



**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**VÝVOJ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORETICKÉ METODY  
PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉKOPISNÝCH NEČISTOT  
INDOMETACINU**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

Školitel rigorózní práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Mgr. Dagmar Doubková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 20. 9. 2018

Mgr. Dagmar Doubková

Velké poděkování patří především PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za odborné vedení rigorózní práce, cenné rady, připomínky a konzultace. Děkuji též všem spoluautorům článku „Development of micellar electrokinetic chromatography method for the determination of three defined impurities in indomethacin“ za spolupráci. Dále bych chtěla poděkovat všem ostatním pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícný přístup.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Dagmar Doubková

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vývoj kapilární elektroforetické metody pro stanovení vybraných lékopisných nečistot indometacinu

Tato rigorózní práce se zabývá vývojem metody micelární elektrokinetické chromatografie pro stanovení vybraných lékopisných nečistot indometacinu (4-chlorbenzoové kyseliny, 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctové kyseliny a 3,4-dichloroindometacinu). Pro separaci byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 64,5 cm a efektivní délce 56 cm s bublinovou detekční celou o vnitřním průměru 150  $\mu\text{m}$ . Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina 1-naftyloctová (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Analýza probíhala při napětí 30 kV. Analyty byly detekovány na katodickém konci kapiláry při vlnové délce 224 nm. Pro optimalizaci separačních podmínek byl použit centrálně kompozitní design. Byl zkoumán vliv koncentrace SDS, obsahu methanolu, koncentrace fosfátového pufru a pH pufru na třech úrovních. Jako optimální složení základního elektrolytu bylo zvoleno: 20 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,57), 58 mmol/l SDS a 0 % (v/v) methanolu. Celková doba separace (s rozlišením všech sloučenin  $R_s \geq 3,8$ ) byla menší než 10 min. Linearita metody byla ověřena v rozsahu koncentrací 1,25 – 80  $\mu\text{g/ml}$  pro každou nečistotu, což odpovídalo 0,05 – 3,2 % obsahu indometacinu (2,5 mg/ml). Kalibrační křivky byly lineární s korelačním koeficientem  $r^2 \geq 0,9997$ . Limit kvantifikace byl 0,05 % (1,25  $\mu\text{g/ml}$ ), což odpovídá kritériím směrnice ICH Q3A.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Dagmar Doubková

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of Thesis: Development of capillary electrophoresis method for the determination of three pharmacopoeial impurities in indomethacin.

This thesis deals with the development of a micellar electrokinetic chromatography method for the determination of indomethacin impurities (4-chlorobenzoic acid, 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetic acid and 3,4-dichloroindomethacin). All separations were performed in a fused silica capillary with 50  $\mu\text{m}$  id; total length 64.5 cm, effective length 56 cm and with extended light path (150  $\mu\text{m}$  id) detection window. 1-naftylacetic acid (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was used as an internal standard. The separations were carried out at 30 kV. The analytes were detected at the cathodic end of the capillary at 224 nm. A central composite design was applied for the optimization of the separation conditions. The effect of SDS concentration, content of methanol, concentration of phosphate buffer and buffer pH was studied at three levels. The optimized background electrolyte was: 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7.57) containing 58 mmol/L SDS and 0% MeOH. The analysis time (with resolution of all compounds  $R_s \geq 3.8$ ) was shorter than 10 minutes. The linearity of the method was tested in the range of 1.25 – 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of each impurity corresponding to 0.05 – 3.2 % relative to the concentration of indomethacin (2.5 mg/ml). The calibration curves were rectilinear with correlation coefficients  $\geq 0.9997$ . The limit of quantification was 0.05 % (corresponds to 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) that complies with the reporting limits regarding the ICH Q3A.

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	- 8 -
1. ÚVOD.....	- 10 -
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE .....	- 12 -
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	- 14 -
3.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA .....	- 15 -
3.2. INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ .....	- 18 -
3.3. DĚLENÍ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD.....	- 19 -
3.4. VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V ANALÝZE NEČISTOT A PŘÍBUZNÝCH LÁTEK.....	- 19 -
3.5. OPTIMALIZAČNÍ STRATEGIE PRO CE SEPARACI.....	- 19 -
3.6. PRINCIPY PLÁNOVÁNÍ EXPERIMENTŮ .....	- 20 -
3.7. NEČISTOTY V LÉČIVÝCH LÁTKÁCH.....	- 22 -
3.8. INDOMETACIN .....	- 24 -
3.9. NEČISTOTY INDOMETACINU .....	- 28 -
3.10. METODY STANOVENÍ INDOMETACINU .....	- 29 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 34 -
4.1. PŘÍSTROJE A MATERIÁL.....	- 35 -
4.2. CHEMIKÁLIE .....	- 35 -
4.3. ROZTOKY.....	- 36 -
4.4. PRACOVNÍ POSTUPY .....	- 38 -
4.5. VÝPOČTY .....	- 38 -
4.6. CHEMOMETRICKÁ OPTIMALIZACE .....	- 40 -
5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	- 42 -
5.1. CHEMOMETRICKÁ OPTIMALIZACE .....	- 43 -
5.2. OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY ANALÝZY.....	- 48 -
5.3. ZPŮSOBILOST SYSTÉMU.....	- 49 -
5.4. KALIBRAČNÍ KŘIVKY .....	- 51 -
6. ZÁVĚR.....	- 56 -
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	- 58 -

## **SEZNAM ZKRATEK**



BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CCD	centrálně kompozitní design
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CRL	chemická referenční látka
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
DAD	detektor diodového pole
DoE	návrh experimentů
DMSO	dimethylsulfoxid
4CHBA	kyselina 4-chlorbenzoová
EOF	elektroosmotický tok
EMA	Evropská léková agentura
FDA	americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICH	mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na léčivé přípravky pro humánní použití
IND	indometacin
IS	vnitřní standard
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	metanol
MMIAA	kyselina 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová
NSAID	nesteroidní protizánětlivý lék
Ph. Eur.	Evropský lékopis
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
USP	lékopis Spojených států amerických
ZR	zásobní roztok
ZR IS	zásobní roztok vnitřního standardu
ZR ST	zásobní roztok standardů

## 1. ÚVOD

Pro zajištění bezpečných a účinných léčiv bylo vypracováno mnoho pokynů definujících požadavky na kvalitu a čistotu léčiv a léčivých přípravků. Vedle pokynů od místních autorit a lékopisů to jsou především pokyny vypracované Mezinárodní konferencí pro harmonizaci (ICH), které se týkají požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití. Konkrétně se jedná o směrnice Q3A (Nečistoty v nových léčivých substancích) a Q3B (Nečistoty v nových léčivých přípravcích) (1).

Posouzení čistoty léčiva podle současných norem vyžaduje použití nejmodernějších analytických metod. Pro testování přítomnosti nečistot v léčivech a léčivých přípravcích jsou testované vzorky hodnoceny zejména separačními technikami, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie nebo kapilární elektroforéza (CE) (2).

Tato rigorózní práce se zabývá vývojem elektromigrační metody pro stanovení tří definovaných nečistot indometacinu a to kyseliny 4-chlorbenzoové, kyseliny 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctové a 3,4-dichloroindometacinu. V odborné literatuře zatím nebyla popsána metoda, která by umožnila současné stanovení výše zmíněných tří nečistot.

Oproti dříve publikované diplomové práci (3) byl pro optimalizaci separačních podmínek použit chemometrický návrh experimentů, který umožňuje detailněji porozumět vlivu jednotlivých faktorů a jejich případných interakcí na výslednou separaci.

## **2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem rigorózní práce bylo navázání na diplomovou práci (3) a její rozšíření. Hlavním úkolem byla optimalizace separačních podmínek pro stanovení tří definovaných nečistot indometacinu, tj. kyseliny 4-chlorbenzoové, kyseliny 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctové a 3,4-dichloroindometacinu, pomocí vhodné elektromigrační techniky, kterou byla na základě předchozích experimentů zvolena micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Oproti diplomové práci byla stanovována přítomnost další nečistoty, tj. 3,4-dichloroindometacinu. Pro vývoj MEKC metody na stanovení nečistot indometacinu byla aplikována metoda multivariantní optimalizace separačních podmínek.

Zatímco pro zvýšení citlivosti byla v diplomové práci použita metoda stackingu, v této práci bylo zvoleno použití kapiláry s rozšířenou detekční celou (tzv. kapiláry s bublinovou detekční celou). Dále bylo cílem ověření linearity, a to v rozsahu začínajícím na hladině 0,05% pro každou nečistotu tak, aby byl rozsah metody v souladu s požadavky lékopisu a směrnic ICH Q3A a ICH Q3B.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je účinná analytická separační metoda, která umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci nabitých iontů i neutrálních molekul, neboť zahrnuje několik elektroforetických technik lišících se svým separačním mechanismem (4). Během posledních let se kapilární elektroforéza ukázala jako rychlá a univerzální analytická technika, která kombinuje jednoduchost s vysokou separační účinností (5).

#### 3.1.1. Elektroforetická pohyblivost

Separace pomocí elektroforézy je založena na rozdílné pohyblivosti částic v elektrickém poli. Pohyblivost iontové částice lze vyjádřit (6):

$$v = \mu_e E$$

*Rovnice 1*

v...rychlost iontové částice [m.s<sup>-1</sup>]

$\mu_e$ ...elektroforetická pohyblivost [m<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>]

E...intenzita elektrického pole [V.m<sup>-1</sup>]

V přítomnosti konstantního elektrického pole je iontová částice vystavena působení elektrostatické síly (F), která je vyjádřena jako:

$$F = qE$$

*Rovnice 2*

q...velikost náboje [C]

E...intenzita elektrického pole [V.m<sup>-1</sup>]

Proti elektrostatické síle (F) působí třecí síla (F<sub>f</sub>), která může být vyjádřena rovnicí podle Stokesova zákona pro sférické částice:

$$F_f = 6\pi\eta r v$$

*Rovnice 3*

$\eta$ ...viskozita elektrolytického roztoku [N.s.m<sup>-2</sup>]

r...poloměr částice [m]

v...rychlost elektroforetického pohybu [m.s<sup>-1</sup>]

Když je dosaženo konstantní rychlosti, pak  $F=F_f$ . Proto platí kombinace:

$$qE = 6\pi\eta r v$$

Rovnice 4

Dosazením Rovnice 1 do Rovnice 4 lze elektroforetickou pohyblivost ( $\mu_e$ ) iontové částice vyjádřit vztahem:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Rovnice 5

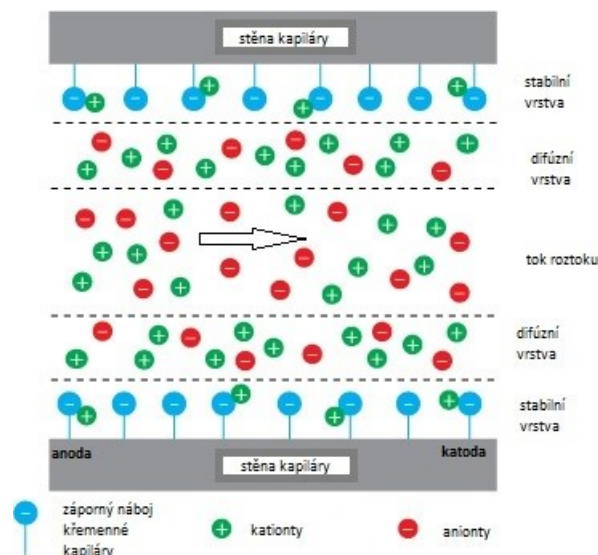
Elektroforetická pohyblivost tak závisí na velikosti a náboji iontové částice, a na viskozitě prostředí. Částice se pak pod vlivem elektrického pole pohybují různou rychlostí (7).

### 3.1.2. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalně fáze u vnitřní stěny kapiláry (8).

Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují. Disociací se vytváří záporný náboj stěny. Ke stěně je přitažena vrstva kladně nabitých iontů základního elektrolytu a vzniká stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty blíže středu kapiláry tvoří tzv. difúzní vrstvu. Je-li zavedeno napětí, tyto kationty migrují ke katodě. Kationty  $H^+$  bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolává tok celého roztoku k detektoru umístěnému před katodou (Obr. 1). Tok je tak silný, že nese ke katodě i anionty (9).





Obrázek 1: Elektroosmotický tok (10)

Velikost elektroosmotického toku může být vyjádřena jako rychlost nebo pohyblivost:

$$v_{EOF} = \left( \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right) E$$

Rovnice 6

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

Rovnice 7

$v_{EOF}$ ...rychlost elektroosmotického toku [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$\mu_{EOF}$ ...pohyblivost elektroosmotického toku [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$\zeta$ ...zeta potenciál [V]

$\varepsilon$ ...permitivita roztoku [ $\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$ ]

$\eta$ ...viskozita roztoku [ $\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ]

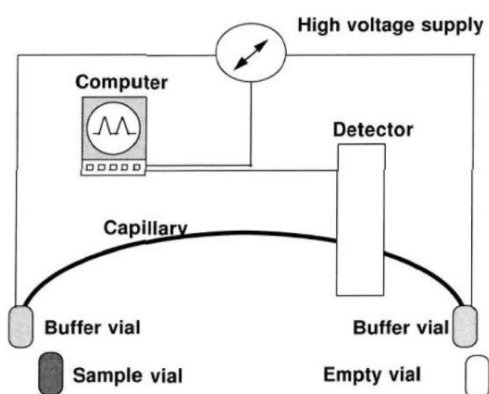
Zeta potenciál je určen nábojem na povrchu stěny kapiláry. Jelikož je tento náboj silně závislý na pH, velikost EOF se mění s pH. Při vyšším pH, kdy jsou silanolové skupiny převážně deprotonované, je EOF znatelně větší než při nižším pH, kdy jsou protonovány. V závislosti na specifických podmínkách se EOF může lišit více než o řád mezi pH 2 a 12 (11).

### 3.2. Instrumentální uspořádání

Základní části kapilární elektroforézy zahrnují zdroj vysokého napětí (0 až 30 kV), křemennou kapiláru, dva zásobníky na základní elektrolyt, do nichž jsou ponořeny konce křemenné kapiláry a platinové elektrody připojené na zdroj vysokého napětí (Obr. 2).

Standardně se pro CE separace používají křemenné kapiláry o vnitřním průměru od 20 do 100  $\mu\text{m}$ . Ze závislosti pohyblivosti EOF na zeta-potenciálu vnitřní stěny kapiláry vyplývá, že kapilára a její stav mají dopad na účinnost a opakovatelnost analýzy. Proto je ošetření kapiláry před, během a po elektroforetické separaci důležitou součástí každé CE metody (12).

Vzorek lze dávkovat na jeden z konců křemenné kapiláry: (i) tlakem (hydrodynamicky) nebo (ii) pomocí elektrického pole (elektrokineticky) (13). Po nadávkování cca 1-2% celkové délky kapiláry je realizována samotná separace. Na opačném konci kapiláry je provedena detekce analytů. Detekce v kapilární elektroforéze je náročným úkolem kvůli malým rozměrům kapiláry a malému objemu vzorku, který je do kapiláry nadávkován (řádově desítky nl). Nejčastěji používanou detekční technikou je DAD detektor, který je běžnou součástí komerčních elektroforetických analyzátorů. Další rozšířené detekční techniky představují hmotnostní spektrometrie, laserem indukovaná fluorescence (LIF) a bezkontaktní vodivostní detekce (6, 14). Ovládání přístroje a vyhodnocení dat je realizováno pomocí PC (7).



Obrázek 2: Základní instrumentální uspořádání (11)

### **3.3. Dělení elektromigračních metod**

Elektromigrační metody mohou být klasifikovány podle různých kritérií. Z teoretického hlediska je nejvýznamnější klasifikace podle počátečních a mezních podmínek separace. Hlavní způsoby CE, které byly vyvinuty a jsou v současnosti využívány, zahrnují kapilární zónovou elektroforézu (CZE), micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF), kapilární gelovou elektroforézu (CGE) a kapilární izotachoforézu (CITP) (15,16).

### **3.4. Využití kapilární elektroforézy v analýze nečistot a příbuzných látek**

Pro separaci a kvantifikaci nečistot a degradačních produktů léčiv je dnes nejvíce používána metoda HPLC na obrácených fázích s UV detekcí (17).

Kapilární elektroforéza je populární alternativa k ostatním chromatografickým metodám. CE je účinná analytická technika, která může být použita k separaci velkého množství látek, od iontů a malých molekul až po látky s vysokou molekulovou hmotností (18).

Stanovení nečistot je jedním z hlavních úkolů CE v rámci farmaceutické analýzy a představují výzvu k selektivitě i citlivosti této techniky. Hlavní látka a strukturně příbuzné nečistoty mají často velmi podobné chemické vlastnosti, které kladou velké nároky na nezbytnou selektivitu. Kromě toho je CE využívána i pro určení enantiomerních nečistot. CE hrála např. důležitou roli při řešení problému toxicity některých šarží heparinu díky separaci a kvantifikaci jeho toxických nečistot (17,19).

### **3.5. Optimalizační strategie pro CE separaci**

Mnoho faktorů může ovlivňovat výsledek separace pomocí kapilární elektroforézy: druh, koncentrace a pH základního elektrolytu, přídavek povrchově aktivní látky (např. SDS), přídavek organického modifikátoru (např. MeOH), napětí či teplota kapiláry. Detailní porozumění vlivu těchto faktorů na výslednou separaci je důležité pro vývoj a optimalizaci separačních podmínek. Z tohoto důvodu je tedy dnes obvyklá (ale zároveň obsoletní) univariantní optimalizace, kdy je jedna proměnná

optimalizována, zatímco ostatní jsou udržovány na konstantní úrovni, nahrazována multivariantní optimalizací (či návrhem experimentů) za účelem nalezení nejen optimálních podmínek, ale i pro odhalení klíčových faktorů ovlivňující samotný separační proces včetně jejich vzájemných interakcí. Tímto postupem lze zároveň predikovat i oblast, ve které je dosaženo separace dle předem definovaných požadavků (v anglicky psané literatuře označované jako „design space“).

Hledání optimálních separačních podmínek v CE je často časově náročné a zdouhavé. Z tohoto důvodu je použití chemometrických technik v CE výhodnější a rozhodující pro konečný zdroj informací. Různé chemometrické techniky, zahrnující i multivariantní, jsou používány, aby optimalizovaly výkon systému a rozšířily jeho separační schopnosti. V širším slova smyslu je chemometrie podobor analytické chemie, která používá matematické, statistické a formální logiky k:

- a) návrhu a/nebo výběru optimálního experimentálního postupu
- b) poskytnutí maxima relevantních chemických informací analýzou chemických dat
- c) získání znalosti o daném chemickém systému (20,21).

### **3.6. Principy plánování experimentů**

Univariantní experimentální přístup znamená studovat každou pokusnou proměnnou zvlášť. Tato strategie „jedné proměnné v čase“ je snadno ovladatelná a široce využívaná, ale není to nejefektivnější přístup. Multivariantní strategie by měla usnadnit organizaci postupného získávání výsledků. Měla by minimalizovat počet pokusů, ale neměla by ohrozit kvalitu experimentu. Naopak by měla zajistit, aby výsledky byly co nejpřesnější (22).

Plánování experimentů je metodika pokusného výzkumu, která je také nazývána „design of experiments“ (DoE). V něm jsou studované proměnné současně měněny během pokusu. Zahrnuje různé strategie a statistické nástroje zaměřené na dovedení výzkumného pracovníka k vybraným oblastem jeho zájmu uvnitř velké experimentální oblasti s minimálním množstvím pokusů (23).

Faktory jsou hlavní kategorií designu. Úrovně každého faktoru jsou hodnoty, kterých daný faktor může nabývat (24).

V podstatě je metoda DoE aplikovatelná na tři hlavní oblasti. První oblastí je screening. Ten je používán k odhalení nejvýznamnějších faktorů a k určení rozsahů, v kterých budou dále zkoumány. Druhou oblastí je optimalizace. V jejím zájmu je definovat, které osvědčené kombinace důležitých faktorů budou mít za následek optimální podmínky. Třetí oblastí je testování robustnosti. Díky němu se určuje, jak citlivá je výsledná metoda/postup na malé změny v nastavení faktorů (25).

Mezi výhody použití DoE patří získání velmi přesných výsledků a nových poznatků (22).

Rozlišuje se několik základních designů plánování experimentů. Prvním důležitým designem je plně faktoriální design pro výzkum dvou nebo tří faktorů. Dalšími jsou částečně faktoriální design, který je široce využíván v oblasti screeningu, a poté kompozitní design, který se používá při optimalizaci (25).

### **3.6.1. Plně faktoriální design**

Plně faktoriální experimentální design poskytuje komplexní analýzu všech faktorů, úrovní a interakcí, které souvisejí s vybranou charakteristikou kvality. Každá úroveň každého faktoru se vyskytuje pro každou kombinaci úrovní jiných faktorů. Plně faktoriální design, kde každý faktor má stejný počet úrovní, je označován jako  $k^n$  faktoriální design, kde  $k$  je počet úrovní,  $n$  je počet faktorů a  $k^n$  je počet potřebných experimentů. Pokud má faktor A tři úrovně, faktor B dvě úrovně a faktor C tři úrovně, pak plně faktoriální design má  $3 \times 2 \times 3 = 18$  potřebných experimentů (24,26).

### **3.6.2. Částečně faktoriální design**

Částečně faktoriálním designem je nazýván ten, který je zlomkem (podmnožinou) plně faktoriálního designu. Tento design redukuje počet potřebných experimentů o  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  nebo  $\frac{1}{2^p}$ . Plně faktoriální design  $2^3$  s osmi experimenty může být snížen na  $2^{3-1}$  částečně faktoriální design se čtyřmi experimenty (24,26).

### **3.6.3. Centrálně kompozitní design**

Centrálně kompozitní design provádí testování na pěti úrovních. Krajní body (faktoriální nebo částečně faktoriální) jsou v plánovaných mezích. Axiální

(hvězdicové) body jsou v určité vzdálenosti od centra v závislosti na počtu faktorů v návrhu. Axiální body rozšiřují rozsah mimo nízké a vysoké nastavení pro všechny faktory. Centrální body doplňují návrh. Centrálně kompozitní návrhy poskytují vysoce kvalitní předpovědi napříč celým experimentem, ale musí být pečlivě zvoleno rozmezí faktorů. Především musí být jisté, že i axiální body leží na proveditelných úrovních (27).

### **3.7. Nečistoty v léčivých látkách**

Mezi témata zásadního významu ve farmakoterapii patří účinnost a bezpečnost. Nečistota je dle směrnic ICH definována jako každá složka nové léčivé látky, která není chemickou entitou definovanou jako nová léčivá látka. Nečistoty mohou být klasifikovány do následujících kategorií: organické nečistoty, anorganické nečistoty a zbytková rozpouštědla. Organické nečistoty mohou vzniknout během výrobního procesu a/nebo skladováním nové léčivé látky. Patří mezi ně: výchozí látky, vedlejší produkty, meziprodukty, degradační produkty, činidla, ligandy a katalyzátory. Anorganické nečistoty jsou výsledkem výrobního procesu. Jsou běžně známé a identifikovatelné a zahrnují: činidla, ligandy, katalyzátory, těžké kovy nebo jiné zbytkové kovy, anorganické soli a jiné (28,29).

Je prakticky nemožné mít absolutně čisté chemické sloučeniny. Dokonce i analyticky čisté chemické sloučeniny obsahují nepatrné stopy nečistot. Takové chemické čistoty, jako je požadováno, může být dosaženo za předpokladu, že je při výrobě léčiva dodržována dostatečná péče na různých úrovních výroby. Úroveň čistoty farmaceutické látky závisí částečně na nákladech použitého procesu, způsobech čištění a stabilitě finálního produktu (30).

Různé regulační orgány jako ICH, FDA, EMA či Kanadská léková a zdravotní agentura zdůrazňují požadavky na čistotu a identifikaci nečistot v účinných farmaceutických složkách (31).

### 3.7.1. Nečistoty podle ICH směrnic

ICH řeší tři základní témata a to kvalitu, bezpečnost a účinnost.

Směrnice ICH Q3A udává limity pro mez uvádění, vyjadřuje se k identifikaci a kvalifikaci nečistot v nových léčivých látkách. Směrnice ICH Q3B se analogickým způsobem zaměřuje na nové léčivé látky v léčivých přípravcích (28, 29, 32).

Mez uvádění je hraniční hodnota, nad (>) kterou by měl být degradační produkt hlášen. Jakýkoli degradační produkt, který byl ve studiích stability pozorován na úrovni vyšší (>) než je identifikační prahová hodnota, a byl skladován za doporučených podmínek, by měl být identifikován (Tab. 1). Pokud byly učiněny pokusy o identifikaci nečistot přítomných na úrovni nižší ( $\leq$ ), než je identifikační prahová hodnota, je také užitečné podat zprávu o výsledcích těchto studií.

Kvalifikace je proces získávání a vyhodnocování údajů, které stanoví úroveň biologické bezpečnosti individuální nečistoty. Nečistoty by měly být hodnoceny podle Tabulky 1 (29).

Tabulka 1: Určení prahových hodnot v nových léčivých látkách (29)

Maximální Denní Dávka <sup>1</sup>	Mez uvádění <sup>2,3</sup>	Práh identifikace <sup>3</sup>	Práh kvalifikace <sup>3</sup>
$\leq 2\text{g/den}$	0,05%	0,1% nebo příjem 1,0 mg za den (co je nižší)	0,15% nebo příjem 1,0 mg za den (co je nižší)
$> 2\text{g/den}$	0,03%	0,05%	0,05%

<sup>1</sup> Množství léčivé látky podávané denně

<sup>2</sup> Vyšší prahové hodnoty pro podávání zpráv by měly být vědecky odůvodněné

<sup>3</sup> Nižší prahové hodnoty mohou být vhodné, pokud je nečistota neobvykle toxická

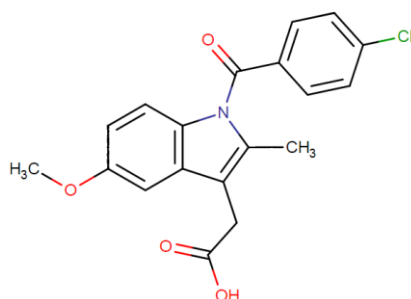
### 3.7.2. Nečistoty podle zahraničních lékopisů

Ph.Eur. obsahuje obecné kapitoly, obecná upozornění a monografické požadavky na nečistoty, ačkoli pokrývají pouze léčivé látky (pouze obecné kapitoly stanovují lékové formy). Podobně jako USP, Ph.Eur. také obsahuje základní metody pro zbytková rozpouštědla. Oba lékopisy poskytují referenční standardy pro nečistoty, které jsou uvedeny v monografiích (28).

### 3.8. Indometacin

Indometacin (Obr. 3) je nesteroidní a protizánětlivá látka (NSAID), běžně užívaná jako lék na předpis ke snížení bolesti, ztuhlosti a otoků. Působí inhibicí produkce prostaglandinů, molekul, které způsobují tyto symptomy (33).

Je to silný lék s mnoha závažnými nežádoucími účinky a neměl by být považován za analgetikum pro menší bolesti a horečku. Léčba je spíše protizánětlivá než analgetická (34).



Obrázek 3: Indometacin (35)

#### 3.8.1. Chemické a farmakokinetické vlastnosti

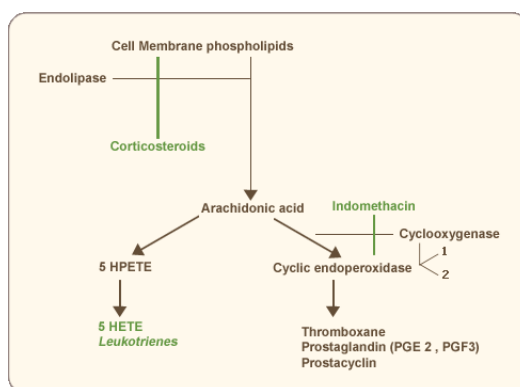
Chemicky je to 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-octová kyselina, její sumární vzorec je  $C_{19}H_{16}ClNO_4$ , molekulární hmotnost 357,8 a  $pK_a$  4,5. Indometacin je bílý nebo žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v alkoholu a běžných organických rozpouštědlech (33,36).

Klasické perorální podání má za následek dobrou biologickou dostupnost, ale potrava podaná současně může oddálit nebo omezit absorpci. Nejvyšší plazmatické koncentrace je dosaženo 1–2 hodiny po dávkování. Indometacin se z 90 % váže na plazmatické bílkoviny a tkáně. Plazmatický poločas indometacinu je kolem 2,5 hodiny. Po jeho distribuci prodělává glukuronidovou konjugaci, O-demethylaci a N-deacetylaci. Méně než 10 % perorálně podané dávky se objevuje v moči jako původní nezměněná sloučenina. Indometacin je také eliminován žlučí a podléhá enterohepatálnímu oběhu (37,38).



### 3.8.2. Mechanismus účinku

Zatímco protizánětlivý účinek indometacinu je spojen s jeho schopností inhibovat cyklooxygenázu (Obr. 4), přesný molekulární mechanismus, kde indometacin a jiná nesteroidní protizánětlivá léčiva prokazují svoje chemoprotylaktické účinky, zůstává nejasný. Může být zapojen sekundární mechanismus redukce prostaglandinů, stejně jako posílení imunitního dohledu a stimulace proliferace T-lymfocytů. Stejně tak není známo, jaký mechanismus nebo interakce s patofyziologickými mechanismy je klíčem ke specifické farmakologii indometacinem při léčbě bolesti hlavy (38,39).



Obrázek 4: Mechanismus účinku indometacinu (40)

### 3.8.3. Farmakologická léčba

Během rozsáhlé snahy o nalezení účinných protizánětlivých a analgetických léků byl před více než 50 lety objeven indometacin jako mimořádně účinný nesteroidní protizánětlivý lék. V 60. letech se deriváty kyseliny octové vyvinuly na indometacin, diklofenac a sulindac a propionové deriváty na ibuprofen, naproxen a ketoprofen. Indometacin byl pravděpodobně neúčinnější z těchto sloučenin a jedna z prvních, která vstoupila do klinických studií. Ve výzkumu je velký zájem o vysvětlení farmakokinetických rozdílů mezi indometacinem a jinými NSAID (41). Je běžně předepisován v dávkování 25–100 mg třikrát nebo čtyřikrát denně (38). Indometacin je léčivem volby u akutní dny, kdy ulevuje rychleji než phenylbutazon. Vhodný je také u ankylozující spondylitidy, osteoartrózy a v případě revmatoidní artritidy se zánětlivými projevy a otoky kloubů. Indometacin hraje zvláštní roli v léčbě bolesti hlavy a je také používán jako nástroj pro diferenciální diagnostiku bolesti hlavy. Se zaměřením na bolest hlavy jsou shromažďovány aktuální

poznatky farmakologie, možnosti léčby a doporučení, pro použití indometacinu v primárních bolestech hlavy (37,39).

Indometacin je také užíván k uzavření Botallovy dučejky u novorozenců (33).

Klinické a epidemiologické studie naznačují, že indometacin a jiné protizánětlivé látky mají ochranný účinek proti Alzheimerově chorobě. Tyto studie byly motivovány důkazy, že zánět a cytokiny hrají roli v patogenezi Alzheimerovy choroby (42).

#### **3.8.4. Nežádoucí účinky a kontraindikace**

Toxicita indometacinu omezuje jeho aplikaci, a navíc zvyšuje mortalitu plodu (43). Indometacin má širokou škálu nežádoucích účinků, klinicky nejvýznamnější z nich jsou vředy a krvácení v horní části gastrointestinálního traktu. Riziko těchto komplikací se zvyšuje v závislosti na dávce. Indometacin snižuje renální funkce a zvyšuje krevní tlak, občas způsobuje vyrážku a bolest hlavy a zřídka může vyústit v hepatotoxicitu a aseptickou meningitidu (38).

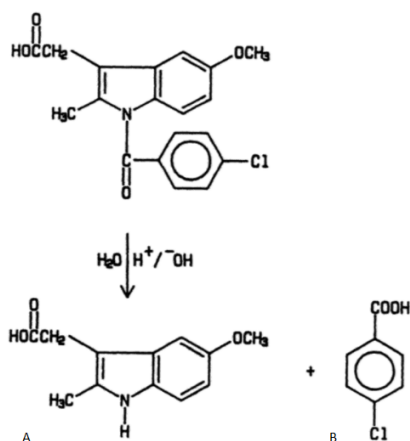
Indometacin je kontraindikován v těhotenství, u astmatiků a u lidí s žaludečními vředy nebo jinými ulceracemi gastrointestinálního traktu (43).

#### **3.8.5. Stabilita indometacinu**

Indometacin ve vodných roztocích a v pevné formě je citlivý na světlo. Vystavení silnému přímému slunečnímu světlu způsobuje změnu barvy indometacinu, proto jsou preventivně používány nádoby odolné vůči světlu (44,45).

Indometacin obsahuje ve své základní struktuře indol. Dusík indolového cyklu je připojen k 4-chlorbenzoylové skupině a výsledná amidová vazba je citlivá k hydrolýze (Obr. 5) (46).

Indometacin se rozkládá na dva degradační produkty: 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctovou kyselinu (A) a 4-chlorbenzoovou kyselinu (B). Druhý degradační produkt musí být monitorován společně s účinnou látkou během výrobního procesu i skladování léčiv, kvůli důkazům o jeho hepatotoxicitě (47,48).



Obrázek 5: Hydrolýza indometacinu (44)

Byla zkoumána kinetika hydrolýzy indometacinu a jeho glykolamidového esteru s cílem posoudit, zda je možné navrhnout ve vodě rozpustné a zároveň stabilní proléčivo indometacinu vhodné pro parenterální nebo oční podání. Z teplotně urychlených studií byly předpovězeny profily pH při 25 °C. Indometacin a jeho ester vykazovaly maximální stabilitu při pH 4,9 a 4,7; respektive životnost při těchto hodnotách pH a 25 °C je 2,0 roku pro indometacin, ale pouze 43 dní pro ester. Ester se degraduje jak ve své esterové skupině, tak i v indol-amidové skupině indometacinové části a vykazuje velmi výraznou hydrolýzu, což vysvětluje limitovanou stabilitu (49).

Indometacin je oficiálním léčivem jak Českého (ČL) a Evropského lékopisu (Ph.Eur.), tak i lékopisu Spojených států amerických (USP). V Českém a Evropském lékopisu je stanovení obsahu indometacinu prováděno metodou HPLC na nepolárních adsorbentech s C-18 stacionární fází, zatímco HPLC metoda používající jako stacionární fází fenylhexylsilylovaný silikagel je používána k testování čistoty. V lékopisu Spojených států amerických je metoda HPLC s C-18 fází používána jak ke stanovení, tak k určení čistoty.

Český lékopis používá ke zkoušení totožnosti kombinaci teploty tání (158–162 °C) a infračervenou spektrofotometrii (porovnání s indometacinem CRL), nebo jako druhou možnost kombinaci absorpční spektrofotometrie v UV oblasti, teploty tání a 2 chemických reakcí.

V Evropském lékopise 9.0 a ČL 2017 je popsáno deset příbuzných látek/nečistot (nečistota A–J). Jejich obsah je limitován obecným přijetím kritérií pro ostatní/nеспециfikované nečistoty (tj. pro každou nečistotu maximálně 0,1 %). Pro

účely validovaných zkoušek jsou v dostatečném množství a čistotě komerčně dostupné pouze tři z těchto nečistot [5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová kyselina (MMIAA), 4-chlorbenzoová kyselina (CHBA) a 3,4-dichlorindometacin (DCHIND)]. Mez uvádění je nastavena na 0,05 %, zatímco obsah pro každou nespecifikovanou nečistotu nesmí přesáhnout 0,10 %. Celkové množství nečistot je limitováno na 0,3 %.

USP udává dvě příbuzné sloučeniny, které odpovídají MMIAA a CHBA. Přijatelné hodnoty pro MMIAA a CHBA jsou nastaveny na 0,1 a 0,5 %. Pro každou další nespecifikovatelnou nečistotu je limit nastaven na 0,1 % a celkový obsah nečistot nesmí přesáhnout 1,0 % (36,37,50,51).

### 3.9. Nečistoty indometacinu

- **4-chlorbenzoová kyselina**

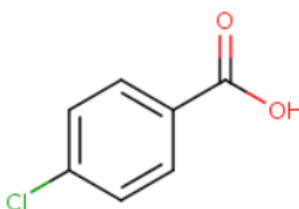
Synonymum: p-chlorbenzoová kyselina

Empirický vzorec: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 156,565

pKa: 4,07 (<https://www.drugbank.ca>, No:DB03728, 19. 9. 2018)

Kyselina 4-chlorbenzoová (Obr. 6) je pevná látka, nejčastěji ve formě bílého lehce načechráného prášku nebo krystalů. Je rozpustná v DMSO, 95% ethanolu, methanolu, acetonu a mírně rozpustná ve vodě. Je inkompatibilní se silnými oxidačními činidly a silnými bázemi. Používá se k výrobě barviv, fungicidů, léčiv a jako laboratorní chemikálie. Jako konzervační činidlo se používá sodná sůl kyseliny 4-chlorbenzoové (52,53,54).



Obrázek 6: Kyselina 4-chlorbenzoová (55)

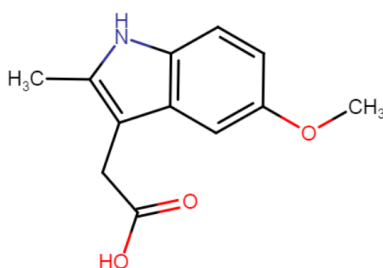
- **5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová kyselina**

Synonymum: 2-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)octová kyselina

Empirický vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>

Molekulární hmotnost: 219,24

Kyselina 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová (Obr. 7) je rozkladným produktem indometacinu a patří do skupiny derivátů indol-3-octové kyseliny. Je to bílý až lehce nažloutlý jemný krystalický prášek, rozpustný v methanolu (56,57).



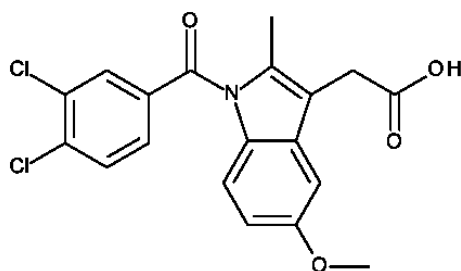
Obrázek 7: 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová kyselina (58)

- **3,4-dichloroindometacin**

Synonymum: 2- [1-(3,4-dichlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]octová kyselina

Empirický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 391,0378 (59)



Obrázek 8: 3,4-dichloroindometacin (60)

### 3.10. Metody stanovení indometacinu

Indometacin lze stanovit za pomoci RP-HPLC metody (61), UV spektrofotometrie (62) a kolorimetrických metod (63). Tyto metody byly použity pro kontrolu jakosti

substance indometacinu nebo stanovení obsahu indometacinu v léčivých přípravcích.

Metody kapilární elektroforézy byly vyvinuty pro stanovení indometacinu v plazmě (MEKC) (64) a pro stanovení nesteroidních protizánětlivých látek v lidském séru (CZE, MEKC) (65).

### **3.10.1. Hodnocení stability indometacinu pomocí RP-HPLC**

Byla vyvinuta a validována rychlá, jednoduchá a plně automatická metoda RP-HPLC s UV detekcí pro stanovení indometacinové substance a degradačního produktu, kyseliny 4-chlorbenzoové.

Analýza probíhala za izokratických podmínek, za použití mobilní fáze acetonitrilu s kyselinou ortofosforečnou (50:50, v/v). Jako stacionární fáze byla zvolena C18 kolona (250 mm × 4,6 mm; 5 µm).

Za výše zmíněných chromatografických podmínek byly získány retenční časy pro roztok standardů, který obsahoval směs testované kyseliny 4-chlorbenzoové (2,074 min) a indometacinu (9,857 min) (Obr. 9).

Byla stanovena linearita metody na osmi koncentračních úrovních od 25,00 do 200,0 µg/ml pro indometacin a od 5,00 do 40 µg/ml pro kyselinu 4-chlorbenzoovou. Kalibrační křivka byla ve studovaném rozmezí lineární, s hodnotami  $r^2=0,9988$  pro indometacin a  $r^2=0,9915$  pro kyselinu 4-chlorbenzoovou.

Přesnost navrhovaného analytického systému byla zjišťována provedením šesti po sobě jdoucích opakovaných nástřiků stejného roztoku standardů. Hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) velikosti ploch byly 0,33 % (IND); 1,14 % (4CHBA).

LOQ pro indometacin a kyselinu 4-chlorbenzoovou byly 0,3 µg/ml a 0,9 µg/ml. Vypočítané LOD byly 0,06 µg/ml (IND) a 0,3 µg/ml (4CHBA) (47).

### **3.10.2. Vývoj a validace metody RP-HPLC pro stanovení stability indometacinu v kapslích**

K rychlé a rutinní analýze indometacinových dávkových forem dostupných na trhu byla validována RP-HPLC metoda pro stanovení indometacinu a jeho degradačních produktů vzniklých za různých stresových podmínek.

Separace byla provedena na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 100 mm; 3,5 μm) s mobilní fází o složení acetonitril: 10 mM acetátový pufr o pH 4 (60:40, v/v). Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při 226 nm.

Retenční čas indometacinu byl 5 min a kalibrační křivka byla testována v rozsahu koncentrací od 7,5 do 75 μg/ml a byla lineární s hodnotou  $r^2=0,998$ .

Detekční limit indometacinu byl 3,33 μg/ml (61).

### **3.10.3. Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení indometacinu a jeho dvou degradačních produktů v topickém gelu**

Byla vyvinuta plně automatická analytická metoda pro stanovení indometacinu a dvou nečistot ve farmaceutických přípravcích za použití HPLC s UV detekcí.

Byly testovány různé stacionární fáze. Především zorbax-phenylová analytická kolona (75 mm × 4,6 mm; 3,5 μm) umožnila separaci indometacinu a jeho dvou degradačních produktů během 7,5 min. Chromatografie byla provedena za použití izokratické eluce s binární mobilní fází složenou z acetonitrilu a 0,2% kyseliny fosforečné (50:50, v/v). Rychlejší separace standardů bylo však dosaženo s analytickou kolonou Zorbax SB-CN (150 mm × 4,6 mm; 5 μm), složení mobilní fáze bylo stejné. Doba analýzy se zkrátila na 5 min.

Pro validaci byla vybrána první metoda, protože v případě Zorbax SB-CN kolony došlo k výskytu interferencí s placebem. Validační parametry jsou uvedeny v Tabulce 2 a porovnány s metodou v kap. 2.10.4. (66)

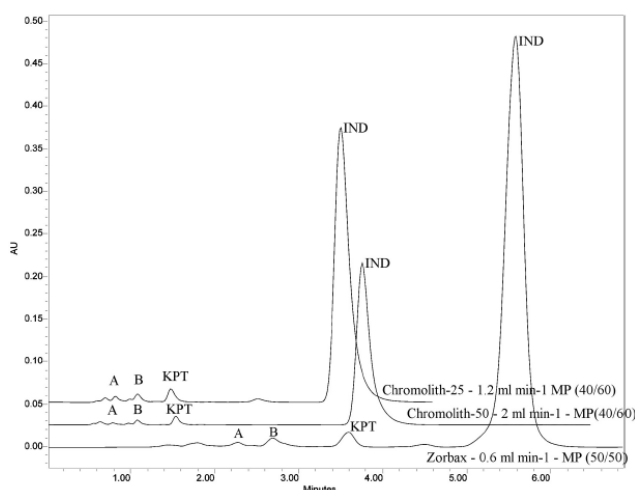
Tabulka 2: Porovnání HPLC metod za použití zorbaxové a chromolitické kolony

Substance	Přesnost RSD [%]	Správnost Recovery [%]	Správnost RSD [%]	Podmínky analýzy
MMIAA	1,97	101,13	2,95	SP: Chromolith SpeedRP-18e (50 x 4,6mm) MP: ACN:PA (40:60) (67)
4CHBA	1,62	95,55	0,99	
IND	1,89	95,75	0,66	
MMIAA	3,10	96,22	1,13	SP: Zorbax SB- Phenyl (75 x 4,6mm) MP: ACN: PA(50:50) (66)
4CHBA	3,25	98,27	0,62	
IND	1,39	99,53	0,70	

### 3.10.4. Aplikace monolitických kolon ve farmaceutické analýze, stanovení indometacinu a jeho degradačních produktů

S ohledem na validační parametry byly testovány tři různé délky chromolitických kolon RP-18e (25 × 4,6 mm; 50 × 4,6 mm a 100 × 3 mm). Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitrilu (ACN) a kyseliny fosforečné (PA) 0,2% v různých poměrech (40:60-60:40, v/v). Po optimalizaci byly výsledky porovnány s hodnotami, které byly získány za použití běžných zorbaxových kolon.

Po vyhodnocení vhodností systému byla vybrána 50-mm monolitická kolona pro její vynikající opakovatelnost a krátký čas analýzy (Obr. 10).



Obrázek 10: HPLC chromatogramy za použití Zorbax SB-Phenyl kolony a monolitických kolon (67)

Vyvinuté metody byly použity ke stanovení všech tří sloučenin (IND, 4CHBA, MMIAA) ve farmaceutickém přípravku – Indobene gel.



Byl testován Indobene gel za použití původních i vyvinutých chromatografických podmínek s monolitickými kolonami o délce 25 a 50 mm. Nejlepších validačních parametrů dosáhla monolitická 50-mm kolona. Validací parametry jsou uvedeny v Tabulce 2.

Dostatečné rozlišení a uspokojivá symetrie píku byly získány pro všechny testované sloučeniny na obou typech kolon, ale separace se značně lišily v časech analýz. Monolitické kolony umožnily provádět analýzu v polovičním čase ve srovnání s běžnými kolonami. Navíc další výhodou 50-mm monolitické kolony byla vysoká opakovatelnost ploch píků i retenčních časů (RSD méně než 0,4 %) (67).

#### **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### 4.1. Přístroje a materiál

- Kapilární elektroforetický analyzátor Agilent 7100 vybavený DAD detektorem, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 µm a bublinovou detekční celou o průměru 150 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Software 3D-CE ChemStation (verze B.04.03-SP1), Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sanorex Digitec DT 52, Bandelin Electronic, Německo
- pH metr Sentron s microFET elektrodou, Sentron, Holandsko (kalibrace pufrů Sentron)
- Nylonový filtr 0,45 µm, Captiva Econofilter, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Milli-Q-system, Millipore, Bedford, MA, USA

#### 4.2. Chemikálie

- Indometacin, ≥99%, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová, ≥98%, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina 4-chlorbenzoová, ≥99%, Sigma-Aldrich, USA
- 2,4-dichloroindometacin, LGC, Německo
- Kyselina 1-naftyloctová, Sigma-Aldrich, USA
- Dodecylsíran sodný, pro elektroforézu, Sigma-Aldrich, USA
- Dihydrogenfosforečnan sodný, p.a., Sigma-Aldrich, USA
- Hydroxid sodný, ≥97%, Sigma-Aldrich, USA
- Methanol, LC-grade, ≥99,9%, Sigma-Aldrich, USA
- Ultra čistá voda (čištěno Milli-Q-System)

### **4.3. Roztoky**

#### **4.3.1. Zásobní roztok (ZR) dihydrogenfosforečnanu sodného**

Do kádinky bylo naváženo množství odpovídající 50, 75 nebo 100 mM koncentraci dihydrogenfosforečnanu sodného a rozpuštěno v dostatečném množství vody. Dále bylo upraveno pH pomocí 1 M a 0,1 M NaOH na hodnotu 6, 7 nebo 8, dle potřeby. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn vodou po rysku.

#### **4.3.2. Roztoky základního elektrolytu pro optimalizaci**

Do kádinky bylo naváženo množství SDS, které odpovídalo 25, 50 nebo 75 mM koncentraci, a následně bylo rozpuštěno za pomoci ultrazvukové lázně přibližně v 20 ml vody a kvantitativně převedeno do 50 ml odměrné baňky. Do stejné odměrné baňky bylo dále napipetováno vždy 10 ml ZR dihydrogenfosforečnanu sodného o požadované hodnotě pH tak, aby byla výsledná koncentrace 10, 15 nebo 20 mM. Dle potřeby byl přidán methanol, jehož výsledná koncentrace byla 0 %, 7,5 % nebo 15 % (v/v). Odměrná baňka byla doplněna vodou po rysku. Takto připravený elektrolyt byl filtrován do vialek pomocí nylonového membránového filtru, o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ , a odplyněn na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

#### **4.3.3. Roztok základního elektrolytu**

Do kádinky bylo naváženo množství SDS odpovídající 58 mM koncentraci, tj. 0,8363 g, a pomocí ultrazvukové lázně 10 minut rozpouštěno přibližně v 20 ml vody. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml ze ZR 100 mM dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 7,6. Do odměrné baňky bylo kvantitativně převedeno SDS a roztok byl doplněn vodou po rysku.

#### **4.3.4. Zásobní roztoky standardů**

Byly připraveny dva zásobní roztoky standardů do 5 ml odměrných baněk. U prvního ZR bylo naváženo množství indometacinu odpovídající koncentraci 5 mg/ml a doplněno methanolem po rysku. Druhý ZR obsahoval všechny nečistoty, tedy 4CHBA, MMIAA a DCHIND, o stejné koncentraci 0,5 mg/ml v methanolu.

#### 4.3.5. Zásobní roztok vnitřního standardu

Zásobní roztok 1-naftyloctové kyseliny byl připraven navážením takového množství, které odpovídalo jeho koncentraci 0,5 mg/ml. Kyselina 1-naftyloctová byla rozpuštěna a doplněna methanolem po rysku 5 ml odměrné baňky.

#### 4.3.6. Pracovní roztoky standardů

Do odměrné baňky o objemu 5 ml bylo napipetováno 2,5 ml ZR indometacinu (odpovídá konečné koncentraci 2,5 mg/ml), 25 µl ZR nečistot (odpovídá konečné koncentraci každé nečistoty 2,5 µg/ml) a 100 µl ZR vnitřního standardu (odpovídá konečné koncentraci 10 µg/ml). Roztok byl doplněn methanolem po rysku.

#### 4.3.7. Kalibrační roztoky

Do 5 ml odměrné baňky bylo postupně pipetováno 2,5 ml zásobního roztoku indometacinu (odpovídá konečné koncentraci 2,5 mg/ml), zásobního roztoku nečistot dle požadované koncentrace (Tab. 3), 100 µl zásobního roztoku vnitřního standardu (odpovídá konečné koncentraci 10 µg/ml). Vše bylo doplněno methanolem po rysku.

Tabulka 3: Příprava kalibračních roztoků s koncentracemi nečistot 1,25–80 µg/ml, koncentrace IND 2,5 mg/ml

Kalibrační roztok č.	1	2	3	4	5	6	7
C MMIAA [µg/ml]	1,25	2,5	5	10	20	40	80
C 4CHBA [µg/ml]	1,25	2,5	5	10	20	40	80
C DCHIND [µg/ml]	1,25	2,5	5	10	20	40	80
ZR IND [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
ZR nečistot [µl]	12,5	25	50	100	200	400	800
ZR IS [µl]	100	100	100	100	100	100	100

## 4.4. Pracovní postupy

### 4.4.1. Kondicionace kapiláry

Nová kapilára byla před první analýzou promývána methanolem (10 min), 1 M hydroxidem sodným (30 min), poté 0,1 M hydroxidem sodným (30 min) a vodou (10 min).

### 4.4.2. Promývání kapiláry

Na začátku každého dne byla kapilára promývána 1 M hydroxidem sodným (2 min); 0,1 M hydroxidem sodným (4 min), vodou (1 min) a methanolem (4 min). Po posledním měření byla kapilára promyta methanolem (5 min); 0,1 M hydroxidem sodným (5 min) a vodou (5 min). Před každým měřením byla kapilára propláchnuta methanolem (5 min); 0,1 M hydroxidem sodným (3 min), vodou (3 min) a základním elektrolytem (4 min).

Z důvodu možné kontaminace vzorku základním elektrolytem, která může negativně ovlivnit stabilitu vzorku s obsahem indometacinu, byla inletová elektroda před dávkováním vzorku vždy dvakrát opláchnuta čistým methanolem (3).

### 4.4.3. Měření kalibrační závislosti

Pro měření linearitu bylo připraveno celkem sedm kalibračních roztoků o koncentraci nečistot 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 µg/ml a indometacinu 2,5 mg/ml. Každý roztok byl analyzován třikrát.

## 4.5. Výpočty

### 4.5.1. Rozlišení ( $R_s$ )

Rozlišení mezi dvěma píky bylo vypočítáno pomocí vztahu (50):

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

*Rovnice 8*

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ ... migrační časy sousedních látek ( $t_{R2} > t_{R1}$ )

$w_{h1}$ ,  $w_{h2}$ ... šířky píků v polovině jejich výšky

#### 4.5.2. Faktor symetrie píku ( $A_s$ )

Faktor symetrie píku byl vypočítán z rovnice (50):

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2 \cdot d}$$

Rovnice 9

$W_{0,05}$ ... šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

$d$ ... vzdálenost mezi kolmicí spuštěné z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

#### 4.5.3. Počet teoretických pater ( $N$ )

Počet teoretických pater může být určen přímo z elektroferogramu, za použití rovnice (6):

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_m}{W_{1/2}}\right)^2$$

Rovnice 10

$t_m$ ... migrační čas

$W_{1/2}$ ... šířka píku v jeho polovině

#### 4.5.4. Výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ )

Pro zjištění výškového ekvivalentu teoretického patra byl použit vztah (6):

$$H = \frac{l}{N}$$

Rovnice 11

$l$ ... efektivní délka kapiláry [m]

$N$ ... počet teoretických pater

#### 4.5.5. Opakovatelnost analýzy

Vzorek obsahující pracovní roztok standardů byl analyzován šestkrát. Z naměřených hodnot byly získány migrační časy a korigované plochy píků (tj. poměr plochy analytu k ploše vnitřního standardu). Pro výpočet průměru, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky byly použity následující rovnice (68,69):

**Aritmetický průměr  $\bar{x}$  :**

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Rovnice 12

n... počet měření

$x_i$ ... hodnoty jednotlivých měření

**Směrodatná odchylka měření s:**

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Rovnice 13

**Relativní směrodatná odchylka RSD:**

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

Rovnice 14

#### **4.5.6. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)**

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Značí nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, nestanovované kvantitativně. U instrumentálních metod je určován jako koncentrace analyzované látky poskytující odezvu s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3.

Limit kvantifikace odpovídá nejnižší koncentraci látky stanovitelné s přijatelnou přesností a správností. Nejčastěji to bývá trojnásobek detekčního limitu. Obvykle je vyjadřován jako poměr signálu k šumu s hodnotou 10 (70).

#### **4.6. Chemometrická optimalizace**

Pro nalezení optimálních separačních podmínek byla použita metoda chemometrické optimalizace. Metoda byla provedena pomocí softwaru MODDE



Go (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Švédsko). Pro určení vlivu hlavních separačních podmínek byl použit centrálně kompozitní design s dvacetičtyřmi experimenty a jedním centrálním bodem, který byl třikrát opakován. Všechny vstupní faktory a výsledná data jsou popsána v kap. 5.1.

#### 4.6.1. Mnohonásobná lineární regrese

Nejlepším způsobem jak modelovat výsledky DoE, je použití mnohonásobné lineární regrese (71).

$$y = \beta_0 + \sum_{n=1}^k \beta_i x_i + \sum_{n=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{n \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Rovnice 15 (72)

y... závislá proměnná, výsledek

$x_{i,j}$ ... nezávislé proměnné, faktory obsažené v modelu

$\beta_0$ ... konstanta

$\beta_i \beta_{ii} \beta_{ij}$ ... koeficienty regrese

$\varepsilon$ ... chyba modelu

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## **5.1. Chemometrická optimalizace**

Optimalizace byla realizována v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a bublinovou detekční celou o průměru 150  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry byla 64,5 cm a efektivní 56 cm. Hydrodynamické dávkování probíhalo při tlaku 50 mbar po dobu 10 sekund. Pro dosažení rychlé analýzy bylo u všech experimentů zvoleno konstantní napětí 30 kV. Teplota kapiláry byla 25 °C.

### **5.1.1. Výběr optimálního separačního systému**

V průběhu optimalizace složení BGE byl studován vliv čtyř faktorů - koncentrace SDS (v rozmezí 25 až 75 mmol/l), koncentrace dihydrogenfosforečnanu sodného (v rozmezí 10–20 mmol/l), objem methanolu (v rozmezí 0 až 15 % v/v) a hodnota pH (v rozmezí 6 až 8) – na výstupní odezvy, kterými byly: migrační čas posledního píku, rozlišení mezi indometacinem a 4-chlorbenzoovou kyselinou a průměrné rozlišení mezi píky (Tab. 4).

Pro optimalizaci byl zvolen centrálně kompozitní design. Celkem bylo provedeno 27 experimentů, z nichž 3 měly stejné hodnoty faktorů, aby byly získány informace o variabilitě. Pořadí experimentů bylo náhodné z důvodu zamezení systematických chyb. Všechny experimenty byly provedeny s roztokem o složení 2,5 mg/ml IND, 10  $\mu\text{g/ml}$  IS a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  nečistot (tj. na hladině 0,1 %).

Data získaná optimalizačním designem byla vyhodnocena metodou vícenásobné lineární regrese a výsledky byly popsány polynomickou funkcí (Rovnice 15).

Tabulka 4: Vliv faktorů základního elektrolytu (koncentrace SDS [mM], koncentrace NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [mM], % (v/v) MeOH, pH) na výstupní odezvy (T<sub>m</sub>, R<sub>S</sub>, R<sub>1</sub>)

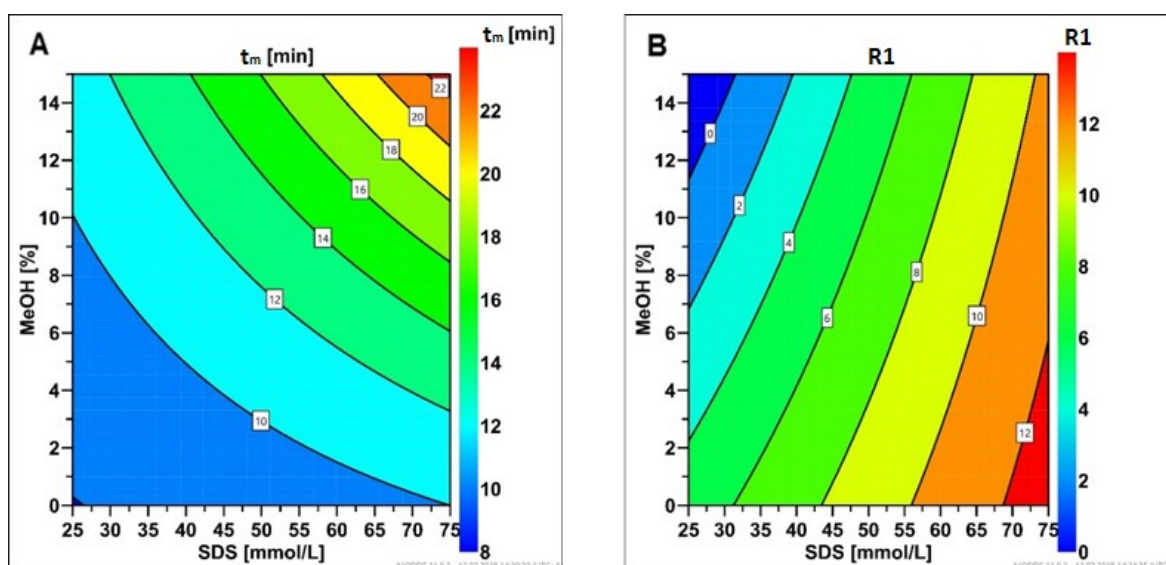
Experiment	pořadí	SDS [mM]	pH	MeOH [%, v/v]	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [mM]	T <sub>m</sub> [min]	R <sub>1</sub> (IND/4CHBA)	R <sub>S</sub> (průměrné)
N11	1	25	8	0	20	8,138	6,41	6,9
N27	2	50	7	7,5	15	12,493	7,28	5,78
N16	3	75	8	15	20	25,627	13	10,31
N12	4	75	8	0	10	10,434	12,4	6,1
N1	5	25	6	0	10	8,19	2,05	3,84
N7	6	25	8	15	10	10,163	-2,76	1,98
N20	7	50	8	7,5	15	11,921	9,95	7,54
N13	8	25	6	15	20	12,333	-3,96	5,63
N2	9	75	6	0	10	10,418	12,13	4,2
N6	10	75	6	15	10	21,798	10,48	6,95
N19	11	50	6	7,5	15	12,75	2,62	3,98
N18	12	75	7	7,5	15	14,285	12,99	7,3
N3	13	25	8	0	10	6,746	3,51	5,12
N14	14	75	6	15	20	26,967	6,03	5,88
N22	15	50	7	15	15	16,881	2,12	5,67
N26	16	50	7	7,5	15	12,313	7,21	5,68
N8	17	75	8	15	10	18,054	8,43	6,6
N25	18	50	7	7,5	15	11,988	6,66	5,5
N23	19	50	7	7,5	10	10,569	5,68	4,8
N4	20	75	8	0	10	8,756	10,13	4,67
N10	21	75	6	0	20	10,605	11,81	4,76
N5	22	25	6	15	10	8,911	0	1,85
N15	23	25	8	15	20	13,197	-2,4	3,5
N24	24	50	7	7,5	20	13,49	8,24	6,71
N21	25	50	7	0	15	8,72	10,68	5,66
N9	26	25	6	0	20	8,685	3,49	4,96
N17	27	25	7	7,5	15	9,39	0	5,8

Analyty migrovaly ve většině případů (22 z 27 analýz) ve stejném pořadí, které bylo: MMIAA, IS, 4CHBA, IND a DCHIND.

Ke změně pořadí došlo u experimentů N5, N7, N13, N15 a N17. U analýz N7, N13 a N15 bylo změněno pořadí migrace 4CHBA a IND, tedy 4CHBA vykazovala menší pohyblivost než IND. Z toho vyplývá, že rozlišení  $R_1$  mělo zápornou hodnotu. Navíc u experimentů N7 a N15 došlo ke společné migraci píků IS a IND, u experimentů N5 a N17 zase společně migrovaly 4CHBA a IND. Tuto změnu v pořadí lze vysvětlit relativně nízkou koncentrací SDS (25 mmol/l) a zároveň vyšším podílem MeOH (15 % v/v, s výjimkou N17: 7,5 % v/v) v BGE.

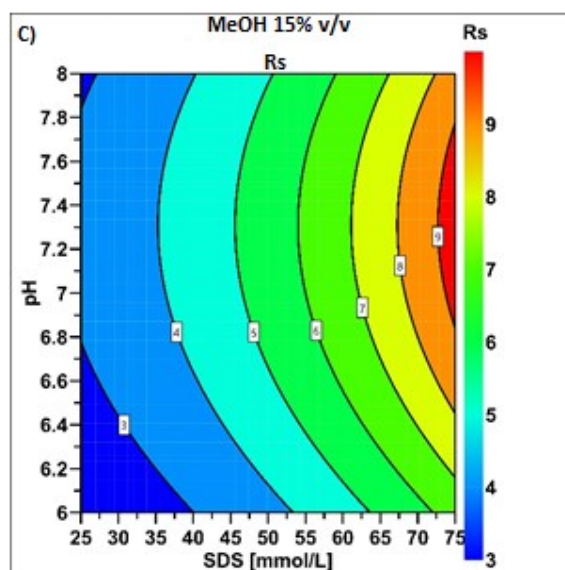
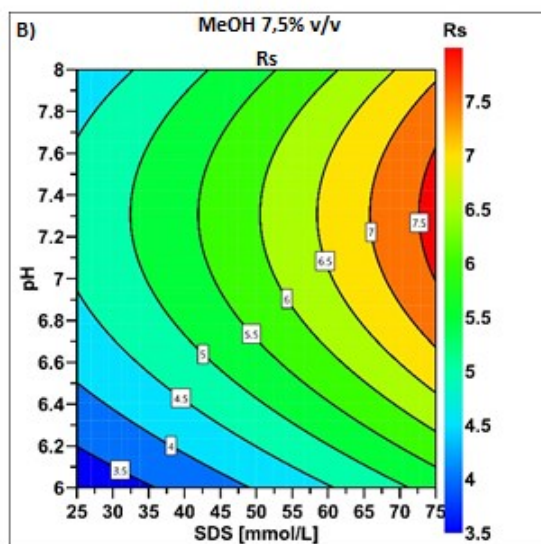
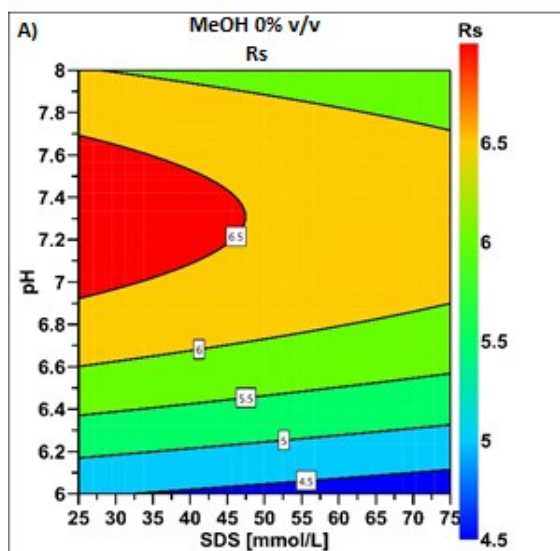
Koncentrace SDS a procentuální obsah MeOH nejvíce ovlivňovaly migrační čas posledního analytu, tj. DCHIND. S vyššími hodnotami těchto faktorů dochází k nárůstu migračního času (Obr. 11A).

Rozlišení mezi IND a 4CHBA je rovněž nejvíce ovlivněno množstvím SDS a MeOH. Rozlišení  $R_1$  nabývá vyšších hodnot se vzrůstající koncentrací SDS, a naopak klesá s nárůstem obsahu MeOH (Obr. 11B). Navíc pokud v BGE vzrůstá podíl MeOH a klesá koncentrace SDS, může to způsobit změnu v migračním pořadí ( $R_1 < 0$ ). Průměrné rozlišení mezi píky  $R_S$  je nejvíce ovlivněno koncentrací SDS, koncentrací fosfátového pufru a jeho pH. Vzájemné působení mezi koncentrací SDS a MeOH má pozitivní vliv na  $R_S$ . Vliv koncentrace SDS a pH při různých hodnotách MeOH (0; 7,5; 15 %) a za stálé koncentrace fosfátového pufru (15 mmol/l) je zobrazen na Obrázku 12.



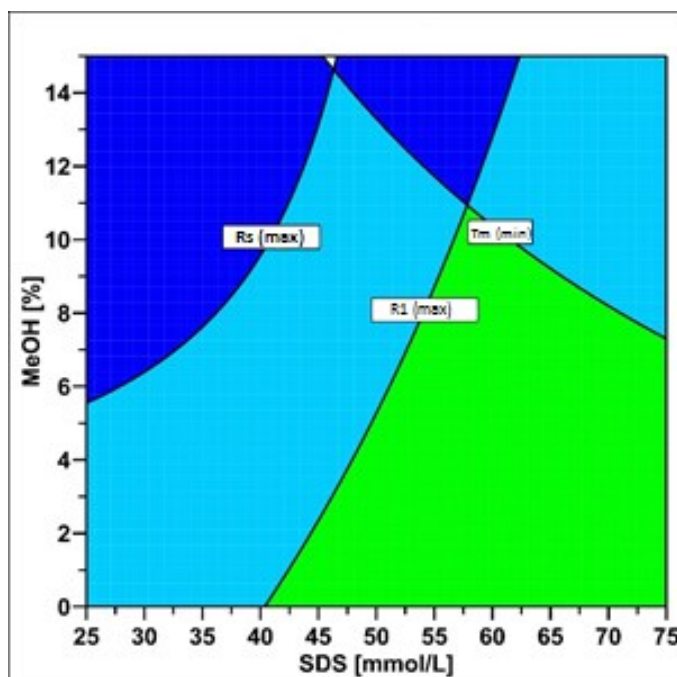
Obrázek 11: A) Diagram znázorňující vliv koncentrace SDS a obsahu MeOH na migrační čas posledního píku  $t_m$

B) Diagram znázorňující vliv koncentrace SDS a obsahu MeOH na rozlišení  $R_1$



Obrázek 12 A), B), C): Diagramy znázorňující vliv koncentrace SDS a pH na  $R_s$ , při různých koncentracích MeOH (A:0%; B:7,5%; C:15%) a za stále koncentrace  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  15 mmol/l

Oblast, kde jsou splněna zadaná kritéria odezvy (čas  $\leq 15$ min,  $R_S \geq 5$ ,  $R_1 \geq 7,5$ ), je zobrazena na Obrázku 13 zeleně. Pokud je BGE o konstantním složení fosfátu (15 mmol/l) a pH (7,0); je požadovaných hodnot dosaženo zvýšením koncentrace SDS nad 40 mmol/l a obsahem MeOH nižším než 11 % v/v. Se snižujícím se množstvím MeOH v BGE se zelená (tj. požadovaná) oblast zvětšuje.



Obrázek 13: Diagram znázorňuje vliv obsahu MeOH a koncentrace SDS za stálé koncentrace  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (15 mmol/l) a pH (7,0) na předem definované hodnoty odezvy (čas  $\leq 15$ min,  $R_S \geq 5$ ,  $R_1 \geq 7,5$ ). Zelená oblast znázorňuje separační podmínky, kde všechny tři odezvy splňují zadaná kritéria.

V závislosti na výše zmíněných vlivech faktorů na separaci byly definovány požadavky na optimální separační systém:

- optimální čas analýzy byl požadován kolem 10 minut (maximální 15 minut).
- průměrné rozlišení 10 (minimálně 7,5)
- rozlišení mezi indometacinem a 4-chlorbenzoovou kyselinou 7,5 (minimálně 5)

Všechny tři odezvy měly rovnocenný význam. Optimalizační nástroj softwaru MODDE Go navrhl optimální složení BGE: 20 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,57; 58 mmol/l SDS; 0 % v/v MeOH. Predikované a naměřené hodnoty výstupních odezvy za podmínek optimalizovaného BGE jsou porovnány v Tabulce 5.

Separace standardů nečistot v přítomnosti nadbytku IND za optimálního složení BGE je zobrazena na Obr. 14.

Tabulka 5: Shrnutí předpokládaných a naměřených hodnot (n=6) separačních parametrů ( $t_m$ ,  $R_S$ ,  $R_1$ ) v optimálním BGE (20 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,57; 58 mmol/l SDS; 0% v/v MeOH)

	$t_m$ [min]	$R_S$	$R_1$
predikované hodnoty	9,63	7,2	11,92
naměřené hodnoty (n=6)	9,54 ± 0,09	5,91 ± 0,12	11,63 ± 0,31

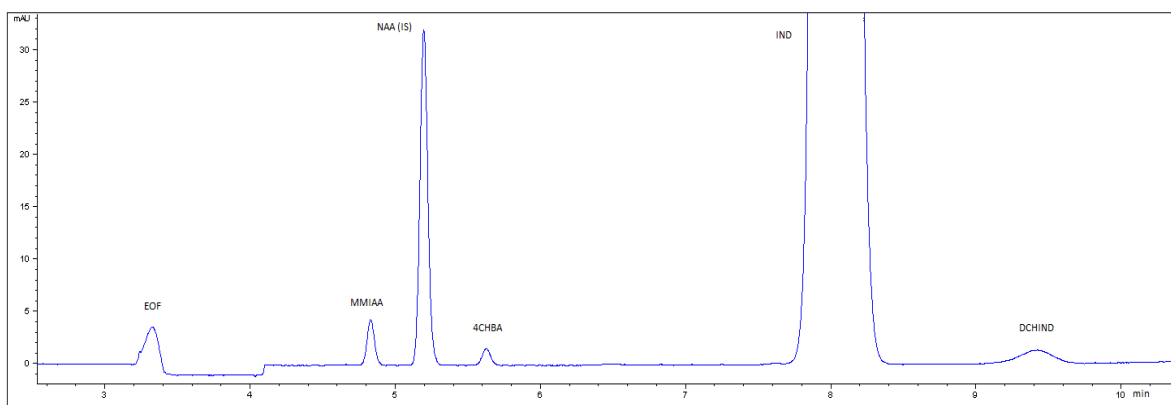
Experimentálně zjištěné hodnoty  $t_m$  a  $R_1$  byly ve velmi dobré shodě (odchylka 0,99 a 2,34 %) s předpokládanými hodnotami. Výsledky  $R_S$  byly odchýlené od předpokládaných hodnot, ale stále v relativně přijatelných mezích (odchylka 17,89 %).

## 5.2. Optimální podmínky analýzy

Tabulka 6: Shrnutí optimálních analytických podmínek

Rozpouštědlo standardů	methanol
Složky základního elektrolytu, koncentrace	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 20 mM SDS: 58 mM
pH základního elektrolytu	7,57
Napětí	+ 30 kV
Detekce	224 nm
Dávkovací tlak	50 mBar
Doba dávkování	10 s
Teplota	25°C
Celková délka kapiláry	64,5 cm
Efektivní délka kapiláry	56 cm
Vnitřní průměr kapiláry	50 $\mu\text{m}$
Průměr bubl. detekč. cely	150 $\mu\text{m}$





Obrázek 14: Záznam analýzy za optimálních podmínek a složení pracovního elektrolytu. Pro analýzu byl použit pracovní roztok o obsahu indometacinu 2,5 mg/ml; 2,5 µg/ml nečistot a 10 µg/ml NAA (IS).

### 5.3. Způsobilost systému

#### 5.3.1. Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ ) bylo vypočteno podle Rovnice 8. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 7.

Rozlišení větší než 1,5 znamená rozdělení píků na základní linii.

Tabulka 7: Rozlišení mezi píky ( $n=6$ )

Dvojice analytů	Rozlišení $R_s$
MMIAA 2,5µg/ml – IS 10µg/ml	3,78
IS 10µg/ml – 4CHBA 2,5µg/ml	4,18
4CHBA 2,5µg/ml – IND 2,5mg/ml	11,63
IND 2,5mg/ml – DCHIND 2,5 µg/ml	4,07

#### 5.3.2. Účinnost separace

Účinnost separace je vyjádřena pomocí zdánlivého počtu teoretických pater ( $N$ ) a výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ), které byly vypočítány z Rovnice 10 a Rovnice 11. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Zdánlivé počty teoretických pater a výškové ekvivalenty (n=6)

Analyt [ $\mu\text{g/ml}$ ]	N	H [ $\mu\text{m}$ ] efekt. délka
MMIAA [2,5]	43263	5,7
CHBA [2,5]	45502	5,4
DCHIND [2,5]	8211	29,8

### 5.3.3. Faktor symetrie

Pro výpočet faktoru symetrie ( $A_s$ ) byla použita Rovnice 9. Hodnoty faktorů symetrie píků jsou uvedeny v Tabulce 9.

Podle ČL 2017 (kap. Chromatografické separační metody) hodnota 1,0 značí ideální symetrii. Faktor symetrie píku má být v rozmezí 0,8 až 1,5.

Tabulka 9: Faktory symetrie píku (n=6)

Analyt	Faktor symetrie $A_s$
MMIAA 2,5 $\mu\text{g/ml}$	0,97
CHBA 2,5 $\mu\text{g/ml}$	1,0
DCHIND 2,5 $\mu\text{g/ml}$	1,21

U nečistot byly hodnoty pro symetrii v požadovaných mezích.

### 5.3.4. Opakovatelnost analýzy

Pro hodnocení opakovatelnosti analýzy byly použity hodnoty opakovatelnosti migračních časů a hodnoty korigovaných ploch píků z šesti provedených měření. Výpočty byly provedeny dle Rovnic 12, 13 a 14. Koncentrace analytů byla 2,5  $\mu\text{g/ml}$  MMIAA; 2,5  $\mu\text{g/ml}$  CHBA; 2,5  $\mu\text{g/ml}$  DCHIND a 2,5 mg/ml IND. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Opakovatelnost migračního času a opakovatelnost poměru korigované plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu. (n=6)

Analyt	RSD [%] migrační čas	RSD [%] poměr korig. ploch
MMIAA	0,31	9,34
CHBA	0,29	6,5
DCHIND	0,92	2,0

## 5.4. Kalibrační křivky

Ke kvantitativnímu hodnocení byla použita závislost poměru korigovaných ploch píku nečistoty a vnitřního standardu. Pro měření kalibrační křivky byl použit základní elektrolyt, který byl vybrán na základě chemometrické optimalizace. Kalibrační závislost byla vypočítána metodou lineární regrese z průměru hodnot korigovaných poměrů ploch. Linearita pro všechny tři nečistoty byla testována v rozsahu 1,25-80 µg/ml, což odpovídá 0,05 –3,2 % koncentraci indometacinu (2,5 mg/ml). Pro každou koncentraci byla provedena tři měření. Kalibrační řada svým rozsahem odpovídala kritériím Ph.Eur., USP a ICH Q3A.

Rovnice kalibrační přímky:

$$y = k \cdot x + q$$

Rovnice 16

y...poměr ploch píku nečistoty a vnitřního standardu (plochy byly korigovány příslušnými migračními časy)

k...směrnice přímky

x...koncentrace nečistoty

q...absolutní člen

### 5.4.1. Kalibrační závislost pro MMIAA

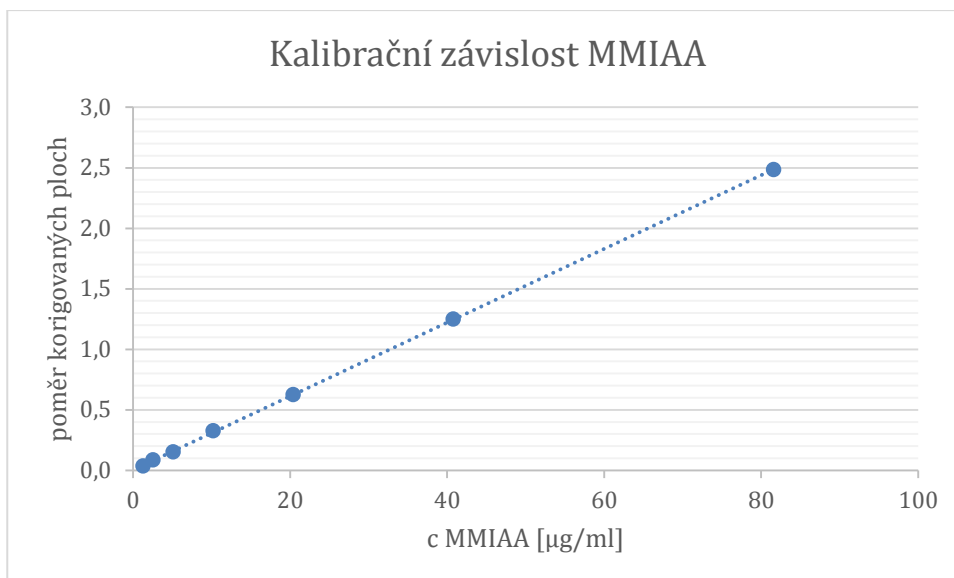
Kalibrační závislost pro MMIAA byla měřena pro hodnoty koncentrací: 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml; 20,0 µg/ml; 40,0 µg/ml; 80,0 µg/ml (Obr. 15)

Počet bodů: 7

$k = 0,0304 \pm 0,00011$

$q = 0,0036 \pm 0,0039$

korelační koeficient= 0,9999



Obrázek 15: Kalibrační závislost pro MMIAA; BGE: 58 mM SDS, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0% MeOH, pH 7,5; koncentrace IS (NAA): 10,0 µg/ml

#### 5.4.2. Kalibrační závislost pro 4CHBA

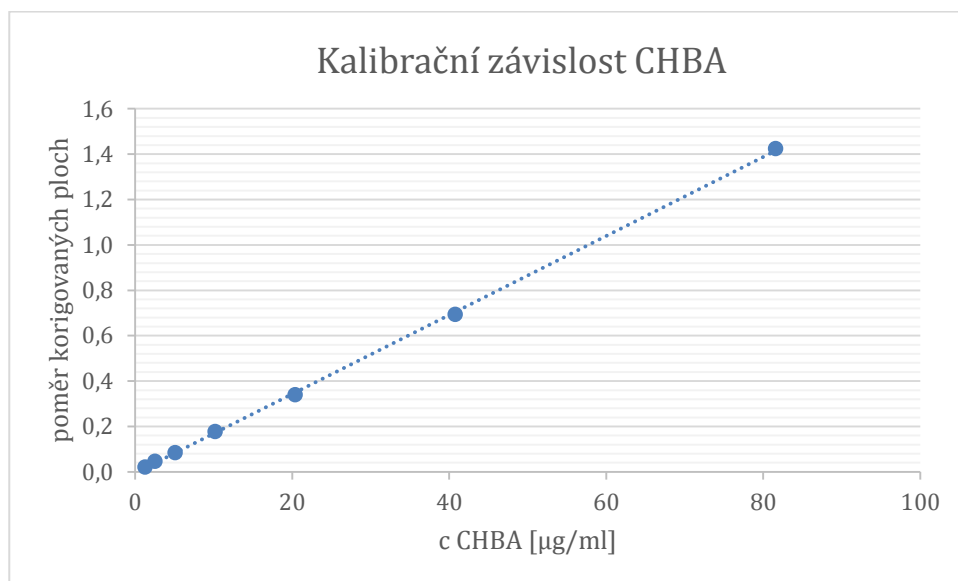
Kalibrační závislost pro 4CHBA byla měřena pro hodnoty koncentrací: 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml; 20,0 µg/ml; 40,0 µg/ml; 80,0 µg/ml (Obr. 16)

Počet bodů: 7

$k = 0,0174 \pm 0,000134$

$q = -0,0055 \pm 0,0045$

korelační koeficient = 0,9997



Obrázek 16: Kalibrační závislost pro 4CHBA; BGE: 58 mM SDS; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0% MeOH; pH 7,5; koncentrace IS (NAA): 10,0 µg/ml

### 5.4.3. Kalibrační závislost DCHIND

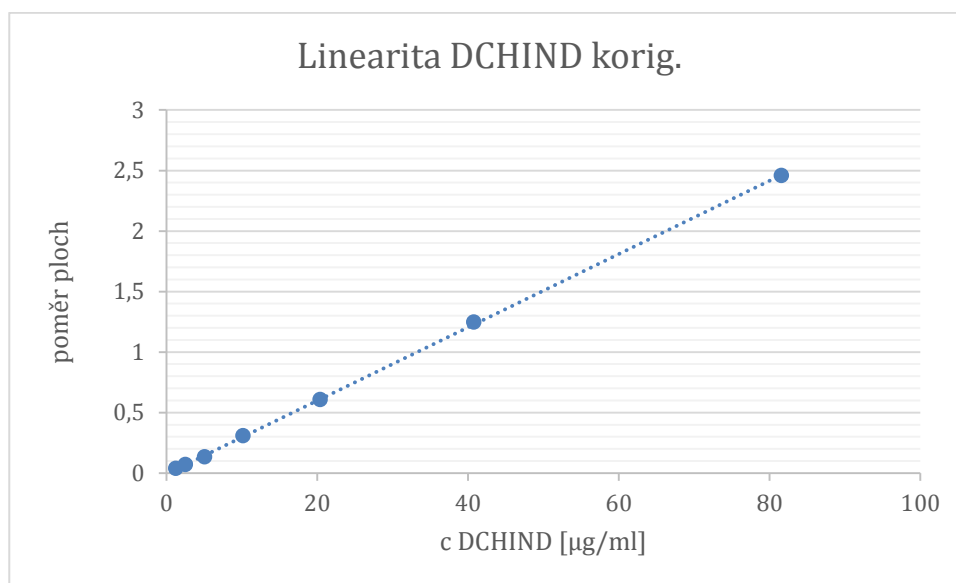
Kalibrační závislost pro DCHIND byla měřena pro hodnoty koncentrací: 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml; 20,0 µg/ml; 40,0 µg/ml; 80,0 µg/ml (Obr. 17)

Počet bodů: 7

$k = 0,0303 \pm 0,00015$

$q = -0,0067 \pm 0,0053$

korelační koeficient = 0,9999



Obrázek 17: Kalibrační závislost pro DCHIND; BGE: 58 mM SDS; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0% MeOH; pH 7,5; koncentrace IS (NAA): 10,0 µg/ml

### 5.4.4. Limit kvantifikace

Hodnota LOQ byla určena jako nejnižší bod kalibrační křivky, tedy 1,25 µg/ml, s hodnotou S/N ≥ 10. V Tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty S/N ± SD a hodnoty korigovaných ploch pro koncentraci nečistot 1,25 µg/ml (včetně RSD). V případě nečistot by měla být zajištěna opakovatelnost ploch na hladině LOQ pod 10% (73).

Tabulka 11: Hodnoty S/N ± SD, korigovaných ploch a RSD korig. ploch (%) na koncentrační hladině 1,25 µg/ml (n = 3).

Analyt	S/N ± SD	korigovaná plocha	RSD [%] korigovaná plocha
MMIAA	24,57 ± 5,43	1,32	1,70
4CHBA	11,10 ± 3,03	0,8	1,04
DCHIND	19,60 ± 3,30	2,23	3,70

#### 5.4.5. Srovnání s metodou HPLC a LVSS

Tabulka 12: Porovnání metod pro stanovení indometacinu

	HPLC (66)	LVSS-MEKC (3)	MEKC
Doba analýzy	< 7,5 min	< 7,5 min	< 10 min
$t_m$ MMIAA	2,04 min	3,94 min	4,58 min
$t_m$ 4CHBA	2,46 min	4,69 min	5,65 min
$t_m$ IND	5,40 min	6,82 min	8,05 min
$t_m$ DCHIND	-	-	9,54 min
LOD MMIAA	56,9 ng/ml	38 ng/ml	-
LOD 4CHBA	225 ng/ml	36 ng/ml	-
LOD DCHIND	-	-	-
LOQ MMIAA	190 ng/ml	115 ng/ml	1,25 µg/ml
LOQ 4CHBA	750 ng/ml	109 ng/ml	1,25 µg/ml
LOQ DCHIND	-	-	1,25 µg/ml
opakovatelnost $t_m$ MMIAA (RSD)	0,18 %	0,57 %	0,31 %
opakovatelnost $t_m$ 4CHBA (RSD)	0,23%	0,46 %	0,29 %
opakovatelnost $t_m$ DCHIND (RSD)	-	-	0,92 %
opakovatelnost poměru korig. ploch MMIAA (RSD)	0,45 %	0,90 %	9,34%
opakovatelnost poměru korig. ploch 4CHBA (RSD)	0,66 %	0,54 %	6,5 %
opakovatelnost poměru korig. ploch DCHIND (RSD)	-	-	2,0 %
přesnost metody MMIAA (RSD)	3,10 %	6,90 %	-
přesnost metody 4CHBA (RSD)	3,25%	7,11 %	-
přesnost metody DCHIND (RSD)	-	-	-

Ve srovnání s metodou HPLC (66) a LVSS (3) byla stanovena další nečistota (3,4-dichlorindometacin) (Tab. 12). Tato nečistota migrovala až za indometacinem,

což prodloužilo celkovou dobu analýzy. Opakovatelnost nové MEKC metody byla horší než u HPLC metody, stejně tak i citlivost. Na rozdíl od publikované HPLC metody byla nová MEKC metoda použita pro analýzu substance indometacinu a topického gelu a tyto výsledky byly zveřejněny (74). Metodou MEKC byl zjištěn obsah  $0,64 \pm 0,07$  % MMIAA a  $1,06 \pm 0,07$  % 4CHBA v topickém gelu (74), zatímco v diplomové práci (3) byl vypočítán obsah MMIAA 1 % a obsah 4CHBA 1,79 %.

## **6. ZÁVĚR**



V této práci byl prezentován vývoj MEKC metody pro stanovení indometacinu a jeho tří nečistot (MMIAA, 4CHBA a DCHIND) za použití chemometrické optimalizace separačních podmínek.

Nově vyvinutá metoda umožňuje, oproti dalším metodám, stanovení 3,4-dichloroindometacinu.

Pro optimalizaci složení základního elektrolytu byl použit přístup „Design of experiments“, díky kterému byly vybrány nejvhodnější separační podmínky. Bylo zjišťováno, jakým způsobem ovlivňují vybrané separační faktory (koncentrace dihydrogenfosforečnanu, pH, koncentrace SDS a množství methanolu) výslednou analýzu. Nové poznatky byly aplikovány při výběru vhodného složení BGE, které bylo zvoleno: 20 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 58 mmol/l SDS, 0 % MeOH, pH 7,5.

Nově navržená metoda umožňuje kvantifikaci všech tří nečistot na úrovni 0,05 % (při koncentraci IND 2,5 mg/ml). To odpovídá kritériím podle Ph.Eur., USP a ICH Q3A směrníc.

Výsledky této práce byly použity pro vypracování publikace (74).

## **7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. SMITH, R.J., WEBB, M.L. Analysis of drug impurities. Ames, Iowa: Blackwell, 2007. ISBN 978-1405133586.
2. RAHMAN, N., AZMI, S.N.H., WU, H.F. The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. Accreditation and Quality Assurance. 2006, 11(1-2), 69-74. DOI: 10.1007/s00769-006-0095-y.
3. MITLENEROVÁ, D. Stanovení indometacinu a jeho rozkladných produktů micelární elektrokinetickou chromatografií. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, 2015, 76 s.
4. ŠTULÍK, K. Analytické separační metody. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. 265 s. ISBN 80-246-0852-9.
5. CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2. vydání. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1998. ISBN 084939127x.
6. LAUER, H.H., ROZING, G.P. High Performance Capillary Electrophoresis: A primer. 2. vydání. Germany: Agilent Technologies, 2009. Publication Part Number: 5990-3777EN.
7. MARINA, M. L., RÍOS A., VALCÁRCEL M. Analysis and detection by capillary electrophoresis. Amsterdam: Elsevier, 2005. 796 s. ISBN 0-444-51718-9.
8. KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chemické Listy. 1997, 91, 320-329.
9. KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2. vydání. Ostrava, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
10. <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchange/forum/files/2013/08/Figure12.56.jpg>; 25.8.2018
11. ALTRIA, K.D. Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications. Methods in molecular biology. 1. vydání, Totowa, N.J.: Humana Press, 1996. 349 s. ISBN 0896033155.
12. LANDERS, J.P. Handbook of capillary electrophoresis. Boca Raton: CRC Press, 1994. 894 s. ISBN 084938690x.
13. SHINTANI, H., POLONSKI, J. Handbook of capillary electrophoresis applications. New York: Blackie Academic & Professional, 1997. 738 s. ISBN 0-7514-0359-8.
14. CAZES, J. Encyclopedia of chromatography. 3. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2010. 602 s. ISBN 978-1-4200-8480-1.
15. DEYL, Z. Electrophoresis: a survey of techniques and applications. New York: Elsevier Scientific Pub. Co., 1983. 491s. ISBN 0444421149.
16. LANDERS, J.P. Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques. 3. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2008. 1592 s. ISBN 978-0-8493-3329-3.

17. GÖRÖG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, 101, 2-16.  
DOI: 10.1016/j.trac.2017.09.012.
18. ZALEWSKA, M., WILK K., MILNEROWICZ, H. Capillary electrophoresis application in the analysis of the anti-cancer drugs impurities. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2013, 70(2), 171-180.
19. ALTRIA, K.D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1996, 735(1-2), 43-56.  
DOI: 10.1016/0021-9673(95)00627-3.
20. HANRAHAN, G., GOMEZ, F.A. *Chemometric methods in capillary electrophoresis*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010. 336 s. ISBN 978-0-470-39329-1.
21. MEAD, R., GILMOUR, S.G., MEAD, A. *Statistical principles for the design of experiments*. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.  
ISBN 978-0-521-86214-1.
22. GOUPY, J. *Methods for experimental design: principles and applications for physicists and chemists*. New York: Elsevier, 1993. 448 s. ISBN 0444895299.
23. ORLANDINI, S., GOTTI, R., FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, 87, 290-307, DOI: 10.1016/j.jpba.2013.04.014
24. TORBECK, L.D. *Pharmaceutical and medical device validation by experimental design*. New York: Informa Healthcare, 2007. 272 s. ISBN 1420055690.
25. ERIKSSON, L. *Design of experiments: principles and applications*. 3rd rev. Umeå: UMETRICS AB, 2008. 425 s. ISBN 978-91-973730-4-3.
26. FRIGON, N.L., MATHEWS, D. *Practical guide to experimental design*. New York: Wiley, 1997. 342 s. ISBN 047113919X.
27. [http://www.oulu.fi/sites/default/files/content/Introduction%20to%20Experiment%20Design\\_2013.pdf](http://www.oulu.fi/sites/default/files/content/Introduction%20to%20Experiment%20Design_2013.pdf) (25.8.2018)
28. GÖRÖG, S. *Identification and determination of impurities in drugs*. New York: Elsevier, 2000. 772 s. ISBN 0444828990.
29. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3A\\_R2/Step4/Q3A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf) (19.3.2018)
30. <http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/779/1/revised%20Impurities%20in%20pharmaceutical%20substances.pdf> (20.3.2018)
31. BARI, S.B., KADAM, B.R., JAISWAL, Y.S., SHIRKHEDKAR, A. Impurity profile: Significance in Active Pharmaceutical Ingredient. *Eurasian journal of analytical chemistry*, 2007, 2(1), 32-53. DOI: 10.12973/ejac/78054.

32. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf) (20.3.2018)
33. HART, F.D., BOARDMAN, P.L. Indomethacin: a new non-steroid anti-inflammatory agent. *British medical journal*, 1963, 2, 965.
34. CURRY, S.H., BROWN, E.A., KUCK, H., CASSIN, S. Preparation and stability of indomethacin solutions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1982, 60(7), 988-992. DOI: 10.1139/y82-139.
35. <https://www.drugbank.ca/structures/DB00328/image.svg> (23.3.2018)
36. Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 9th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2014.
37. EBADI, M. *Desk reference of clinical pharmacology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 824 s. ISBN 1420047434.
38. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Agents. IARC *Handbooks of cancer prevention: Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*, Oxford University Press, 1997. 224 s. ISBN 92 832 3001 9
39. SUMM, O., EVERS, S. Mechanism of Action of Indomethacin in Indomethacin-Responsive Headaches. *Current Pain and Headache Reports*. 2013, 17(4) DOI: 10.1007/s11916-013-0327-x.
40. <https://www.yashcopvtltd.com/images/mechanism-of-action-Indomethacin.png> 24.3.2018
41. LUCAS, S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2016, 56(2), 436-446. DOI: 10.1111/head.12769.
42. SMALHEISER, N.R., SWANSON, D.R. Indomethacin and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996, 46(2), 583-583. DOI: 10.1212/WNL.46.2.583.
43. CRAIG, C.R., STITZEL, R.E. *Modern pharmacology*. 4. vydání. Boston: Little, Brown, 1994. 907 s. ISBN 0316159328.
44. FLOREY, K. *Analytical profiles of drug substances*. New York: Academic Press, 1984, 771 s. ISBN 0122608135
45. CONNORS, K.A., AMIDON, G.A., STELLA, V.J. *Chemical stability of pharmaceuticals: A handbook for pharmacists*. 2. vydání. New York: Wiley, 1986. 847 s. ISBN 9780471879558.
46. LI, M. *Organic chemistry of drug degradation*. Cambridge: RSC, 2012. 287 s. ISBN 978-1-84973-421-9.
47. Kougioumtzoglou, A., Evaluation of the stability of indomethacin substance under a model of physiological conditions, using modified and validated RP-HPLC method. *Pharmacia*, 2015, 62(2), 10-17. DOI: 10.13140 / RG.2.1.3100.2722

48. D'ENG, B. Evaluation of the hepatotoxic activity of several chlor-nitro derivatives of benzoic acid. *Voprosy meditsinskoj khimii*, 1983, 29(6), 113-117.
49. KAHNS, A.H. Kinetics of hydrolysis of indomethacin and indomethacin ester prodrugs in aqueous solution. *Acta pharmaceutica nordica*, 1989, 1(6), 327-336.
50. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Český lékopis 2017*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. 4904 s. ISBN 978-80-271-0500-7
51. The United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopoeia – National formulary [USP 39 NF 34]*, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD 2015
52. ASH, M. *Handbook of preservatives*. Endicott: Synapse Information Resources, 2004. 873 s. ISBN 1-890595-66-7.
53. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> , CID: 6318, (7.4.2018)
54. <https://toxnet.nlm.nih.gov> , UNII: IC7888DF4L, (7.4.2018)
55. <https://toxnet.nlm.nih.gov/png/74-11-3.png> (7.4.2018)
56. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> , CID:76151, (8.4.2018)
57. <http://www.chemicalbook.com> , CAS:2882-15-7, (8.4.2018)
58. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/2882-15-7> (8.4.2018)
59. <https://www.lgcstandards.com/GB/en> , CAS: 402849-26-7, (8.4.2018)
60. <https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/images/hd3/h4b/9484028018718/719.png>
61. SAWANT, N., PAI, S. Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Estimation of Indomethacin in Pharmaceutical Capsule Formulation. *Journal of Pharmaceutical Research*. 2016, 15(3). DOI: 10.18579/jpcrk/2016/15/3/103040.
62. ALI, K.F., ALBAKAA, R.M., ALI, Z.H. New assay method UV spectroscopy for determination of Indomethacin in pharmaceutical formulation. *J. Chem .Pharma. Res.*, 2015 , 7(4), 1591- 1596.
63. ADEGOKE, O.A., IDOWU, O.S., OLANIYI, A.A. Novel colorimetric assay of indomethacin using 4-carboxyl-2, 6-dinitrobenzene diazonium ion. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*. 2006, 56(2), 189-202.
64. LIN, S.J., CHEN, Y.R., SU, Y.H., TSENG, H.I., CHEN, S.H. Determination of indomethacin in plasma by micellar electrokinetic chromatography with UV detection for premature infants with patent ductus arteriosus. *Journal of Chromatography B*. 2006, 830(2), 306-313. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.11.007.

65. MAKINO, K. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human specimens by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 2004, 25(10-11), 1488-1495.  
DOI: 10.1002/elps.200305870
66. NOVÁKOVÁ, L., MATYSOVÁ, L., HAVLÍKOVÁ, L., SOLICH, P. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, 37(5), 899-905. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.09.012.
67. ŽÁKOVÁ, Petra, Hana SKLENÁŘOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Renata HÁJKOVÁ, Ludmila MATYSOVÁ a Petr SOLICH. Application of monolithic columns in pharmaceutical analysis. Determination of indomethacin and its degradation products. *Journal of Separation Science*. 2009, 32(15-16), 2786-2792.  
DOI: 10.1002/jssc.200900217.
68. KIRKUP, L. *Data analysis with Excel: an introduction for physical scientists*. New York: Cambridge University Press, 2002. 446 s. ISBN 0521797373.
69. DVOŘÁK, P.; BAILEY, N. T. J. *Základy statistického vyhodnocování výsledků*. Brno: FVHE VFU, 2012, 27.
70. KLIMEŠ, J. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2011. 268 s. ISBN 978-80-87009-29-1.
71. FRIGON, N.L., MATHEWS, D. *Practical guide to experimental design*. New York: Wiley, 1997. 342 s. ISBN 978-0-471-13919-5.
72. CANDIOTI, L.V., ZAN, M.M.D., CÁMARA, M.S., GOICOCHEA, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014, 124, 123-138.  
DOI: 10.1016/j.talanta.2014.01.034.
73. FABRE, H.; ALTRIA, K. D. Validating CE methods for pharmaceutical analysis. *LC GC EUROPE*, 2001, 14(5), 302-310.
74. Riasová P., Doubková D., Pincová L., Jung O., Polášek M., Jáč P.: Development of micellar electrokinetic chromatography method for the determination of three defined impurities in indometacin, *Electrophoresis*, accepted.  
DOI:10.1002/elps.201800080.