amount of the impurity that was added to the sample at three selected levels across the range of concentrations.

2.4.3. Specificity

The specificity of the method was confirmed by analysis of the sample spiked with all the available impurities. In addition to fully validated impurities, paracetamol impurities 4-nitrophenol and 4-chloracetanilid and pitophenone impurities PEE and MeKHBB were also spiked. Impurities were spiked in correspondence to the concentrations of the related drugs in the sample solution (Section 2.3.2). The concentration levels were as follows: 0.01% for 4-aminophenol, 0.1% for 4-nitrophenol and 4-chloracetanilid, 0.5% for impurities B, E and X, 0.3% for impurity C and 1.0% for impurity A. Chromatograms of sample solvent 3 and the placebo solution were also obtained to demonstrate no interferences with the peaks from the spiked sample. The ability of the method to analyze the stability samples was examined by analysis of the batch of Spasmopan® two years after its expiry date. The impurity profile of this batch was compared with the profile obtained from the precision data (Section 2.4.1) and with the contents of impurities in the active pharmaceutical ingredients which were used for manufacturing the expired batch. The peak purity test was also evaluated to confirm that no unknown impurity co-elutes with the principal peaks of the drugs.

2.4.4. Robustness

The robustness of the method was examined by varying the chromatographic conditions such as the pH of the buffer (± 0.2), column temperature ($\pm 5^\circ\text{C}$), flow rate (± 0.1 ml/min), volume of acetonitrile at all points of the gradient ($\pm 2\%$), concentration of salt in the buffer ($\pm 10\%$) and particular column used. The sample spiked with 4-aminophenol, impurities A, B, C, E and X, at concentration levels like in the sample for specificity (Section 2.4.3) was analyzed and the retention times of all the impurities and principal peaks were monitored.

2.4.5. Stability of the sample and standard solutions

One sample from the linearity evaluation (Section 2.4.2) was used for the stability study of the sample solution. The sample was stored in the autosampler at 10°C in the dark and at ambient temperature not protected from the light. It was analyzed after 24 h. The standard solution was stored under the same conditions and was analyzed after 24, 48 and 72 h. The absolute differences in the contents of the impurities and drugs between the measurements at the beginning and at the end of the stability study were calculated and evaluated.

3. Results and discussion

3.1. Method development and optimization

3.1.1. Method without an ion-pair reagent

Although methods for related substances of paracetamol and codeine are based on ion-pair chromatography [4,45], the first attempt was made to develop a fast and novel method without an ion-pair reagent, which would avoid interferences caused by possible impurities from the ion-pair reagent. Separation of all the

impurities and drugs was achieved using ACE3 C18, 150×4.9 mm, $3 \mu\text{m}$ particle size column at 25°C and gradient elution with phosphate buffer (10 mM, pH 7.0), acetonitrile and methanol as follows [(min)/% acetonitrile/% methanol] 0/5/5, 5/15/5, 25/85/0, 26/5/5, 35/5/5. However, this method was found to be insufficiently robust to changes in the pH of the buffer (± 0.1) and column temperature ($\pm 5^\circ\text{C}$). Because of the number of impurities to be separated in 20 min, there were several critical pairs which were resolved only under specific conditions. In addition, the peak shape of the last impurity in the chromatogram (impurity PEE of pitophenone) was not satisfactory (USP tailing factor = 2.2). Other columns with similar dimensions (e.g. Gemini C18, YMC ODS-A, Zorbax ODS-A, Kinetex C18, Zorbax Eclipse C18) were also tested under these conditions and all of them yielded similar elution profiles to column ACE3, but with lower selectivity. Zorbax Aqua C18 column exhibited very different selectivity (especially for paracetamol impurities), but with even more unresolved pairs of peaks.

3.1.2. Ion-pair reversed phase method

As development of the method without an ion-pair reagent was not successful (Section 3.1.1), an ion-pair reversed phase HPLC method from our previous work [unpublished data] was tested. This method, which was suitable for separation of paracetamol, 4-aminophenol, codeine and impurities A and C, used a Symmetry C18 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) column heated to 35°C and gradient elution of sodium 1-octanesulfonate buffer at pH 2.5 with acetonitrile and methanol as follows [(min)/% acetonitrile/% methanol] 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. However, the majority of the peaks from the spiked sample of Spasmopan® (Section 2.4.3) were not satisfactorily resolved under these conditions, as almost all the impurities were eluted between 26 and 44 min. The column, its temperature and the buffer composition were kept constant, but the gradient programme was modified. Several critical pairs of compounds, i.e., 4-aminophenol and an unknown minor impurity of paracetamol; impurities of codeine E and B; C and A; and fenpiverinium and an impurity of pitophenone X were monitored carefully to achieve sufficient resolution. Gradients which started with 80% buffer resulted in poor retention of 4-aminophenol, which co-eluted with the solvent peaks and other minority impurities of paracetamol. Similar to the non-ion-pair reversed phase method, retention of codeine and its impurities was very sensitive to the ratio of methanol and acetonitrile in the mobile phase (a higher volume of methanol led to longer retention). After testing several gradients, the final gradient programme (see Section 2.2) without the presence of methanol, starting with the same content of buffer and with the faster first part of the gradient (compared to the original gradient) was developed. Under the final conditions, all the compounds were successfully resolved ($R \geq 2.1$) for any pair of peaks and an excellent peak shape was also achieved for all the impurities ($1.0 \leq \text{USP tailing factor} \leq 1.1$).

3.1.3. Sample preparation

The suppository is a complicated dosage form to analyze because it contains a large amount of non-polar placebo components which need to be removed to protect the column. However, suppositories melt at 37°C so that a heated ultrasonic bath was used to disintegrate them in water/organic modifier mixture and then the sample was cooled in a refrigerator to precipitate the placebo components (1 h, 4°C). Pure methanol, acetonitrile and isopropanol and their mixtures with water in ratios of 1:1 were tested as solvents. The mixture of acetonitrile and water provided the best accuracy for the drugs and the placebo components precipitated completely, unlike in the pure organic solvents. The ratio of water and acetonitrile in the sample solvent had to be changed to 8:2 due to the peak shape of 4-aminophenol. At this ratio, precipitation of the placebo components took at least 2.5 h in the refrigerator.

Table 2
Precision data.

Compound	Content range (%)	RSD (%)	Δ (%)
Paracetamol	–	0.12	–
Codeine	–	0.69	–
Pitophenone	–	0.36	–
Unknown imp. of paracetamol	<0.03	0.90	0.000
Imp. A	0.31–0.50	1.4	0.017
Imp. C	0.05–0.14	2.4	0.003
Imp. E	0.05–0.14	2.0	0.007
Imp. X	<0.03	2.8	0.001

Content range – the content of the impurity in percent of the related drug amount in one suppository.

RSD – for paracetamol, codeine and pitophenone calculated from the peak areas of five injections of standard solution; for impurities calculated from the content determined from six replicate samples.

Δ – absolute difference of the impurity content between the first and the second analysts.

Therefore, they were removed with hexane as described under Section 2.3.2 and no quantitative difference was observed between these two removal methods. Water in the sample solvent was subsequently replaced by sodium 1-octanesulfonate buffer from the mobile phase (pH 2.5) to avoid incompatibilities between the mobile phase and sample solvent. However, at this pH, the amount of 4-aminophenol in the sample solution increased continuously due to hydrolysis of the paracetamol. On the other hand, both at higher pH values (i.e., 3.5 and 6.3) and then in the unbuffered sample solvent, the amount of 4-aminophenol in the sample

solution decreased continuously due to its decomposition [46]. The mixture of water and methanol was the only solvent in which 4-aminophenol was stable. However, in this sample solvent, codeine was found to be unstable, as the amount of impurity C in the sample solution increased rapidly (54% of peak area after 6 h). Finally, the sample solvent containing the buffer with pH 3.0 was chosen since the sample in this buffer was stable for up to 24 h (see Section 3.2.5).

3.2. Method validation

3.2.1. Precision

The repeatability and intermediate precision were performed as described under Section 2.4.1. Impurities present in the real sample were determined as a percent of the amount of related drug in one suppository against the calibration obtained by injection of a standard solution. The % RSD of the content was calculated for one unknown minor impurity of paracetamol and for impurities A, C, E and X, which were present in the samples. The % RSD values of the peak areas of five injections of standard solution were also calculated. The intermediate precision was evaluated as the absolute difference between the results obtained by the first and the second analysts. Values of RSD \leq 0.7% for five injections of the standard solution and RSDs in the range 0.9–2.8% for the contents of impurities demonstrated the good repeatability of the method. The absolute difference between the results of the first and the second analysts was in the range 0.000–0.017% and demonstrated the reproducibility of the method (Table 2).

Table 3
Linearity, LOD and LOQ data.

Compound	Concentration range (%)	Regression equation	Correlation coefficient	RSD of area/concentration ratio (%)	σ (μ V)	LOD (μ g/ml)	LOQ (mg/ml)
Paracetamol	0.05–0.24	$y = 7.21 \times 10^6 x - 1.33 \times 10^3$	1.000	0.2	36	0.038	0.115
Codeine phosphate hemihydrate	0.10–0.30	$y = 3.52 \times 10^4 x - 2.80 \times 10^2$	1.000	2.5	19	0.21	0.63
Pitophenone hydrochloride	0.10–0.30	$y = 2.02 \times 10^3 x - 4.20 \times 10^2$	1.000	0.6	16	0.02	0.05
4-Aminophenol	0.003–0.017	$y = 1.09 \times 10^7 x - 1.00 \times 10^4$	0.998	8.0	58	0.059	0.178
Imp. A	0.39–1.50	$y = 4.55 \times 10^4 x + 3.92 \times 10^2$	1.000	0.9	16	0.14	0.42
Imp. B	0.10–0.65	$y = 4.64 \times 10^4 x - 1.25 \times 10^2$	1.000	1.2	17	0.14	0.42
Imp. C	0.10–0.40	$y = 5.22 \times 10^4 x + 2.10 \times 10^2$	0.999	1.5	21	0.14	0.44
Imp. E	0.10–0.65	$y = 5.41 \times 10^4 x + 1.26 \times 10^2$	1.000	1.4	17	0.12	0.36
Imp. X	0.10–0.65	$y = 2.27 \times 10^5 x - 2.69 \times 10^1$	1.000	0.6	25	0.02	0.07

σ – baseline noise obtained from the chromatogram of the placebo solution at the retention time of the analyte.

LOD – limit of detection, LOQ – limit of quantification.

Regression equation – relationship between peak area and concentration.

Acceptance criteria [47].

Correlation coefficient >0.98.

RSD of area/concentration ratio \leq 10.0% for impurities and \leq 3.0% for drug substances.

Table 4
Relative response factors and accuracy data.

Parameter	4-Aminophenol	Imp. A	Imp. B	Imp. C	Imp. E	Imp. X
RRF	0.7	0.8	0.8	0.7	0.7	0.9
Level 1 (%)	0.003	0.39	0.1	0.1	0.1	0.1
Recovery (%)	79.2	104.8	101.7	104.5	106.1	101.9
RSD (%)	1.8	1.0	1.7	1.0	1.6	0.3
Level 2 (%)	0.014	1.25	0.54	0.34	0.54	0.54
Recovery (%)	94.6	104.4	102.9	104.5	103.5	101.3
RSD (%)	1.4	1.1	0.1	2.1	0.7	0.6
Level 3 (%)	0.017	1.51	0.65	0.39	0.65	0.65
Recovery (%)	96.3	104.1	104.0	104.3	104.7	101.7
RSD (%)	1.1	1.0	0.8	1.9	0.4	0.7

RRF – relative response factor, calculated as a ratio of slopes of regression lines of the drug and its particular impurity.

Acceptance criteria [47].

$0.05 \leq c_{\text{imp}} < 0.1\%$; recovery: 50.0–150.0%.

$0.1 \leq c_{\text{imp}} < 0.5\%$; recovery: 70.0–130.0%.

$0.5 \leq c_{\text{imp}} < 1.0\%$; recovery: 80.0–120.0%.

$c_{\text{imp}} \geq 1.0\%$; recovery: 90.0–110.0%.

Table 5
Specificity – the expired batch of Spasmopan data.

Compound	Δ (%)	Purity angle	Purity threshold
Paracetamol	–	0.031	0.237
Codeine	–	0.227	0.312
Pitophenone	–	0.180	0.770
Fenpiverinium	–	0.400	0.691
Imp. A	0.0	–	–
Imp. C	0.0	–	–
Imp. E	0.0	–	–
Imp. X	0.3	–	–

Δ – the difference in the content of the impurity between the batch of Spasmopan® two years after the expiry date (four years after manufacturing) and the active pharmaceutical ingredient used for its manufacturing.
The peak is spectrally clear if the purity angle < the purity threshold.

3.2.2. Linearity, accuracy, LOD and LOQ

The linearity and accuracy of the method were verified by analyzing spiked samples of Spasmopan® as described in Section 2.4.2. In relation to their contents in the non-spiked sample of Spasmopan®, the linearity of all the active pharmaceutical ingredients and impurity A was also examined by spiking their reference solutions into the placebo solution at five levels. The concentration range was set as follows: 0.05–0.24% of the concentration of the sample solution for paracetamol, 0.10–0.30% of the concentration of the sample solution for codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride and 0.10–2.03% of the concentration of codeine phosphate hemihydrate in the sample solution for impurity A. The relative difference between the two slopes of the regression lines for impurity A was 2.4%. The relative response factor of each impurity was included to calculate the recovery. This factor was calculated as the ratio of the slopes of the linearity regression lines of the drug substance and its particular impurity (based on the peak areas). The LOD and LOQ values were determined as ratios $3.3 \times \sigma/S$ and $10 \times \sigma/S$, respectively, where σ was the baseline noise obtained from the chromatogram of the placebo solution and S was the slope of the regression line (based on peak heights) obtained from the linearity data. Data such as the

regression equation, correlation coefficient, RSD of the area/concentration ratio, the LOD and the LOQ are reported in Table 3 and showed satisfactory sensitivity of the method and excellent linearity between the peak area and concentration for each compound, as well as the fact that points in the residual plots were randomly distributed around the horizontal axis. The relative response factors and recovery data are reported in Table 4 and indicated that the method is accurate. Lower recovery of 4-aminophenol at a concentration level of 0.003% in comparison with the other levels could have been caused by partial instability of this impurity, but at such a low level that it was still within the acceptance criteria [47]. The RSD value of the recovery of $\leq 2.1\%$ demonstrated the repeatability of the determination for all the spiked impurities.

3.2.3. Specificity

The specificity of the method was examined by analyzing a sample spiked with all the available impurities as described under Section 2.4.3. The chromatograms of sample solvent 3 and the placebo solution were also obtained to examine possible interferences. As the placebo components were completely removed by hexane during sample preparation (Section 2.3.2), no differences between the chromatograms of the placebo and of the sample solutions were observed. All the peaks of the sample solvent were well separated from the peaks of the impurities and drugs in the sample solution and are designated in the chromatogram of the spiked sample (Fig. 2). The sample solvent peak with retention time of about 8 min was quite intense when a new column was used.

The batch of Spasmopan® two years after its expiry date was analyzed to confirm the capability of the method to analyze the stability samples of this drug product. The impurity profiles of the expired and the actual batch of Spasmopan® were same from a qualitative point of view as no new impurity was observed in the chromatogram of the expired batch. From a quantitative point of view, the only difference was an increase in the content of impurity X compared to its content in pitophenone hydrochloride, which was used for manufacturing the expired batch (Table 5) and thus

Table 6
Robustness data.

Parameter	Retention time (min)	Resolution								
		Paracetamol	Codeine	Pitophenone	Fenpiverinium	4-Aminophenol	Imp. A	Imp. B	Imp. C	Imp. E
pH of mobile phase										
2.3	4.10	14.8	13.9	7.1	4.2	5.2	13.8	21.0	4.6	17.9
2.5	4.13	13.4	12.7	7.4	5.6	4.3	14.4	19.8	4.6	16.4
2.7	4.12	13.5	12.5	8.4	4.6	4.8	13.9	19.4	4.6	15.8
Flow rate										
0.9 ml/min	4.59	13.0	12.5	7.3	6.1	4.9	14.2	19.0	4.6	16.8
1.0 ml/min	4.13	13.4	12.7	7.4	5.6	4.3	14.4	19.8	4.6	16.4
1.1 ml/min	3.79	13.7	12.9	7.3	5.2	3.7	14.5	20.9	4.6	15.9
% Acetonitrile										
–2%	4.57	13.9	12.7	7.3	6.6	4.1	16.6	20.2	5.0	16.2
Initial	4.13	13.4	12.7	7.4	5.6	4.3	14.4	19.8	4.6	16.4
+2%	3.90	12.7	12.6	7.4	4.5	4.6	12.1	19.0	4.2	16.4
Column temperature										
30 °C	4.34	13.3	12.7	6.6	5.8	4.4	14.7	19.1	4.1	16.8
35 °C	4.13	13.4	12.7	7.4	5.6	4.3	14.4	19.8	4.6	16.4
40 °C	4.03	13.4	12.7	7.9	5.6	4.2	14.2	20.4	5.1	16.2
Salt concentration in the buffer										
1.20 g/l	4.12	13.4	12.6	7.3	4.4	4.7	13.8	19.5	4.5	16.8
1.33 g/l	4.13	13.4	12.7	7.4	5.6	4.3	14.4	19.8	4.6	16.4
1.46 g/l	4.22	13.5	12.7	7.3	5.7	4.2	14.3	20.1	4.6	16.4
Second column	4.22	13.6	12.6	7.3	5.8	4.0	14.1	20.5	4.6	16.1

Retention time – reported only for paracetamol (the first integrated peak in the chromatogram).

Resolution – reported for all the compounds except paracetamol, calculated between adjacent peaks.

Table 7
Stability of the sample solution data.

Compound	Time = 0 h [% abs.]	Time = 24 h [% abs.]	Result
4-Aminophenol – autosampler 10 °C/darkness	0.015	0.012	Stable
4-Aminophenol – ambient temperature/not protected from light	0.015	0.004	Unstable
Impurity B – autosampler 10 °C/darkness	0.75	0.74	Stable
Impurity B – ambient temperature/not protected from light	0.75	0.74	Stable
Impurity E – autosampler 10 °C/darkness	0.68	0.69	Stable
Impurity E – ambient temperature/not protected from light	0.68	0.68	Stable
Impurity C – autosampler 10 °C/darkness	0.48	0.45	Stable
Impurity C – ambient temperature/not protected from light	0.48	0.45	Stable
Impurity A – autosampler 10 °C/darkness	2.09	2.05	Stable
Impurity A – ambient temperature/not protected from light	2.09	2.05	Stable
Impurity X – autosampler 10 °C/darkness	0.65	0.64	Stable
Impurity X – ambient temperature/not protected from light	0.65	0.65	Stable

Result – the difference between content is/is not within the acceptance criteria [48].
Acceptance criteria [48].

$C_{imp} < 0.5\%$; change $\leq 20\%$ over specified time.

$0.5\% \leq C_{imp} < 5\%$, change $\leq 10\%$ over specified time.

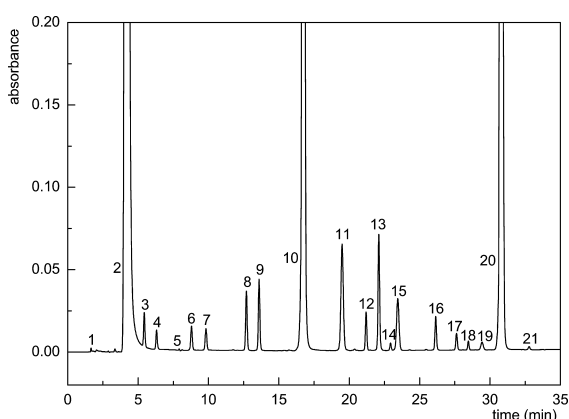


Fig. 2. Chromatogram of the sample solution of Spasmopan® spiked with impurities at concentration levels: 0.01% for 4-aminophenol, 0.1% for 4-nitrophenol and 4-chloroacetanilid, 0.5% for impurities B, E, X, 0.3% for impurity C and 1.0% for impurity A. Detection at 220 nm. Peaks: (1) solvent peak; (2) paracetamol; (3, 4) paracetamol unknown minor impurities; (5) solvent peak; (6) paracetamol unknown minor impurity; (7) 4-aminophenol; (8) impurity B; (9) impurity E; (10) codeine; (11) 4-nitrophenol; (12) impurity C; (13) impurity A; (14) codeine unknown minor impurity; (15) 4-chloroacetanilid; (16) impurity X; (17) fentanyl; (18) impurity PEE; (19) impurity MeKHBB; (20) pitrophenone; (21) pitrophenone unknown minor impurity.

impurity X was confirmed as the main degradation product of pitrophenone hydrochloride in suppository dosage form. Codeine phosphate hemihydrate and paracetamol were found to be stable in suppository dosage form, as no significant increase in their impurities was observed. The peak purity of fentanyl and pitrophenone was evaluated directly in the chromatogram of the sample solution. For evaluation of codeine and paracetamol peak purities, the sample solution had to be diluted two times and five hundred times, respectively, so that the responses were in an appropriate absorbance value range around 1. The peak purity test was successfully met for all the principal peaks of the drugs in analysis of the expired batch (Table 5) and confirmed their spectral clearness.

3.2.4. Robustness

The robustness of the method was tested by changing the variable chromatographic conditions as described in Section 2.4.4. The retention times of the drugs, validated impurities (4-aminophenol, imp. A, imp. B, imp. C, imp. E and imp. X) and resolutions were

monitored. The data are reported in Table 6 and showed that the method is robust, as all the compounds were satisfactorily resolved and the elution order remained unchanged under all the tested changes in the chromatographic conditions.

3.2.5. Stability of reference and sample solutions

The reference and sample solutions, the same solutions as those used for evaluation of the accuracy (Section 3.2.2), were stored and analyzed as described under Section 2.4.5. The reference solution (2.3.3) was found to be stable for up to 72 h stored in the autosampler and at ambient temperature but not protected from light, as the maximum difference in the concentrations of the drugs was 0.003% absolute at a concentration level of 0.200% and therefore was within the acceptance criteria [48]. The sample solution was found to be stable for up to 24 h when stored only in the autosampler, as reported in Table 7, but should be analyzed immediately following preparation because of decomposition of 4-aminophenol.

4. Conclusions

A gradient ion-pair reversed phase HPLC method was developed and validated for separation of paracetamol, codeine phosphate hemihydrate, pitrophenone hydrochloride and their impurities in the presence of fentanyl bromide in combined suppository dosage form. The described method successfully separated related substances of paracetamol (i.e., 4-aminophenol, 4-nitrophenol, 4-chloroacetanilid), codeine impurities A, B, C and E and pitrophenone related substances (i.e., PEE, MeKHBB and impurity X). Impurity X was found to be the main degradation product of pitrophenone hydrochloride in suppository dosage form. The method is precise, linear, accurate, sensitive, specific, robust and capable of analyzing the stability samples of Spasmopan® and could be used as a routine quality control method.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

Financial support from project SVV 260084 of Charles University in Prague is acknowledged.

References

- [1] H. Lüllman, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger, *Color Atlas of Pharmacology*, 2nd ed., Thieme, New York, 2000.
- [2] M.J. Neal, *Medical Pharmacology at a Glance*, 7th ed., Wiley, Hoboken, 2012.

- [3] S.K. Kulkarni, I. Ninan, A. Sighn, Antispasmodic activity of diclofenac and its combination with pitofenone and fempiverinon on rat colon, *Indian J. Pharmacol.* 30 (1998) 323–325, CAN130:148241.
- [4] European Pharmacopoeia, 8.2th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2014.
- [5] A.M. Larson, J. Polson, R.J. Fontana, T.J. Davern, E. Lalani, L.S. Hynan, J.S. Reisch, F.V. Schiødt, G. Ostapowicz, O. Shakil, W.M. Lee, Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study, *Hepatology* 42 (2005) 1364–1372.
- [6] X. Feng, Q. Zhang, P. Cong, Z. Zhu, Determination of the paracetamol degradation process with online UV spectroscopic and multivariate curve resolution-alternating least squares methods: comparative validation by HPLC, *Anal. Methods* 5 (2013) 5286–5293.
- [7] L.M. Flower, R.B. Moore, J.R. Foster, E.A. Lock, Nephrotoxicity of 4-aminophenol glutathione conjugate, *Hum. Exp. Toxicol.* 10 (1991) 451–459, CAN116:209251.
- [8] T. Nemeth, P. Jankovics, J. Nemeth-Palotas, H. Kozegi-Szalai, Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 746–749.
- [9] E. McEvoy, S. Donegan, J. Power, K. Altria, Application of MELC and MEEKC for the analysis of paracetamol and related impurities in suppositories, *Chromatographia* 68 (2008) 49–56.
- [10] G. Milch, E. Szabo, Derivative spectrophotometric assay of acetaminophen and spectrofluorometric determination of its main impurity, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 1107–1113.
- [11] B. Dejaegher, M.S. Bloomfield, J. Smeyers-Verbeke, Y.V. Heyd, Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations, *Talanta* 75 (2008) 258–265.
- [12] J. Forshed, F.O. Andersson, S.P. Jacobsson, NMR and Bayesian regularized neural network regression for impurity determination of 4-aminophenol, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 495–505.
- [13] S.L. Eldridge, V.K. Almeida, A.K. Korir, C.K. Larive, Separation and analysis of trace degradants in a pharmaceutical formulation using on-line capillary isotachopheresis-NMR, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8446–8453.
- [14] E.A. Abdelaleem, N.S. Abdelwahab, Stability-indicating TLC-densitometric method for simultaneous determination of paracetamol and chlorzoxazone and their toxic impurities, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 187–191.
- [15] D.A. Shash, J.P. Rana, S.L. Baldania, U.K. Chhalotiya, K.K. Bhatt, High-performance thin-layer chromatographic method for the estimation of paracetamol, dicyclomine hydrochloride, and mefenamic acid in combined tablet dosage form, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 27 (2014) 52–57.
- [16] I.U. Khan, M. Ashfaq, S.N. Razaq, I. Mariam, Simultaneous determination of piroxicam and paracetamol in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1437–1450.
- [17] M.S. Ali, S. Raffiuddin, M. Ghorri, A.R. Kahtri, Simultaneous determination of paracetamol, chlorzoxazone, and related impurities 4-aminophenol, 4-chloroacetanilide, and p-chlorophenol in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 82–93.
- [18] M. Kamberi, C.M. Riley, X. Ma, C.C. Huang, A validated, sensitive HPLC method for the determination of trace impurities in acetaminophen drug substance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 123–128.
- [19] O. Calinescu, I.A. Badea, L. Vladescu, V. Meltzer, E. Pincu, HPLC separation of acetaminophen and its impurities using a mixed-mode reversed-phase/cation exchange stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 335–342.
- [20] R.N. Rao, A. Narasaraju, Rapid separation and determination of process-related substances of paracetamol using reversed-phase HPLC with photo diode array as a detector, *Anal. Sci.* 22 (2006) 287–292.
- [21] M. Crevar, B. Ivkovic, S. Vladimirov, V. Kuntic, Z. Vujic, Statistical optimization of reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of caffeine paracetamol and its degradation product p-aminophenol, *Acta Chim. Slov.* 55 (2008) 665–670.
- [22] E. Wyszeccka-Kaszuba, M. Warowna-Grzeskiewicz, Z. Fijalek, Determination of 4-aminophenol impurities in multicomponent analgesic preparations by HPLC with amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1081–1086.
- [23] W.R. Sisco, C.T. Rittenhouse, L.A. Everhart, A.M. McLaughl, Simultaneous high-performance liquid chromatographic stability-indicating analysis of acetaminophen, codeine phosphate, and sodium benzoate in elixirs, *J. Chromatogr.* 354 (1986) 355–366.
- [24] W.R. Sisco, C.T. Rittenhouse, L.A. Everhart, Simultaneous high-performance liquid chromatographic stability-indicating analysis of acetaminophen and codeine phosphate in tablets and capsules, *J. Chromatogr.* 348 (1985) 253–263.
- [25] K. Persson-Stubberud, O. Astrom, Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis. II. Validation, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95–102.
- [26] R. Kommana, P. Basappa, Validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of codeine phosphate and chlorpheniramine maleate from their combined liquid dosage form, *Chromatogr. Res. Int.* (2013), 404727 7p.
- [27] Z. Budvari-Barany, G. Szasz, K. Gyemessi-Forras, Optimized and validated HPLC methods for compendial quality assessment. II. Opium alkaloids, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3257–3268.
- [28] A. Kulikov, U. Artem, A.P. Biochenko, A.G. Verushkin, Optimization of micellar LC conditions for separation of opium alkaloids and their determination in pharmaceutical preparations, *Anal. Methods* 3 (2011) 2749–2757.
- [29] L. Krenn, B. Boros, R. Ohmacht, L. Jelinek, HPLC separation of opium alkaloids on porous and non-porous stationary phases, *Chromatographia* 51 (2000) S175–S178.
- [30] I. Bjoernsdottir, S.H. Hansen, Determination of opium alkaloids in opium by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 687–693.
- [31] I. Bjoernsdottir, S.H. Hansen, Comparison of aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis for quantitative determination of morphine in pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1083–1089.
- [32] B. Morelli, Determination of noramidopyrine methanesulfonate sodium salt, pitofenone hydrochloride and fempiverine bromide in pharmaceuticals by ratio – spectra zero – crossing derivative spectrophotometry, *Anal. Lett.* 31 (1998) 2431–2445.
- [33] B. Morelli, Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 423–433.
- [34] T. Galaon, M. Radulescu, V. David, A. Medvedovici, Use of an immiscible diluent in ionic liquid/ion pair LC for the assay of an injectable analgesic, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 1360–1368.
- [35] D. Radulovic, L. Zivarovic, D. Zivanov-Stakic, Determination of mixture of spasmolytics in pharmaceutical preparations using TLC densitometry, *Acta Pol. Pharm.* 46 (1989) 506–509, CAN113:158810.
- [36] D. Agbaba, O. Grozdanovic, L. Popovic, S. Vladimirov, D. Zivanov-Stakic, HPTLC in the quantitative assay of drugs, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9 (1996) 116–119, CAN125:96252.
- [37] D. Radulovic, Z. Blagojevic, Thin layer chromatography of some pharmaceutical preparations containing sodium metamizole, *Arh. Farm.* 32 (1982) 3–7, CAN97:98433.
- [38] I. Ojanpera, J. Vartiavaara, A. Ruohonen, E. Vuori, Combined use of normal and reversed-phase thin-layer chromatography in the screening for basic and quaternary drugs, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1435–1446.
- [39] H. Schuetz, A. Pielmeyer, G. Weiler, Thin-layer chromatographic screening of 500 toxicologically relevant substances by corrected Rf values (Rfc values) in two systems, *Aerzt. Lab.* 36 (1990) 113–123, CAN113:110560.
- [40] T. Daldrup, P. Michalke, W. Boehme, A screening test for pharmaceuticals, drugs and insecticides with reversed-phase liquid chromatography – retention data of 560 compounds, *Chromatogr. Newsl.* 10 (1982) 1–7, CAN98:84433.
- [41] T. Daldrup, F. Susanto, P. Michalke, Combination of TLC, GLC (OV 1 and OV 17) and HPLC (RP 18) for a rapid detection of drugs, intoxicants and related compounds, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 308 (1981) 413–427, CAN96:29498.
- [42] L. Fisnerova, B. Brunova, K. Gajewski, S. Simek, An improved method for the manufacture of spasmolytic 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl]benzoic acid methyl ester hydrochloride. Patent No. CS 266674 Kind B1, 1990, CAN117:90155.
- [43] Y.R. Latha, V. Ananda, V. Chandhy, K. Rao-Gopal, A.R. Ramesh, Synthesis and identification of different polymorphs of pitofenone HCl by FTIR and X-ray diffraction spectrometry, *Res. Rev. Biomed. Biotechnol.* 1 (2010) 101–110, CAN156:560387.
- [44] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [45] USP 37, The United States Pharmacopoeial Convention, 2014.
- [46] L. Hanyšová, P. Kastner, J. Klimeš, Study of stability of 4-aminophenol as dominant decomposition product of paracetamol, *Chem. Listy* 98 (2004) 152–156.
- [47] J.B. Crowther, Validation of pharmaceutical test method, in: S. Ahuja, S. Scypinsky (Eds.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 415–443.
- [48] R. LoBrutto, T. Patel, Method validation, in: Y. Kazakevich, R. LoBrutto (Eds.), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, Hoboken, 2007, pp. 455–502.

Publikace II

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

Jiří Vojta, Aleš Jedlička, Pavel Coufal, Lucie Janečková

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



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



Jiří Vojta^{a,b}, Aleš Jedlička^a, Pavel Coufal^b, Lucie Janečková^{a,*}

^a Zentiva, k.s., Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Science, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2014

Received in revised form 16 January 2015

Accepted 19 January 2015

Available online 18 February 2015

Keywords:

Impurities

Valsartan

Amlodipine

Hydrochlorothiazide

UPLC

ABSTRACT

A new rapid stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form was developed. The separation of Ph. Eur. related substances of amlodipine besylate (A, B, D, E, F, G), hydrochlorothiazide (A, B, C), valsartan (B, C), two other valsartan impurities (S)-2-(N-([2'-cyanobiphenyl-4-yl]methyl)pentanamido)-3-methylbutanoic acid and (S)-3-methyl-2-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methylamino)butanoic acid and several unknown impurities was achieved by reversed phase liquid chromatography with UV detection. The detection wavelengths were set as follows: 225 nm for valsartan, its impurities and for the impurity D of amlodipine, 271 nm for hydrochlorothiazide and its impurities and 360 nm for amlodipine and its impurities except for impurity D. Zorbax Eclipse C8 RRHD (100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm) was used as a separation column and the analytes were eluted within 11 min by a programmed gradient mixture of 0.01 M phosphate buffer pH 2.5 and acetonitrile. The method was successfully validated in accordance to the International Conference of Harmonization (ICH) guidelines for amlodipine besylate and its impurity D, valsartan and its impurity C and hydrochlorothiazide and its impurities A, B and C. The triple-combined tablets were exposed to thermal, higher humidity, acid, alkaline, oxidative and photolytic stress conditions. Stressed samples were analyzed by the proposed method. All the significant degradation products and impurities were satisfactory separated from each other and from the principal peaks of drug substances. The peak purity test complied for peaks of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in all the stressed samples and indicated no co-elution of degradation products. The method was found to be precise, linear, accurate, sensitive, specific, robust and stability-indicating and could be used as a routine purity test method for amlodipine besylate, valsartan, hydrochlorothiazide and their pharmaceutical combinations.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

High blood pressure is a global health issue. It indirectly contributes to the deaths of 9.4 million people every year all around the world as it is a key factor in deaths due to heart disease and stroke [1]. Combined treatment of hypertension allows better control of blood pressure compared with monotherapy in the majority of patients [2]. Valsartan reduces blood pressure through renin-angiotensin system. It causes vasodilatation as an antagonist of the angiotensin II receptor. Hydrochlorothiazide treats the symptoms of hypertension through its diuretic effect [3].

Amlodipine interferes with calcium channels and thus reduces the calcium influx into cells. This reduction leads to a vasodilatation effect and therefore to lower blood pressure [4]. A purity testing method is required by the registration authorities and therefore it is an important part of the development of a drug product. It is necessary to have at disposal a validated analytical method for assuring the maximum safety of drug therapy [5,6]. Liquid chromatography is a widely used method for pharmaceutical analysis and its newest technical approach called “ultra high performance liquid chromatography” has brought significant advantages like higher peak capacity and sensitivity, better resolution, lower solvent consumption and shorter analysis times [7]. Monographs employing the HPLC method for related substances are devoted to valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in European Pharmacopoeia [8] as well as in USP [9]. UPLC

* Corresponding author. Tel.: +420 267 242 354.

E-mail address: Lucie.Janeckova@zentiva.cz (L. Janečková).

methods dealing with impurities were published for valsartan [10] and amlodipine [11]. Determination of valsartan Ph. Eur. impurity C [8] and hydrochlorothiazide Ph. Eur. impurity B [8] in combination with these two drug substances was performed under reversed phase HPLC conditions [9,12]. Other methods were focused mostly on assay of the drug substances in this combination [13–18]. For the combination of valsartan and amlodipine besylate, only stability-indicating [19–21] and non stability-indicating [22–25] assay methods have been published. Amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in combination with olmesartan medoxomile were also analyzed by stability-indicating assay methods [26–28] and by non-stability-indicating assay methods for a combination of amlodipine besylate, hydrochlorothiazide and aliskiren hemifumarate [29,30]. Hydrochlorothiazide impurities A, B and C named according to Ph. Eur. [8] were determined together with losartan and its three impurities by a reversed-phase HPLC method suitable for both assay of drug substances and their purity test [31]. The same hydrochlorothiazide impurities were also determined in a combined tablet dosage form of hydrochlorothiazide and telmisartan [32]. A purity test method for hydrochlorothiazide dealing with its Ph. Eur. impurities A and B [8] was performed by a stability-indicating UPLC method for a combined pharmaceutical dosage form of hydrochlorothiazide and eprosartan [33]. Purity testing methods based on reversed phase HPLC [34] and ion-pair chromatography [35] were developed for the combination of lisinopril and hydrochlorothiazide and its Ph. Eur. impurities A and B [8]. Amlodipine Ph. Eur. impurity D [8] as its main acidic degradation product was determined by stability-indicating purity testing methods for combinations of amlodipine with atorvastatin calcium [36] and amlodipine with benazepril [37]. As mentioned, combined pharmaceutical dosage forms containing valsartan or amlodipine besylate have been analyzed mostly by assay methods and purity test methods have been published mainly for combination with hydrochlorothiazide. The triple combination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide has so far been analyzed only by assay methods. The retention behavior of these drug substances in reversed phase HPLC methods depends on the pH of mobile phase. If a mobile phase with low pH value is used, the analytes elute in the order hydrochlorothiazide, amlodipine and valsartan [38–46]. If weak acidic or neutral conditions are used, the elution order of amlodipine and valsartan is reversed [47–50] and, if neutral or basic buffer is used, valsartan is eluted first, followed by hydrochlorothiazide, and amlodipine leaves the column last [51,52]. Only two stability-indicating assay methods have been published for this triple combination [39,53]. However, no peak purity data and identification of degradation products were provided. Determination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide was also performed by spectrophotometric methods [45,54–56]. The aim of this work was to develop and validate a stability-indicating analytical method for quantitative purity testing of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide, as no method for determination of their impurities in such a combination was found in the literature. The still unofficial USP describes only an HPLC column for the determination of organic impurities of this triple combination [57]. Additionally and according to our best knowledge, no UPLC method for analysis of this combination of drug substances has been published to date.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Reference materials of valsartan, amlodipine besylate, hydrochlorothiazide, samples of triple combined tablets and placebo were supplied by Zentiva (Prague, Czech Republic).

Hydrochlorothiazide impurity chlorothiazide (Imp. A, according to Ph. Eur. [8]) was purchased from European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Strasbourg, France). Hydrochlorothiazide impurity salamide (Imp. B, according to Ph. Eur. [8]) was supplied by Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Hydrochlorothiazide impurity dimer (Imp. C, according to Ph. Eur. [8]) was purchased from TRC (Toronto, Canada). Valsartan impurity C (according to Ph. Eur. [8]) was supplied by HuaHai Pharmaceuticals (Zhejiang, China). Other valsartan impurities such as impurity B (according to Ph. Eur. [8]), (S)-2-(N-([2'-cyanobiphenyl-4-yl]methyl)pentanamido)-3-methylbutanoic acid (Imp.07) and (S)-3-methyl-2-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methylamino)butanoic acid (Imp. 09) were delivered from Divis laboratories (Hyderabad, India). Amlodipine impurity D (according to Ph. Eur. [8]) was supplied by Siegfried (Zofingen, Switzerland). Amlodipine impurities A, B and G (according to Ph. Eur. [8]) were purchased from LGC GmbH (Luckenwalde, Germany) and impurities E and F (according to Ph. Eur. [8]) were purchased from TLC Pharmachem (Vaughan, Canada). Ultra gradient HPLC grade acetonitrile and HPLC gradient grade methanol were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, USA). The mobile phase and solvents were prepared using ammonium dihydrogen phosphate (99.0%), *ortho*-phosphoric acid (85%), sodium hydroxide (99.0%), hydrochloric acid (37.5%) and hydrogen peroxide (30%), all purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and water for chromatography was treated by the Milli-Q system from Merck Millipore (Billerica, USA).

2.2. Chromatographic conditions

The UPLC experiments were performed on the Acquity UPLC H-Class system with column thermostat and PDA detector from Waters (Milford, USA). Data were collected and evaluated by Empower3 software from Waters. UPLC column Zorbax Eclipse Plus C8 RRHD, 100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm particle size, from Agilent (Santa Clara, CA), thermostatted at 30 °C was used for the separation. The mobile phase was a gradient mixture of component A (1.15 g/l solution of ammonium dihydrogen phosphate adjusted to pH 2.5 with *ortho*-phosphoric acid) and component B (acetonitrile). The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/min. The final gradient program [(min)/%B] was 0/15, 11/75, 12/75, 12.5/15 and 15/15. The sample temperature was set at 10 °C and the injection volume was 2 μL. Data for the impurities of valsartan and impurity D of amlodipine were evaluated at a wavelength of 225 nm. Other amlodipine impurities were detected and evaluated at a wavelength of 360 nm and a wavelength of 271 nm was used for evaluation of the impurities of hydrochlorothiazide. The PDA detector operated at sampling rate 10 points per second. A Sonic 6D ultrasonic bath from Polsonic (Warszawa, Poland) was used for sample sonication. Samples were centrifuged with a Mikro 220R centrifuge from Hettich (Tuttlingen, Germany).

2.3. Preparation of solutions

2.3.1. Sample solvent preparation

Ten milliliter of *ortho*-phosphoric acid (85%) were pipetted into a 1000 mL volumetric flask and diluted with water to 1000 mL. This solution was mixed with acetonitrile and methanol in a ratio of 40/30/30 (phosphoric acid solution/acetonitrile/methanol; v/v/v).

2.3.2. Sample solution preparation

Twenty tablets were thoroughly homogenized. An amount of 795 mg of the homogenized sample was weighed into a 25 mL amber volumetric flask and 20 mL of sample solvent were added. The sample was put in an ultrasonic bath and sonicated for 25 min. During the sonication, the sample was occasionally shaken and

Table 1
Composition of the formulated triple combined tablets.

Compound	Amount (mg)	Concentration in the sample solution (mg/mL)	Impurity	Limit (%)
Valsartan	320	12.8	Impurity B	0.2
			Impurity C	0.3
			Impurity 07	0.2
			Impurity 09	0.2
			Unknown impurity	0.2
Hydrochlorothiazide	25	1.0	Impurity A	1.0
			Impurity B	1.0
			Impurity C	1.0
			Unknown impurity	0.2
Amlodipine	10	0.40	Impurity A	0.2
			Impurity B	0.2
			Impurity D	0.5
			Impurity E	0.2
			Impurity F	0.2
			Impurity G	0.2
Unknown impurity	0.2			

the temperature of the bath was controlled not to exceed 25 °C. After the sonication, the sample was made up to the mark with the sample solvent. Then the sample was stirred for 15 min using a magnetic stirring plate. After this, the sample was centrifuged for 10 min at 1.4×10^4 rotations per minute and 10 °C. The supernatant was carefully transferred into a vial using a pipette tip and crimped. The final concentrations of the drug substances were 12.8 mg/mL of valsartan, 0.4 mg/mL of amlodipine and 1.0 mg/mL of hydrochlorothiazide calculated with respect to their contents in the formulated tablets (Table 1).

2.3.3. Standard solution preparation

Valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide reference materials were dissolved in the sample solvent at a concentration level which corresponded to 0.2% of the concentration of the sample solution for all the drug substances.

2.3.4. Placebo solution preparation

An amount of 436 mg of homogenized placebo (mainly composed from croscopovidone, microcrystalline cellulose, stearate and anhydrous colloidal silica) was weighed into a 25 mL amber volumetric flask. Then the placebo solution was prepared in the same way as the sample solution (Section 2.3.2).

2.4. Method validation

The method was validated according to the ICH Q2 (R1) guideline [58] for amlodipine besylate impurity D, hydrochlorothiazide impurities A, B, C and valsartan impurity C. The selectivity of the method was confirmed for all the above mentioned impurities with addition of the other available amlodipine besylate impurities A, B, E, F, G and valsartan impurities B, 07 and 09. These amlodipine besylate and valsartan impurities were quantified as unknown impurities in the sample solution because they did not exceed the limits for unknown impurities during preliminary stability studies of the tablets and therefore it was not necessary to fully validate them. The structures of all impurities and drug substances are shown in Supplementary information 1–3.

Supplementary information 1–3 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.059>.

2.4.1. Precision

The repeatability of the method was verified by analysis of six replicate samples of formulated tablets and then the % RSD

values of the contents of the detected impurities were calculated. The intermediate precision was determined by analyzing six replicate samples of the same batch of formulated tablets by a different analyst in a different laboratory on a different day using a different column (same type, different batch). The % RSD values of the contents of the impurities were calculated for all the replicates (combined from two analysts).

2.4.2. Linearity and accuracy

The linearity and accuracy of the method were examined by analyzing spiked samples of formulated tablets. Reference materials of amlodipine impurity D, hydrochlorothiazide impurities A, B, C and valsartan impurity C were dissolved in the sample solvent and then spiked into the weighed sample of triple combined tablets at five concentration levels, three samples per level. These samples were treated according to the sample solution preparation procedure (Section 2.3.2). The volume of sample solvent was reduced by the volume of spikes of impurities. Three unspiked samples of formulated tablets were also prepared to correct the amount of impurities which were originally present. The linearity and accuracy of determination of drug substances were also evaluated for quantification of unknown impurities. Reference materials of valsartan, hydrochlorothiazide and amlodipine besylate were dissolved in the sample solvent and spiked into the weighed sample of placebo at five concentration levels, three samples per level. These samples were treated according to the procedure of the placebo solution preparation (Section 2.3.4). The volume of sample solvent was reduced by the volume of spikes of impurities. The linearity was calculated for each impurity and each drug from the whole range of concentrations. Samples for evaluation of the linearity and accuracy were prepared corresponding to the concentrations of the related drugs in the sample solution (Section 2.3.2) at the concentration levels: 0.10–0.30% for amlodipine, 0.05–0.30% for hydrochlorothiazide and valsartan, 0.10–0.66% for amlodipine impurity D, 0.05–1.20% for hydrochlorothiazide impurities A and B, 0.10–1.24% for hydrochlorothiazide impurity C and 0.05–0.41% for impurity C of valsartan. The accuracy was calculated for each impurity and each drug as the percent recovery of the amount of the impurity/drug that was added to the sample at three selected levels across the range of concentrations.

2.4.3. Selectivity

The selectivity of the method was confirmed by analysis of the sample spiked with all the available impurities. In addition to

fully-validated impurities, amlodipine besylate impurities A, B, E, F, G and valsartan impurities B, 07 and 09 were also spiked. Impurities were spiked relative to the concentrations of the related drugs in the sample solution (Section 2.3.2). The concentration levels were set as the limit concentrations for each impurity (see Table 1). Chromatograms of the sample solvent and the placebo solution were also obtained to demonstrate that there were no interferences with the peaks for the spiked sample. The stability-indicating property of the method was examined by performing the forced degradation study (see Section 2.5). The peak purity test was also evaluated to confirm that there was no co-elution of any unknown impurity with the principal peaks of the drugs.

2.4.4. Robustness

The robustness of the method was examined by varying the chromatographic conditions, such as the pH of the buffer (± 0.3), column temperature ($\pm 5^\circ\text{C}$), flow rate ($\pm 0.1\text{ mL/min}$), volume of acetonitrile at all points of the gradient ($\pm 2\%$), concentration of salt in the buffer ($\pm 10\%$) and particular column used. The spiked sample prepared in the same way as the sample for evaluation of the selectivity (Section 2.4.3) was analyzed and the retention times of all the impurities and principal peaks were monitored.

2.4.5. Stability of the sample and standard solutions

One sample solution from the linearity evaluation (Section 2.4.2) was used for a stability study of the sample solution. The sample was stored in an autosampler at 10°C in the dark as well as at ambient temperature not protected from the light. It was analyzed after 15, 36 and 48 h. The standard solution was stored under the same conditions as the sample solution and was analyzed after 24, 48 and 72 h. The absolute differences in the contents of the impurities and drugs between the measurements at the beginning and at the end of the stability study were calculated and evaluated.

2.5. Forced degradation study

The ability of the method to separate drug substances and their known and unknown degradation products was examined by a forced degradation study. The samples of homogenized tablets were treated under thermal, hydrolytic, acidic, alkaline, oxidative and photolytic stress conditions. Then they were prepared according to procedure described in Section 2.3.2. An unstressed sample solution was also prepared as a blank in this study. For evaluation of the peak purity of hydrochlorothiazide and valsartan, the sample solutions had to be diluted 25 times and 125 times, respectively, so that the responses were in an appropriate absorbance value range around 1.

2.5.1. Stress conditions

For dry thermal stress conditions, the weighed sample was placed in an oven at 65°C for 18 h. For hydrolytic stress conditions, one milliliter of water was added to the weighed sample and then the sample was kept at 65°C for 18 h. For acidic and alkaline stress conditions, three milliliter of 0.5 M HCl and two milliliter of 0.2 M NaOH were added to the weighed sample and then the sample was treated at 50°C for 2 h. To simulate oxidative stress conditions, three milliliter of 30% H_2O_2 were added to the weighed sample and then the sample was kept at 50°C for 2 h. For photolytic stress conditions, the sample was prepared according to the procedure described in Section 2.3.2 but without using an amber volumetric flask. The sample was exposed to daylight for 18 h before centrifugation.

3. Results and discussion

3.1. Method development and optimization

3.1.1. Chromatographic conditions

The reversed phase UPLC method with gradient elution of the mobile phase consisting of low pH phosphate buffer and acetonitrile was chosen as a default chromatographic system because of its benefits [7] and good peak shapes provided by assay methods [38–46]. The sample for optimization of the chromatographic conditions was prepared as described in Section 2.3.2 but 60% methanol was used as a solvent and the sample was spiked with all the available impurities at concentration levels corresponding to their limits (see Table 1). To achieve satisfactory retention of highly polar hydrochlorothiazide, the gradient had to start with a low content of acetonitrile. The first promising separation was achieved on an Acquity UPLC BEH C8 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm column at 25°C with a linear gradient of 95% of 0.01 M ammonium dihydrogen phosphate buffer pH 2.5 and 5% acetonitrile at the beginning to 35% of the buffer and 65% acetonitrile after 7 min (flow rate 0.4 mL/min) with injection volume of 1.0 μL . However, satisfactory sensitivity for amlodipine and its impurities was not achieved with this injection volume because of the low concentration of amlodipine in the sample solution compared to hydrochlorothiazide and valsartan (see Table 1). Several critical pairs of compounds (i.e., hydrochlorothiazide impurities B and A; hydrochlorothiazide impurity A and hydrochlorothiazide; unknown hydrochlorothiazide impurity and valsartan impurity 09; hydrochlorothiazide impurity C and unknown impurity of valsartan; valsartan and amlodipine impurity B; and amlodipine impurities B and G) were monitored carefully to achieve sufficient resolution. The sensitivity for amlodipine and its impurities could have been improved by using a larger injection volume (2 μL). However, the column was overloaded by hydrochlorothiazide and its peaks were distorted when 2 μL were injected. The gradient programs starting with 10% or 15% of acetonitrile resulted in better peak shapes for hydrochlorothiazide impurities, but they were still partly distorted even when 1 min of isocratic elution was added into the program. A higher content of acetonitrile at the start of the gradient program led to co-elution of hydrochlorothiazide impurities B and A. Other columns with similar dimensions, such as fused-core Ascentis Express C8 2.7 μm and Zorbax Eclipse Plus C8 RRHD 1.8 μm were also tested under these conditions and both of them yielded similar elution profile to the BEH C8 column and suffered from distortion of the hydrochlorothiazide peaks. Finally, the column Zorbax Eclipse C8 Plus RRHD 3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm was chosen. The diameter of 3.0 mm meant that it was necessary to use a flow rate of 0.8 mL/min. An injection volume of 2 μL of the sample solution could be used with this column as the hydrochlorothiazide peaks were no longer distorted, the column was not overloaded and, despite the higher column volume, the sensitivity was maintained for amlodipine impurity D. A smoother baseline compared to that observed with the narrower columns was also achieved. The gradient program (slower compared to the original gradient program) and column temperature were gradually adjusted to their final values as described in Section 2.2 and consequently satisfactory resolution of all the critical pairs of peaks was achieved ($R \geq 2.2$). The detection wavelengths were set as a compromise between the sensitivity and selectivity for each drug substance based on their absorption spectra. Amlodipine exhibited strong absorption at 238 nm and 360 nm. The latter was chosen as an optimal wavelength because of the better signal to noise ratio, except for impurity D, which did not absorb at this wavelength. This impurity was finally evaluated at 225 nm, which was also the optimal wavelength for valsartan and its impurities. Hydrochlorothiazide absorbed UV light strongly at 229 nm, 271 nm and 317 nm. The

middle value was chosen because hydrochlorothiazide impurity A did not absorb at 317 nm.

3.1.2. Sample preparation

An amount of 795 mg of homogenized tablets had to be dissolved in a volume of 25 mL to achieve satisfactory sensitivity for all the drug substances and impurities without overloading the separation column. Originally 60% methanol was used as a solvent. It was found, however, that hydrochlorothiazide is quite unstable in this solvent, as the area corresponding to its impurity B increased rapidly (65% of area after 18 h at laboratory temperature). In addition, the recovery of hydrochlorothiazide impurity C in 60% methanol was not satisfactory. Degradation of hydrochlorothiazide to its impurity B was stopped by using a 1.6% solution of *ortho*-phosphoric acid instead of water in 60% methanol. The recovery of impurity C improved when 80% methanol or 60% acetonitrile were used as solvents. However, the peaks of hydrochlorothiazide and its impurities were distorted when these sample solvents were used. Consequently, the combination of the two variants led to a final sample solvent consisting of a 1.6% solution of *ortho*-phosphoric acid, acetonitrile and methanol in a volume ratio of 40/30/30 (v/v/v). Using this sample solvent, hydrochlorothiazide was found to be stable in the sample solution for up to 48 h at 10 °C (see Section 3.2.5) and satisfactory recovery of hydrochlorothiazide impurity C was achieved (see Section 3.2.2). The need to maintain a constant temperature during sonication (25 °C) and centrifugation (10 °C) was also a result of the instability of hydrochlorothiazide. When the temperature was not maintained constant, a significant increase (up to 73%) in the peak area of hydrochlorothiazide unknown impurity RRT 1.25 was found in comparison with the sample prepared under controlled conditions. It was necessary to use the amber volumetric flask due to the photosensitivity of amlodipine (see Section 3.3.2).

3.2. Method validation

3.2.1. Precision

The repeatability and intermediate precision were determined as described in Section 2.4.1. Impurities present in the real sample were determined as a percent of the amount of related drug in one tablet against the calibration obtained by injection of a standard solution. The % RSD of the content was calculated for one unknown minor impurity of valsartan, amlodipine impurity D and hydrochlorothiazide impurities A, B and C, which were present in the samples. The % RSD values of the peak areas of five injections of standard solution were also calculated. The intermediate precision was evaluated as the % RSD values of all the results obtained by the first and second analysts. The values of RSD $\leq 0.5\%$ for five injections of the standard solution and RSDs in the range 0.31–1.2% for the contents of impurities met the acceptance criteria [59] and demonstrated the good repeatability of the method. The % RSD values of the contents of impurities calculated from all the replicates were in the range 1.7–13%, met the acceptance criteria [59] and demonstrated the intermediate precision of the method (Table 2).

3.2.2. Linearity, accuracy, LOD and LOQ

The linearity and accuracy of the method were verified by analyzing spiked samples of tablets and placebo as described in Section 2.4.2. The relative response factor for each impurity was included to calculate the recovery. This factor was calculated as the ratio of the slopes of the linearity regression lines of the drug substance and its particular impurity (based on the peak areas). The LOD and LOQ values were determined as ratios $3.3 \times \sigma/S$ and $10 \times \sigma/S$, respectively, where σ was the mean value of the baseline noise obtained from six chromatograms of the placebo solution and S was the slope of the regression line (based on peak heights) obtained from the linearity

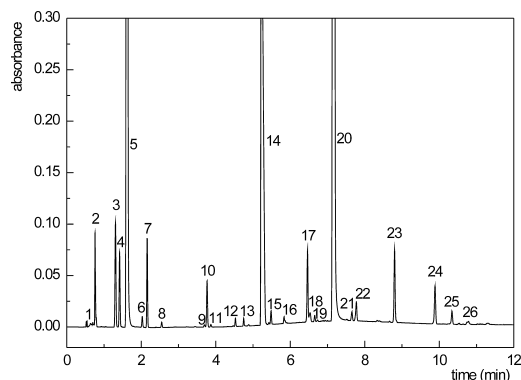


Fig. 1. Chromatogram of the sample solution of formulated tablets spiked with impurities at limit concentration levels (see Table 1). Evaluated at 225 nm. Peaks: (1) solvent peaks; (2) besylate; (3) impurity B (HCTZ); (4) impurity A (HCTZ); (5) hydrochlorothiazide; (6) unknown impurity RRT 1.25 (HCTZ); (7) impurity 09 (VALS); (8) unknown impurity RRT 1.57 (HCTZ); (9) minor unknown impurity of hydrochlorothiazide; (10) impurity C (HCTZ); (11) unknown impurity RRT 0.54 (VALS); (12) impurity D (AMLO); (13) impurity F (AMLO); (14) amlodipine; (15) unknown impurity RRT 0.77 (VALS); (16) impurity E (AMLO); (17) impurity C (VALS); (18) unknown impurity RRT 0.91 (VALS); (19) minor unknown impurity of valsartan; (20) valsartan; (21) impurity B (AMLO); (22) impurity G (AMLO); (23) impurity 07 (VALS); (24) impurity B (VALS); (25) impurity A (AMLO); (26) solvent peaks. HCTZ – hydrochlorothiazide, AMLO – amlodipine, VALS – valsartan.

data. Data such as the regression equation, correlation coefficient, RSD of the area/concentration ratio and standard deviation values of the slope and the intercept are reported in Table 3 and showed excellent linearity between the peak area and the concentration for each compound, as well as the fact that points in the residual plots were randomly distributed around the horizontal axis. The LOD and the LOQ data are reported in Table 4 and showed satisfactory sensitivity of the method. The relative response factors and recovery data are reported in Table 5 and indicated that the method is accurate, as the recovery values were in the range 92–104%. The RSD value of the recovery $\leq 3.4\%$ demonstrated the repeatability of the determination for all the spiked analytes. Baseline noise, LOD, LOQ and recovery of amlodipine were evaluated at a detection wavelength of 360 nm because only impurity D from among the amlodipine impurities was detected at 225 nm.

3.2.3. Selectivity

The selectivity of the method was examined by analyzing a sample spiked with all the available impurities at their limit levels (see Table 1), as described in Section 2.4.3. The chromatograms of the sample solvent and placebo solution were also obtained to examine possible interferences. All the peaks of the sample solvent and placebo solution were separated from the peaks of the impurities and drugs in the sample solution and are designated in the chromatogram of the spiked sample (Fig. 1). A forced degradation study was performed to confirm the stability-indicating ability of the method (see Section 3.3). The chromatogram of the spiked sample solution evaluated at 225 nm (all the impurities were detected) is shown in Fig. 1. It demonstrates satisfactory selectivity of the method as the resolution of all the peaks of interest was not less than 2.2 with the exception of partial co-elution of valsartan impurity C with valsartan unknown impurity RRT 0.91 (resolution $R = 1.02$) and partial co-elution of amlodipine impurity E with a minor unknown impurity of valsartan ($R = 0.75$). The selectivity of the method was enhanced by using different detection wavelengths for each drug substance and its impurities. As a result, the partial co-elution of amlodipine impurity E and unknown impurity of valsartan visible at 225 nm was resolved by detection of

Table 2
Precision data.

Compound	Content range (%)	Precision RSD (%)	Intermediate precision RSD (%)
Hydrochlorothiazide	–	0.36	–
Amlodipine	–	0.44	–
Valsartan	–	0.27	–
Unknown imp. of valsartan	≤0.05	0.58	4.0
Imp. D (amlodipine)	0.05–0.20	0.95	13
Imp. A (hydrochlorothiazide)	≤0.05	1.2	2.7
Imp. B (hydrochlorothiazide)	≤0.05	0.71	3.8
Imp. C (hydrochlorothiazide)	0.20–0.50	0.31	1.7
Precision	Intermediate precision		
$c_{\text{imp}} < 0.1\%$; RSD ≤ 30%	$c_{\text{imp}} < 0.1\%$; RSD ≤ 40%		
$0.1 \leq c_{\text{imp}} < 0.2\%$; RSD ≤ 20%	$0.1 \leq c_{\text{imp}} < 0.2\%$; RSD ≤ 30%		
$0.2 \leq c_{\text{imp}} < 0.5\%$; RSD ≤ 10%	$0.2 \leq c_{\text{imp}} < 0.5\%$; RSD ≤ 15%		

Content range – the content of the impurity in percent of the related drug amount in one tablet.

Precision RSD – for hydrochlorothiazide, amlodipine and valsartan calculated from the peak areas of five injections of the standard solution; for impurities calculated from the content determined from six replicate samples.

Intermediate precision RSD – for impurities calculated from the content determined from twelve replicate samples (combined from two analysts).

Acceptance criteria [59].

Table 3
Linearity data.

Compound	Concentration range (%)	Regression equation	Correlation coefficient	RSD of area/concentration ratio (%)	SD of the slope	SD of the intercept
Hydrochlorothiazide	0.05–0.30	$y = 9.3291 \cdot 10^4 x + 68$	1.000	0.59	168	34
Amlodipine at 225 nm	0.10–0.30	$y = 1.9448 \cdot 10^4 x + 36$	0.999	0.96	83	17
Amlodipine at 360 nm	0.10–0.30	$y = 9.4960 \cdot 10^3 x + 28$	0.999	2.3	93	19
Valsartan	0.05–0.30	$y = 1.0349 \cdot 10^6 x + 1723$	1.000	1.5	2262	446
Imp. A (hydrochlorothiazide)	0.05–1.20	$y = 4.8862 \cdot 10^4 x - 197$	1.000	1.4	73	57
Imp. B (hydrochlorothiazide)	0.05–1.20	$y = 7.1284 \cdot 10^4 x - 304$	1.000	0.8	149	114
Imp. C (hydrochlorothiazide)	0.10–1.24	$y = 6.9387 \cdot 10^4 x - 511$	0.999	3.7	387	308
Imp. D (amlodipine)	0.10–0.66	$y = 1.9347 \cdot 10^4 x - 123$	0.999	1.3	106	47
Imp. C (valsartan)	0.05–0.41	$y = 1.1037 \cdot 10^6 x + 649$	1.000	0.54	1372	354

Regression equation – relationship between peak area and concentration.

Acceptance criteria [60]: correlation coefficient >0.98 for impurities and >0.99 for drug substances. RSD of area/concentration ratio ≤ 10.0% for impurities and ≤ 3.0% for drug substances.

amlodipine impurities at 360 nm. Valsartan and its impurities did not absorb at 360 nm and impurity E was evaluated as a single peak. Despite the partial co-elution, valsartan impurity C was quantified successfully and accurately (see Table 5). Due to the resolution, valsartan impurity C was cut off from the unknown impurity. In addition, both impurities had similar valsartan's absorption spectra and the unknown impurity never exceeded the reporting limit for valsartan (0.05%) during the preliminary stability studies of tablets and the forced degradation study.

3.2.4. Robustness

The robustness of the method was tested by changing the variable chromatographic conditions as described in Section 2.4.4. The retention times of the drugs, all spiked impurities and several

unknown impurities were monitored and resolution values for all peaks were calculated. The data are reported in Table 6 and showed that the method is robust since resolution values did not change significantly with an exception when a buffer with higher pH was used. The pair of compounds hydrochlorothiazide impurity C and the unknown impurity of valsartan RRT 0.54 were co-eluted when the buffer with pH 2.8 was used. The separation of these compounds was robust at pH values up to 2.7 ($R \geq 1.9$).

3.2.5. Stability of reference and sample solutions

The reference and sample solutions, the same solutions as those used for evaluation of the accuracy (Section 3.2.2), were stored and analyzed as described under Section 2.4.5. The reference solution (Section 2.3.2) was found to be stable for up to 72 h stored

Table 4
LOD and LOQ data.

Compound	σ (μV)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (%)	LOQ (%)
Hydrochlorothiazide	45	0.028	0.086	0.003	0.009
Amlodipine at 225 nm	–	–	–	–	–
Amlodipine at 360 nm	45	0.093	0.283	0.023	0.071
Valsartan	62	0.047	0.141	0.0004	0.001
Imp. A (hydrochlorothiazide)	45	0.056	0.171	0.006	0.017
Imp. B (hydrochlorothiazide)	45	0.040	0.120	0.004	0.012
Imp. C (hydrochlorothiazide)	33	0.028	0.084	0.003	0.008
Imp. D (amlodipine)	107	0.103	0.313	0.026	0.078
Imp. C (valsartan)	62	0.044	0.135	0.0003	0.001

σ – baseline noise obtained from the chromatogram of the placebo solution at the retention time of the analyte, calculated as the mean of six injections.

LOD – limit of detection, LOQ – limit of quantification.

Table 5
Relative response factors and accuracy data.

Parameter	Hydrochlorothiazide			Amlodipine		Valsartan		
	Substance	Imp. A	Imp. B	Imp. C	Substance	Imp. D	Substance	Imp. C
RRF	–	1.91	1.31	1.34	–	1.01	–	0.94
Level 1 (%)	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10	0.05	0.05
Recovery (%)	96.7	91.8	94.4	100.0	103.7	94.4	103.3	100.6
RSD (%)	0.7	0.2	1.1	1.4	3.4	0.4	2.4	0.4
95% confidence interval	95.1–98.3	91.4–92.2	91.7–97.1	96.6–103.5	94.9–112.5	93.4–95.4	97.1–109.4	99.5–101.7
Level 2 (%)	0.24	1.02	1.00	1.03	0.24	0.55	0.24	0.34
Recovery (%)	95.5	95.6	95.4	95.0	100.5	95.7	100.3	99.2
RSD (%)	0.4	0.3	0.4	0.3	0.7	0.5	0.3	0.1
95% confidence interval	94.6–96.3	94.9–96.3	94.5–96.3	94.3–95.7	98.6–102.3	94.6–96.9	99.5–101.2	99.0–99.4
Level 3 (%)	0.30	1.20	1.20	1.24	0.30	0.66	0.3	0.41
Recovery (%)	95.5	95.5	95.7	95.3	99.3	96.4	99.9	99.5
RSD (%)	0.3	0.3	0.3	0.2	0.7	1.1	0.2	0.2
95% confidence interval	94.7–96.3	94.7–96.4	94.8–96.7	94.7–95.8	97.6–100.9	93.9–99.0	99.5–100.3	98.9–100.1

RRF – relative response factor, calculated as a ratio of slopes of regression lines of the drug substance and its particular impurity.

Acceptance criteria [60].

$0.05 \leq c < 0.1\%$; recovery: 50.0–150.0%.

$0.1 \leq c < 0.5\%$; recovery: 70.0–130.0%.

$0.5 \leq c < 1.0\%$; recovery: 80.0–120.0%.

$c \geq 1.0\%$; recovery: 90.0–110.0%.

in the autosampler at 10 °C and also at ambient temperature not protected from the light, as the maximum difference in the concentrations of the drugs was 1.5% relative (0.003% absolute) at a concentration level of 0.200% and therefore the difference was within the acceptance criteria (change $\leq 10\%$ relative over the specified time) [59]. The sample solution was found to be stable for up to 48 h when stored in the autosampler at 10 °C, as the difference in the contents of impurities was in the range 0.01–2.86% relative and therefore within the acceptance criteria (change $\leq 10\%$ over the specified time) [59]. The partial instability of hydrochlorothiazide and its impurity C resulted in stability of the sample solution only for up to 36 h at ambient temperature. After that, the contents of two unknown hydrochlorothiazide impurities RRT 1.25 and RRT 1.57 increased over the reporting limit (0.05%) and thus did not meet the acceptance criteria (no new impurity \geq reporting limit) [59]. In addition, the content of hydrochlorothiazide impurity C decreased by 7.5% relative after 36 h at ambient temperature.

That value met the acceptance criteria [59] but the degradation was significant compared the value of the solution stored in the autosampler at 10 °C (0.17% relative after 48 h).

3.3. Forced degradation study

The stability-indicating property of the method was confirmed by analysis of the degraded samples. The samples were stressed under the thermal, hydrolytic, acidic, alkaline, oxidative and photolytic conditions described in the Section 2.5 and analyzed. DAD data of analyzed samples were evaluated. Degradation products were assigned to the proper drug substance on the basis of the UV spectra and preliminary experiments with separately stressed active pharmaceutical ingredients. All the detected degradation products and present impurities were satisfactory separated from each other ($R \geq 1.2$). The peak purity test successfully passed for the peaks of hydrochlorothiazide, amlodipine and valsartan in

Table 6
Robustness data expressed as resolution between adjacent peaks.

Parameter	Standard conditions	Second column	% acetonitrile		pH of the buffer (2.5)		Salt concentration in the buffer (1.15 g/l)		Flow rate (0.8 mL/min)		Column temperature (30 °C)	
			–2%	+2%	2.2	2.8	1.04 g/l	1.27 g/l	0.7 mL/min	0.9 mL/min	25 °C	35 °C
Compound												
Besylate ^a	0.76	0.74	0.84	0.71	0.77	0.76	0.77	0.77	0.87	0.68	0.77	0.76
Imp. B (HCTZ)	13.9	12.9	14.1	13.2	13.9	14.3	14.1	14.0	14.5	13.3	14.9	13.1
Imp. A (HCTZ)	2.4	2.4	3.1	1.9	2.5	2.4	2.6	2.5	2.6	2.4	2.7	2.4
Hydrochlorothiazide	3.3	3.1	3.5	3.0	3.3	3.2	3.3	3.3	3.3	3.2	3.4	3.2
Imp. RRT 1.25 (HCTZ)	6.8	6.7	7.5	6.3	6.8	6.8	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.8
Imp. 09 (VALS)	3.3	3.0	6.3	1.3	4.5	2.0	3.3	3.5	3.0	4.6	2.8	4.4
Imp. RRT 1.57 (HCTZ)	9.8	10.2	8.4	10.7	9.0	11.3	10.1	10.0	10.7	8.7	10.7	8.8
Imp. C (HCTZ)	26.9	26.8	27.5	24.9	26.4	26.2	26.9	26.7	25.9	26.8	26.9	25.3
Imp. RRT 0.54 (VALS)	2.3	1.7	2.8	2.2	2.1	–	1.8	1.9	1.7	3.0	0.9	3.4
Imp. D (AMLO)	16.2	16.2	16.7	15.6	15.7	17.3	16.2	15.9	15.1	17.7	16.0	16.7
Imp. F (AMLO)	6.2	6.3	6.2	6.3	6.2	6.2	6.3	6.3	6.0	6.4	6.6	6.0
Amlodipine	6.7	6.4	6.6	6.7	6.8	6.4	6.7	6.7	6.5	6.9	6.7	6.7
Imp. RRT 0.77 (VALS)	3.6	3.9	3.6	3.8	4.0	3.3	3.9	3.9	4.4	3.1	3.9	3.6
Imp. E (AMLO)	8.1	7.5	8.0	8.0	7.7	8.7	8.0	8.0	6.8	8.2	8.3	8.1
Imp. C (VALS)	14.4	15.2	14.3	14.5	15.4	13.7	15.4	15.4	15.7	12.0	15.5	14.1
Imp. RRT 0.91 (VALS)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
Valsartan	6.2	6.1	6.2	6.2	6.3	6.1	6.3	6.4	6.2	6.2	6.4	6.2
Imp. B (AMLO)	5.9	5.8	5.5	5.5	5.5	5.9	5.7	5.6	5.8	5.4	5.9	5.2
Imp. G (AMLO)	2.2	2.2	2.2	2.2	2.4	1.6	2.2	2.2	1.6	3.1	2.1	2.4
Imp. 07 (VALS)	19.3	20.6	18.9	19.1	19.7	19.3	19.4	19.7	20.0	20.0	19.9	19.0
Imp. B (VALS)	19.4	19.2	19.4	19.4	19.2	19.0	19.4	19.5	18.9	19.8	19.1	19.4
Imp. A (AMLO)	7.9	8.0	7.8	7.8	7.8	8.0	8.0	8.0	8.0	7.6	8.3	7.4

^a The first integrated peak in the chromatogram. The retention times in minutes are reported.

HCTZ – hydrochlorothiazide, VALS – valsartan, AMLO – amlodipine.

Table 7
Forced degradation study data.

Stress condition	Hydrochlorothiazide			Amlodipine			Valsartan		
	Degradation products	Purity		Degradation products	Purity		Degradation products	Purity	
		Angle	Threshold		Angle	Threshold		Angle	Threshold
Thermal 65 °C, 18 h	Imp. B	0.030	0.251	Imp. D	0.043	0.244	Imp. 09 RRT 0.54	0.056	0.269
Hydrolytic (1 mL H ₂ O) 65 °C, 18 h	Imp. B, C, A RRT 1.25, 1.57 RRT 2.08, 2.14	0.033	0.253	Imp. D; RRT 0.79 RRT 0.96, 0.98, 1.21 1.33, 1.74, 1.87, 1.88	0.098	0.240	Imp. 09 RRT 0.54 RRT 0.94, 1.19	0.053	0.268
Acidic (3 mL 0.5 M HCl) 50 °C, 2 h	Imp. B, C, A RRT 1.57	0.031	0.256	Imp. D	0.053	0.247	Imp. 09	0.047	0.270
Alkaline (2 mL 0.2 M NaOH) 50 °C, 2 h	Imp. B, C RRT 1.57	0.308	0.549	Imp. D RRT 0.79, 1.87	0.056	0.248	–	0.477	1.098
Oxidative (3 mL 3% H ₂ O ₂) 50 °C 2 h	Imp. B	0.060	0.298	Imp. D	0.041	0.244	Imp. 09 RRT 0.54	0.060	0.270
Photolytic (daylight) 18 h	–	0.030	0.252	Imp. D	0.035	0.247	–	0.038	0.259

The peak is spectrally clear if the purity angle < the purity threshold.

analysis of all the stressed samples and thus confirmed the spectral clearness of the principal peaks. The data from the forced degradation study are summarized in Table 7 and represent the stability-indicating ability of the method. The method was found to be suitable for the analysis of stability samples.

3.3.1. Hydrochlorothiazide

As mentioned in Sections 3.1.2 and 3.2.5, hydrochlorothiazide was found to be a relatively unstable molecule. Impurity B was found as hydrochlorothiazide's main degradation product as its content increased significantly under all the stress conditions with the exception of daylight conditions. The maximum degradation was observed under the hydrolytic stress condition as the content of impurity B increased 175 times in comparison with an unstressed sample. The impurities A and C and unknown impurities RRT 1.25 and RRT 1.57 were also found as degradation products under the hydrolytic stress conditions, as their contents increased two-fold, three-fold, three-fold and ten-fold, respectively. Degradation of hydrochlorothiazide under different conditions and peak purity data are reported in Table 7.

3.3.2. Amlodipine

Amlodipine degraded mainly to its impurity D. The content of impurity D increased under all the stress conditions including daylight. After 18 h of daylight, the amount of impurity D increased twice and this resulted in the necessity of using amber glass for preparation of the sample solution. Similar to hydrochlorothiazide, the main degradation was observed under hydrolytic stress conditions. Other degradation products, such as several unknown impurities, were detected and data including peak purity are reported in Table 7.

3.3.3. Valsartan

Valsartan was found to be relatively stable in comparison with hydrochlorothiazide and amlodipine. It degraded significantly only to impurity 09 under thermal, hydrolytic, acidic and oxidative stress conditions (Table 7). However, due to the amount of valsartan in the tablets and therefore in the sample solution, the content of impurity 09 increased over the reporting limit (0.05%) only under the thermal and hydrolytic stress conditions. Despite the degradation pathway, the limit for unknown impurities (0.2%) was found to be suitable for impurity 09 and thus it did not need to be validated as described in Section 3.2. No degradation of valsartan was observed under the alkaline and photolytic stress conditions. An increase in the contents of several unknown impurities was observed under

hydrolytic and oxidative stress conditions. Peak purity data and a list of degradation products are reported in Table 7.

4. Conclusion

A new rapid gradient-reversed phase UPLC method was developed and validated for separation of hydrochlorothiazide, amlodipine, valsartan and their impurities in combined tablet dosage form. The described method successfully separated Ph. Eur. related substances of hydrochlorothiazide A, B and C, amlodipine besylate Ph. Eur. related substances A, B, D, E, F and G, valsartan Ph. Eur. related substances B and C and impurities 07 and 09 and several unknown impurities of all the drug substances. The method is precise, linear, accurate, sensitive, specific, robust and stability-indicating. The method could be used as a routine quality control method of triple combined dosage form and also for stability studies.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

The financial support from the project SVV 260205 of Charles University in Prague is gratefully acknowledged.

References

- [1] A Global Brief on Hypertension, World Health Organization, Geneva, 2013.
- [2] , in: Guidelines for the management of arterial hypertension, Eur. Heart J. 28 (2007) 1462–1536.
- [3] H. Lüllman, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger, Color Atlas of Pharmacology, 2nd ed., Thieme, New York, 2000.
- [4] G.A. McKay, R.M. Walters, Lecture Notes, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 9th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2013.
- [5] S. Gorog, Drug safety, drug quality, drug analysis, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 247–253.
- [6] S. Ahuja, Assuring quality of drugs by monitoring impurities, Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (2007) 3–11.
- [7] M. Gumustas, S. Kurbanoğlu, B. Uslu, S.A. Oskan, UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, Appl. Valid. Parameters Chromatogr. 76 (2013) 1365–1427.
- [8] European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 8.2th ed., 2014, Strasbourg.
- [9] USP 37, The United States Pharmacopoeial Convention, 2014.
- [10] C. Krishnaiah, A.R. Reddy, R. Kumar, K. Mukkanti, Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms, J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 483–489.
- [11] R. Kormany, J. Fekete, D. Guillarme, S. Fekete, Reliability of simulated robustness testing in fast liquid chromatography, using state-of-the-art column technology, instrumentation and modelling software, J. Pharm. Biomed. Anal. 89 (2014) 67–75.

- [12] D. Ivanovic, A. Malenovic, B. Jancic, M. Madenica, M. Maskovic, Monitoring of impurity level of valsartan and hydrochlorothiazide employing RP-HPLC gradient mode, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 2879–2890.
- [13] M. Kharoaf, N. Malkeih, M. AbuAlhasan, R. Shubitah, N. Jaradat, A.N. Zaid, Tablet formulation and development of a validated stability indicating HPLC method for quantification of valsartan and hydrochlorothiazide combination, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2012) 284–290.
- [14] P. Antil, D. Kaushik, G. Jain, K.S. Srinivas, I. Thakur, UPLC method for simultaneous determination of Valsartan & Hydrochlorothiazide in drug products, *J. Chromatogr. Sep. Technol.* 4 (2013) 1–5.
- [15] A.A. Elshanawane, L.M. Abdelaziz, M.M. Kamal, H.M. Hafez, Quantitative determination of four angiotensin-II-receptor antagonists in presence of hydrochlorothiazide by a gradient technique HPLC in their pharmaceutical preparations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37 (2014) 171–186.
- [16] S. Singh, K. Patel, V.K. Agrawal, S. Chaturverdi, Stability indicating HPTLC method for simultaneous determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in tablets, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2012) 468–471.
- [17] S. Ahmed, N.N. Atia, N.A. Mohamed, Dual separation mode for simultaneous determination of antihypertensive drug combinations by high-performance liquid chromatography, *Talanta* 84 (2011) 666–672.
- [18] A.A. Ramadan, H. Al-Akrra, M. Maktabi, TLC simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in pure form and in tablets using butyl-modified Aleppo Bentonite, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (2013) 762–769.
- [19] C.V.N. Prasad, Ch.S. Kumari, J.S. Ramulu, A stability indicating RP-HPLC method with shorter runtime for simultaneous estimation of Valsartan and Amlodipine from their combination drug product, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 1 (2011) 102–110.
- [20] S.S. Chitlange, K. Bagri, D.M. Sakarkar, Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of Valsartan and Amlodipine in capsule formulation, *Asian J. Res. Chem.* 1 (2008) 15–18, CAN 151:497799.
- [21] Y.R. Reddy, K.K. Kumar, M.R.P. Reddy, K. Mukkanti, Rapid determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceutical preparations by stability-indicating ultra performance liquid chromatography, *Anal. Chem.: Indian J.* 11 (2012) 335–341, CAN 157:616076.
- [22] S.R. Dhaneshwar, N.G. Patre, M.V. Mahadik, Validated TLC method for simultaneous quantitation of amlodipine besylate and valsartan in bulk drug and formulation, *Chromatographia* 69 (2009) 157–161.
- [23] N.H. Al-Shaalan, M.A. Alnowaiser, Simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceutical formulation using high performance liquid chromatography, *J. Chem. Pharm. Res.* 2 (2010) 129–134.
- [24] N.K. Ramadan, H.M. Mohamed, A.A. Moustafa, Rapid and highly sensitive HPLC and TLC methods for quantitation of amlodipine besylate and valsartan in bulk powder and in pharmaceutical dosage forms and in human plasma, *Anal. Lett.* 43 (2010) 570–581.
- [25] L. Peikova, B. Tsvetkova, RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceutical dosage form, *Pharmacia (Sofia)* 60 (2013) 19–23.
- [26] P.S. Jain, M.K. Patel, A.P. Gorle, A.J. Chaudhari, S.J. Surana, Stability-indicating method for simultaneous estimation of olmesartan medoxomil, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide by RP-HPLC in tablet dosage form, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 680–687.
- [27] G.P. Pandya, H.S. Joshi, Development and validation of stability indicating HPLC assay method for simultaneous determination of amlodipine besylate, olmesartan medoxomil and hydrochlorothiazide in tablet formulation, *Pharm. Sin.* 4 (2013) 145–152.
- [28] N. Dubey, A. Jain, A.K. Raghuvanshi, D.K. Jain, Stability-indicating HPTLC method for simultaneous estimation of amlodipine besylate, hydrochlorothiazide and olmesartan medoxomil in combined tablet dosage forms, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 25 (2012) 475–480.
- [29] R.I. El-Bagary, G. Patonay, A.A. Elzahr, E.F. Elkady, W.A. Ebeid, Ion-pair LC method for simultaneous determination of aliskiren hemifumarate, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals, *Chromatographia* 77 (2014) 257–264.
- [30] M.M. Salim, W.M. Ebeid, N. El-Enany, F. Belal, M. Walsh, G. Patonay, Simultaneous determination of aliskiren hemifumarate, amlodipine besylate, and hydrochlorothiazide in their triple mixture dosage form by capillary zone electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1206–1213.
- [31] D.L. Hertzog, J.F. McCafferty, X.G. Fang, R.J. Tyrrell, R.A. Reed, Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 747–760.
- [32] S. Mukhopadhyay, K. Kadam, L. Sawant, D. Nachane, N. Pandita, Simultaneous determination of related substances of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by using reversed phase high performance liquid chromatographic method, *J. Pharm. BioAllied Sci.* 3 (2011) 375–383.
- [33] B. Satheesh, S.K. Pulluru, K. Nitin, D. Saravanan, Simultaneous determination of eprosartan, hydrochlorothiazide, and their related compounds in pharmaceutical dosage forms by UPLC, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 1885–1900.
- [34] D. Ivanovic, M. Medenica, B. Jancic, N. Knezevic, A. Malenovic, J. Milic, Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril, and their impurities, *Acta Chromatogr.* 18 (2007) 143–156.
- [35] P. Aparna, S. Rao, K.M. Thomas, K. Mukkanti, Simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide related impurities in lisinopril and hydrochlorothiazide combined tablet dosage forms using HPLC, *Anal. Chem.: Indian J.* 7 (2008) 454–461, CAN 150:337789.
- [36] R.J.V. Eranki, G. Inti, V. Jayaraman, S.R. Vidiyala, R.J. Sree, New stability indicating method for quantification of impurities in Amlodipine and Atorvastatin calcium tablets by validated HPLC, *Int. J. Pharm. Res. Sch.* 2 (2013) 458–471.
- [37] R.J.V. Eranki, G. Inti, V. Jayaraman, R. Pannala, S.R. Vidiyala, R.J. Sree, New stability indicating method for quantification of impurities in Amlodipine and Benazepril capsules by validated HPLC, *Am. J. Anal. Chem.* 4 (2013) 715–724.
- [38] R.A. Shaalan, T.S. Belal, Gradient HPLC-DAD determination of the antihypertensive mixture of amlodipine besylate, valsartan, and hydrochlorothiazide in combined pharmaceutical tablets, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 215–230.
- [39] S.E.K. Tekkeli, Development of an HPLC-UV method for the analysis of drugs used for combined hypertension therapy in pharmaceutical preparations and human plasma, *J. Anal. Methods Chem.* (2013), Article Number 179627.
- [40] D. Jothieswari, K. Anandakumar, S.D. Vijaya, B. Vijayakumar, D. Priya, R.B. Stephen, Validated RP-HPLC method for the simultaneous determination of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in bulk and in pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Sci.* 5 (12) (2012).
- [41] B.N. Deepthi, D.N. Rao, M.P. Rao, S.R. Beeravalli, Y.R. Krishna, V. Rao, L.S. Koundilya, Method development and validation of simultaneous estimation of Amlodipine besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in pure drug and pharmaceutical formulations by using RP-HPLC, *Int. J. Univ. Pharm. Biosci.* 2 (2013) 174–185.
- [42] S.M. El-Gizawy, O.H. Abdelmageed, M.A. Omar, S.M. Deryea, A.M. Abdel-Megied, Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of amlodipine, valsartan, hydrochlorothiazide in dosage form and spiked human plasma, *Am. J. Anal. Chem.* 3 (2012) 422–430.
- [43] R.N. Sharma, S.S. Pancholi, Simple RP-HPLC method for determination of triple drug combination of valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide in human plasma, *Acta Pharm. (Zagreb)* 62 (2012) 45–58.
- [44] K.R. Ulavapally, J. Sriramulu, V.R. Pyreddy, V. Bobbarala, Single RP-HPLC method for the determination of hydrochlorothiazide, amlodipine besylate and valsartan in pharmaceutical products, *J. Pharm. Res.* 4 (2011) 894–896.
- [45] M. Sharma, C. Kothari, O. Sherikar, P. Mehta, Concurrent estimation of amlodipine besylate, hydrochlorothiazide and valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV spectrophotometry, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 27–35.
- [46] C. Vishnuvardhan, P. Radhakrishnanand, S.G. Navalgund, K.R. Atcha, N. Satheeshkumar, RP-HPLC method for the simultaneous estimation of eight cardiovascular drugs, *Chromatographia* 77 (2014) 265–275.
- [47] S.E. Vignaduzzo, P.M. Castellano, T.S. Kaufman, Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of amlodipine, hydrochlorothiazide, and valsartan in tablets of their novel triple combination and binary pharmaceutical associations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 2383–2395.
- [48] S.J. Varghese, T.K. Ravi, Quantitative simultaneous determination of amlodipine, valsartan, and hydrochlorothiazide in Exforge HCT tablets using high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 981–994.
- [49] W.M. Ebeid, E.F. Elkady, A.A. El-Zahr, R.I. El-Bagary, G. Patonay, Synchronized separation of seven medications representing most commonly prescribed antihypertensive classes by using reversed-phase liquid chromatography: application for analysis in their combined formulations, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 748–757.
- [50] R.S.Ch. Phani, K.R.S. Prasad, U.R. Mallu, High resolution RP-HPLC method for the determination of hypertensive drug products, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 440–454.
- [51] H.W. Darwish, S.A. Hassan, M.Y. Salem, B.A. El-Zeany, Rapid and sensitive TLC and HPLC with on-line wavelength switching methods for simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 345–356.
- [52] M. Younus, T.K. Reddy, Y.R. Reddy, M.F. Arif, RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form, *J. Pharm. Res.* 3 (2010) 2647–2650.
- [53] A. Hemke, M. Bhure, V. Anjanekar, K. Gupta, Validated RP-HPLC method for simultaneous determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan in pharmaceutical formulation, *Int. J. Pharm. Technol.* 5 (2013) 5383–5392.
- [54] M.B. Nikam, H. Dhamane, A. Aligave, M.S. Kondawar, Simultaneous estimation of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide by first order derivative UV spectrophotometric method, *Int. J. Pharm. Technol.* 2 (2010) 642–650.
- [55] H.W. Darwish, S.A. Hassan, M.Y. Salem, B.A. El-Zeany, Comparative study between derivative spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools applied for the simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide, *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 215–223.
- [56] V.R. Galande, K.G. Baheti, S. Indraksha, M.H. Dehghan, Estimation of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in bulk mixture and tablet by UV spectrophotometry, *Indian J. Pharm. Sci.* 74 (2012) 18–23.
- [57] USP 37 Second supplement, The United States Pharmacopeial Convention, 20.10.2014.
- [58] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- [59] R. LoBrutto, T. Patel, Method validation, in: Y. Kazakevich, R. LoBrutto (Eds.), HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, Hoboken, 2007, pp. 455–502.
- [60] J.B. Crowther, Validation of pharmaceutical test method, in: S. Ahuja, S. Scypinsky (Eds.), Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 415–443.

2. Příprava monolitických stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii

2.1 Teoretický úvod

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

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

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

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

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

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

2.2 Experimentální část

2.2.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

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

připraveny z glycidyl-methakrylátu (99%), 2-hydroxyethyl-methakrylátu (99%), ethylen-dimethakrylátu (99%), propan-1-olu (99%), dekan-1-olu (99%), cyklohexanolu (99%), butan-1,4-diolu (99%) a 2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenonu (99%) od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Chemikálie byly navažovány na analytických vahách XE Series Model 100A od společnosti Denver Instrumentation Company (Bohemia, USA). Směsi byly odplyňovány v ultrazvukové lázni Elmasonic S15H od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika) a probublávány dusíkem (99,999%) od společnosti Linde (Praha, Česká republika). K iniciaci polymerizace byla použita ruční UV lampa se dvěma 15W výbojkovými trubicemi poskytující záření o vlnové délce 254 nm od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika). Destičky byly oplachovány hexanem (99%) od společnosti Merck (Praha, Česká republika). Detekce DAPPI byla testována za použití verapamilu (99%), acetonu (99%) a toluenu (99%) od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific (San Jose, USA). Data byla vyhodnocena pomocí softwaru XCalibur™ od stejného dodavatele. Iontový zdroj DAPPI byl postaven v laboratoři oddělení hmotnosti spektrometrie Ústavu organické chemie a biochemie (Praha, Česká republika). Molekuly byly ionizovány vakuovou UV lampou PKR 106 od firmy Heraeus Noblelight (Hanau, Německo). K porovnání byly použity destičky TLC silica gel 60 F₂₅₄ MS-grade od společnosti Merck (Praha, Česká republika). Rychlost vzlínání hexanu byla testována ve 250mL skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem od společnosti P-Lab (Praha, Česká republika).

2.2.2 Postup přípravy a testování monolitických tenkých vrstev

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

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

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

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

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

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

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

2.3 Výsledky a diskuze

2.3.1 Vývoj postupu přípravy monolitických TLC destiček

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

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

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

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

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

2.3.2 Mechanická odolnost a rychlost vztlínání pro monolitické TLC destičky

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

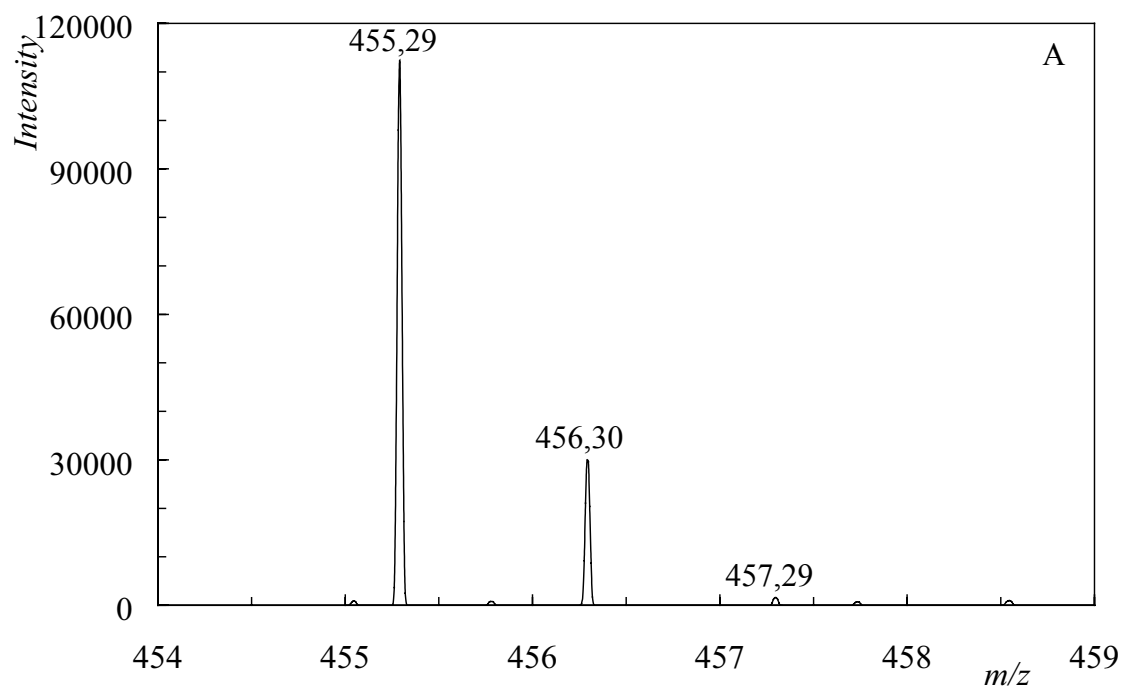
Výrazně mechanicky odolnější byly monolity na bázi HEMA a to především při použití porogenní směsi propan-1-ol/butan-1,4-diol (směs S3). Tento monolit měl velmi pevnou a hladkou strukturu s lesklým povrchem. Negativními vlastnostmi této stacionární fáze bylo pomalé vztlínání hexanu (více než 30 minut),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

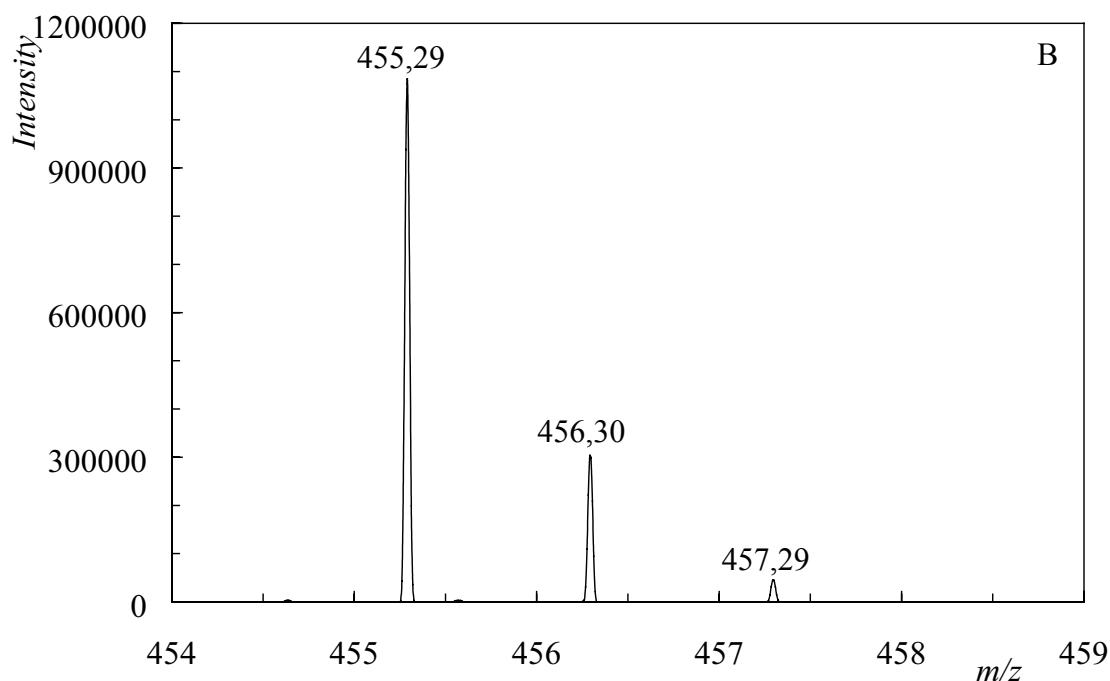
cyklohexanol/dekan-1-ol byl získán monolit mechanicky méně odolný než monolit ze směsi S3, ale více odolný než monolity na bázi GMA. Povrch monolitu nebyl na pohled tak hladký a lesklý jako povrch monolitu vzniklého při použití porogenní směsi propan-1-ol/dekan-1-ol. Monolit (S4) polymeroval zcela i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

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

2.3.3 Testování ionizace technikou DAPPI

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





Obr. 20 Hmotnostní spektrum verapamilu ($M_r = 454$ g/mol). Koncentrace verapamilu: 10 mmol/L. Dávkovaný objem: 1,0 μ L. Ionizace DAPPI v pozitivním módu z TLC silica gel 60 F₂₅₄ MS-grade destičky (A) a monolitické TLC destičky S3 (B). Experimentální podmínky viz kapitola 2.2.2. Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific).

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

Literatura II

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

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

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

Publikace III

Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních
separačních médií

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

Chemické Listy 108 (2014) 127 – 134

PŘÍPRAVA A APLIKACE MONOLITICKÝCH KOLON JAKO MODERNÍCH SEPARAČNÍCH MÉDIÍ

**JIŘÍ VOJTA, ADÉLA MUSILOVÁ-
SVOBODOVÁ, MARTIN FRANC, PAVEL
COUFAL a ZUZANA BOSÁKOVÁ**

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
jiri.vojta@natur.cuni.cz*

Věnováno památce prof. Ing. Karla Štulika, DrSc.

Došlo 5.3.13, přijato 10.6.13.

Klíčová slova: monolitické kolony, organické polymery, silika, příprava, aplikace

Obsah

1. Úvod
2. Monolity na bázi organického polymeru a jejich příprava
 - 2.1. Modifikace povrchu organických monolitů
3. Monolity na bázi oxidu křemičitého
 - 3.1. Příprava a charakteristika silikových monolitů
4. Aplikace monolitických kolon
5. Závěr

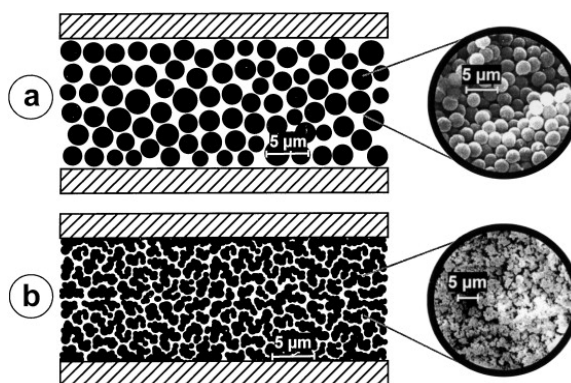
1. Úvod

Úvodem tohoto referátu bychom rádi předeslali, že následující text je určen především pro čtenáře, kteří

s monolity začínají a hledají základní obecné informace o monolitických kolonách a jejich přípravě. Text je více orientován na organické monolitické fáze, jejichž příprava v laboratoři je jednodušší a rozšířenější.

Monolitické stacionární fáze jsou unikátní separační média, která jsou vytvořena z jednoho kusu pórovitého materiálu nejčastěji na bázi organického polymeru nebo oxidu křemičitého. Historie monolitických kolon započala ve druhé polovině 20. století a v českém článku ji přehledně zpracoval František Švec¹. V dnešní době se monolitických stacionárních fází využívá zejména v kapilární kapalinové chromatografii (CLC), kapilární elektrochromatografii (CEC) a v klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) ve formě kolon či monolitických disků. Morfologický rozdíl mezi monolitickou a klasickou náplňovou kolonou je schematicky znázorněn na obr. 1.

Monolity mají bimodální charakter pórů, obsahují velké póry umožňující průtok mobilní fáze (makropóry > 50 nm, nejčastěji cca 1 μm) a malé póry, které zajišťují dostatečný specifický povrch pro interakci s analytem (mezopóry 2–50 nm, mikropóry < 2 nm). Tato distribuce pórů je typická pro monolity na bázi oxidu křemičitého. Naproti tomu organické monolity v sobě mezopóry mohou³, ale i nemusí obsahovat⁴. Monolitická fáze vyplňuje celý vnitřní prostor kolony, mobilní fáze tak protéká přímo stacionární fází a analyty se k aktivním centrům dostávají konvektivním tokem, čímž se urychluje jejich transport kolonou a interakce se stacionární fází. Matematický popis přenosu hmoty v monolitech byl teoreticky odvozen Liapisev v roce 1999 (cit.⁵). Makropóry také umožňují kratší analýzy, jelikož lze použít vyšší průtok mobilní fáze bez výrazné ztráty účinnosti a překročení tlakového limitu chromatografického systému. Monolitická média vytvořená z organických polymerů jsou také stabilní v široké škále hodnot pH, lze je přechovávat i v nesmočeném stavu



Obr. 1. Struktura stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně; cit.²

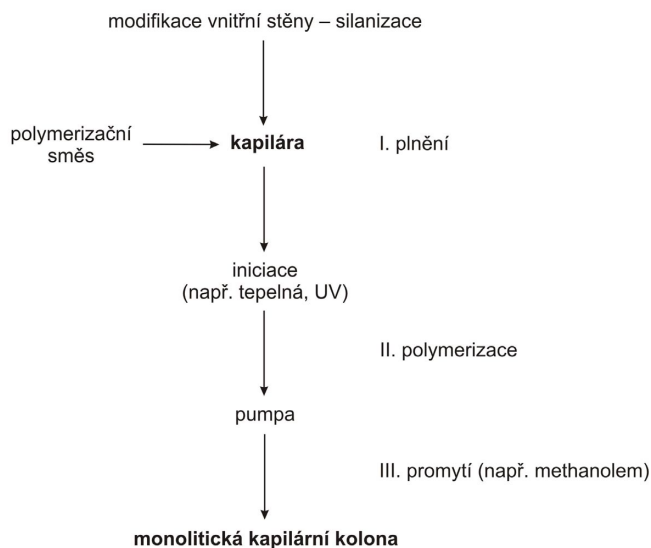
a působením tlaku postupně nesedají jako kolony náplňové.

2. Monolity na bázi organického polymeru a jejich příprava

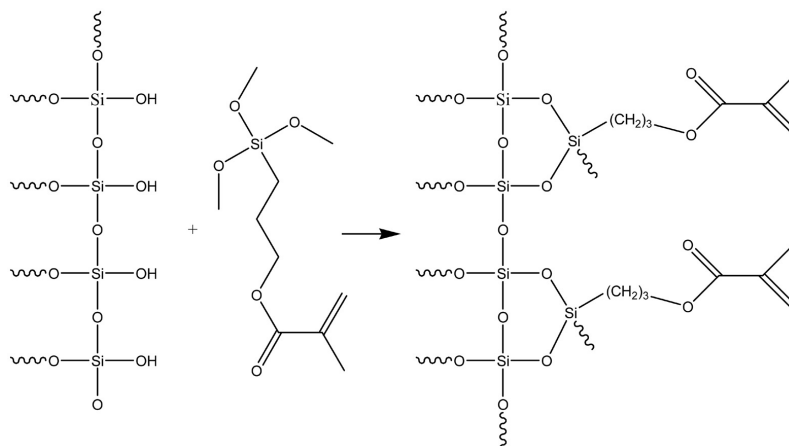
Polymerizační směs pro přípravu organických monolitů se skládá z monomeru, síťovacího činidla (zpravidla molekula obdobná monomeru, avšak obsahující dvě dvojně vazby), iniciátoru a porogenní směsi. Složky porogenní směsi nejsou zabudovány do polymerní struktury monolitu, pouze vznikající monolit solvatují a jejich objem tak udává jeho konečnou porozitu. Nejpoužívanějšími monomery jsou deriváty methakrylátu, akrylamidu a styrenu. Nejběžnějšími síťovacími činidly pak jsou ethylen-dimethakrylát a divinylbenzen. Monolity se nejčastěji připravují radikálovou kopolymerizací, při které je polymerizační směs uzavřena v těle budoucí separační kolony (*in situ*). V prvním kroku se iniciátor (např. α,α' -azobisisobutyronitril) rozpadá na radikály, které iniciují vlastní polymerizační reakci. Vzniká polymerizační řetězec, který s časem nabývá na hmotnosti a postupně se více síťuje, až se stává v polymerizační směsi nerozpustným a precipituje jako takzvané polymerizační jádro. Pro vzniklé jádro jsou termodynamicky výhodnějšími solventy monomery než složky porogenní směsi a polymerizace tak dále pokračuje uvnitř jádra i v okolní kapalině. Polymerizace uvnitř jádra je však kineticky preferována, jelikož koncentrace monomerů v jádře je vyšší. Řetězce polymeru vzniklé v kapalině jsou brzy zachyceny jádrem, které s časem dále narůstá. Když jádro doroste do určité velikos-

ti, síťováním se spojí se sousedními jádry a vytvoří shluk. V pozdější fázi polymerizace se narůstající shluky spojují a vytvářejí strukturu s průtočnými póry, která dále zesiluje vnitřním síťováním a narůstá o nové řetězce vytvořené polymerizací v roztoku až do konečné podoby tuhého monolitu, který uvnitř pórů obsahuje pouze nereaktivní porogenní směs. Naproti tomu sférické částice organických polymerů používané v náplňových kolonách se vytvářejí procesem suspenzní polymerizace a morfologie těchto částic je ovlivněna dalšími vlivy, jako jsou dynamika míchání polymerizační směsi a mezifázové napětí mezi vodnou a organickou fází. Sférické částice a monolity připravené z totožné polymerizační směsi mají pak odlišnou vnitřní strukturu⁶. Jedním z hlavních směrů využití monolitických kolon ve výzkumu jsou kapilární separační metody (CLC, CEC). Křemenné kapiláry vyplněné organickou monolitickou stacionární fází však zatím nejsou komerčně dostupné a příprava těchto kolon se tedy musí uskutečňovat přímo v laboratoři. Na obr. 2 je znázorněno schéma přípravy kapilární monolitické kolony na bázi organického polymeru.

Pro účely CLC je nezbytné pevné uchycení monolitické stacionární fáze k vnitřní stěně kapiláry, aby vlivem tlaku kapaliny nedošlo k jejímu vytlačení. Pevné spojení monolitu se stěnou křemenné kapiláry se realizuje procesem silanizace, kterým se na stěnu kapiláry chemicky naváže sloučenina s dvojnou vazbou. Tato dvojná vazba se pak přímo účastní polymerizace monolitu, a ten je tak navázán ke stěně kapiláry na mnoha místech kovalentní vazbou. Schéma silanizace křemenné kapiláry 3-(trimethoxysilyl)-propyl-methakrylátem (dále jen γ -MAPS) je znázorněno na obr. 3.

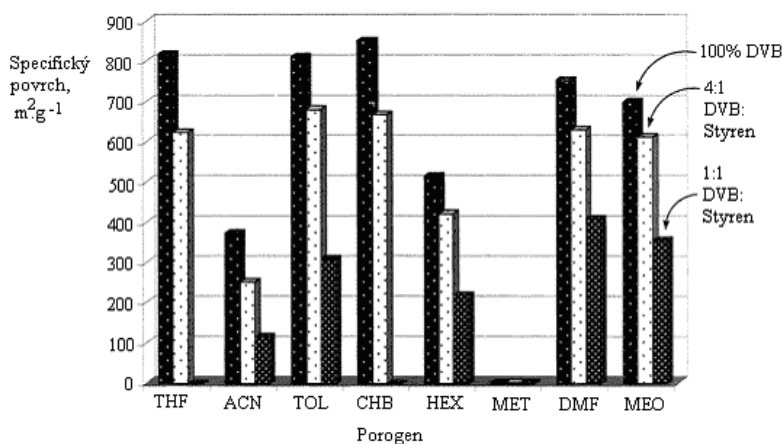


Obr. 2. Schéma přípravy kapilární kolony s organickou monolitickou stacionární fází; cit.⁷

Obr. 3. Schéma silanizace křemenné kapiláry γ -MAPS; cit.⁸

V prvním kroku je nutné povrch kapiláry aktivovat hydroxidem sodným a vodou, čímž se siloxanové skupiny převedou na silanolové. Silanolové skupiny jsou pak přístupné pro vlastní reakci se silanizačním činidlem. Podmínky, při kterých se jednotlivé kroky silanizace provádějí, se často liší v použitém rozpouštědle, koncentraci silanizačního činidla a hydroxidu, čase i teplotě. Způsob silanizace ovlivňuje charakteristiky vnitřní stěny kapiláry, jako jsou kontaktní úhel, smáčivost a adheze⁸, a nepřímo tak i vlastnosti budoucí monolitické stacionární fáze.

Vhodným výběrem monomerů ovlivňujeme nejen chemickou podstatu monolitu, ale i jeho morfologii⁹. Různé monomery mají totiž rozdílné sférické a další fyzikálně-chemické vlastnosti, odlišně interagují se složkami porogenní směsi a mají jinou reakční kinetiku. Na morfologii výsledného monolitu má významný vliv i množství síťovacího činidla. Na obr. 4 je sloupcovými grafy znázorněn nárůst specifického povrchu poly(styren-*co*-divinylbenzenového) monolitu s rostoucím zastoupením divinyl-



Obr. 4. Závislost specifického povrchu poly(styren-*co*-divinylbenzenového) monolitu na obsahu síťovacího činidla a použitého porogenu. DVB - divinylbenzen, THF - tetrahydrofuran, ACN - acetonitril, TOL - toluen, CHB - chlorbenzen, HEX - *n*-hexan, MET - methanol, DMF - *N,N*-dimethylformamid, MEO- methyl-*terc*-butyl ether. Převzato se souhlasem z cit.¹⁰. Copyright (2001) American Chemical Society

benzenu v polymerizační směsi při použití různých porogenu. Při vyšším obsahu síťovacího činidla je polymer vznikající v počáteční fázi polymerizace více zesíťován a ze směsi precipituje jádro menší velikosti. Spojování menších jader vede i k menšímu objemu mezi nimi, a tedy i k menším pórům monolitu a jeho rostoucímu specifickému povrchu.

Zvýšením obsahu síťovacího činidla tedy dosáhneme vyššího specifického povrchu monolitu, avšak snížíme množství základního monomeru na jeho povrchu. Změny morfologických vlastností monolitu při zachování chemického složení pak dosáhneme v první řadě optimalizací porogenní směsi. Porogenní směs ovlivňuje velikost pórů monolitu solvatací vznikajícího polymerovaného jádra. S rostoucí schopností porogenu solvatovat jádro klesá zastoupení monomerů v jeho okolí a z polymerizační směsi precipituje jádro menší velikosti, což vede k menším pórům a vyššímu specifickému povrchu monolitu. Z obr. 4 vyplývá, že např. toluen je dobrým solvatačním činidlem pro poly(styren-*co*-divinylbenzenové) monolity, zatímco polární methanol nikoli. Velmi často se v porogenních směsích používá dodekan-1-ol, který je slabým solvatačním činidlem a kterým lze zvětšit póry styrenových i methakrylátových monolitů. Morfologii a částečně i chemické složení monolitu je možné ovlivnit časem polymerizace. Například monolit na bázi poly(butyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátu) je v počáteční fázi polymerizace tvořen malými gloubulemi, které obsahují více síťovacího činidla než základního monomeru. S postupem času se globule spojují a tvoří shluky, čímž se ztrácí zastoupení mezopórů ze struktury monolitu. S narůstajícím časem tak klesá porozita a specifický povrch monolitu¹¹.

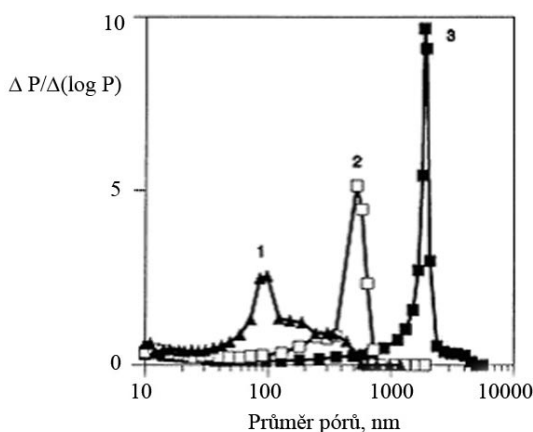
Pravděpodobně nepoužívanějším způsobem iniciace polymerizace je iniciace termická. Jako iniciátoru se obvykle

používá α,α' -azobisisobutyronitrilu (dále jako AIBN). Na obr. 5 je znázorněn vliv teploty na distribuci pórů poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátového) monolitu. V souladu s mechanismem vzniku vede vyšší teplota ke zmenšení pórů. Při vyšší teplotě se rychleji rozpadá iniciátor a vzniká více jader a více shluků. Jelikož je množství monomerů konstantní, musí mít při větším počtu jednotlivé shluky menší velikost a jejich spojováním vzniká monolit s menšími póry a vyšším specifickým povrchem. V oblasti nižších teplot (55–70 °C) toto pravidlo však není zcela univerzální. Efekt zvýšení rozpustnosti vznikajícího polymeru ve směsi s rostoucí teplotou a následná precipitace jádra o větší velikosti se u polymerizace monolitů neprojeví¹².

Druhým nejčastějším způsobem iniciace polymerizace je působení UV záření. Jako iniciátor lze opět použít AIBN, ale častější je použití 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenonu (DMPAP). Výhodou iniciace UV zářením je především rychlost. Polymerizace iniciovaná tímto způsobem trvá několik málo minut, zatímco termicky iniciovaná polymerizace probíhá v řádu hodin. Iniciace UV zářením za laboratorní teploty také umožňuje použití složek porogenní směsi s nižším bodem varu, které by se při teplem iniciované polymerizaci odpařily. Nevýhodou tohoto způsobu iniciace je nutnost použití těla kolony vytvořeného z materiálu dobře prostupného pro UV záření. V případě kapilárních kolon to znamená použití keramických kapilár potažených teflonem, které jsou mnohonásobně dražší než běžné kapiláry potažené polyimidem. Iniciace UV zářením také prakticky znemožňuje použití monomerů na bázi styrenu, které v této oblasti spektra výrazně absorbují. Radikálovou polymerizaci lze iniciovat i dalšími způsoby, jako je např. mikrovlnné či γ -záření. Monolitické kolony se také nepřipravují pouze polymerizací s volnými radikály, ale i dalšími způsoby, které jsou přehledně popsány v článku¹⁴ z roku 2010.

2.1. Modifikace povrchu organických monolitů

Různé druhy interakcí v chromatografii vyžadují od stacionárních fází přítomnost funkčních skupin a u monolitických kolon existují dva základní přístupy, jak dosáhnout přítomnosti těchto klíčových skupin na povrchu monolitu. Principiálně nejjednodušší je použití základního monomeru, který požadovanou funkční skupinu obsahuje. Takto lze připravit monolity, které obsahují např. skupinu hydroxylovou, amidovou, sulfonovou, fosfátovou a karboxylovou¹⁵. Výhodou tohoto přístupu je jednoduchá příprava, na druhou stranu značná část použitého monomeru je obsažena i ve vnitřní struktuře monolitu a naopak na povrchu je přítomné i síťovací činidlo. Požadovaná funkční skupina monomeru také může být příčinou jeho omezené rozpustnosti v polymerizační směsi, což může limitovat jeho obsah, nebo i znemožnit jeho použití. Druhý přístup zahrnuje metody chemické modifikace povrchu již vytvořeného monolitu. Postup je tedy víceokrový, což může vést ke snížení reprodukovatelnosti výsledných kolon a ke zvýšení časové, materiálové i energetické náročnosti přípravy.



Obr. 5. Distribuce pórů poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátového) monolitu při různých teplotách polymerizace (1) 80 °C, (2) 70 °C, (3) 55 °C. Měřeno rtuťovým porozimetrem. Převzato se souhlasem z cit.¹³. Copyright (1996) American Chemical Society

Existuje mnoho způsobů chemické modifikace povrchu monolitů. Základním přístupem je chemická reakce funkční skupiny přítomné na povrchu monolitu s funkční skupinou derivatizačního činidla, které obsahuje i skupinu potřebnou pro provedení požadovaného druhu chromatografie. K tomuto účelu se jako základního monomeru s výhodou užívá glycidyl-methakrylát, který obsahuje reaktivní epoxidovou skupinu. Použitím vhodných derivatizačních činidel lze pak připravit např. širokou škálu iontově výměnných kolon^{16–20}. Tímto způsobem se odstraní komplikace s rozpustností molekuly obsahující funkční skupinu. Navíc základní monolit, u kterého byla optimalizována příprava pro získání požadovaných morfologických vlastností, lze použít pro modifikaci s různými činidly a získat tak morfologicky obdobné kolony, které při separaci poskytují odlišné interakce. Experimentálně náročnější modifikací povrchu monolitů je technika roubování (grafting), při které se na povrch monolitu radikálovou polymerizací navazují řetězce funkčních monomerů. Na hydrolyzované epoxidové skupiny poly(glycidyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátového) monolitu byly například navázány polymerní řetězce 2-akrylamido-2-methylpropan-1-sulfonové kyseliny pomocí iniciace ceričitými ionty²¹. Na obr. 6 je pak znázorněné schéma dvoukrokového roubování vybraného monomeru iniciovaného UV zářením.

V prvním kroku se pomocí záření bisfenol radikálově naváže na povrch monolitu. Váže se namísto atomu vodíku, tudíž není třeba žádného speciálního reakčního monomeru. Ve druhém kroku molekuly bisfenonu navázané na monolit pracují jako iniciátor a „vyrůstají“ na nich polymerní řetězce z funkčního monomeru. Výhodou dvoukrokového postupu je eliminace problému s rozpustností nepolárního iniciátoru v polárnějším monomeru. Dále také nedochází k tvorbě polymerních řetězců v roztoku, které by nebyly navázány na monolit. Výhodou techniky roubování oproti chemické derivatizaci monolitu je vyšší zastoupení funkčních skupin na povrchu a lepší využití některých vzácných monomerů, které by mohly být v základní polymerizační směsi nerozpustné. Zajímavou technikou úpravy povrchu poly(styren-*co*-chlormethylstyren-*co*-divinylbenzenového) monolitu je tzv. hypercrosslinking, kterým nezavádíme funkční skupinu do monolitu, ale ovlivňujeme jeho morfologické vlastnosti. Vlivem reakční kinetiky zreaguje veškerý divinylbenzen rychleji a na povrchu mo-

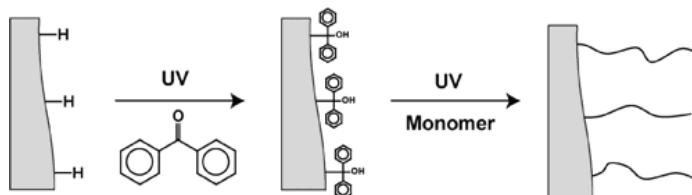
monolitu tak zbývají velmi málo zesíťované řetězce. Tyto řetězce lze 1,2-dichlorethanem rozvolnit a vzájemnou Freidel-Craftsovou alkylací fixovat jejich strukturu ve formě vysoce zesíťované vrstvičky polymeru. Tzv. hypercrosslinkovaný monolit má až čtyřikrát vyšší specifický povrch a díky své komplexní morfologii je vhodný pro analýzy malých i velkých molekul²³.

3. Monolity na bázi oxidu křemičitého

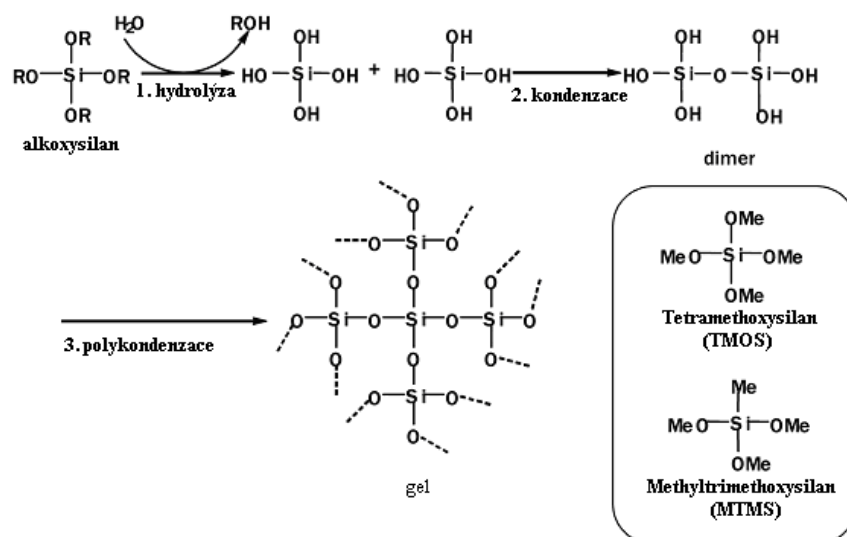
Náplňové kolony tvořené částicemi silikagelu si stále zachovávají dominantní postavení v oblasti kapalinové chromatografie, nicméně jejich možnou a zároveň výhodnou alternativou jsou anorganické monolity. Začátkem 90. let Nakanashi a Soga představili postup přípravy spojitě porézního materiálu (novou technologií sol-gel) z oxidu křemičitého s bimodální distribucí pórů²⁴. První HPLC aplikace na porézní tyčince z oxidu křemičitého modifikované oktadecylovými řetězci je připisována Tanakovi a spol.²⁵, který demonstroval použití tohoto separačního média v reverzním módu jak pro separace malých, tak velkých molekul. O dva roky později byla popsána *in-situ* příprava silikových monolitů v kapiláře o vnitřním průměru 100 μm (cit.²⁶). V současnosti jsou komerčně dostupné monolitické kolony na bázi siliky různých rozměrů pod názvem ChromolithTM od firmy Merck (Německo) a OnyxTM od firmy Phenomenex (USA).

3.1. Příprava a charakteristika silikových monolitů

Monolity na bázi siliky se nejčastěji připravují takzvaným sol-gel procesem. Příprava je založena na hydrolytické iniciované polykondenzaci tetraalkoxysilanů, např. tetramethoxysilanu (TMOS), tetraethoxysilanu (TEOS) nebo methyltrimethoxysilanu (MTMS), doprovázené oddělením fází v přítomnosti ve vodě rozpustného organického polymeru (porogenu), např. poly(ethylenoxidu) (PEO), nebo polyakrylové kyseliny. Schéma typického sol-gel procesu znázorňuje obr. 7. Jednou z preferovaných metod přípravy silikových tyčinek je hydrolyza TMOS vodným roztokem 0,01 M octové kyseliny obsahujícím PEO (cit.²⁷). Octová kyselina zde plní funkci katalyzátoru. Po důkladném promíchání je homogenní směs naplněna do formy a ponechána reagovat při zvýšené teplotě.



Obr. 6. Ilustrační schéma dvoukrokového „photografitingu“ s použitím bisfenonu jako iniciátoru. Převzato se souhlasem z cit.²². Copyright (2006) American Chemical Society

Obr. 7. Typická reakce sol-gel a příslušné monomery; cit.²⁸

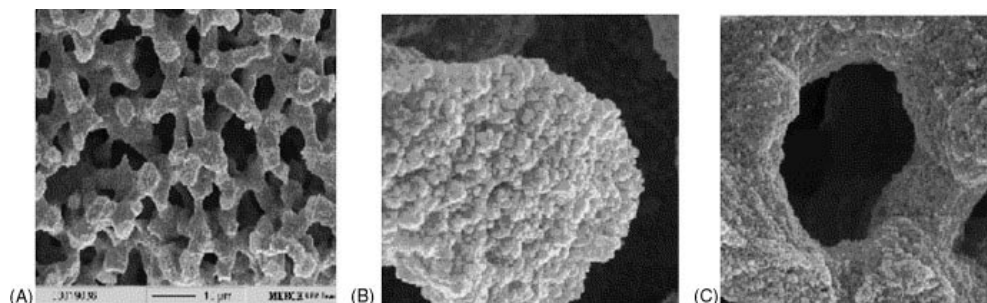
K vytvoření gelu dochází již po dvou hodinách a následuje zrání gelu, které trvá i několik dnů. Tyčinka je poté promyta destilovanou vodou a následně vystavena působení hydroxidu amonného za zvýšené teploty, čímž dochází k vytvoření sítě mezopórů. Následuje fáze vysušení vzniklého gelu a vytvoření kolony vložení tyčinky do formy z vhodného materiálu. Silikový monolit umístěný v koloně je možné dále modifikovat navázáním různých funkčních skupin, nejčastěji se jedná o oktadecylaci.

Na výslednou strukturu a chemické složení monolitu má vliv celá řada faktorů. Rozhodující jsou hodnoty pH reakční směsi²⁹, použité rozpouštědlo, koncentrace reaktantů, množství vody v systému, volba katalyzátoru hydrolyzy a kondenzace, v neposlední řadě pak teplota a reakční čas. Obecně platí, že s rostoucím pH směsi vzrůstá porozita gelu a klesá specifický povrch a se zvyšující koncentrací TMOS roste mechanická stabilita monolitu. Na rozdíl od organických monolitů dochází u silikových monolitů během přípravy ke značnému smrštění stacionární fáze. Toto zmenšení objemu nedovoluje přípravu „*in situ*“, a vyžaduje dvoukrokovou přípravu. V prvním kroku je monolit připraven ve vhodné formě a poté vpraven do pouzdra ze smršťivého materiálu PEEK (poly(ether-ether-ke-ton)), který plní funkci těla kolony. Chceme-li připravit tyčinku konvenčních rozměrů o průměru 4,6 mm, je nutné vycházet z formy o vnitřním průměru 6 mm. U chromatografických kolon běžných rozměrů může po sušení docházet k praskání, což monolit činí nepoužitelným pro chromatografické separace. Objemové změny s sebou přinášejí také omezení z hlediska délky kolon, proto je obtížné připravit

tyčinky delší než 15 cm, aniž by nedocházelo k jejich ohybu. Výhodou přípravy kapilárních kolon je pak stejně jako u organických monolitů kovalentní navázání monolitu na vnitřní stěnu křemenné kapiláry³⁰. Jak je patrné z předchozího textu, je příprava silikových monolitů v laboratorních podmínkách relativně obtížná, proto se běžně pro separace využívají komerčně dostupné kolony, které se velmi často v laboratoři dále modifikují. Na trhu dostupné silikové monolity obsahují makropóry o velikosti kolem 2 μm a mezopóry o velikosti 13 nm a dosahují specifického povrchu kolem 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ (cit.³¹). Obr. 8 demonstruje typickou porézní strukturu silikového monolitu.

4. Aplikace monolitických kolon

Aplikace monolitických kolon zahrnují separace nízkou- i vysokomolekulárních látek, v HPLC i CEC (cit.³²). Povaha a velikost pórů umožňují velmi dobrou propustnost pro větší molekuly, a proto jsou organické monolity vhodným materiálem pro separace proteinů, oligo- a polynukleotidů, štěpů DNA, a dokonce i živých mikroorganismů. Přehledný článek³³ z roku 2012 však poukazuje na skutečnost, že dnes již můžeme s porézními polymerními materiály na bázi organického polymeru dosáhnout velmi účinných separací malých molekul za izokratických podmínek. Díky rozmanitosti monolitických stacionárních fází se můžeme s monolity setkat jak v chromatografii na reverzní fázi (RPC), tak při hydrofobní interakční chromatografii (HIC), v iontové výměnné (IEC) a afinitní chromatografii



Obr. 8. SEM obrázky typické porézní struktury monolitu na bázi oxidu křemičitého (A), struktura mezopórů (B) a průtočných pórů (C); cit.³¹

(AC) nebo v chromatografii na molekulových sítích (SEC). Pro reverzní chromatografii je možné využít jak anorganických, tak organických monolitů. Separační média založená na kopolymeru styrenu a divinylbenzenu i monolity na bázi oxidu křemičitého byla úspěšně použita pro separace proteinů, peptidů a alkylbenzenů v reverzním módu³². Vhodnou alternativou k reverzní chromatografii je hydrofobní interakční chromatografie, která využívá vodných mobilních fází s přidávkou solí. Tato metoda je zvláště vhodná pro separace proteinů, u kterých díky absenci organického modifikátoru zůstává zachována jejich biologická aktivita. Jako separační média pro hydrofobní interakční chromatografii proteinů byly úspěšně použity monolitické kolony založené na kopolymeru polyakrylamidu a butylmethakrylátu³⁴. Monolitické kolony na bázi siliky se zapolymerovanou akrylovou kyselinou nebo akrylamidem je možné využít ve spojení s hydrofilní interakční chromatografií (HILIC)³⁵, která je vhodnou volbou v případě separací velmi polárních látek. O odlišných přístupech ke vzniku monolitických iontoměničů organického typu pojednává odstavec 2.1. V případě silikových monolitů se pro zavedení nabitých skupin v naprosté většině případů využívá technika postpolymerizační modifikace, kdy je možné postupnými kroky získat stacionární fáze tvořené anexem i katexem zároveň³⁶. U afinitní chromatografie jsou na povrchu monolitu imobilizovány ligandy, které dokážou specificky interagovat s jednotlivými složkami vzorku. Jako ligandy mohou vystupovat barviva, bílkoviny, enzymy (i jejich substráty, koenzymy či inhibitory), protilátky nebo antigeny, polysacharidy atd. Využití monolitů v oblasti afinitní chromatografie podrobně popisuje souhrnný článek³⁷ z roku 2011. Další skupinu tvoří vtištěné polymery, tzv. „MIPs – molecularly imprinted polymers“⁴⁴. V tomto případě nedochází k imobilizaci ligandu jako u afinitní chromatografie, ale ke vtištění templátu do matrice. Templát je následně z monolitu vhodným činidlem uvolněn. Vývoj a možné použití vtištěných organických i anorganických monolitů v HPLC a CEC mapuje ucelený článek³⁸ z roku 2011. Vhodnou chemickou modifikací monolitů a zabudováním chirálního selektoru vznikají chirální stacionární fáze, které se velmi dobře uplatňují při

farmaceutických analýzách v elektrochromatografickém módu³⁹. Monolitické materiály však nemusí sloužit pouze jako separační média v chromatografických metodách, ale lze jich s výhodou využít i při prekoncentračních krocích a extrakci na pevné fázi (SPE) nebo jako nosiče pro imobilizaci enzymů. Slibné je především jejich využití v miniaturizovaných systémech, jakými jsou čipy, kde je dosti obtížné homogenně naplnit malý prostor částicemi. O pokročilých aplikacích monolitů pojednává souhrnný článek⁴⁰ z roku 2010.

5. Závěr

Pravděpodobně největší výhodou monolitických stacionárních fází je možnost měnit vnitřní strukturu (objem a distribuci pórů), a tím ovlivňovat výsledné separační vlastnosti chromatografických kolon. Ve srovnání s klasickými náplňovými kolonami jsou monolity výjimečné díky svým hydrodynamickým vlastnostem. Nezanedbatelnou výhodou je také absence frit, kterou lze ocenit především v elektrochromatografickém módu. Ačkoliv mají monolitické kolony řadu unikátních vlastností oproti běžným stacionárním fázím, ani jím se určitá omezení nevyhnou. U monolitů na bázi organického polymeru můžeme jmenovat botnání v organických rozpouštědlech, které může ovlivnit celkovou porozitu stacionární fáze a tedy i separační účinnost. U anorganických monolitů je to především rozpustnost oxidu křemičitého v alkalickém prostředí a celkově obtížnější příprava v laboratorních podmínkách. V každém případě je monolitům v současnosti věnována velká pozornost, ať už vědeckými týmy či firmami, zabývajícími se vývojem nových separačních médií. Za vše mluví jak vysoký počet časopiseckých publikací a dvě rozsáhlé monografie^{41,42}, tak skutečnost, že jsou tomuto tématu věnovány samostatné sekce na chromatografických konferencích.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSMT 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, dále za podpory projektu SVV 267215 Univerzity

Karlovy v Praze a projektu GAUK 349511 Grantové Agentury Univerzity Karlovy v Praze.

LITERATURA

- Švec F.: Chem. Listy 98, 232 (2004).
- Oberacher H., Huber C. G.: Trends Anal. Chem. 21, 166 (2002).
- Wang Q. C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. 65, 2243 (1993).
- Lee D., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 1051, 53 (2004).
- Meyers J. J., Liapis A. I.: J. Chromatogr., A 852, 3 (1999).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 7, 707 (1995).
- Urban J., Jandera P.: J. Sep. Sci. 31, 2521 (2008).
- Courtois J., Szumski M., Byström E., Iwasiewicz A., Shchukarev A., Irgum K.: J. Sep. Sci. 29, 14 (2006).
- Svec F., Fréchet J. M. J., v knize: *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications* (Svec F., Tennikova T. B., Deyl Z., ed.), kap. 2. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Santora B. P., Gagné M. R.: Macromolecules 34, 658 (2001).
- Nischang I., Brüggemann O.: J. Chromatogr., A 1217, 5389 (2010).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: Macromolecules 28, 7580 (1995).
- Viklund C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 8, 744 (1996).
- Svec F.: J. Chromatogr., A 1217, 902 (2010).
- Nordborg A., Hilder E. F.: Anal. Bioanal. Chem. 394, 71 (2009).
- Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 702, 89 (1995).
- Sýkora D., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 852, 297 (1999).
- Wieder W., Bisjak C. P., Huck C. W., Bakry R., Bonn G. K.: J. Sep. Sci. 29, 297 (2006).
- Ueki Y., Umemura T., Li J., Odake T., Tsunoda K.: Anal. Chem. 76, 7007 (2004).
- Yang G., Liu H., Zhang Y., Wang S., Yin B., Chen Y.: J. Chromatogr., A 1129, 231 (2006).
- Viklund C., Svec F., Fréchet J. M. J.: Biotechnol. Prog. 13, 597 (1997).
- Stachowiak T. B., Svec F., Fréchet J. M. J.: Chem. Mater. 18, 5950 (2006).
- Urban J., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 1217, 8212 (2010).
- Nakanishi K., Soga N.: J. Am. Ceram. Soc. 74, 2518 (1991).
- Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N.: Anal. Chem. 68, 3498 (1996).
- Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N.: J. High Resol. Chromatogr. 21, 477 (1998).
- Nakanishi K., Minakuchi H., Soga N., Tanaka N.: J. Sol-Gel Sci. Technol. 8, 547 (1997).
- Kato M., Sakai-Kato K., Toyooka T.: J. Sep. Sci. 28, 1893 (2005).
- Brus J., Kotlík P.: Chem. Listy 92, 302 (1998).
- Ishizuka N., Kobayashi H., Minakuchi H., Nakanishi K., Hirao K., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N.: J. Chromatogr., A 960, 85 (2002).
- Cabrera K.: J. Sep. Sci. 27, 843 (2004).
- Zou H., Huang X., Ye M., Luo Q.: J. Chromatogr., A 954, 5 (2002).
- Svec F.: J. Chromatogr., A 1228, 250 (2012).
- Xie S. F., Svec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr., A 775, 65 (1997).
- Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N.: J. Chromatogr., A 1164, 198 (2007).
- Ikegami T., Ichimaru I., Kajiwara W., Nagasawa N., Hosoya K., Tanaka N.: Anal. Sci. 23, 109 (2007).
- Arrua R. D., Igarzabal C. I. A.: J. Sep. Sci. 34, 1974 (2011).
- Zheng Ch., Huang Y.-P., Liu Z.-S.: J. Sep. Sci. 34, 1988 (2011).
- Mangelings D., Heyden Y. V.: Electrophoresis 32, 2583 (2011).
- Vázquez M., Paull B.: Anal. Chim. Acta 668, 100 (2010).
- Svec F., Tennikova T. B., Deyl Z. (ed.): *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications*. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Wang P.G. (ed.): *Monolithic Chromatography and its Modern Application*, ILM Publications, St Albans 2010.

J. Vojta, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, and Z. Bosáková (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): **Preparation and Application of Monolithic Columns as Modern Separation Media**

This article provides basic information on monolithic columns for separation purposes. General characteristics of monolithic columns and their difference from common packed columns are described. Preparation of monolithic columns, various effects on their morphological properties and possible applications are discussed, both for organic and silica monoliths.

3. Závěr

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

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

Prohlášení o spoluautorství

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

- I. **J. Vojta**, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 85 – 92. (podíl 85 %)

- II. **J. Vojta**, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková: A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 109 (2015) 36 – 44. (podíl 85 %)

- III. **J. Vojta**, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková: Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií, Chem. Listy 108 (2014) 127 – 134. (podíl 50 %)

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

.....
RNDr. Lucie Janečková, Ph.D.

Seznam publikací, patentů přednášek a plakátových sdělení

Publikace

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

Patenty

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

Přednášky

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

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

Plakátová sdělení

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