

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Optimalizace a validace HPLC metody  
pro stanovení triamcinolon-acetonidu  
v topickém léčivém přípravku

Rigorózní práce

Hradec Králové 2007

Anton Krivda

**Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při vypracování této rigorózní práce. Děkuji také PharmDr. Lucii Havlíkové, Ph.D. a RNDr. Daliborovi Šatinskému, Ph.D. za ochotu a odbornou pomoc a ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za trpělivost a vstřícné jednání. Také děkuji Mgr. Veronice Loukotové za pomoc při zpracování číselných dat.**

## **Abstrakt**

Autor: Krivda A.  
Název: Optimalizace a validace HPLC metody pro stanovení triamcinolon-acetonidu v topickém léčivém přípravku  
Jazyk: Český  
Klíčová slova: HPLC • Triamcinolon-acetonid • Triamcinolon • Methylparaben • Propylparaben • Validace

Byla vyvinuta a validována nová metoda pro stanovení účinné látky triamcinolon-acetonidu, jeho degradačního produktu triamcinolonu a dvou konzervačních látek přítomných v krému (methylparaben a propylparaben), pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi, která užívá estradiol jako vnitřní standard.

Separční chromatografický proces byl prováděn na koloně Supelco Discovery HSF5. Mobilní fáze pro separaci všech složek se skládá ze směsi acetonitrilu a vody (45:55 v/v). Čas analýzy byl kratší než 9 minut při průtokové rychlosti 0,6 ml/min a UV detekci při 240 nm. Metoda byla vyvinuta proto, aby mohla být aplikována do rutinních analýz topického farmaceutického produktu Triamcinolon krém 0,1%.

## **Abstract**

Author: Krivda A.  
Title: The optimisation and validation of HPLC method for determination of triamcinolone acetonide in topical pharmaceutical product  
Language: Czech  
Keywords: HPLC • Triamcinolone acetonide • Triamcinolone • Methylparaben • Propylparaben • Validation

A novel reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was developed and validated for the determination of active component triamcinolone acetonide, its degradation product triamcinolone and two preservatives presented in the cream – methylparaben and propylparaben, using estradiol as an internal standard.

The chromatographic separation was performed on a Supelco Discovery HSF5 column. The mobile phase for separation of all compounds consists of a mixture of acetonitrile and water (45:55 v/v). The analysis time was less than 9 minutes, at a flow rate of 0,6 ml/min and detection at 240 nm. The method was found to be applicable for routine analysis (stability tests, homogeneity) in the pharmaceutical product topical cream Triamcinolone cream 0,1%.

## ***Obsah***

Obsah .....	5
1 Úvod a cíl práce.....	9
1.1 Úvod a cíl práce .....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Použité zkratky .....	12
2.2 Triamcinolon HBF krém .....	14
2.2.1 Pojem „krém“.....	14
2.2.2 Charakteristika přípravku .....	14
2.3 Triamcinoloni acetonidum .....	15
2.3.1 Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika .....	15
2.3.2 Farmakologická charakteristika .....	17
2.4 Methylparabenum a Propylparabenum .....	18
2.5 Chromatografické metody .....	20
2.5.1 Obecné principy chromatografických metod .....	20
2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	23
2.5.2.1 Kapalinový chromatograf .....	24
2.5.2.2 Chromatografické kolony a eluční činidla .....	24
2.5.2.3 Přímá detekce v HPLC .....	28
2.6 Validace analytických metod .....	29
2.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému (SST, System suitability test).....	30
2.6.1.1 Opakovatelnost analýzy.....	30
2.6.1.2 Dělicí účinnost systému.....	31
2.6.1.3 Asymetrie chromatografického píku.....	31
2.6.1.4 Rozlišení chromatografických píků .....	32
2.6.2 Validace analytické metody .....	32
2.6.2.1 Správnost (accuracy).....	32
2.6.2.2 Přesnost (precision).....	33
2.6.2.3 Selektivita (selectivity) .....	33
2.6.2.4 Linearita (linearity) a rozsah (range) .....	34
2.6.2.5 Detekční limit (limit of detection, LOD).....	34

2.6.2.6	Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ) .....	35
2.6.2.7	Robustnost (robustness).....	35
2.6.2.8	Stabilita standardů a vzorků .....	36
2.7	Analytické metody pro hodnocení Triamcinoloni acetonidum ...	36
2.7.1	Stanovení lékopisné .....	36
2.7.1.1	Český lékopis 2005.....	36
2.7.1.2	Lékopisy zahraniční .....	37
2.7.2	Stanovení triamcinolon-acetonidu metodou HPLC.....	37
3	Experimentální část .....	39
3.1	Přístrojové vybavení .....	40
3.2	Chemikálie.....	40
3.2.1	Příprava zásobních a pracovních roztoků .....	41
3.3	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek ....	41
3.4	Vzorky přípravků .....	42
3.4.1	Příprava vzorku .....	42
4	Výsledky a diskuse .....	44
4.1	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek ....	45
4.1.1	Vlnová délka detektoru.....	45
4.1.2	Hledání vhodné analytické kolony a složení mobilní fáze ..	47
4.1.3	Hledání vnitřního standardu .....	59
4.1.4	Souhrn optimálních chromatografických podmínek.....	61
4.1.5	Stanovení obsahu triamcinolonacetonidu, methylparabenu a propylparabenu v krému .....	61
4.2	Validace metody .....	63
4.2.1	Test vhodnosti HPLC systému .....	63
4.2.1.1	Opakovatelnost.....	63
4.2.1.2	Účinnost chromatografické kolony .....	66
4.2.1.3	Asymetrie chromatografických píků .....	67
4.2.1.4	Rozlišení chromatografických píků .....	68
4.2.2	Přesnost .....	69
4.2.2.1	Přesnost pro nečistotu .....	69

4.2.3	Linearita .....	70
4.2.4	Správnost .....	74
4.2.5	Selektivita .....	77
4.2.6	Robustnost .....	79
4.2.6.1	Vliv složení mobilní fáze na stanovení obsahu analytu...	79
4.2.6.2	Stabilita roztoků .....	83
4.2.7	Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ).....	85
5	Závěr .....	87
6	Použitá literatura.....	90



## ***1 Úvod a cíl práce***

## **1.1 Úvod a cíl práce**

Triamcinolon-acetonid patří mezi syntetické fluorované glukokortikoidy a je používán díky svému vystupňovanému protizánětlivému a imunosupresivnímu působení. Je součástí mnoha léčivých přípravků a lékových forem (parenterální, perorální, topická, pulmonární, nasální,...). Ve formě topického léčivého přípravku je používán k symptomatické léčbě akutních a subakutních, eventuelně i chronických, neinfekčních kortikosteroidoreaktivních dermoepidermitid.

K zajištění hlavních cílů farmacie, a to kvality, účinnosti a bezpečnosti léčivého přípravku, slouží mnoho analytických metod, které se liší principem, náročností provedení, citlivostí a selektivitou. Triamcinolon-acetonid je v ČL 2005 i ve většině ostatních dostupných zahraničních lékopisech stanovován spektrofotometricky. Vzrůstající nároky na produkty farmaceutických firem se sebou nesou požadavky na zavádění modernějších, přesnějších a spolehlivějších analytických metod do kontrolní praxe.

Většina léčivých přípravků je složena z mnoha různých chemických substancí, a proto jsou výhodné zejména metody, které umožňují separaci jednotlivých složek a jejich následnou identifikaci a kvantifikaci. Takovou metodou je i vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která díky svojí vysoké selektivitě a citlivosti patří mezi oblíbené analytické metody pro analýzu chemických individuí i léčivých přípravků.

Cílem této práce bylo optimalizovat a validovat metodu pro stanovení Triamcinoloni acetonidum (Triamcinolon-acetonidu) a jeho rozkladného produktu Triamcinolonum (Triamcinolonu) spolu s protimikrobními látkami Methylparabenum (Methylparabenu) a Propylparabenum (Propylparabenu) v topickém léčivém přípravku „Triamcinolon HBF krém“.

## **2 Teoretická část**

## 2.1 Použité zkratky

ACN	Acetonitril
AK	Analytická kolona
BP	British Pharmacopoeia (Britský lékopis)
COX	Cyklooxygenáza
ČL	Český Lékopis
EP	European Pharmacopoeia (Evropský lékopis)
ES	Estradiol
GC	Gas Chromatography (Plynová chromatografie)
Glc	Glucose (Glukóza)
GLC	Gas-Liquid Chromatography (Plynová rozdělovací chromatografie)
GSC	Gas-Solid Chromatography (Plynová adsorpční chromatografie)
HILIC	Hydrophilic Interacion Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
IEC	Ion-Exchange Chromatography (Iontově výměnná chromatografie)
IS	Internal Standard (Vnitřní standard)
L1	kolona obsahující C18 silikagel o velikosti částic od 3 do 10 $\mu\text{m}$ (označení dle USP)
LC	Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie)
LLC	Liquid-Liquid Chromatography (Kapalinová rozdělovací chromatografie)
LOD	Limit Of Detection (Limit detekce)
LOQ	Limit Of Quantitation (Limit kvantifikace)
LSC	Liquid-Solid Chromatography (Kapalinová adsorpční chromatografie)

MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MP	Methylparaben
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)
NPLC	Normal Phase Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie na normální fázi)
PJ	The Pharmacopoeia of Japan (Japonský lékopis)
PP	Propylparaben
PR	Průtoková rychlost
RP	Reversed Phase (Reverzní fáze)
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie na reverzní fázi)
SEC	Size Exclusion Chromatography
SF	Stacionární fáze
S <sub>R</sub>	Relativní směrodatná odchylka
SÚKL	Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv
TA	Triamcinolon-acetonid
TC	Triamcinolon
THF	Tetrahydrofuran
USP	United States Pharmacopoeia (Americký lékopis)
UV	Ultra-Violet (Ultrafialové spektrum)

## **2.2 Triamcinolon krém HBF<sup>1</sup>**

### **2.2.1 Pojem „krém“**

„Krémy“ je ve farmacii poměrně úzce specifikovaný pojem. V ČL 2005 je definován v článku „Praeparata semisolidia ad usum cutaneum“ jako vícefázový přípravek obsahující lipofilní a vodnou fázi. Makroskopicky se jeví jako bílá nebo nažloutlá homogenní beztvářá hmota. Krémy jsou tedy dermálně aplikovatelné léčivé přípravky tvořené polotuhým emulzním základem, v němž jsou obvykle dispergovány (suspendovány nebo rozpuštěny) léčivé látky. Krémový základ tvoří látky přírodního a/nebo syntetického původu a svým složením může ovlivňovat účinek léku a uvolňování léčiva. Reologicky patří mezi viskoelastické soustavy, mají vlastnosti jak látek pevného skupenství (elastická deformace), tak látek kapalného skupenství (difuzivita). Jejich plastická deformovatelnost zabezpečuje stálost tvaru při obyčejné teplotě a potřebnou deformovatelnost působením vnější síly při roztírání na kůži.

### **2.2.2 Charakteristika přípravku**

„Triamcinolon krém HBF“ slouží k symptomatické léčbě akutních a subakutních, eventuelně chronických, neinfekčních kortikosteroidoreaktivních dermoepidermitid. Má velmi dobré uplatnění v léčbě zejména ekzému, některých forem psoriázy, iritované pityriasis rosea, solární dermatitidy, akutní radiodermatitidy, urtikarií po poštípání hmyzem, lokalizovaného endogenního pruritu, lichen ruber planus a integumentálního lupus erythematoses.

Při krátkodobé terapii se může objevit mírná spontánně reverzibilní kožní reakce (pocit svědění, pálení, napětí a podráždění ošetřované oblasti kůže). Při dlouhotrvající léčbě se zvyšuje citlivost kůže na světlo, může dojít k sekundární infekci ošetřovaných míst, ke vzniku steroidní

---

<sup>1</sup> Kapitola 2.2. byla vypracována ze zdrojů [1], [2], [3], [4], [5]

akné, k posunům pigmentu, případně k hypertrichóze. Přípravek je balen po 30 g v hliníkových tubách a je vázán na lékařský předpis.

Přípravek je homogenní, bílý krém. Účinnou látkou je triamcinoloni acetonidum v koncentraci 0,1 g na 100 g krému. Kompletní složení je uvedeno v Tab.1.

Tab.1.: Složení přípravku Triamcinolon krém HBF

Látka	Množství ve 100 g přípravku
Triamcinoloni acetonidum	0,10 g
Methylparabenum	0,20 g
Propylparabenum	0,05 g
Alcohol cetylicus	4,00 g
Aqua purificata	59,15 g
Carbomera	0,20 g
Cera alba	1,00 g
Glyceroli monostearas 90	3,00 g
Natrii hydroxidum	0,03 g
Paraffinum perliquidum	8,00 g
Propylenglycolum	8,00 g
Stearomacrogolum 2	1,00 g
Stearomacrogolum 21	3,00 g
Triglycerida saturata media	12,00 g

## 2.3 *Triamcinoloni acetonidum*<sup>2</sup>

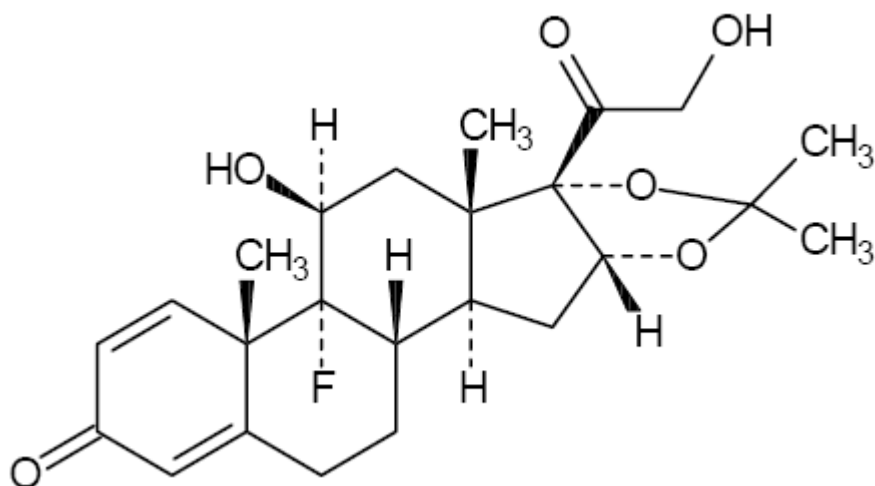
### 2.3.1 *Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika*

Triamcinoloni acetonidum (Triamcinolon-acetonid) obsahuje cyklopentanperhydrofenantrénový skelet, který je typický pro látky s hormonální aktivitou. Glukokortikoidní aktivita je dána ketoskupinou na

<sup>2</sup> Kapitola 2.3. byla vypracována ze zdrojů [1], [2], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11]

C-3, dvojnou vazbou mezi C-4=C-5 a třemi hydroxylovými skupinami na C-11 $\beta$ , C-17 $\alpha$  a C-21. Chemicky jde o 9-fluor-11 $\beta$ ,21-dihydroxy-16 $\alpha$ ,17-isopropylidendioxypregna-1,4-dien-3,20-dion. Chemická struktura je uvedena na Obr.1.

Obr.1.: Struktura triamcinolon-acetonidu



Je to bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

**Sumární vzorec:**  $C_{24}H_{31}FO_6$

**M<sub>r</sub>:** 434,50

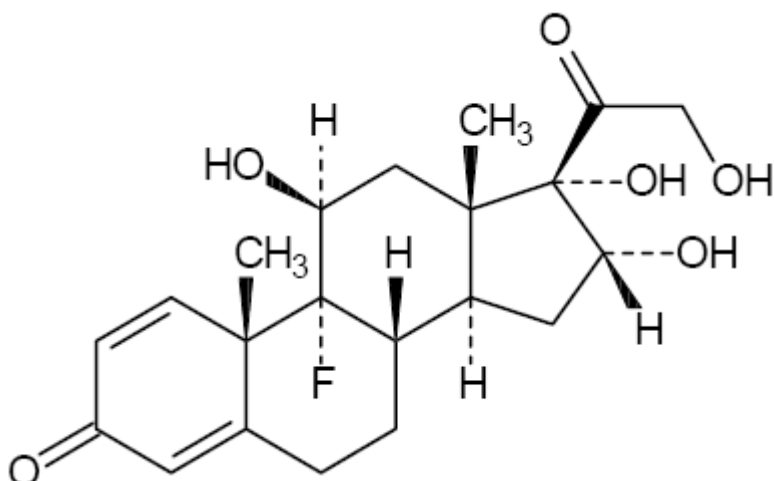
**Synonyma:** Triamcinolon acetonid, Triamcinolone acetone

Látka je uvedena v ČL 2005 i v ostatních dostupných zahraničních lékopisech.

Na Obr.2 je uvedena jeho lékopisná nečistota – Triamcinolonum (Triamcinolon).



Obr.2.: Struktura triamcinolonu



**Sumární vzorec:**  $C_{21}H_{27}FO_6$

**Mr:** 394,45

**Synonyma:** Triamcinolone

### 2.3.2 *Farmakologická charakteristika*

Triamcinolon-acetonid patří farmakologicky mezi glukokortikoidy. Endogenní glukokortikoidy (hlavně hydrokortison) mají mnoho účinků a účastní se většiny fyziologických procesů v organismu. Zasahují do metabolismu jednak glycidů (snižují utilizaci Glc, zvyšují glukoneogenezi a vyvolávají hyperglykémii, což vede k zvýšené sekreci inzulínu, který působí ukládání glykogenu v játrech), proteinů (katabolické působení se sníženou syntézou) a lipidů (redistribuce tuku). Kromě už uvedených účinků mají jak endogenní tak exogenní glukokortikoidy různě vyznačen účinek mineralokortikoidní (dochází k retenci sodíku a ztrátám draslíku), zasahují do metabolismu kostní hmoty a pojivové tkáně (vyvolávají negativní vápníkovou bilanci a zvyšují katabolismus kolagenu) působí také na CNS (vliv na náladu), ledviny, kardiovaskulární systém, gastrointestinální trakt a podobně. Nejvíce terapeuticky využívaným efektem synteticky vyráběných glukokortikoidů je jejich silné protizánětlivé a imunosupresivní působení. Dochází k inhibici jednak časně manifestace zánětu (vasodilatace, bolest, exsudace, zvýšení teploty), ale i pozdních

proliferativních příznaků chronického zánětu. Ovlivňují všechny typy zánětlivých reakcí bez ohledu na vyvolávající příčinu (patogen, chemická nebo fyzikální noxa, neadekvátní odpověď imunitního systému). Na potlačení akutní formy zánětu se kortikosteroidy podílejí zejména inhibicí produkce prostaglandinů v důsledku snížené aktivity fosfolipázy A<sub>2</sub>, COX-2 a pomocných T-buněk, snížením klonální expanze T a B lymfocytů a produkce IgG. U chronického zánětu se uplatňuje hlavně snížení aktivity mononukleárních buněk a funkce fibroblastů, snížené uvolňování histaminu z bazofilů.

Triamcinolon-acetonid je součástí mnoha léčivých přípravků a lékových forem. Jde hlavně o přípravky určené k parenterální (injekce), perorální (tablety), topické (krém, mast, lotio, tinktura, pěna, spray), pulmonální (aerosol) a nasální aplikaci (spray). Podávání kortikoidů může být provázeno nežádoucími účinky, které v naprosté většině souvisejí s jejich mnohočetnými fyziologickými funkcemi v organismu. Mezi nejzávažnější patří inhibice reparativních a hojivých procesů, snížení odpovědi na infekci a tkáňové poškození, snížená schopnost kůry nadledvin syntetizovat hormony jako důsledek náhlého vysazení (Addisonova nemoc), manifestace Cushingova syndromu, hyperglykémie, hypertenze, úbytek svalové hmoty a redistribuce tuku, osteoporóza, kožní atrofie, poruchy menstruace, psychotické poruchy. Jejich výskyt, intenzita a četnost závisí na druhu přípravku, délce podávání, výši aplikovaných dávek a aplikační cestě.

## **2.4 *Methylparabenum a Propylparabenum***<sup>3</sup>

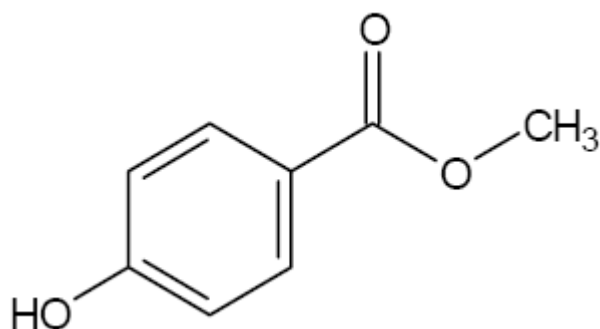
Methylparabenum (Methylparaben) a Propylparabenum (Propylparaben) jsou estery kyseliny 4-hydroxybenzoové podobných chemických a fyzikálně-chemických vlastností. Methylparaben, chemicky methyl-4-hydroxybenzoát, je bílý krystalický prášek nebo je tvořen

---

<sup>3</sup> Kapitola 2.4. byla vypracována ze zdrojů [6], [7], [8], [9], [10], [12]

bezbarvými krystaly. Propylparaben, chemicky propyl-4-hydroxybenzoát, je bílý krystalický prášek. Jde o látky velmi těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a v methanolu. Struktury jsou uvedeny na Obr.3 a Obr.4.

Obr.3.: Struktura methylparabenu

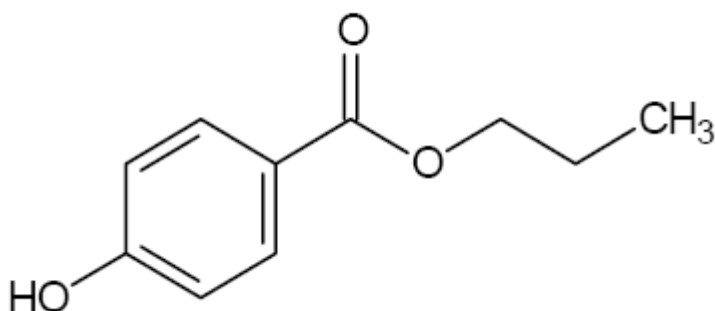


**Sumární vzorec:**  $C_8H_8O_3$

**$M_r$ :** 152,15

**Synonyma:** Methylis parahydroxybenzoas

Obr.4.: Struktura propylparabenu



**Sumární vzorec:**  $C_{10}H_{12}O_3$

**$M_r$ :** 180,20

**Synonyma:** Propylis parahydroxybenzoas

Parabeny se využívají ke konzervaci léčivých a kosmetických přípravků, kde působí bakteriostaticky. V přípravku „Triamcinolon krém HBF“ jsou obsaženy v poměru 4:1 ve prospěch methylparabenu (viz.

Kap.2.2.2 – Tab.1). Nehodí se ke konzervaci potravin, protože působí mírně anesteticky. Nežádoucím účinkem parabenů je také jejich estrogenní efekt, který klesá v řadě butylparaben > propylparaben > ethylparaben > methylparaben. Jejich účinek není závislý na pH prostředí.

## **2.5 Chromatografické metody <sup>4</sup>**

### **2.5.1 Obecné principy chromatografických metod**

Chromatografické metody jsou v analýze využívány velice široce, patří mezi vysoce účinné separační techniky, které slouží k oddělení složek analyzované směsi s možností jejich kvalitativního a kvantitativního hodnocení.

Společným principem chromatografie je postupné, mnohokrát opakující se vytváření rovnováhy analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jde o sorpci na stacionární fázi, která je nepohyblivá a desorpci do mobilní fáze, která unáší separované látky a je tedy hybnou silou chromatografického procesu. K separaci dochází na základě různé afinity látek analyzované směsi ke stacionární a mobilní fázi. V případě, že mobilní i stacionární fázi jsou kapaliny, podstatou separace je rozdílná rozpustnost dělených látek v těchto navzájem nemísitelných kapalinách.

Chromatografické metody lze rozdělit podle různých hledisek:

- dle charakteru (skupenství) mobilní fáze na:
  - plynovou chromatografii (GC)
  - kapalinovou chromatografii (LC)
- dle podstaty separačního děje existují chromatografie:

---

<sup>4</sup> Kapitola 2.5. byla vypracována ze zdrojů [6], [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22]

- adsorpční – podstatou je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu (LSC – pevná fáze-kapalina, GSC – pevná fáze-plyn)
- rozdělovací – separace je založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), případně jde o rozdělování v systému kapalina-plyn (GLC)
- iontově výměnná – stacionární fází jsou iontoměniče (katexy nebo anexy) a mechanismem separace je rozdílná afinita k iontovýměnným skupinám iontoměniče, která je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, velikostí a mocenstvím iontů dělených látek
- gelová permeační – separace probíhá na základě různé velikosti molekul dělené směsi, které jsou unášeny kapalinou protékající přes kolonu naplněnou porézním materiálem. Molekuly dle velikosti pronikají nebo nepronikají do pórů určitých rozměrů a tím je dána míra jejich zadržování v koloně
- afinitní – pomocí této techniky může být izolována jakákoliv molekula, která reaguje specificky a reverzibilně s jinou molekulou. Těmito dvěma molekulami mohou být např.: protilátka - antigen, enzym - kofaktor, inhibitor - substrát nebo případně hormon či léčivo a příslušný bílkovinný receptor nebo přenašeč.

- dle použité techniky:
  - sloupcová chromatografie
  - papírová chromatografie
  - chromatografie na tenké vrstvě

Stručný přehled chromatografických technik uvádí Tab.2.

Tab.2.: Stručný přehled chromatografických technik

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Uspořádání	Chromatografická technika
<p><b>Plyn</b> <i>plynová chromatografie – GC</i></p>	<p><b>Kapalina</b>  <b>tuhá látka</b></p>	<p>kolonové</p>	<p><i>plynová rozdělovací chromatografie – GLC</i> <i>plynová adsorpční chromatografie – GSC</i></p>
		<p>kolonové</p> <p>plošné</p>	<p><i>gelová permeační chromatografie – GPC</i> <i>kapalinová rozdělovací chromatografie – LLC</i> <i>tenkovrstvá rozdělovací chromatografie – TLC</i> <i>papírová rozdělovací chromatografie – PC</i></p>
<p><b>Kapalina</b> <i>kapalinová chromatografie – LC</i></p>	<p><b>Kapalina</b>  <b>tuhá látka</b></p>		<p>kolonové</p>
		<p>plošné</p>	<p><i>tenkovrstvá adsorpční chromatografie – TLC</i></p>

## 2.5.2 **Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

HPLC je jedna z nejprogresivnějších analytických metodik. Její hlavní výhodou je možnost automatizace, potřeba malého množství vzorku, rychlost a vysoká citlivost analýzy s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení směsi látek a její univerzálnost. Umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů, čímž odstraňuje hlavní nedostatky plynové chromatografie.

Při této metodě nastává dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní kapalnou fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Může být využito téměř všech mechanismů separace, tedy lze nalézt selektivní a účinný systém k dělení různých směsí látek.

HPLC analýzu lze realizovat pomocí dvou typů eluce. Neliší-li se příliš eluční parametry látek, použije se isokratická eluce mobilní fází s konstantním složením. Jestliže se látky výrazně liší svými elučními parametry, využívá se gradientové eluce s plynule se měnícím složením mobilní fáze, při čemž se vytváří pH popřípadě koncentrační gradient.

Po nástřiku analyzovaného vzorku na kolonu je tento unášen mobilní fází (eluční činidlo), ustavuje se rovnováha mezi stacionární (náplň kolony) a mobilní fází a dochází k separaci složek směsi. Rozdělené látky prochází detektorem, který identifikuje jejich přítomnost a na chromatografickém záznamu se jako odezva na signál detektoru zakreslí pík.

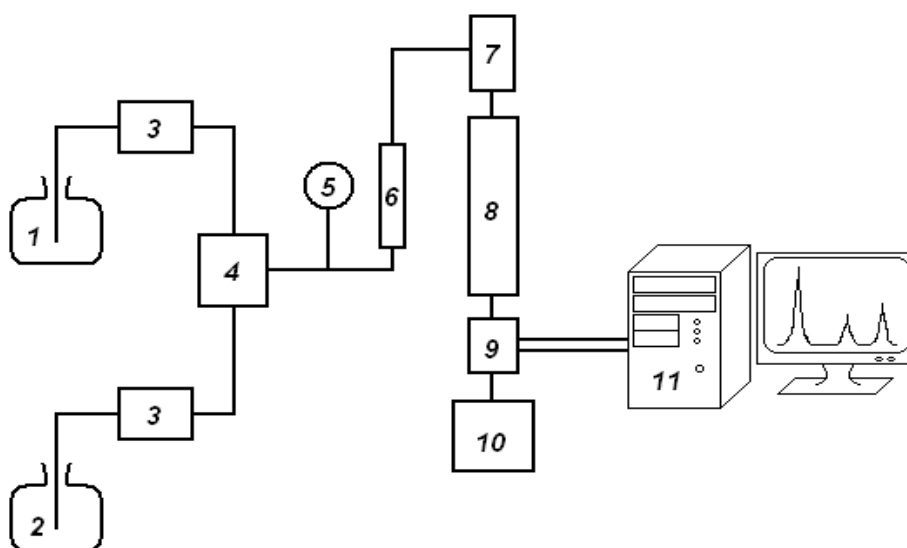
Na separaci látek má vliv výběr kolony a mobilní fáze, citlivost měření je limitována použitým detektorem.

Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas  $t_R$ , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantifikace látek může být učiněna buď pomocí výšky píku, nebo plochy píku ( $A$ , area) na chromatografickém záznamu za použití vnitřního nebo vnějšího standardu. Výhodnější je provedení s vnitřním standardem, protože analýza pak probíhá pro sledované látky i standard za stejných experimentálních podmínek.

### 2.5.2.1 *Kapalinový chromatograf*

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které umožňují dávkování vzorku, průchod mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. Sestava chromatografu pro HPLC je buď kompaktní konstrukce s fixním uspořádáním komponent, nebo stavebnicového typu kdy jednotlivé součásti jsou odděleny a dají se přestavovat.

Obr.5.: Schéma kapalinového chromatografu



Základní součásti sestavy znázorňuje Obr.5. Jsou to: zásobníky mobilní fáze (1, 2), vysokotlaké čerpadlo (3), směšovač (4), manometr (5), dávkovací zařízení (6), předkolona (7), analytická kolona (8), detektor (9), sběrač frakcí (10), počítač se speciálním softwarem (11). Přítomen může být ještě odplyňovač (degasser).

### 2.5.2.2 *Chromatografické kolony a eluční činidla*

HPLC chromatografické kolony jsou trubice z nerezové oceli nebo ze speciálně tvrzeného skla o délce 3–50 cm o vnitřním průměru 1–8 mm. Důležité je, aby náplň kolony byla naprosto rovnoměrná a homogenní. Kolona musí odolávat relativně vysokým tlakům, chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek, na něž nesmí působit rozkladně.



Důležité jsou předklony, které se používají k analýze složitých směsí, zejména biologického materiálu, jejichž analýza zkracuje životnost analytických kolon. Předklony slouží k ustálení průtoku mobilní fáze, může na ní také docházet k zachycování různých nečistot a vzorky tak přicházejí na analytickou kolonu „čistší“.

Kvalita sorbentu má hlavní vliv na účinnost separace. Důležitá je velikost a stejnoměrnost částic, podobně i tvar, struktura a porozita. Pro většinu HPLC analýz se používají nemodifikovaná nebo chemicky modifikovaná zrnka silikagelu (chemickou reakcí navázané radikály na –OH skupiny silikagelu) o velikosti 1,8 - 10  $\mu\text{m}$  nebo oxid hlinitý (alumina). K dělení látek pomocí HPLC lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorbce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu).

Používaná rozpouštědla a jiné složky mobilní fáze musí mít vhodnou kvalitu. Složky mobilní fáze se obvykle filtrují, aby z nich byly odstraněny částice větší než 0,45  $\mu\text{m}$ . Rozpouštědla jsou před čerpáním do systému obvykle odplynována probubláváním heliem, v ultrazvukové lázni nebo se používají membránová či vakuová zařízení zařazená přímo do systému, která zabraňují tvorbě bublin v cele detektoru.

Výběr mechanismu retence, stacionární fáze a elučního činidla se odvíjí od charakteru stanovované látky. Z tohoto hlediska rozlišujeme několik způsobů provedení HPLC:

- ***RPLC (Reverse phase liquid chromatography)***

Tento způsob provedení HPLC byl dlouho zodpovědný za rozšířenou popularitu HPLC jako separační metody. RPLC, neboli chromatografie na „reverzní“ fázi, vyžaduje nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Mobilní fáze se většinou skládá ze směsi vody (případně pufru), methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu a jiných polárních rozpouštědel. Typickou stacionární fází jsou chemicky modifikovaná zrnka silikagelu (viz Tab.3.). Nevýhodou těchto fází je, že při pH vyšším než 8 dochází

k částečnému rozpouštění silikagelu, což snižuje životnost kolon. RPLC kolony mohou být použity k analýze rozmanitého okruhu sloučenin, od slabě polárních a nepolárních sloučenin až po kyselá, bazická a amfoterní směsi. Pro analýzu látek, které pro svou separaci potřebují bazické pH se používají různé jiné polymerní látky.

Tab.3.: Stručný přehled modifikujících skupin pro RPLC

Modifikující skupina	Chemický vzorec
Dokosyl	$-(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}_3$
Oktadecyl	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
Oktyl	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
Hexyl	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
Ethyl	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$
Trimethyl	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
Fenyl	$-\text{C}_6\text{H}_5$
Bifenyl	$-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$

- **NPLC (Normal phase liquid chromatography)**

Chromatografie na „normální“ fázi má opačné uspořádání než RPLC. NPLC užívá polární stacionární fázi (např. silikagel) a nepolární mobilní fázi (nejčastěji organická rozpouštědla jako je heptan, cyklohexan, tetrachlormethan, toluen a jiné). Polární povrch může být taky získán derivatizací základu částicemi, které obsahují polární funkční skupiny (viz. Tab.4.). NPLC je cestou volby pro analýzu velice polárních a hydrofilních sloučenin.

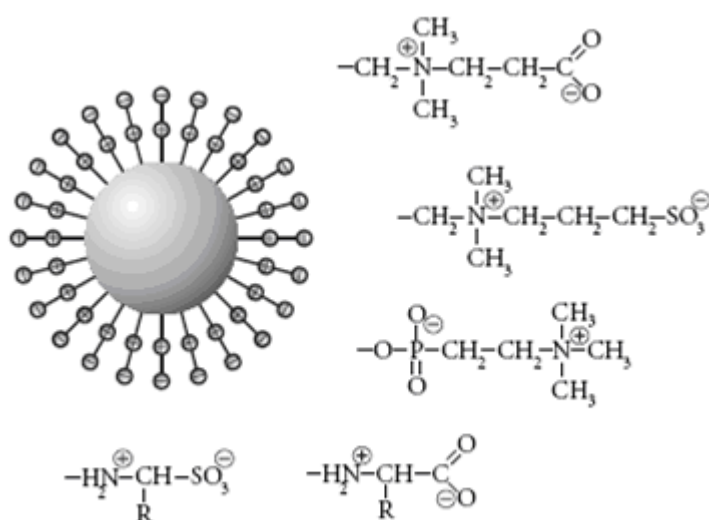
Tab.4.: Stručný přehled modifikujících skupin pro NPLC

Modifikující skupina	Chemický vzorec
Amino	—NH <sub>2</sub>
Alkylamino	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub>
Kyano	—C≡N
Alkylkyano	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C≡N
Diol	—CH(OH)-CH <sub>2</sub> OH

- **HILIC (Hydrophilic-interaction liquid chromatography)**

Kapalinová chromatografie založena na hydrofilních interakcích je alternativou NPLC, s tím rozdílem, že místo 100% organické mobilní fáze používá směs organických rozpouštědel a ultračisté vody. Typický eluent se skládá ze 40–97% acetonitrilu, zbytek (min. 3%) tvoří voda, případně pufr. Stacionární fáze je více polární než u NPLC, používají se zejména tzv. ZIC (zwitterionic – obojetně iontové) SF (Obr.6.).

Obr.6.: Přehled ZIC stacionárních fází



Mechanismy retence, které se uplatňují při separaci, spočívají v elektrostatických interakcích a „hydrofilním rozdělávání“.

- **IEC (Ion-exchange chromatography)**

Pro dělení látek iontového charakteru se používají stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů (viz Tab.5.). Mechanismus IEC je popsán v Kap.2.5.1.

Tab.5.: Stručný přehled modifikujících skupin s vlastnostmi iontoměničů

Obecný název modifikující skupiny	Chemický vzorec	Charakter stacionární fáze
Amino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	slabě bazický anex
Ethylendiamino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	Anex
Kvarterní amin	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	silně bazický anex
Karboxylová kyselina	$-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	slabě kyselý katex
Sulfonová kyselina	$-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$	silně kyselý katex

- **SEC (Size exclusion chromatography)**

Tento způsob separace není založen na interakcích se stacionární a mobilní fází (míněno adsorpce a rozdělování), ale na síťovém efektu polymerních gelů (Sephadex), tedy na rozlišování jednotlivých komponent vzorku na základě jejich velikosti (mechanismus popsán v Kap.2.5.1.). SEC má dominantní postavení v separaci výšemolekulárních sloučenin. Využívá se například v biochemii pro izolaci frakcí proteinů, nebo pro finální čištění biotechnologických produktů.

### 2.5.2.3 **Přímá detekce v HPLC**

Úkolem detektorů je monitorování mobilní fáze vycházející z kolony. Výstupem detektoru je signál, kterého intenzita je závislá na koncentraci látky přítomné v eluátu. Z citlivosti použitého detektoru vychází citlivost celé analytické metody. Na detektory jsou kladeny mimořádné požadavky a to:

- univerzální nebo selektivní odpověď na složky eluátu

- vysoká citlivost
- linearita odezvy
- reprodukovatelnost a spolehlivost
- co nejmenší ovlivnění detektoru vnějšími podmínkami (teplota, složení mobilní fáze)

Přehled nejčastěji používaných detektorů je v Tab.6.

Tab.6.: Přehled detektorů používaných v HPLC

Detektor	Měřená veličina	Citlivost v g/ml	Selektivita
<b>Amperometrický</b>	elektrický proud	$10^{-10}$	Ano
<b>Fluorimetrický</b>	fluorescenční tok	$10^{-10}$	Ano
<b>Hmotnostní spektrometr</b>	molekulová hmotnost	$10^{-11}$	Ano
<b>Infračervený</b>	transmitance	$10^{-6}$	Ano
<b>Kapacitní</b>	relativní permitivita	$10^{-7}$	Ano
<b>Konduktometrický</b>	elektrická vodivost	$10^{-8}$	Ano
<b>Refraktometrický</b>	index lomu	$10^{-7}$	Ne
<b>Ultrafialový</b>	absorbance	$10^{-10}$	Ano

Nejpoužívanější detektory jsou spektrofotometry pracující v oblasti UV a VIS, následují fluorimetrické, konduktometrické a amperometrické detektory.

## 2.6 Validace analytických metod <sup>5</sup>

Validace analytických metod je definována jako proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody, demonstruje, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná a poskytuje použitelná analytická data.

<sup>5</sup> Kapitola 2.6. byla vypracována ze zdrojů [13], [15], [18], [23], [24], [25], [26], [27]

Cílem je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v různých laboratořích.

Procesem validace se zabývá ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), která usiluje o jednotnost metodiky a terminologie validačního programu na území EU, Japonska a USA. Mezi významné světové autority patří i USP, v České republice pro kontrolní laboratoře je to SÚKL a Český lékopis.

Validace chromatografických metod zahrnuje testování způsobilosti chromatografického systému a testování validačních charakteristik, které ověřují kvalitu analytické metody.

### **2.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému (SST, System suitability test)**

SST je nedílnou součástí validace analytické metody. U instrumentálních fyzikálně-chemických metod není prakticky možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých bude metoda poskytovat spolehlivé výsledky. Splnění požadavků testu způsobilosti při každém novém použití metody předpokládá, že dříve provedená validace platí a proto ji není nutné celou opakovat.

#### **2.6.1.1 Opakovatelnost analýzy**

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky  $s_R(\%)$  v procentech pro plochy píku ( $A_1 - A_i$ ) a retenční časy ( $t_{R1} - t_{Ri}$ ) pro řadu (šest až deset) následných měření porovnávacího roztoku standardu a vypočítá se ze vzorců:

$$x_p = \frac{\sum x_i}{n} \qquad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (x_i - x_p)^2}{(n-1)} \right\}} \qquad s_R = \frac{100 \cdot s}{x_p}$$

Požadavek je, aby jak pro  $A$  tak i pro  $t_R$  byla  $s_R(\%) < 1\%$ .

### 2.6.1.2 *Dělicí účinnost systému*

Účinnost analytické kolony charakterizuje její schopnost separovat složky směsi a může být vyjádřena jako zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ):

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$t_R$  retenční čas odpovídající látky

$w_h$  šířka píku v polovině jeho výšky

Požadavek na  $N$  se různí a je dán délkou kolony.

### 2.6.1.3 *Asymetrie chromatografického píku*

Tato veličina vyjadřuje míru symetrie chromatografického píku. Asymetrie  $T$  se vypočte:

$$T = \frac{w_{0,05}}{2 \cdot f}$$

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

$f$  menší část úsečky, která vznikla protnutím úsečky vedené v jedné dvacetině výšky píku rovnoběžně se základní linií a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku.

Pro symetrický pík je  $T = 1$  a tato hodnota se s rostoucí asymetrií zvětšuje. Se zvyšováním hodnoty asymetrie roste možnost chyby při výpočtu plochy píku. Požadavek pro HPLC je  $T < 1,2$ .

#### 2.6.1.4 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení vyjadřuje míru odlišení látek, které eluují blízko sebe.

U píku sledované látky a píku nejbližše eluované látky (může být i nečistota) se odměří úseky na základní linii ( $w_i$  a  $w_j$ ) a odpovídající retenční časy ( $t_{Ri}$  a  $t_{Rj}$ ). Rozlišení se vypočítá:

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj})}{w_i + w_j}$$

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. (Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný.)

### 2.6.2 Validace analytické metody

#### 2.6.2.1 Správnost (accuracy)

Správnost analytické metody vyjadřuje shodu mezi naměřenou hodnotou a správnou hodnotou. Vymezení správnosti vyžaduje referenční hodnotu, což je známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou s ověřenou správností. Statisticky se správnost testuje změřením šesti různých vzorků a vyjadřuje se pomocí výtěžnosti  $R$  (recovery), která udává poměr množství (koncentrační) analytu získaného danou analytickou metodou ( $c_i$ ) k přijaté referenční hodnotě ( $c_0$ ):

$$R_i (\%) = \frac{100 \cdot c_i}{c_0} \quad R_p = \frac{(\sum R_i)}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_p)^2}{(n-1)}}$$
$$s_R = \frac{100 \cdot s}{R_p}$$

Požadavek je, aby  $R_p = 95\% - 105\%$  a  $s_R(\%) < 5\%$ .



### 2.6.2.2 Přesnost (precision)

Přesnost analytické metody představuje míru shody (stupeň rozptylu) mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem za předepsaných podmínek. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

- Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje přesnost změřenou za stejných podmínek (jeden analytik se stejnými činidly na tomtéž přístroji).
- Mezilehlá přesnost (intermediate precision) se provádí v jedné laboratoři se stejným zhomogenizovaným vzorkem, ale v různý den s různými činidly, analytiky i přístroji.
- Reprodukovatelnost (reproducibility) vyjadřuje přesnost mezi laboratořemi, ověřuje zda metoda bude dávat stejné výsledky v různých laboratořích.

Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Změří se odpovídající plochy píků ( $A_i$ ) pro hlavní látku i pro přítomné vedlejší látky a získané hodnoty se použijí pro výpočet průměrné hodnoty  $A_p$ , směrodatné odchylky  $s$  a relativní směrodatné odchylky  $s_R(\%)$  podle vzorců:

$$A_p = \frac{(\sum A_i)}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (A_i - A_p)^2}{(n-1)} \right\}} \quad s_R = \frac{100 \cdot s}{A_p}$$

Požadavek je  $s_R(\%) < 5\%$ .

### 2.6.2.3 Selektivita (selectivity)

Selektivita popisuje vlastnost analytické metody změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných očekávaných látek, kterými

mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby a rozkladné produkty. V HPLC se zjišťuje porovnáním chromatogramů roztoků standardů a placebo. Zjišťuje se, zda se na záznamu placebo nevyskytují interferující píky v retenčních časech stanovovaných látek.

#### **2.6.2.4 Linearita (*linearity*) a rozsah (*range*)**

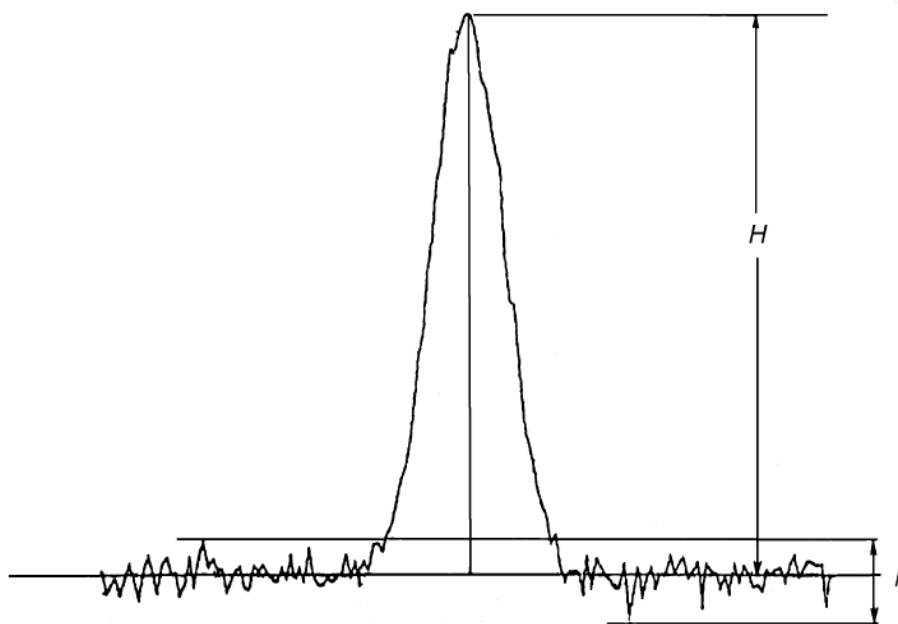
Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými. Linearita je schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje sérií tří až šesti nástřiků minimálně pěti roztoků standardů, jejichž koncentrace je v rozmezí 50 – 150% nebo 80 – 120% deklarované koncentrace. Výsledky se zpracovávají standardním postupem lineární regrese.

Rozsahem metody se rozumí koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána, přičemž výsledky jsou správné a přesné.

#### **2.6.2.5 Detekční limit (*limit of detection, LOD*)**

Limit detekce vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace analyzované látky, nestanovované kvantitativně. Může se určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu základní linie s hodnotou 3.

Obr.7.: Ukázka chromatografického záznamu pro výpočet LOD a LOQ



#### 2.6.2.6 **Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)**

Limit kvantifikace analytické metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která je stanovitelná s vhodnou přesností a správností. LOQ je parametrem kvantitativních zkoušek pro analýzu nečistot a degradačních produktů. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%, proto je možné LOQ vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu, nebo se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

#### 2.6.2.7 **Robustnost (robustness)**

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Pro vyjádření robustnosti chromatografické metody se mění určité parametry: složení mobilní fáze, pH vodné složky MF, průtoková rychlost, analytická kolona, teplota na koloně, vlnová délka detekce a vymezí se míra vlivu těchto změn na přesnost stanovení.

### 2.6.2.8 *Stabilita standardů a vzorků*

Připravené roztoky standardu a vzorku rozdělené na dvě části se po 4 dny uchovávají při teplotě 2 - 8°C v temnu a při laboratorní teplotě za přístupu světla. Každý den se takto skladované roztoky analyzují a plochy píku se srovnávají s plochami píků získaných z čerstvě připravených roztoků. Stabilita  $S_T(\%)$  se vypočte:

$$S_T(\%) = \frac{100 \cdot |A_i - A_0|}{A_0}$$

$A_i$  průměr ploch píků sledované látky u roztoku skladovaného

$A_0$  průměr ploch píků sledované látky u roztoku čerstvě připraveného

Požadavek je, aby hodnota  $S_T(\%)$  byla  $< 1\%$ .

## 2.7 *Analytické metody pro hodnocení Triamcinolonu acetonidum*<sup>6</sup>

### 2.7.1 *Stanovení lékopisné*

#### 2.7.1.1 *Český lékopis 2005*

ČL 2005 uvádí pro stanovení triamcinolon-acetonidu metodu absorpční spektrofotometrie v ultrafialové oblasti.

Postup:

50,0 mg se rozpustí v lihu 96% a zředí se jím na 50,00 ml. 2,00 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,00 ml. Změří se absorbance v maximu při 238,5 nm a vypočítá se obsah  $C_{24}H_{31}FO_6$  za použití specifické absorbance, která má hodnotu 355. (pozn. roztoky se během stanovení chrání před světlem.)

<sup>6</sup> Kapitola 2.7. byla vypracována ze zdrojů [6], [7], [8], [9], [10], [28], [29], [30], [31], [32], [33], [34]

### **2.7.1.2 Lékopisy zahraniční**

Postup stanovení v britském (BP 2004) a evropském (EP 2002) lékopise je shodný jako v lékopise českém. Japonský lékopis (PJ 1976) využívá pro stanovení triamcinolonacetonidu rovněž spektrofotometrické stanovení, jen s malým rozdílem v přípravě roztoku. 10,0 mg se rozpustí v ethanolu 96% a zředí se jím na 100,00 ml. 5,00 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,00 ml. Změří se absorbance v maximu kolem 240 nm a vypočítá se obsah  $C_{24}H_{31}FO_6$  za použití specifické absorbance, která má hodnotu 354.

Zcela rozdílnou metodu pro stanovení TA uvádí lékopis americký (USP 28), který využívá HPLC (viz. Kap.2.7.2, Tab.7.).

### **2.7.2 Stanovení triamcinolon-acetonidu metodou HPLC**

Byla vypracována literární rešerše zaměřena na nalezení informací prakticky využitelných pro vývoj metody stanovení triamcinolon-acetonidu pomocí HPLC. Výsledky jsou uvedeny v Tab.7.

Tab.7.: Přehled stanovení triamcinolonacetonidu metodou HPLC

Stacionární fáze	Kolona	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Hodnocené látky	Citace
L1	300 x 3.9 mm	voda : acetonitril (70:30 v/v)		UV při 254 nm	triamcinolon-acetonid	[6]
Supelco Discovery C18	125 x 4 mm	voda : acetonitril (60:40 v/v)	0,6	UV při 240 nm	triamcinolon-acetonid, triamcinolon, methylparaben, propylparaben	[28], [29]
Bondapack TM CN	150 x 3.9 mm	acetonitril : 20 mM octan amonný (pH 5) (10:90 v/v)	1,0	UV při 232 nm	triamcinolon-acetonid, oxymetazolin hydrochlorid	[30]
C18	250 x 4.6 mm	gradient		UV při 240 nm	triamcinolon-acetonid, chlorhexidin glukonát, lignokain hydrochlorid	[31]
C18		acetonitril : voda (28 : 72 v/v, pH 2.3)	1,2	UV při 254 nm	dexametason, triamcinolon-acetonid (IS)	[32]
Ultrasphère™ UP5ODB C18	150 x 2 mm	gradient	0,25	MS	kortikosteroidy	[33]
Supelco DB-8	75 x 4 mm	gradient	1,0	MS	kortikosteroidy	[34]

### **3 *Experimentální část***

### 3.1 *Přístrojové vybavení*

<b>Analytické váhy:</b>	Sartorius 2004 MP, Germany
<b>Centrifuga:</b>	EBA 21, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
<b>Kapalinový chromatograf:</b>	SHIMADZU LC-2010 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
<b>Ultrazvuková lázeň:</b>	BANDELIN, SONOREX Digitec, Germany
<b>UV – VIS spektrofotometr:</b>	Hewlett Packard 8453, USA
<b>Vyhodnocení:</b>	Chromatografická stanice Shimadzu CLASS-VP, verze 6.12 SP4

### 3.2 *Chemikálie*

**Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC** (š.č. 60550), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

**β-Estradiol, 97%** (š.č. 16320LA), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

**Butyl-4-hydroxybenzoate** (š.č. 426009/1), Flukachemika, Germany

**Ethyl-4-hydroxybenzoate** (š.č. S03380-101), Flukachemika, Germany

**Kyselina fosforečná 85% p.a.**, Merck, Germany

**Methanol CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC** (š.č. 6047M), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

**Methylparaben** (š.č. 021228), Herbacos-Bofarma, Pardubice

**Propylparaben** (š.č. 20040201), Herbacos-Bofarma, Pardubice

**Tetrahydrofuran CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC** (š.č. 52380), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

**Triamcinolone** (PS 008/2), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

**Triamcinolon-acetonid** (š.č. 9184/M2), Herbacos-Bofarma, Pardubice

**Ultračistá voda**, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)



### **3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků**

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních a pracovních roztoků zkoušených látek, methylparabenu, propylparabenu, triamcinolonu a triamcinolonacetonidu, byl použit acetonitril. Látky jsou v tomto rozpouštědle dobře rozpustné.

Pro zásobní roztoky byly zvoleny koncentrace 50 mg/100 ml pro methylparaben, 12,5 mg/100 ml pro propylparaben, 5 mg/100 ml pro triamcinolon a 25 mg/100 ml pro triamcinolon-acetonid.

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků tak, aby jejich koncentrace odpovídaly koncentraci roztoku získaného extrakcí 0,5 g přípravku „Triamcinolon HBF krém“ do 20,00 ml rozpouštědla při 100% výtěžnosti, tedy o koncentraci 5 mg/100 ml pro methylparaben, 1,25 mg/100 ml pro propylparaben a 2,5 mg/100 ml pro triamcinolon-acetonid desetinasobným zředěním zásobních roztoků.

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních a pracovních roztoků látek, které byly zkoušeny jako potenciální interní standard byl použit acetonitril.

Pro zásobní roztok IS byla zvolena koncentrace 50 mg/100 ml.

Pracovní roztoky byly připravované o koncentraci 5 mg/100 ml ze zásobních roztoků jejich desetinasobným zředěním.

### **3.3 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek**

Nejdříve bylo nutné najít vhodné chromatografické podmínky. Těmito podmínkami byly vlnová délka detekce, složení mobilní fáze a analytická kolona s vhodným sorbentem a vhodný interní standard.

Při hledání vlnové délky detektoru bylo proměřeno UV spektrum stanovovaných látek. Při měření spektra byla snaha vyhnout se krátkým vlnovým délkám pod cca 240 nm, kde by mohly absorbovat složky krémového základu, případně jiné balastní látky. Po nalezení vhodné

vlnové délky byly zkoušeny různé analytické kolony a různé mobilní fáze. Byly zkoušeny kolony s různě polárními sorbenty – Agilent Zorbax<sup>®</sup> SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), Agilent Zorbax<sup>®</sup> SB-PHENYL (75 x 4.6 mm; 3.5 µm), Agilent Zorbax<sup>®</sup> TMS (250 x 4.6 mm; 5 µm), Atlantis<sup>®</sup> dC18 (50 x 3.0 mm; 3 µm), Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm), Nucleosil<sup>®</sup> 100-5-CN (250 x 4.6 mm, 5 µm), Phenome Gemini 3µ C18 110A (50 x 2.00 mm; 3 µm), Supelco Discovery<sup>®</sup> C18 (12.5 cm x 4.6 mm; 5 µm) a Supelco Discovery<sup>®</sup> HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm). U každé kolony bylo testováno několik mobilních fází.

Neméně důležitým krokem optimalizace chromatografických podmínek bylo nalezení vnitřního standardu. Bylo testováno několik látek.

### **3.4 Vzorky přípravků**

**Triamcinolon krém HBF** (vzorek č. VV 051/07), Herbacos-Bofarma, Pardubice, ČR

**Triamcinolon krém, placebo bez ÚL, PP, MP** (vzorek č. VV 084/07), Herbacos-Bofarma, Pardubice, ČR

#### **3.4.1 Příprava vzorku**

Vzorek byl připravován postupem, vycházejícím ze zkušeností s hodnocením léčivých přípravků podobných vlastností v kontrolní laboratoři na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo naváženo 0,5 g krému přesně, bylo přidáno 20,00 ml roztoku interního standardu v acetonitrilu a směs byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byla směs centrifugována 15 minut při 3000 otáčkách za minutu. Supernatant byl filtrován a byl dávkován autosamplerem přímo na analytickou kolonu.

V tomto extrakčním postupu je možno modifikovat jednotlivé parametry a to složení extrakční směsi, délku sonikace, popřípadě délku a rychlost centrifugace.

## ***4 Výsledky a diskuse***

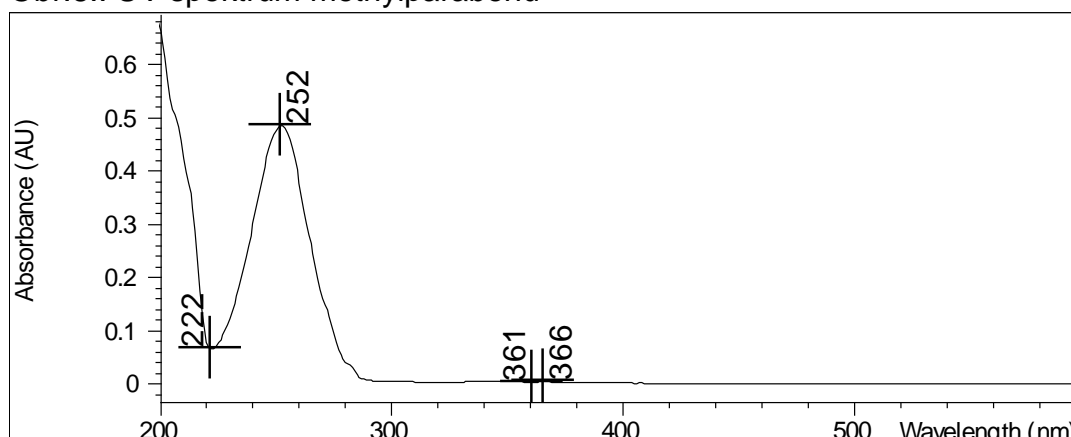
## 4.1 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Ke všem měřením byla použita HPLC sestava Shimadzu uvedena v Kap.3.1 a devět analytických kolon s různě polárním sorbentem. Na kolonu bylo nastříkováno 20  $\mu$ l vzorku, u některých kolon byl tento objem zredukován na dostačujících 10  $\mu$ l. Cílem bylo nalézt optimální podmínky pro provádění analýzy, tzn. takové, za kterých bude možné provést separaci, identifikaci a kvantifikaci sledovaných látek a poté validaci vyvinuté metody.

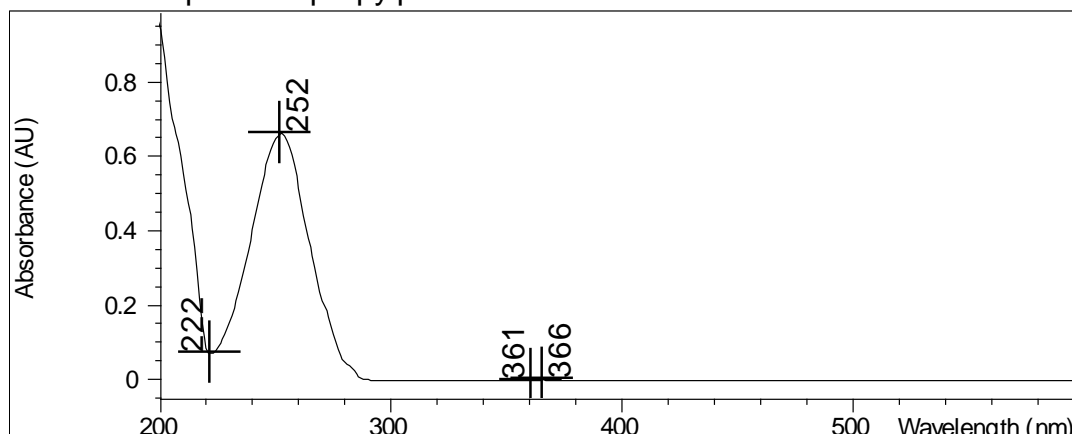
### 4.1.1 Vlnová délka detektoru

Pro stanovení optimální vlnové délky pro detekci stanovovaných látek byla použita UV spektra naměřena v acetonitrilových roztocích standardních látek methylparabenu, propylparabenu, triamcinolonu a triamcinolonacetionidu (viz Obr.8. – Obr.11.) za použití acetonitrilu jako slepého vzorku, ale také výsledky rešerše. Koncentraci měřených roztoků nebylo nutné pro tento účel definovat.

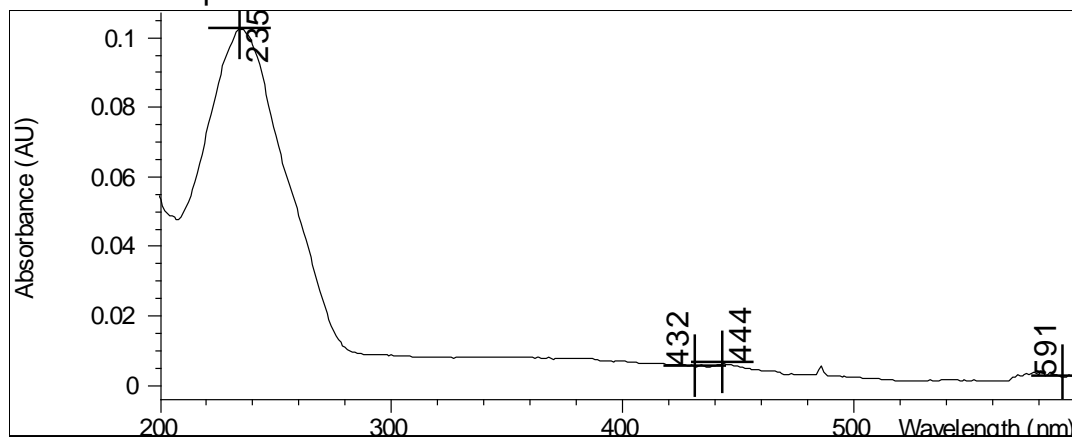
Obr.8.: UV spektrum methylparabenu



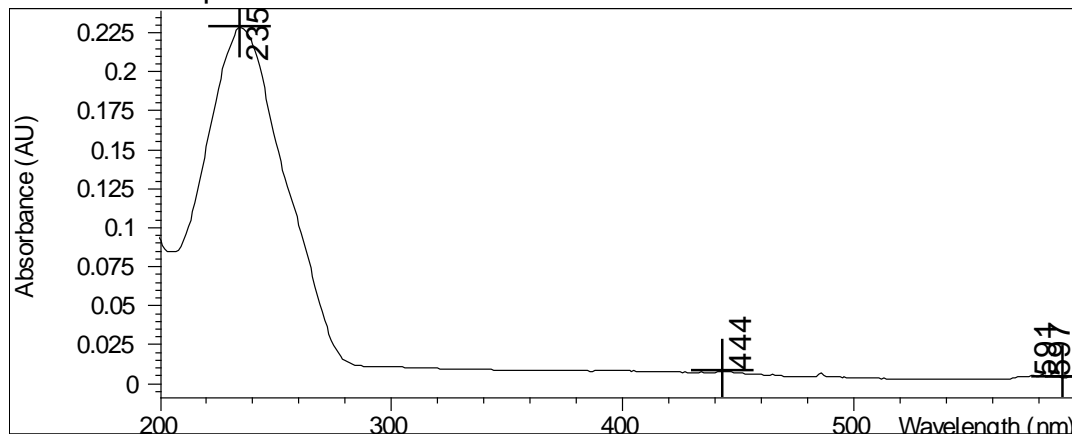
Obr.9.: UV spektrum propylparabenu



Obr.10.: UV spektrum triamcinolonu



Obr.11.: UV spektrum triamcinolonacetonidu



Na základě polohy maxim na výše uvedených spektrech a s ohledem na zdroje z rešerše byla jako optimální vlnová délka detekce zvolena hodnota 240 nm.

#### **4.1.2 Hledání vhodné analytické kolony a složení mobilní fáze**

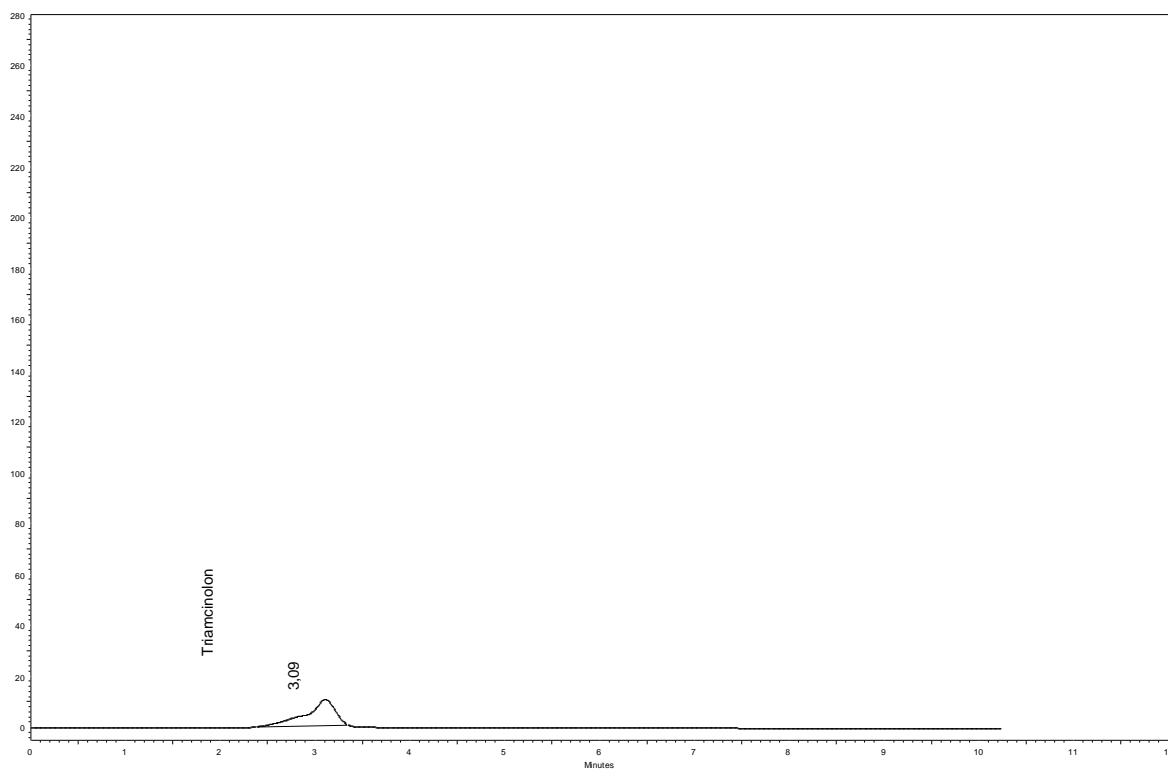
Při hledání optimálního složení mobilní fáze a optimální analytické kolony bylo využito poznatků rešerše.

Nakolik se jako nejvíce problematická látka z hlediska separačního procesu pomocí HPLC jevila hlavně nečistota (triamcinolon), bylo obvyklé, že měření se provádělo nejdříve s roztokem této sloučeniny a až poté byl na kolonu nastříknut roztok všech standardů sledovaných analytů.

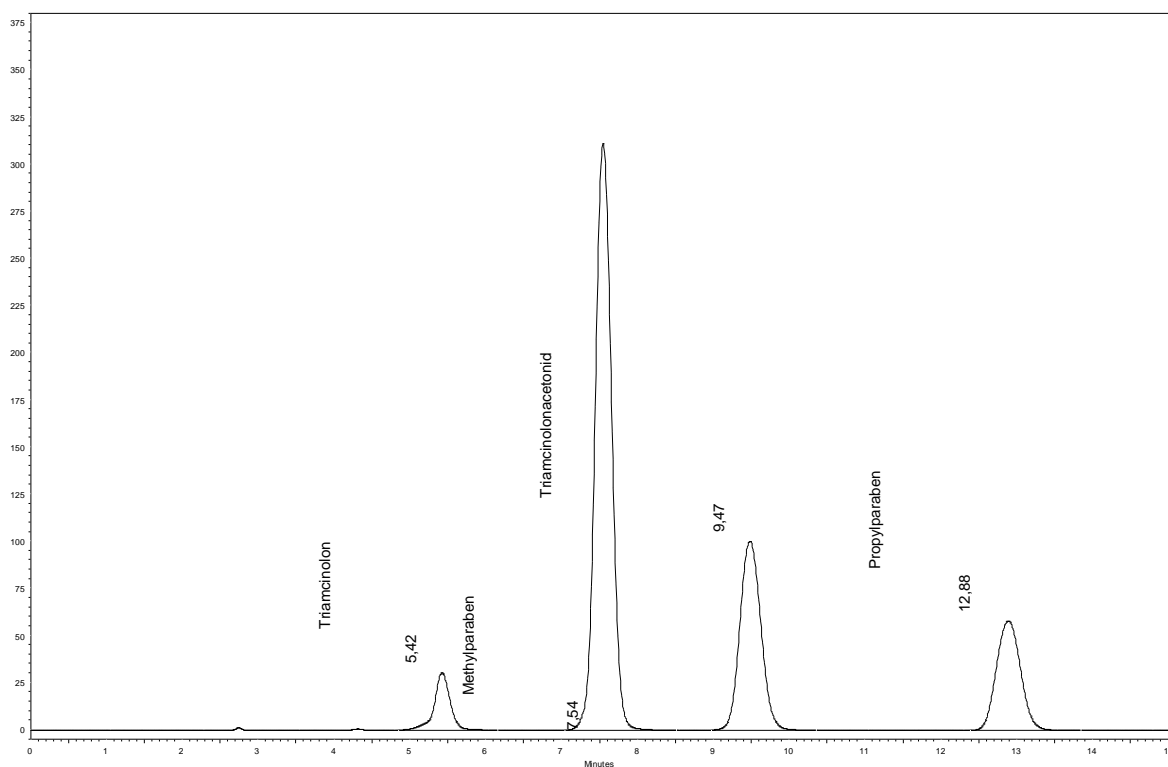
Ke všem měřením byli použité roztoky připravené postupem a o koncentracích uvedených v Kap.3.2.1.

Nejdříve bylo zkoušeno několik analytických kolon se stacionární fází C18 – Supelco Discovery<sup>®</sup> C18 (12.5 cm x 4.6 mm; 5 μm) (viz Obr.12.), Atlantis<sup>®</sup> dC18 (50 x 3.0 mm; 5μm), Phenome Gemini 3μ C18 110A (50 x 2.00 mm; 3 μm) a Hypersil ODS (250 x 4.6 mm; 5μm). Ve složení mobilní fáze byl měněn poměr acetonitrilu a vody, podíl vody tvořil 50 – 80% (objemová procenta). Nastříkovaný objem byl volen podle typu a délky kolony a to buď 10 nebo 20 μl. Průtoková rychlost byla měněna v rozmezí 0,5 – 0,8 ml/min. Na prvních třech kolonách nedocházelo k dostatečnému separačnímu procesu. Jako vhodná se jevila teprve kolona Hypersil ODS (250 x 4.6 mm; 5μm). Na Obr.13. a Obr.14. jsou uvedeny chromatografické záznamy měření na této AK.

Obr.12.: Supelco Discovery® C18 (12.5 cm x 4.6 mm; 5 µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (60:40 v/v), nášťik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



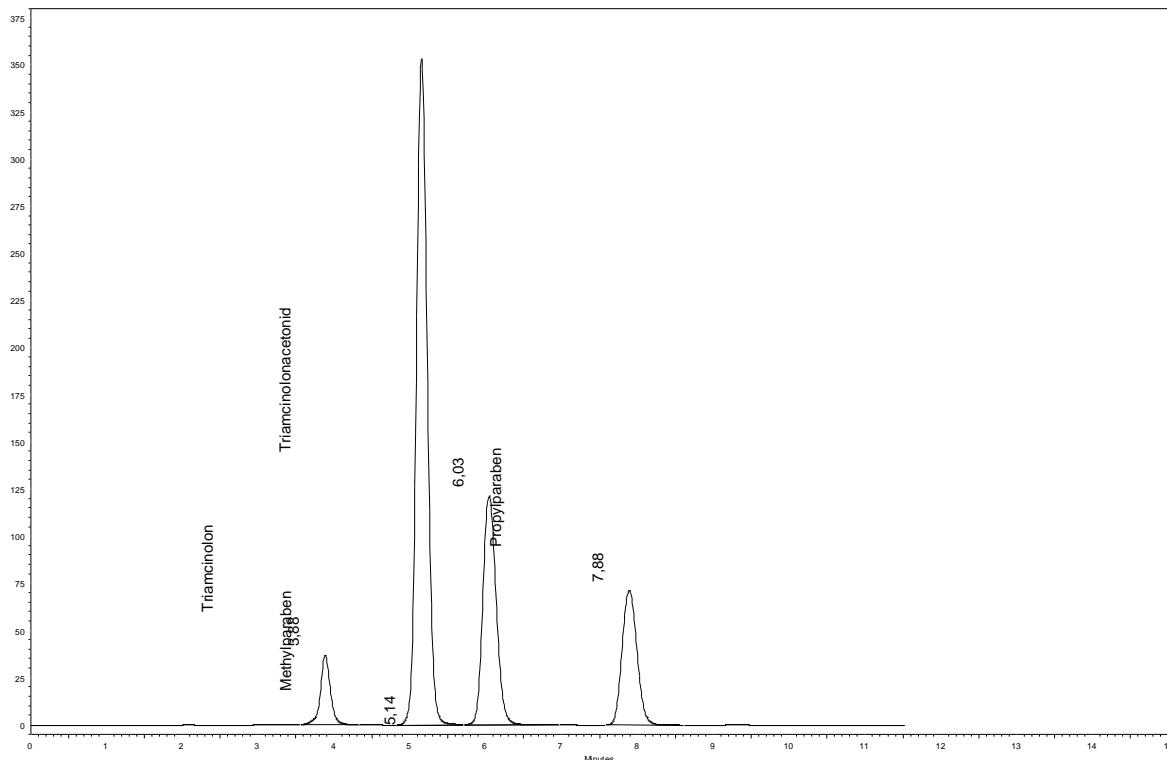
Obr.13.: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm; 5µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (55:45 v/v), nášťik - 20 µl, průtok – 0,8 ml/min





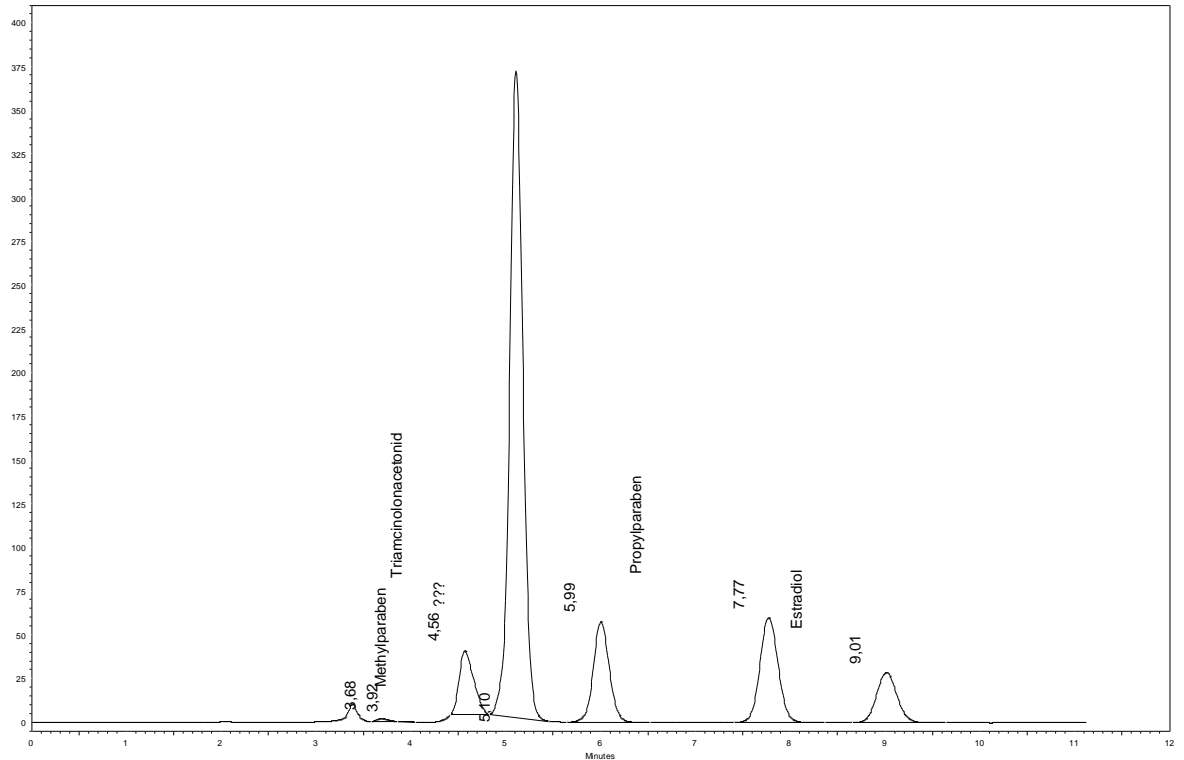
Změna podílu vody v MF z 55% na 50% (objemová procenta) urychlil analýzu o cca 5 minut.

Obr.14.: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (50:50 v/v), nástřik - 20  $\mu$ l, průtok – 0,8 ml/min



Ačkoli se toto uspořádání chromatografického systému jevílo optimální, při orientační extrakci účinných látek z Triamcinolon krému HBF docházelo k nevysvětlitelnému rozdělování píku methylparabenu na úkor jeho kvantitativního úbytku (Obr.15.). Tento nedostatek se nepodařilo odstranit ani modifikací extrakčního postupu, bylo změněno trvání ultrazvukování a centrifugace i počet otáček. Taktéž byla zkoušena změna složení extrakční směsi (např. úprava pH pomocí kyseliny fosforečné).

Obr.15.: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (50:50 v/v), nástržik - 20  $\mu$ l, průtok – 0,8 ml/min, vzorek – Triamcinolon krém HBF



Vzhledem k uvedeným skutečnostem nebylo vhodné pokračovat ve vývoji metody pro stanovení methylparabenu, propylparabenu, triamcinolonu a triamcinolon-acetonidu tímto směrem. (pozn. Na chromatografickém záznamu – Obr.15. je i pík estradiolu, který byl použit jako potenciální IS nejen u této kolony ale i některých dalších AK – viz níže)

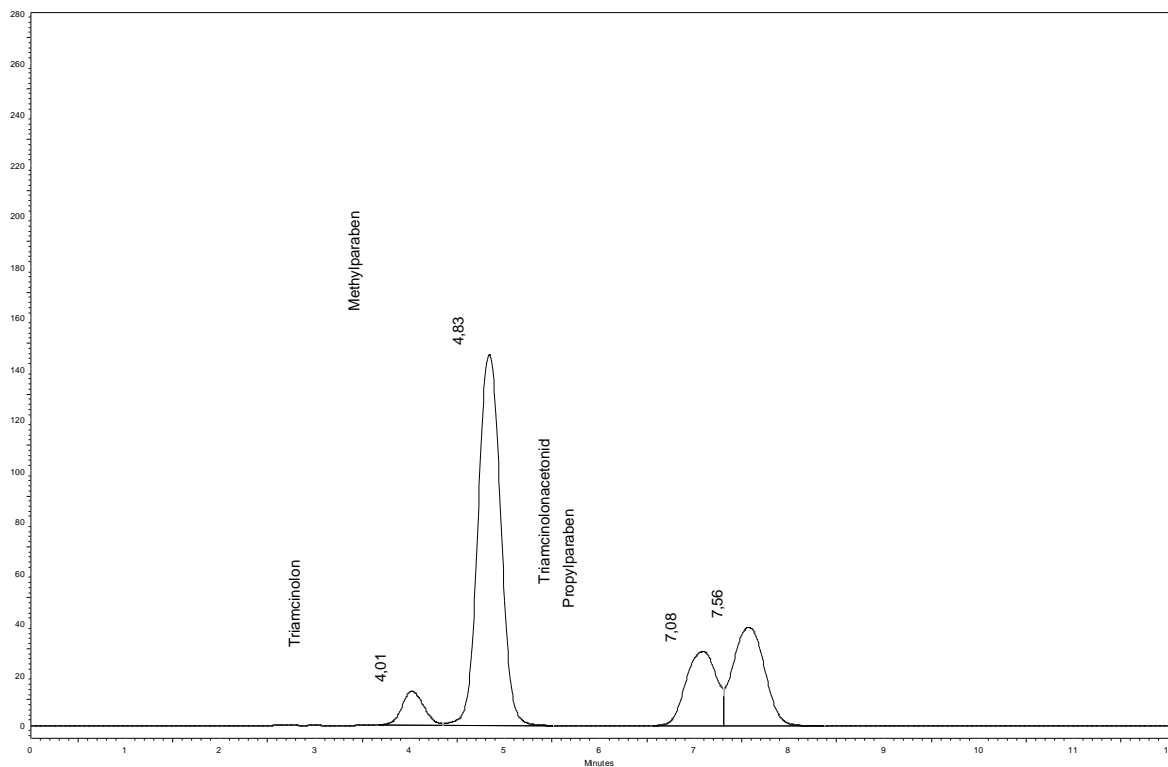
Dalšími zkoušenými kolonami byly AK se stacionární fází CN – Agilent Zorbax<sup>®</sup> SB–CN (150 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m) a Nucleosil<sup>®</sup> 100–5–CN (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Ve složení mobilní fáze byl obvykle měněn poměr acetonitrilu a vody, případně byla určitá objemová část těchto rozpouštědel nahrazena dalšími rozpouštědly jako tetrahydrofuran a methanol. V Tab.8. jsou uvedené připravené mobilní fáze se kterými byla provedena měření.

Tab.8.: Přehled připravených mobilních fází

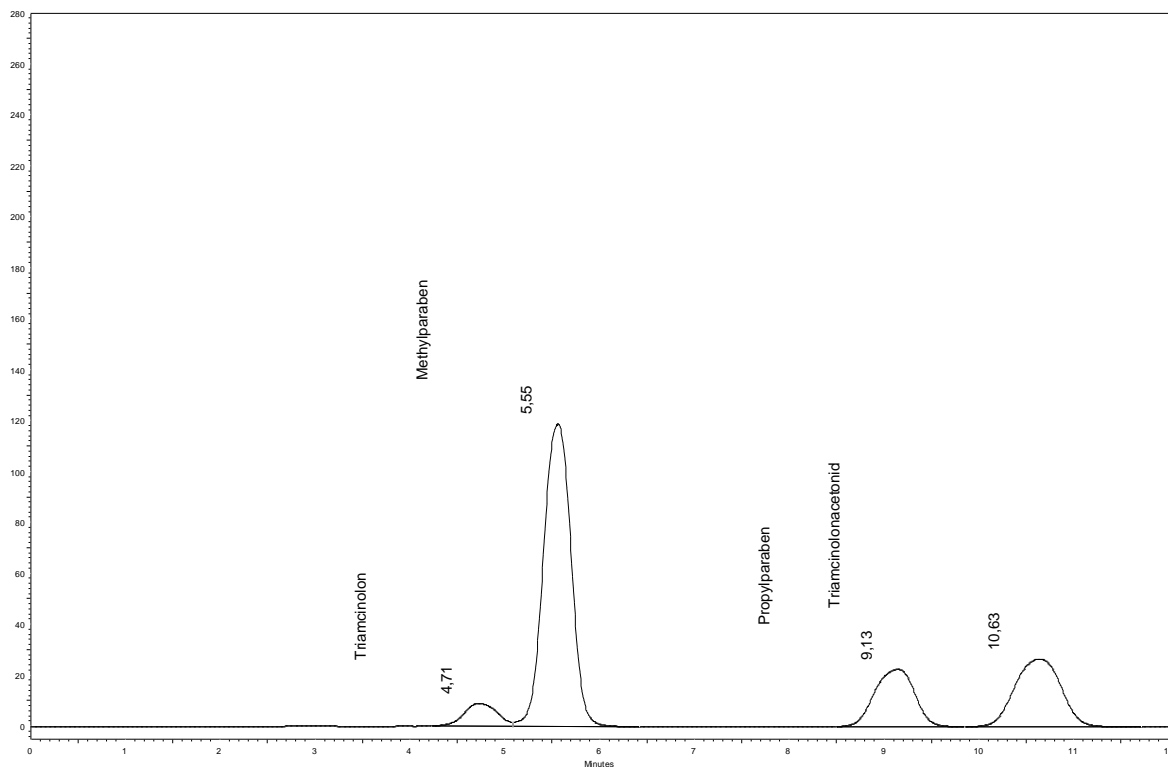
MF č.	Voda	Acetonitril	Methanol	Tetrahydrofuran
	Objemová procenta			
1	60	40	-	-
2	70	30	-	-
3	65	35	-	-
4	62	38	-	-
5	63,5	36,5	-	-
6	63,5	26,5	10	-
7	53,5	36,5	10	-
8	60	35	5	-
9	63	32	5	-
10	63,5	31,5	-	5
11	58,5	36,5	-	5
12	55	40	-	5
13	60	36	-	4
14	65	31	-	4

Na Obr.16. – Obr.20. jsou uvedeny ukázky chromatografických záznamů z měření na těchto kolonách.

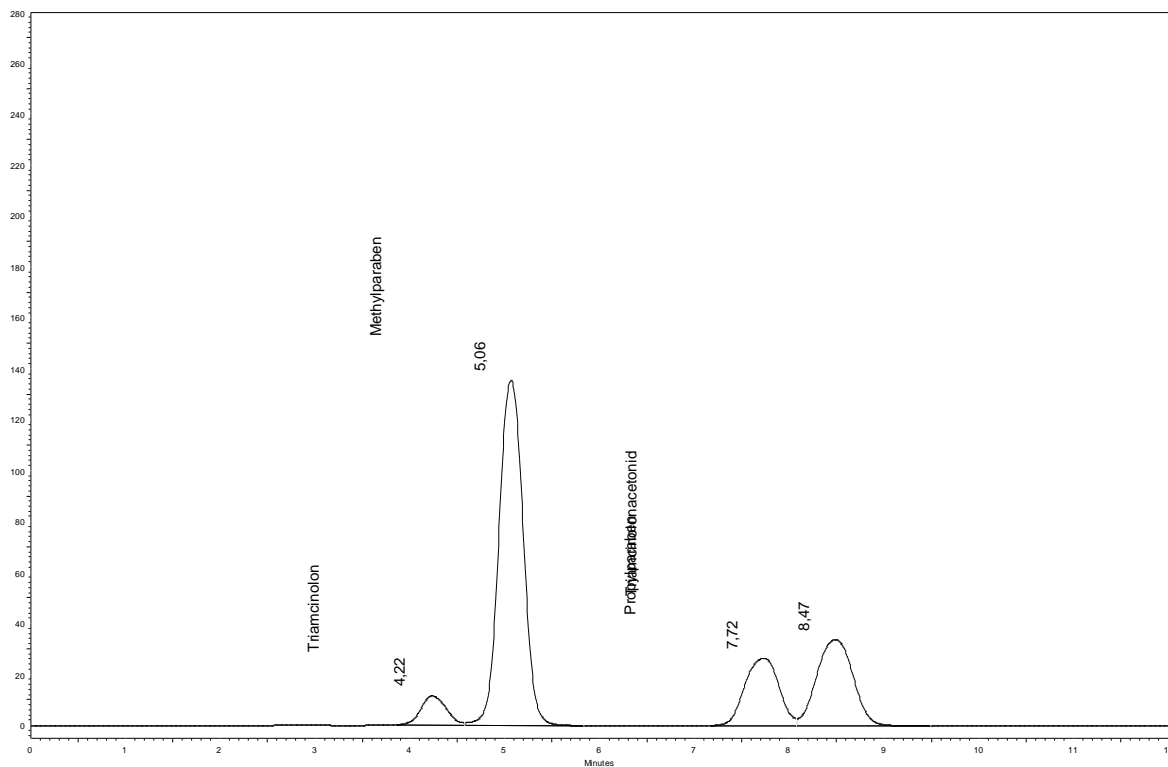
Obr.16.: Agilent Zorbax® SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H2O:ACN (60:40 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



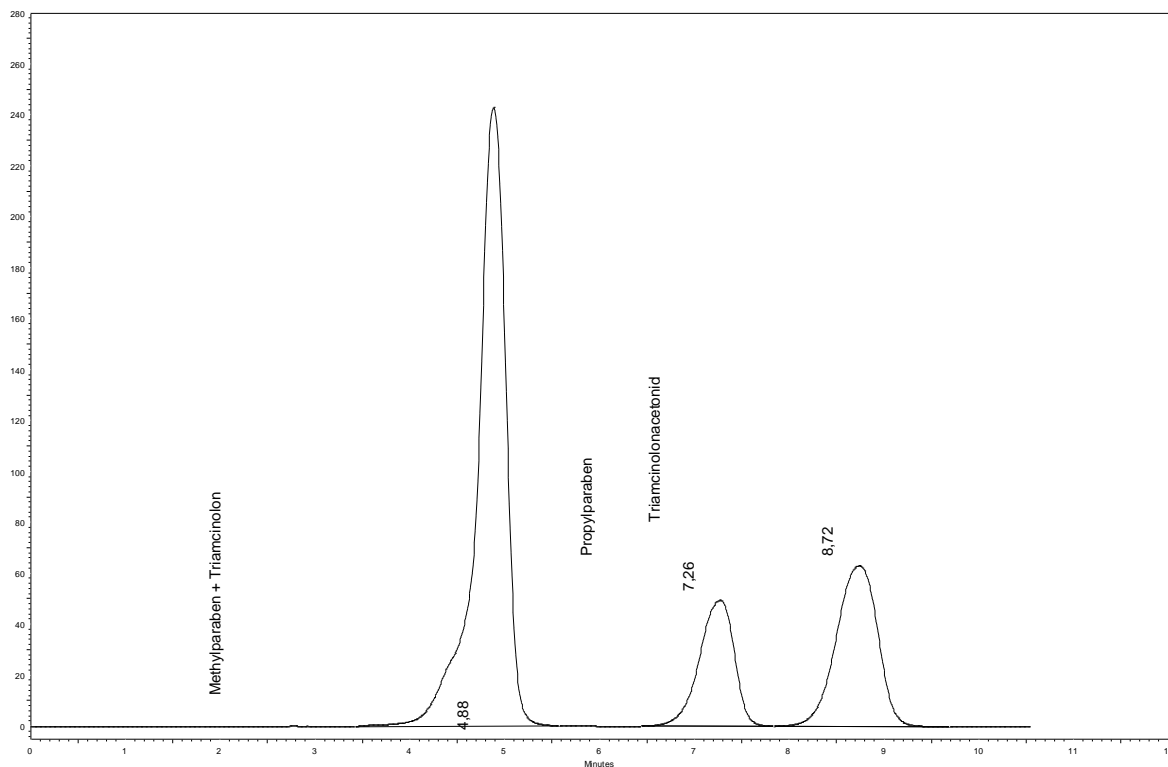
Obr.17.: Agilent Zorbax® SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H2O:ACN (65:35 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



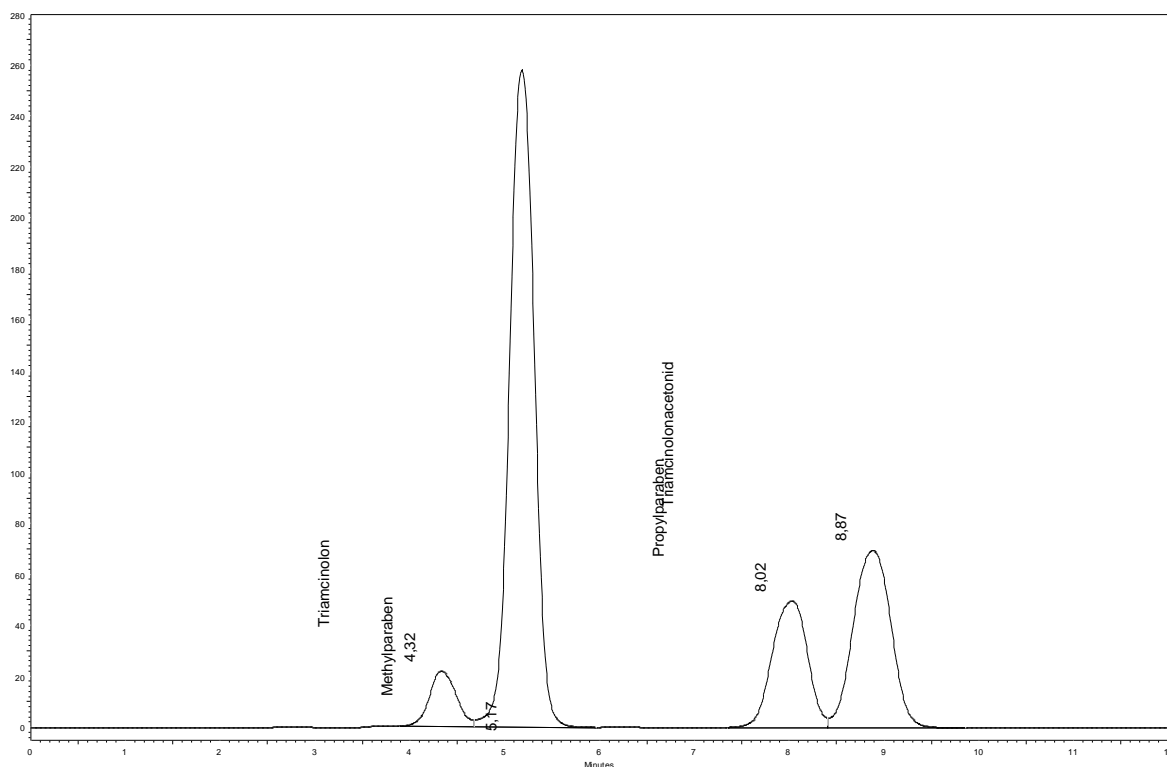
Obr.18.: Agilent Zorbax® SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (62:38 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



Obr.19.: Agilent Zorbax® SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN:MeOH (60:35:5 v/v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



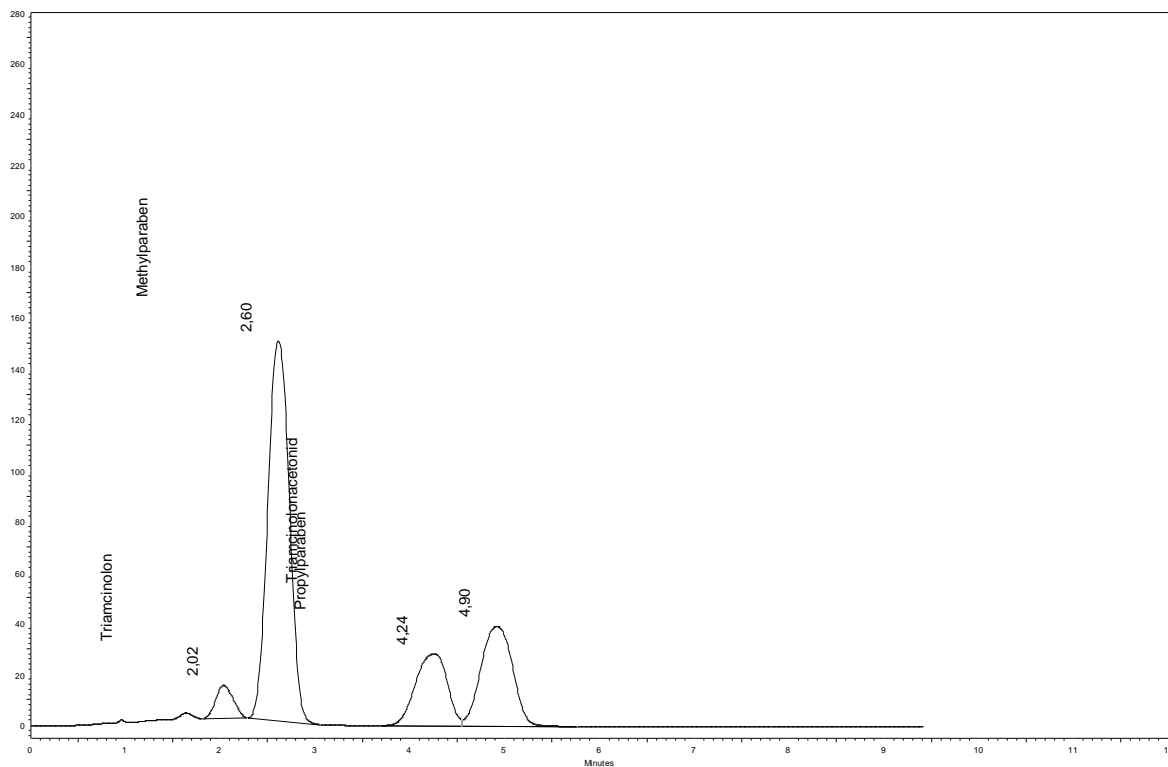
Obr.20.: Agilent Zorbax® SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN:THF (60:36:4 v/v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



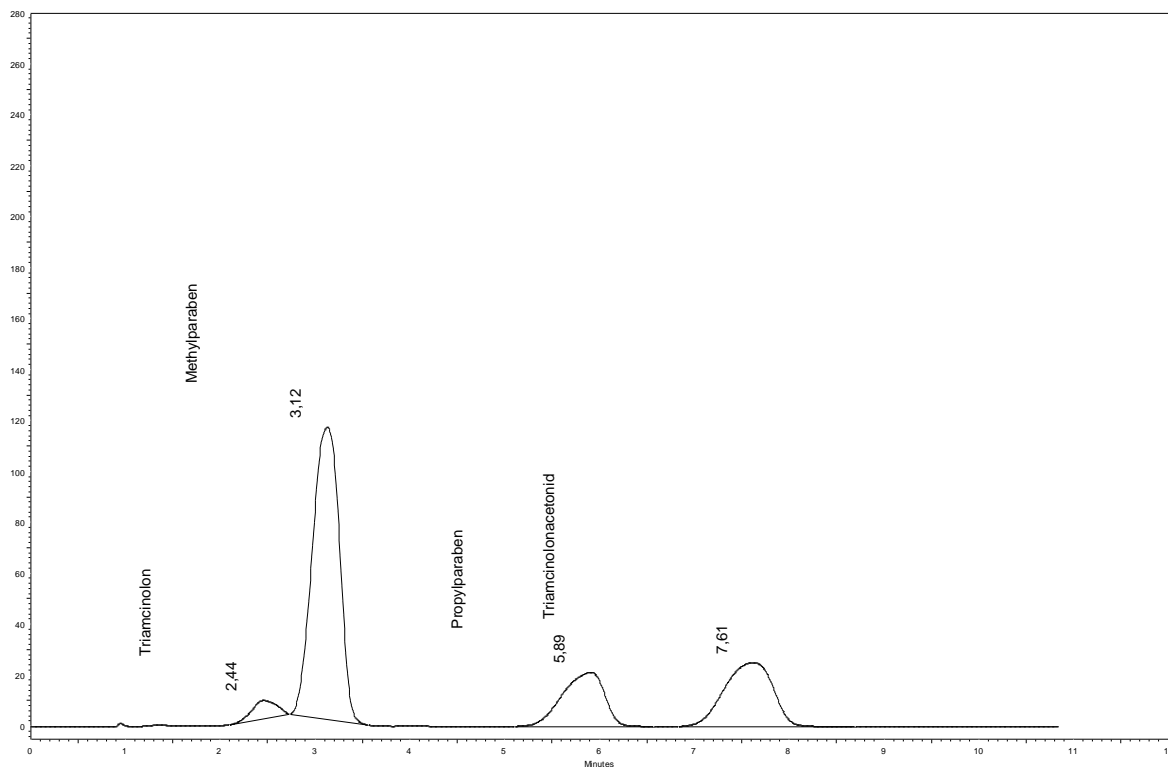
Jak je patrné z chromatografických záznamů (Obr.16. – Obr.20.), dané podmínky nevedly k dokonalému separačnímu procesu u všech látek, konkrétně nebylo možné oddělit triamcinolon od methylparabenu nebo naopak píky propylparabenu a triamcinolonacetonidu nebyly rozděleny na základní linii. Taktéž tvar píků nebyl optimální.

Proto následovala další změna typu analytické kolony – AK s vázanou phenylovou stacionární fází (Agilent Zorbax® SB-PHENYL (75 x 4.6 mm; 3.5 µm)). Ačkoli bylo zkoušeno několik MF, výsledky na této AK byly také neuspokojivé (Obr.21. a Obr.22.)

Obr.21.: Agilent Zorbax® SB-PHENYL (75 x 4.6 mm; 3.5 µm), MF – H2O:ACN (60:40 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min

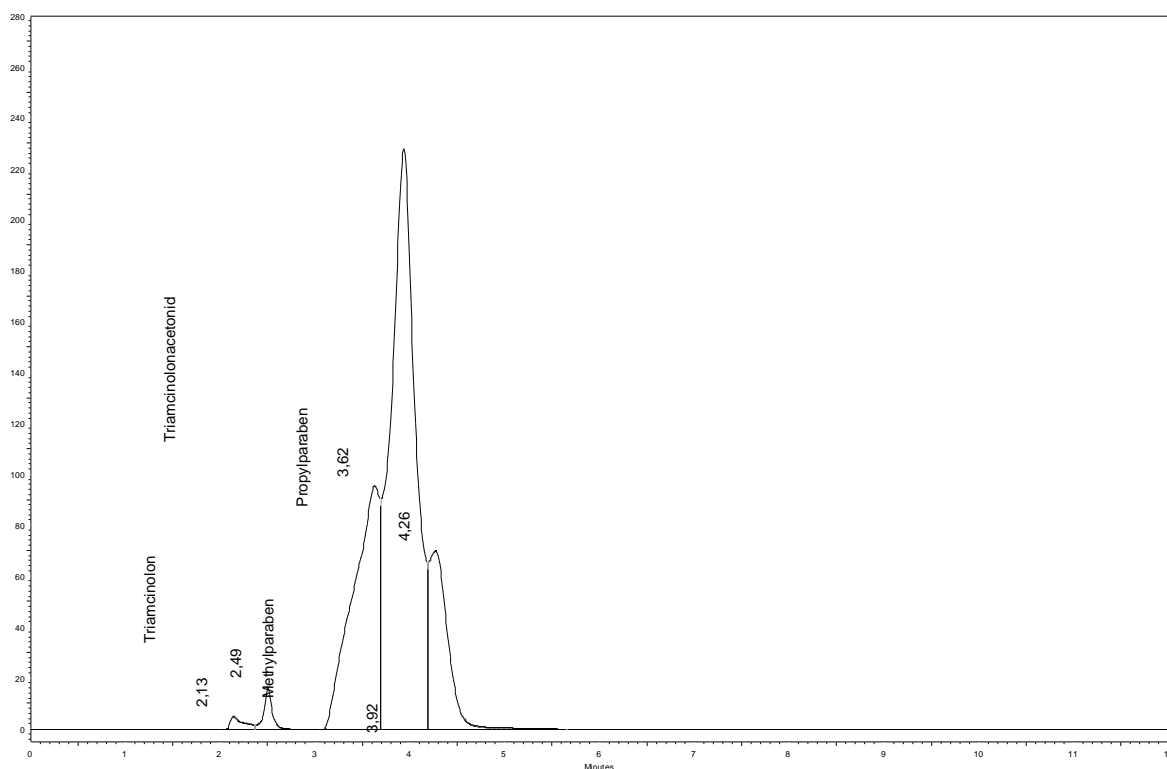


Obr.22.: Agilent Zorbax® SB-PHENYL (75 x 4.6 mm; 3.5 µm), MF – H2O:ACN (65:35 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,6 ml/min



Další testovanou kolonou byla AK Agilent Zorbax® TMS (250 x 4.6 mm; 5 µm). Na koloně s touto SF nedocházelo téměř k žádné separaci, proces rozdělování byl jen nepatrně naznačen (jak je zřejmé z Obr.23.). Úprava MF nevedla ke zvýšení účinnosti chromatografického procesu.

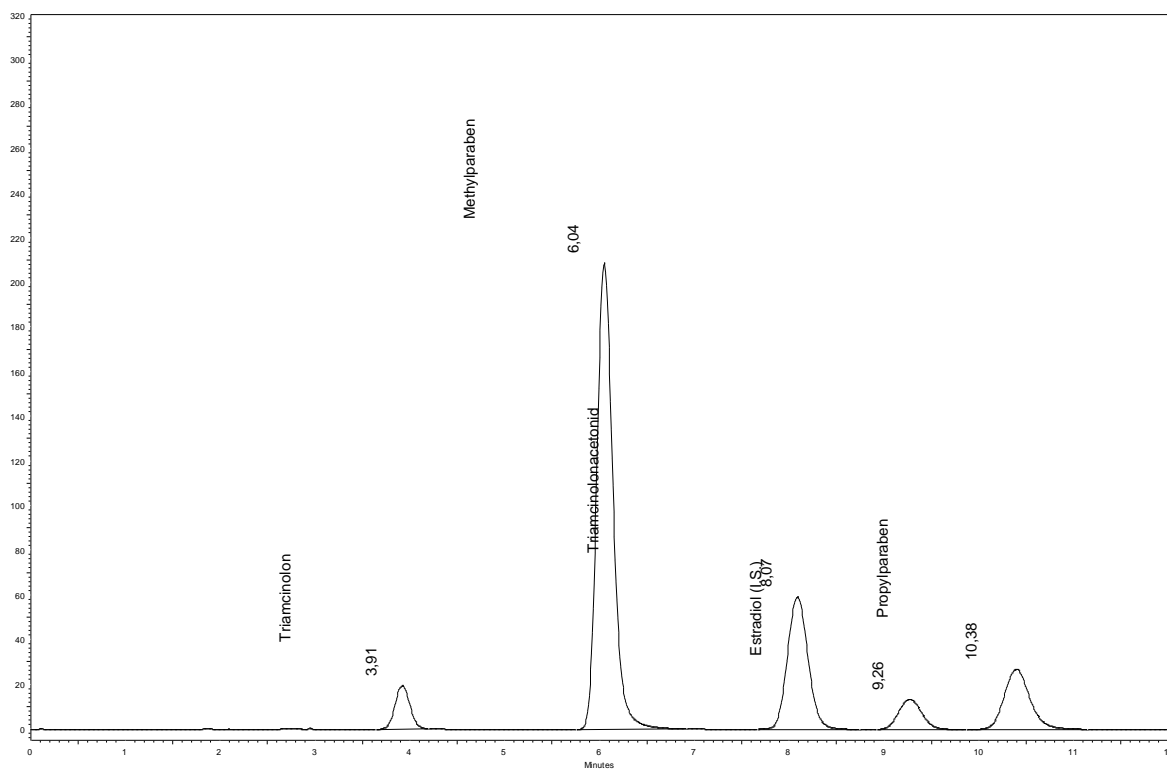
Obr.23.: Agilent Zorbax® TMS (250 x 4.6 mm; 5 µm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (60:40 v/v), nástřik - 20 µl, průtok – 0,7 ml/min



Následovala další změna chromatografických podmínek – měření bylo prováděno na AK Supelco Discovery® HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm). Až u této kolony bylo dosaženo relativně optimálního dělicího procesu a to už při první zkoušené mobilní fázi.

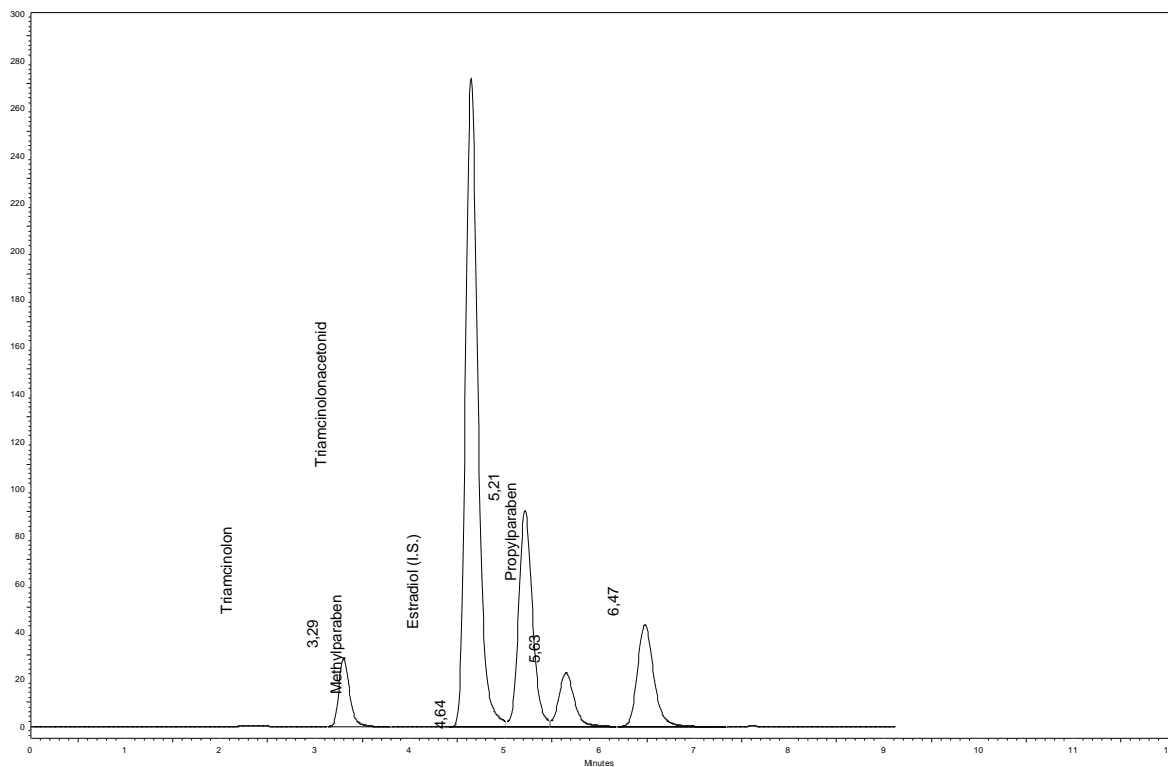


Obr.24.: Supelco Discovery<sup>®</sup> HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm), MF – H<sub>2</sub>O:ACN (60:40 v/v), nástřik - 10 μl, průtok – 0,6 ml/min

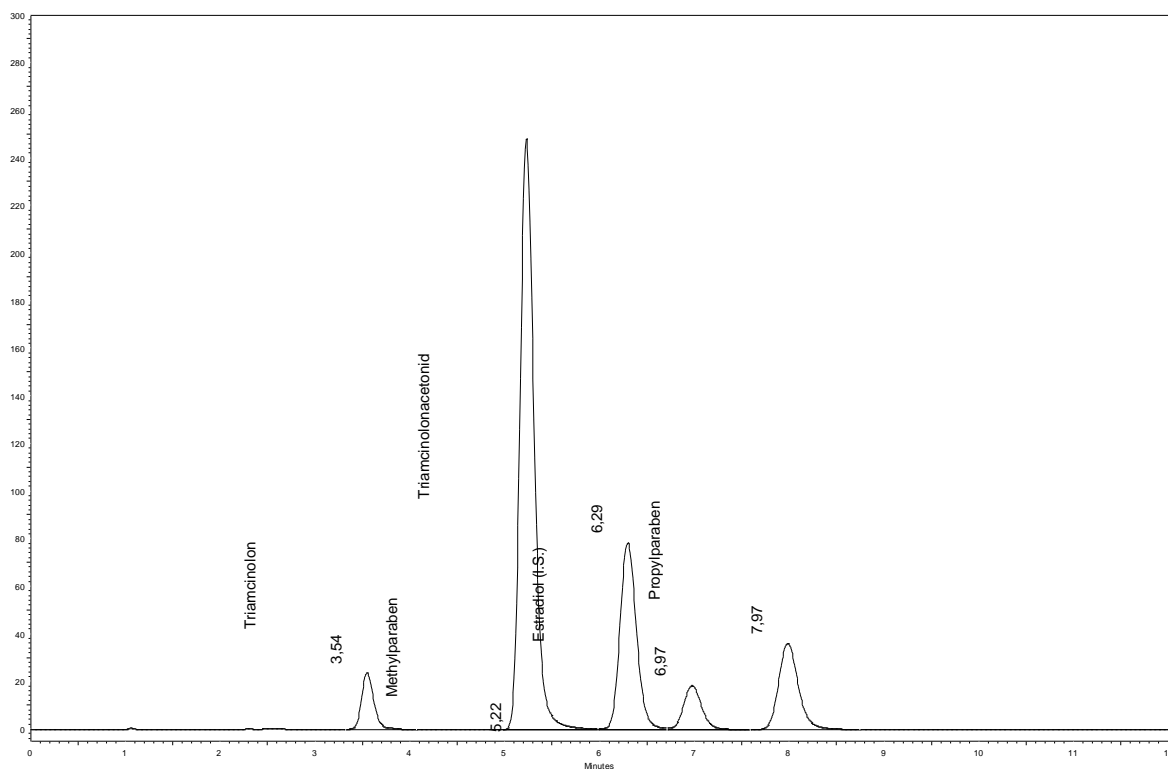


Jak je patrné z Obr.24., k rozdělení sledovaných látek dochází na základní linii, avšak analýza je příliš dlouhá a tudíž byla tendence celkový čas analýzy zkrátit a to úpravou složení MF(viz Obr.25. a Obr.26.).

Obr.25.: Supelco Discovery<sup>®</sup> HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm), MF –  
H2O:ACN (50:50 v/v), nástřik - 10 μl, průtok – 0,6 ml/min



Obr.26.: Supelco Discovery<sup>®</sup> HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm), MF –  
H2O:ACN (55:45 v/v), nástřik - 10 μl, průtok – 0,6 ml/min



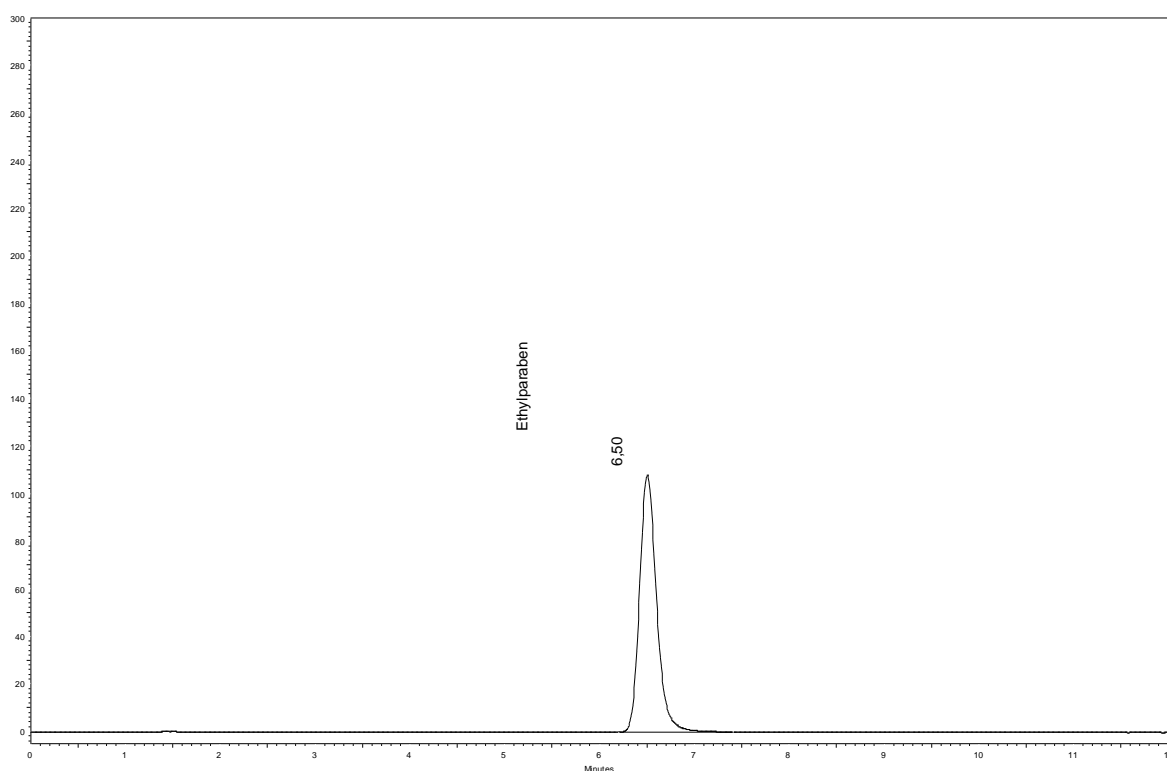
Teprve tato analytická kolona (Supelco Discovery<sup>®</sup> HSF5 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm)) a složení MF – voda : acetonitril v poměru 55 : 45 (v:v) vedlo k dostačujícímu a přitom časově přijatelnému chromatografickému separačnímu procesu a bylo zvoleno za optimální a dále využíváno.

#### 4.1.3 Hledání vnitřního standardu

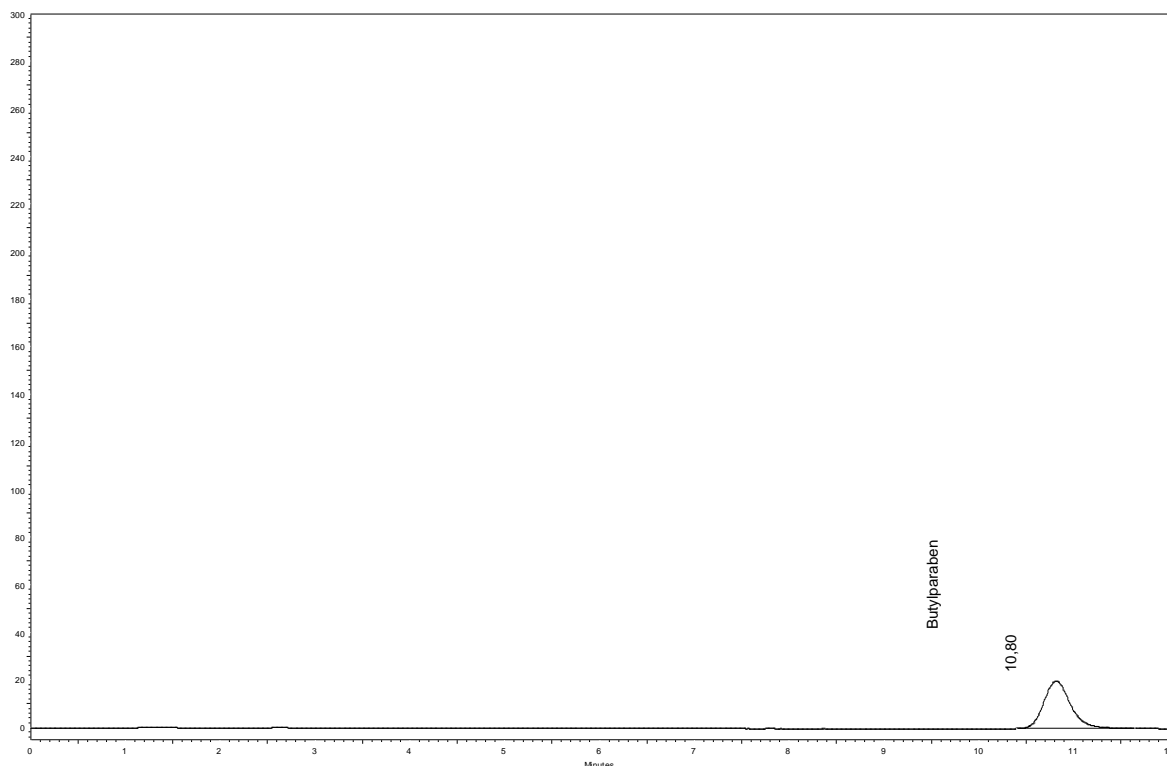
Při hledání vhodného IS bylo nutné najít takovou látku, která bude splňovat některé požadavky kladené na vnitřní standard, jmenovitě podobná chemická struktura a retenční vlastnosti, přičemž její pík musí být zřetelně oddělen od píků ostatních analytů. Taky cena není nezanedbatelným kritériem.

Hledání bylo vzhledem k relativně vysokému počtu stanovovaných látek zahájeno už během optimalizace chromatografických podmínek. Pro danou směs látek byly jako IS už trochu tradičně testovány parabeny, konkrétně ethylparaben a butylparaben. Na Obr.27. a Obr.28. jsou uvedeny chromatografické záznamy potenciálních vnitřních standardů.

Obr.27.: Chromatografický záznam ethylparabenu



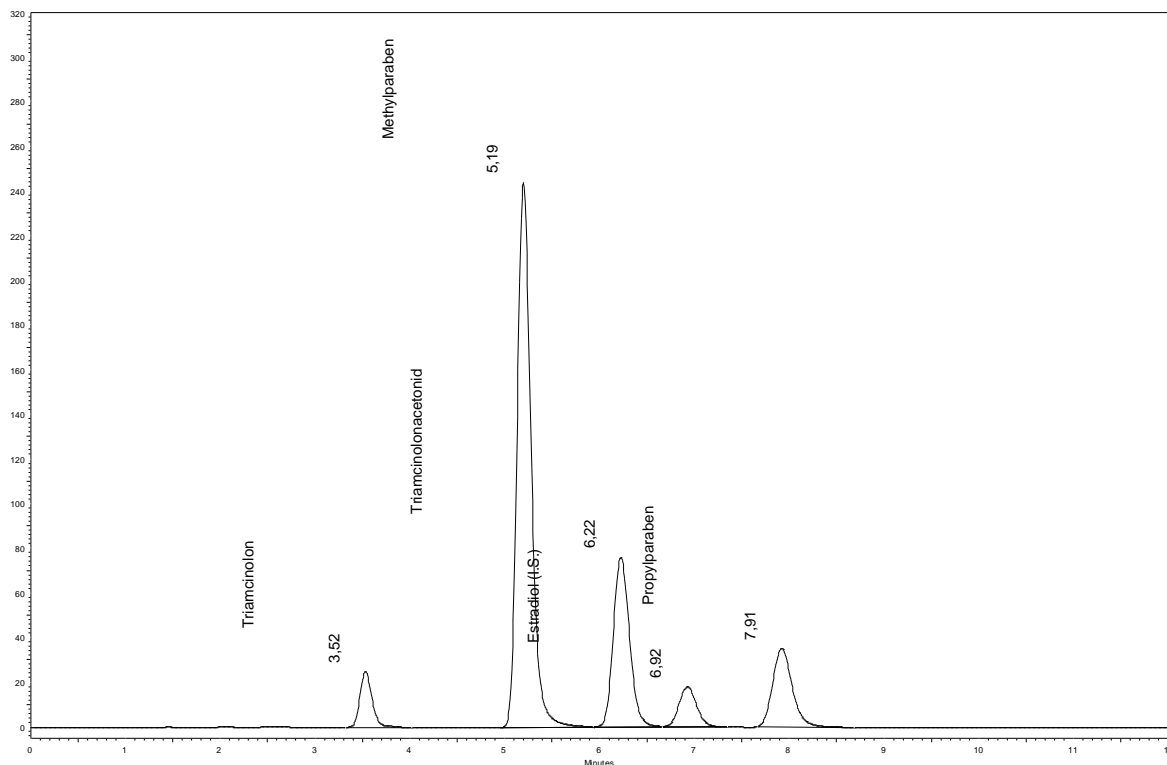
Obr.28.: Chromatografický záznam butylparabenu



Z uvedených záznamů je patrné, že ethylparaben není možné za uvedených chromatografických podmínek použít jako IS, jelikož se eluuje v přibližně stejném retenčním čase jako hlavní účinná látka triamcinolon-acetonid. Naproti tomu použití butylparabenu by bylo možné, avšak na úkor prodloužení analýzy.

Další chemickou sloučeninou zkoušenou pro tento účel byl estradiol. Jeho pík se nacházel mezi píky triamcinolonacetonidu a propylparabenu a neinterferoval s žádnou ze složek směsi stanovovaných látek a neprodlužoval čas analýzy, a proto byl pro tuto metodu vhodný (viz Obr.29.).

Obr.29.: Chromatografický záznam standardních látek a vnitřního standardu estradiolu



#### 4.1.4 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

<b>Mobilní fáze:</b>	voda : acetonitril (55:45 v/v)
<b>Analytická kolona:</b>	Supelco Discovery <sup>®</sup> HSF5 (150 x 4.6 mm; 5 μm)
<b>Průtoková rychlost <math>f_m</math>:</b>	0,6 ml/min
<b>Vlnová délka detekce:</b>	240 nm
<b>Vnitřní standard:</b>	Estradiol
<b>Dávkovaný objem:</b>	10 μl
<b>Režim:</b>	izokratický
<b>Teplota:</b>	laboratorní

#### 4.1.5 Stanovení obsahu triamcinolon-acetonidu, methylparabenu a propylparabenu v krému

- 1) Připraví se roztoky standardů v acetonitrilu s obsahem 5 mg/100 ml estradiolu (IS), 5 mg/100 ml methylparabenu,

1,25 mg/100 ml propylparabenu, 0,5 mg/100 ml triamcinolonu (nečistota) a 2,5 mg/100 ml triamcinolon-acetonidu ze dvou samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.

- 2) Provedou se dvě nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeném v Kap. 3.4.1. Supernatant odpovídající příslušné navážce se změří třikrát.
- 3) Výpočet obsahu triamcinolon-acetonidu, methylparabenu a propylparabenu se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{ISV} \cdot m_S \cdot F \cdot 100}{A_S / A_{ISS} \cdot m_V \cdot Z}$$

- $A_V$**  plocha píku stanovované látky z nástřiku roztoku vzorku  
 **$A_{ISV}$**  plocha píku IS estradiolu z nástřiku roztoku vzorku  
 **$A_S$**  plocha píku stanovované látky z nástřiku roztoku standardů  
 **$A_{ISS}$**  plocha píku IS estradiolu z nástřiku roztoku standardů  
 **$m_S$**  navážka TA (MP, PP) v g  
 **$m_V$**  navážka vzorku krému v g  
 **$F$**  faktor korekce na obsah referenční látky (viz Tab.9.)  
 **$Z$**  faktor zředění ( $Z = 5$ )

Tab.9.: Faktor korekce

Látka	$F$ (%)
Methylparaben	98,91
Propylparaben	99,50
Triamcinolon	99,63
Triamcinolonacetonid	100,71

(pozn. Faktory korekce uvedené v Tab.9. se vztahují k čistotě standardních látek (pracovních standardů), které byly používány při přípravě roztoku standardů, nemají tedy obecnou platnost)

## **4.2 Validace metody**

### **4.2.1 Test vhodnosti HPLC systému**

#### **4.2.1.1 Opakovatelnost**

Na analytickou kolonu byl opakovaně nastříknut roztok standardů v acetonitrilu o koncentraci:

Estradiol	4,977 mg/100 ml
Methylparaben	5,261 mg/100 ml
Propylparaben	1,253 mg/100 ml
Triamcinolon	0,556 mg/100 ml
Triamcinolon-acetonid	2,563 mg/100 ml

Výpočet směrodatné odchylky pro retenční čas ( $t_R$ ) a plochu píku ( $A$ ) byl prováděn pomocí programu Microsoft Excel 2000.

Výsledky jsou uvedeny v Tab.10. – Tab.14.

Tab.10.: Opakovatelnost – estradiol

<b>Estradiol</b>		
<b>číslo pokusu</b>	<b>A</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>
1	248141	6,98
2	245496	6,97
3	247753	6,97
4	246818	6,96
5	246696	6,96
6	245883	6,95
7	245003	6,94
8	245014	6,93
<i>n</i>	8	8
$\bar{x}$	246351	6,96
<i>s</i>	1198,90	0,0167
<b><math>s_R(\%)</math></b>	<b>0,49</b>	<b>0,24</b>

Tab.11.: Opakovatelnost – methylparaben

<b>Methylparaben</b>		
<b>Číslo pokusu</b>	<b>A</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>
1	2550099	5,23
2	2554914	5,23
3	2551332	5,23
4	2553002	5,21
5	2552939	5,22
6	2550179	5,21
7	2545618	5,21
8	2541276	5,20
<i>n</i>	8	8
$\bar{x}$	2549920	5,22
<i>s</i>	4454,08	0,0116
<b><math>s_R(\%)</math></b>	<b>0,17</b>	<b>0,22</b>



Tab.12.: Opakovatelnost – propylparaben

Propylparaben		
Číslo pokusu	A	$t_R$ (min)
1	525338	8,00
2	523827	7,98
3	524783	7,98
4	524547	7,96
5	526792	7,96
6	524283	7,95
7	521153	7,94
8	520644	7,93
<i>n</i>	8	8
$\bar{x}$	523921	7,96
<i>s</i>	2067,64	0,0231
$s_R(\%)$	<b>0,39</b>	<b>0,29</b>

Tab.13.: Opakovatelnost – triamcinolon

Triamcinolon		
Číslo pokusu	A	$t_R$ (min)
1	214323	3,54
2	214430	3,54
3	214682	3,54
4	213961	3,53
5	214760	3,53
6	214022	3,54
7	214279	3,53
8	213914	3,53
<i>n</i>	8	8
$\bar{x}$	214296	3,54
<i>s</i>	319,93	0,0053
$s_R(\%)$	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>

Tab.14.: Opakovatelnost – triamcinolon-acetonid

Triamcinolon-acetonid		
číslo pokusu	A	$t_R$ (min)
1	945850	6,29
2	945145	6,29
3	946895	6,29
4	945559	6,28
5	945392	6,28
6	944898	6,28
7	942892	6,28
8	942123	6,26
<i>n</i>	8	8
$\bar{x}$	944844	6,28
<i>s</i>	1573,80	0,0099
$s_R(\%)$	<b>0,17</b>	<b>0,16</b>

Při testování opakovatelnosti analýzy se při osminásobném opakování nástřiku roztoku standardů pohybovala směrodatná odchylka  $s_R(\%)$  ploch píků (A) a retenčních časů ( $t_R$ ) pod 1%.

#### 4.2.1.2 Účinnost chromatografické kolony

Pro výpočet účinnosti byly brány hodnoty získané jako průměr ze tří analýz roztoku standardů v testu na opakovatelnost. Účinnost kolony byla vyjádřena jako počet teoretických pater  $N$ , který byl počítán podle vzorce uvedeného v Kap. 2.6.1.2.

Tab.15.: Počet teoretických pater

Analyzovaná látka	$t_R$ (min)	$w_h$ (min)	$N$
<b>Estradiol</b>	6,96	0,204	<b>6454</b>
<b>Methylparaben</b>	5,22	0,155	<b>6289</b>
<b>Propylparaben</b>	7,96	0,220	<b>7259</b>
<b>Triamcinolon</b>	3,54	0,135	<b>3813</b>
<b>Triamcinolonacetonid</b>	6,28	0,185	<b>6390</b>

n=3

Požadavek pro 15 cm dlouhou kolonu je minimálně  $N = 1500$  a je splněn u všech sledovaných látek.

#### 4.2.1.3 *Asymetrie chromatografických píků*

Asymetrie chromatografických píků  $T$  byla vypočtena podle vzorce uvedeného v Kap. 2.6.1.3 a to odečtením z chromatogramů získaných nástřikem roztoku standardů pro opakovatelnost. Výsledky v Tab.16. jsou průměrem ze tří hodnot.

Tab.16.: Asymetrie chromatografických píků

Analyzovaná látka	$w_{0,05}$ (min)	$f$ (min)	$T$
<b>Estradiol</b>	0,457	0,209	<b>1,09</b>
<b>Methylparaben</b>	0,351	0,148	<b>1,11</b>
<b>Propylparaben</b>	0,498	0,209	<b>1,19</b>
<b>Triamcinolon</b>	0,306	0,131	<b>1,17</b>
<b>Triamcinolonacetonid</b>	0,406	0,178	<b>1,14</b>

n = 3

Asymetrie píků u hodnocených látek byla nižší než maximální povolená hodnota  $T = 1,2$ .

#### 4.2.1.4 Rozlišení chromatografických píků

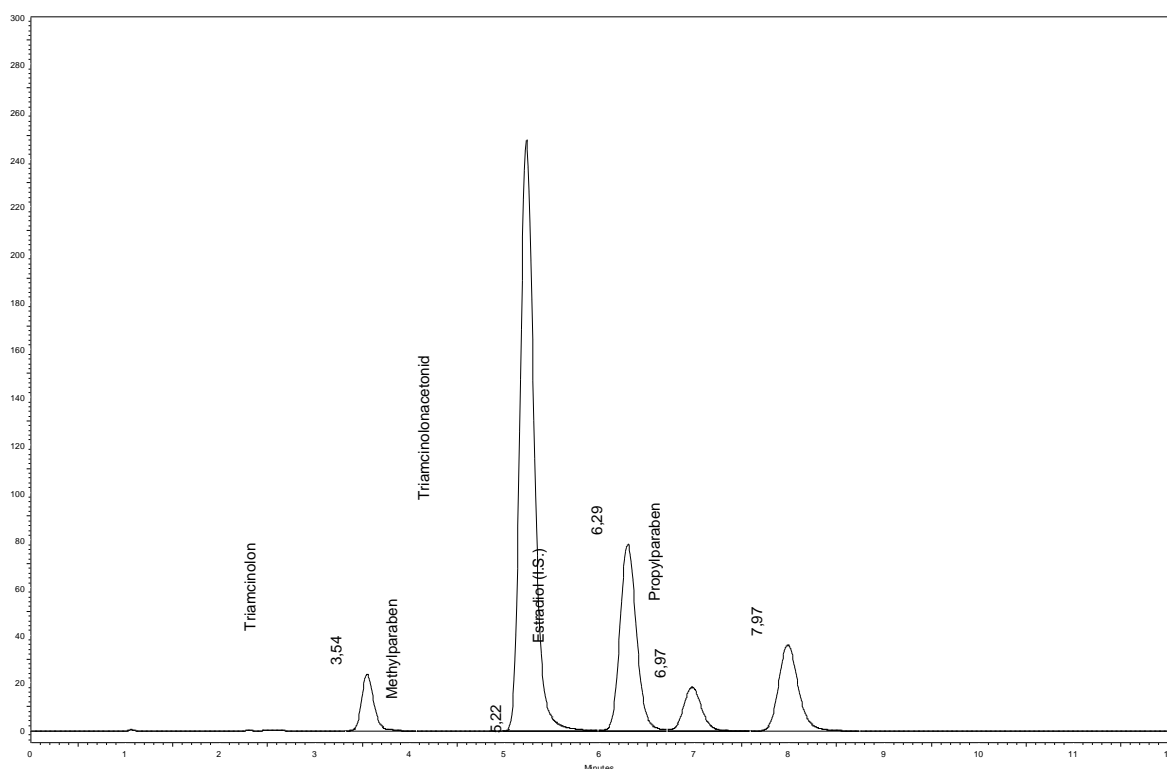
Rozlišení bylo počítáno pomocí chromatografické stanice Shimadzu CLASS-VP, podle vzorce uvedeného v Kap. 2.6.1.4. Výsledky uvedeny v Tab.17. jsou průměrem ze tří hodnot získaných proměřením roztoku standardů při zkoušce opakovatelnosti.

Tab.17.: Rozlišení chromatografických píků

Hodnocené látky	$R_{ij}$
Estradiol – propylparaben	6,67
Methylparaben – triamcinolonacetonid	3,63
Triamcinolon – methylparaben	2,02
Triamcinolonacetonid – estradiol	2,73

n = 3

Obr.30.: Ukázka chromatogramu dokumentující rozlišení



Hodnoty rozlišení chromatografických píků u všech sledovaných látek splňují požadavek  $R_{ij} > 1,5$ .

#### 4.2.2 Přesnost

Bylo analyzováno šest roztoků vzorku Triamcinolon krém HBF, vzorek č. VV 051/07, které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v Kap. 3.4.1. Plochy píků uvedeny v Tab.18. jsou průměrem ze tří měření a jsou přepočtené na navážku 0,5000 g krému.

Tab.18.: Přesnost

Roztok č.	Plocha píku (m = 0,5000 g)		
	Methylparaben	Propylparaben	Triamcinolonacetonid
1	2550211	556579	820995
2	2580563	563230	825498
3	2598506	568603	827601
4	2568987	562449	831543
5	2546250	558151	831146
6	2605481	568772	835646
<i>n</i>	6	6	6
$\bar{x}$	2575000	562964	828738
<i>s</i>	24453,18	5095,33	5160,02
<i>s<sub>R</sub></i> (%)	<b>0,95</b>	<b>0,91</b>	<b>0,62</b>

Při testování přesnosti se hodnota směrodatné odchylky  $s_R$  ploch píků pohybovala pod 5%.

##### 4.2.2.1 Přesnost pro nečistotu

Bylo analyzováno šest roztoků vzorku Triamcinolon krém (placebo bez ÚL, PP, MP), vzorek č. VV 084/07, které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v Kap. 3.4.1, (pozn. Do centrifugační zkumavky byl odměřován roztok standardních látek triamcinolonu (nečistota) a estradiolu (IS)). Výsledky uvedeny v Tab.19. jsou průměrem ze tří měření.

Tab.19.: Přesnost pro nečistotu

Vzorek číslo	Plocha píku (A) Triamcinolonu
1	206815
2	206612
3	209868
4	210984
5	210720
6	210349
<i>n</i>	6
$\bar{x}$	209225
<i>s</i>	1981,98
<i>s<sub>R</sub></i> (%)	<b>0,95</b>

Při testování přesnosti pro nečistotu byla směrodatná odchylka  $s_R(\%)$  ploch píků pod 5%.

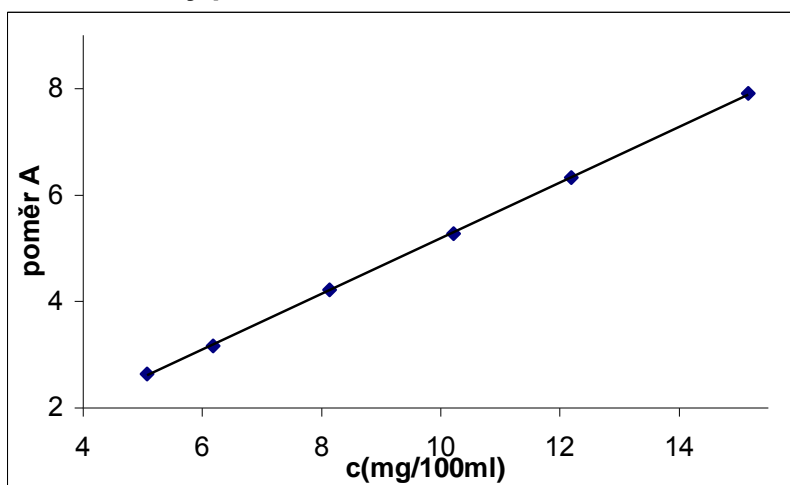
#### 4.2.3 *Linearita*

Pro hodnocení linearity byla použita metoda vnitřního standardu (jako vnitřní standard byl použit estradiol). Bylo připraveno šest kalibračních roztoků pracovních standardů methylparabenu, propylparabenu, triamcinolonu a triamcinolon-acetonidu (připravené koncentrace jsou uvedeny v tabulkách – Obr.31. – Obr.34.), přídavek IS byl 5 mg/100 ml. Poměr ploch píků pro každou koncentraci je průměrem ze tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost  $A_{\text{látka}}/A_{\text{IS}}$  kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese v programu Microsoft Excel 2000.

Obr.31.: Linearita – methylparaben

### Methylparaben

c(mg/100ml)	poměr A
5,0789	2,6356
6,1803	3,1628
8,1452	4,2170
10,2221	5,2713
12,1989	6,3255
15,1691	7,9069



Regresní funkce :  $y = kx + q$

počet bodů  $n = 6$

počet stupňů volnosti  $v = 4$

#### Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 0,5234$	$\pm 0,0029$
absolutní člen	$q = -0,052$	$\pm 0,029$

koeficient korelace  $R = 0,999938$

reziduální odchylka  $s_{rez} = 0,0248$

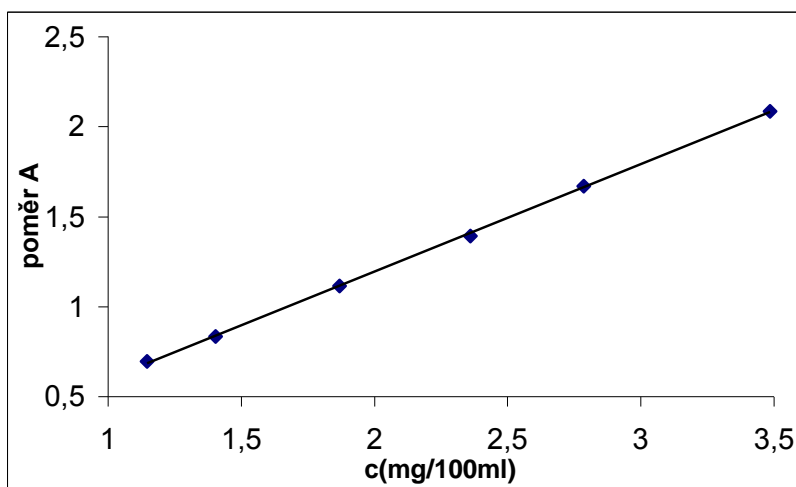
hodnota F-statistiky  $F = 3,23E+4$

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9%

Obr.32.: Linearita – propylparaben

**Propylparaben**

c(mg/100ml)	poměr A
1,1482	0,6950
1,4056	0,8340
1,8696	1,1120
2,3614	1,3900
2,7865	1,6680
3,4863	2,0850



**Regresní funkce :  $y = kx + q$**

**počet bodů  $n = 6$                       počet stupňů volnosti  $v = 4$**

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
<b>směrnice</b>	<b>k =</b>	0,5968	$\pm$ 0,0059
<b>absolutní člen</b>	<b>q =</b>	-0,002	$\pm$ 0,014

<b>koeficient korelace</b>	<b>R =</b>	0,99981
<b>reziduální odchylka</b>	<b>s<sub>rez</sub> =</b>	0,0116

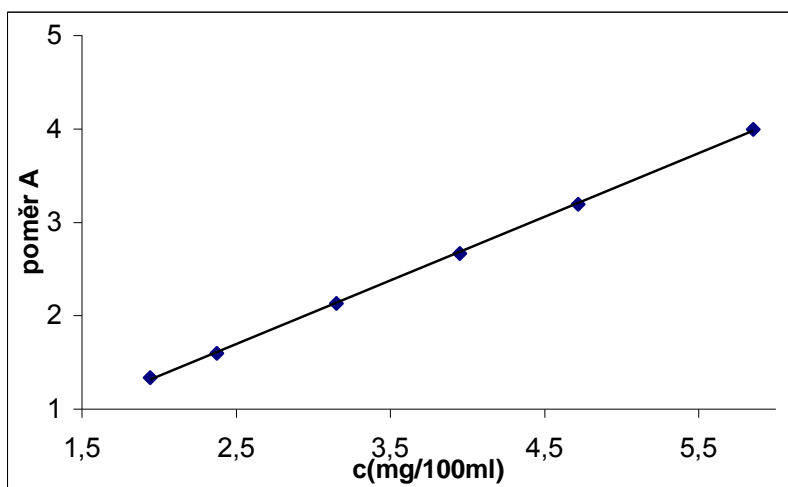
**hodnota F-statistiky    F = 1,03E+4**  
**Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9%**



Obr.33.: Linearita – triamcinolon-acetonid

**Triamcinolonacetonid**

c(mg/100ml)	poměr A
1,9458	1,3306
2,3748	1,5968
3,1509	2,1290
3,9507	2,6613
4,7210	3,1935
5,8560	3,9919



**Regresní funkce :  $y = kx + q$**

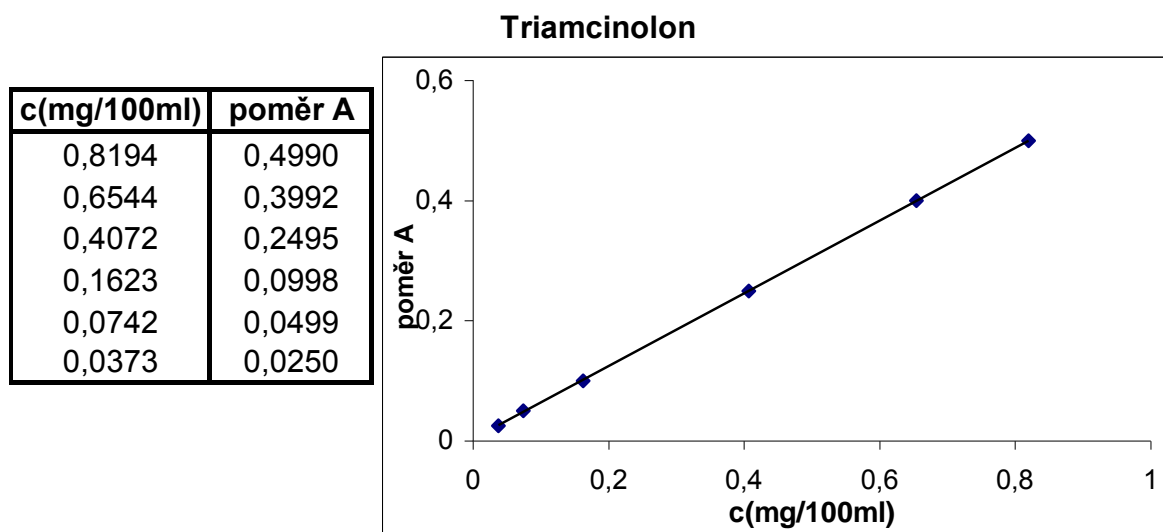
**počet bodů  $n = 6$                       počet stupňů volnosti  $v = 4$**

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
<b>směrnice</b>	<b>k =</b>	0,6813	$\pm$ 0,0049
<b>absolutní člen</b>	<b>q =</b>	-0,014	$\pm$ 0,019

<b>koeficient korelace</b>	<b>R =</b>	0,99990
<b>reziduální odchylka</b>	<b>s<sub>rez</sub> =</b>	0,0161

<b>hodnota F-statistiky</b>	<b>F =</b>	1,96E+4
<b>Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9%</b>		

Obr.34.: Linearita – triamcinolon



**Regresní funkce :  $y = kx + q$**

**počet bodů  $n = 6$                       počet stupňů volnosti  $v = 4$**

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
<b>směrnice</b>	<b>k</b> =	0,6052	± 0,0018
<b>absolutní člen</b>	<b>q</b> =	0,00303	± 0,00082

<b>koeficient korelace</b>	<b>R</b> =	0,999983
<b>reziduální odchylka</b>	<b>s<sub>rez</sub></b> =	0,00128

<b>hodnota F-statistiky</b>	<b>F</b> =	1,18E+5
<b>Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9%</b>		

Koeficient korelace byl  $R > 0,9990$  u v šech sledovaných látek. Z výše uvedených údajů vyplývá, že závislost plochy píku na koncentraci stanovované látky je lineární a metoda je použitelná pro kvantitativní analýzu.

#### 4.2.4 **Správnost**

Byl změřen roztok standardů:

$$C_{0(MP)} = 5,261 \text{ mg/100 ml}$$

$$C_{0(PP)} = 1,253 \text{ mg/100 ml}$$

$$C_{0(TA)} = 2,563 \text{ mg/100 ml, měření bylo provedeno šestkrát.}$$

Dále bylo analyzováno šest modelových vzorků (placebo + methylparaben + propylparaben + triamcinolonacetonid), které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v Kap. 3.4.1 s přidavkem roztoku standardů o koncentraci  $c_0$ .

Výsledky jsou uvedeny v Tab.20. – Tab.22. Výtěžnost  $R_i(\%)$  byla vypočtena podle vzorce uvedeného v Kap. 2.6.2.1.

Tab.20.: Správnost - methylparaben

<b>Methylparaben</b>				
<b>Vzorek č.</b>	<b><math>c_0</math> (mg/100 ml); n = 6</b>	<b><math>A_i</math></b>	<b><math>c_i</math> (mg/100 ml)</b>	<b><math>R_i(\%)</math></b>
<b>1</b>	5,261 odpovídá $A_0$ : 2549919,9	2494875,7	5,1474	97,84
<b>2</b>		2496885,0	5,1516	97,92
<b>3</b>		2494850,0	5,1474	97,84
<b>4</b>		2496080,0	5,1499	97,89
<b>5</b>		2468925,7	5,0939	96,82
<b>6</b>		2503851,3	5,1660	98,19
		<b><math>n</math></b>	<b>6</b>	
		<b><math>R_p(\%)</math></b>	<b>97,75</b>	
		<b><math>s</math></b>	<b>0,473</b>	
		<b><math>s_R(\%)</math></b>	<b>0,48</b>	

Tab.21.: Správnost - propylparaben

<b>Propylparaben</b>				
<b>Vzorek č.</b>	<b><math>c_0</math> (mg/100 ml); n = 6</b>	<b><math>A_i</math></b>	<b><math>c_i</math> (mg/100 ml)</b>	<b><math>R_i</math> (%)</b>
1	1,253 odpovídá $A_0$ : 523920,9	513069,3	1,2270	97,93
2		512821,3	1,2265	97,88
3		511733,3	1,2239	97,67
4		513986,3	1,2292	98,10
5		510069,7	1,2199	97,36
6		514196,7	1,2297	98,14
			<b><math>N</math></b>	<b>6</b>
			<b><math>R_p</math> (%)</b>	<b>97,85</b>
			<b><math>s</math></b>	<b>0,294</b>
			<b><math>s_R</math> (%)</b>	<b>0,30</b>

Tab.22.: Správnost – triamcinolon-acetonid

<b>Triamcinolon-acetonid</b>				
<b>Vzorek č.</b>	<b><math>c_0</math> (mg/100 ml); n = 6</b>	<b><math>A_i</math></b>	<b><math>c_i</math> (mg/100 ml)</b>	<b><math>R_i</math> (%)</b>
1	2,563 odpovídá $A_0$ : 944844,3	919192,7	2,4934	97,29
2		924722,3	2,5084	97,87
3		928760,7	2,5194	98,30
4		927904,3	2,5170	98,21
5		920839,3	2,4979	97,46
6		929709,0	2,5219	98,40
			<b><math>n</math></b>	<b>6</b>
			<b><math>R_p</math> (%)</b>	<b>97,92</b>
			<b><math>s</math></b>	<b>0,463</b>
			<b><math>s_R</math> (%)</b>	<b>0,47</b>

Požadavek, aby  $R_p(\%) = 95-105\%$  a  $s_R(\%) < 5\%$  byl splněn u všech sledovaných látek.

#### **4.2.5 Selektivita**

Separace triamcinolon-acetonidu ( $c = 2,493 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ), methylparabenu ( $c = 4,964 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ) a propylparabenu ( $c = 1,598 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ) je dokumentována na chromatogramu standardů s přidavkem interního standardu estradiolu ( $c = 5,058 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ) a nečistoty triamcinolonu ( $c = 0,589 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ), viz Obr.35.

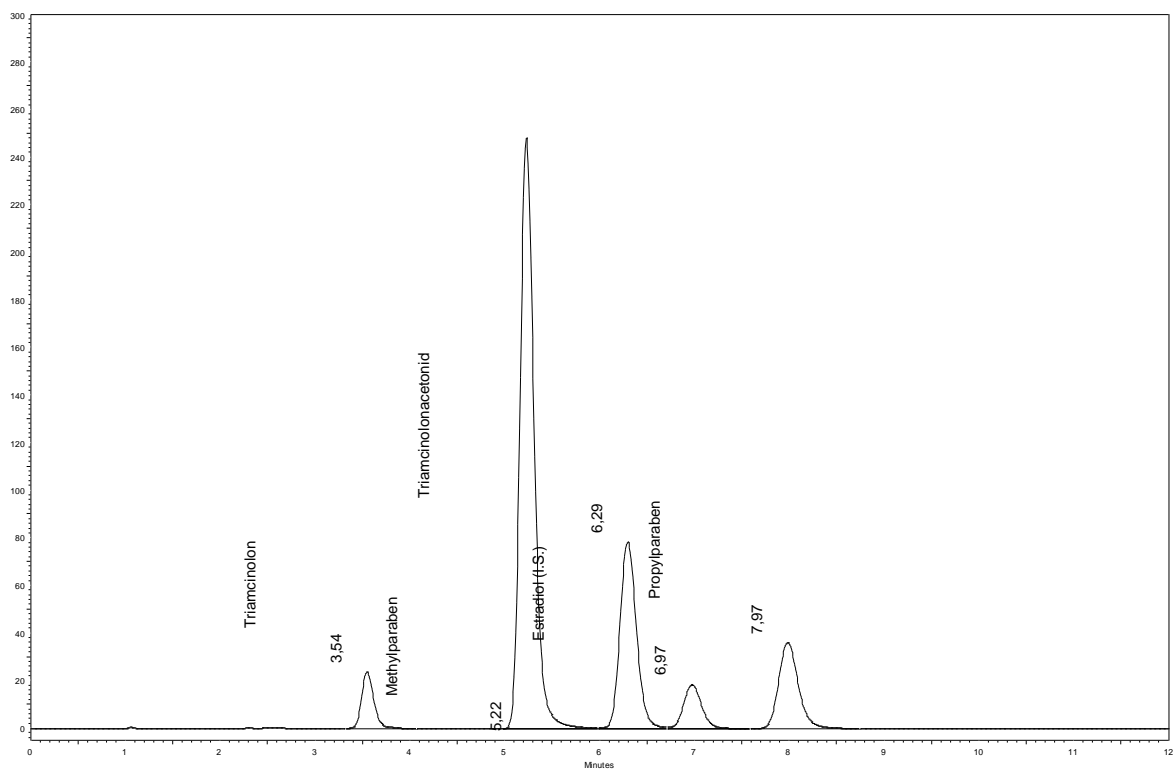
Chromatografický pík nečistoty má odlišný retenční čas od účinné látky i obou konzervačních přísad.

Vzorky „Triamcinolon krém HBF“ a „Triamcinolon krém, placebo bez ÚL, PP, MP“ byly zpracovány dle postupu uvedeného v Kap. 3.4.1. Z chromatogramu placebo (Obr.36.) je zřejmé, že v retenčních časech odpovídajícím stanovovaným látkám není žádný pík interferující látky.

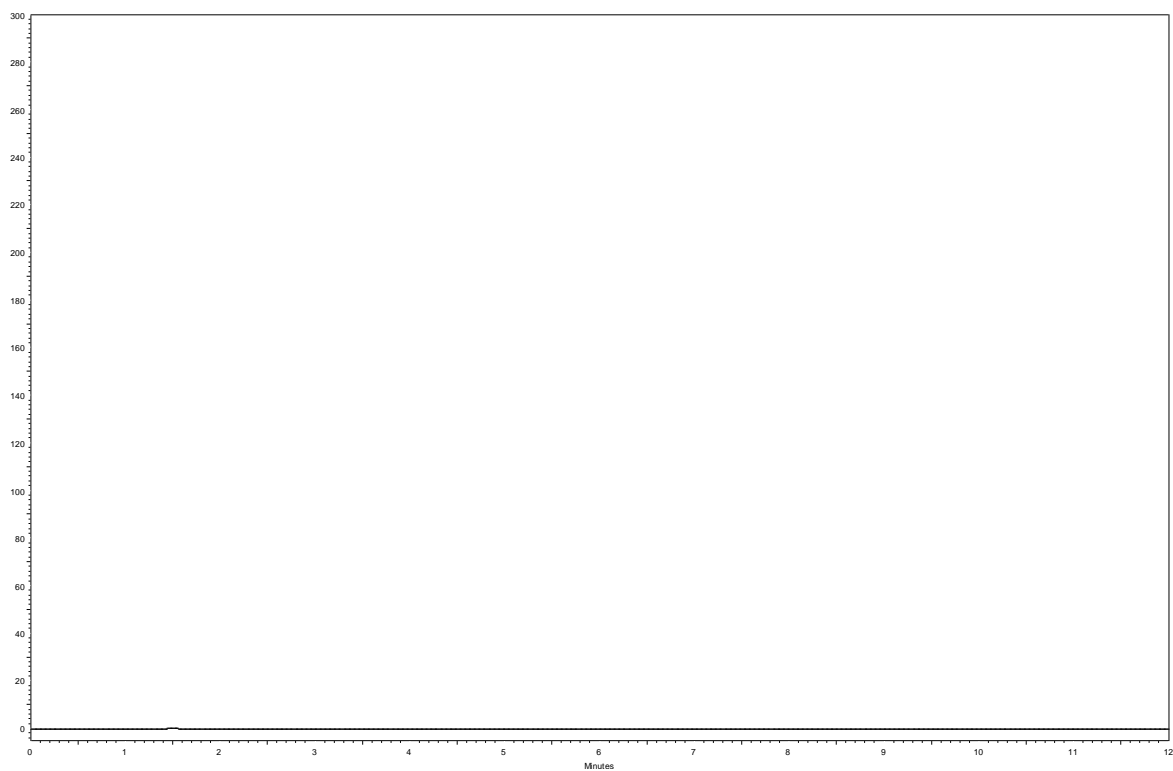
Chromatogram léčivého přípravku s přidavkem vnitřního standardu je dokumentován na Obr.37., všechny složky jsou dokonale separovány.

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce triamcinolon-acetonidu, její nečistotě triamcinolonu a konzervačním přísadám methylparabenu a propylparabenu.

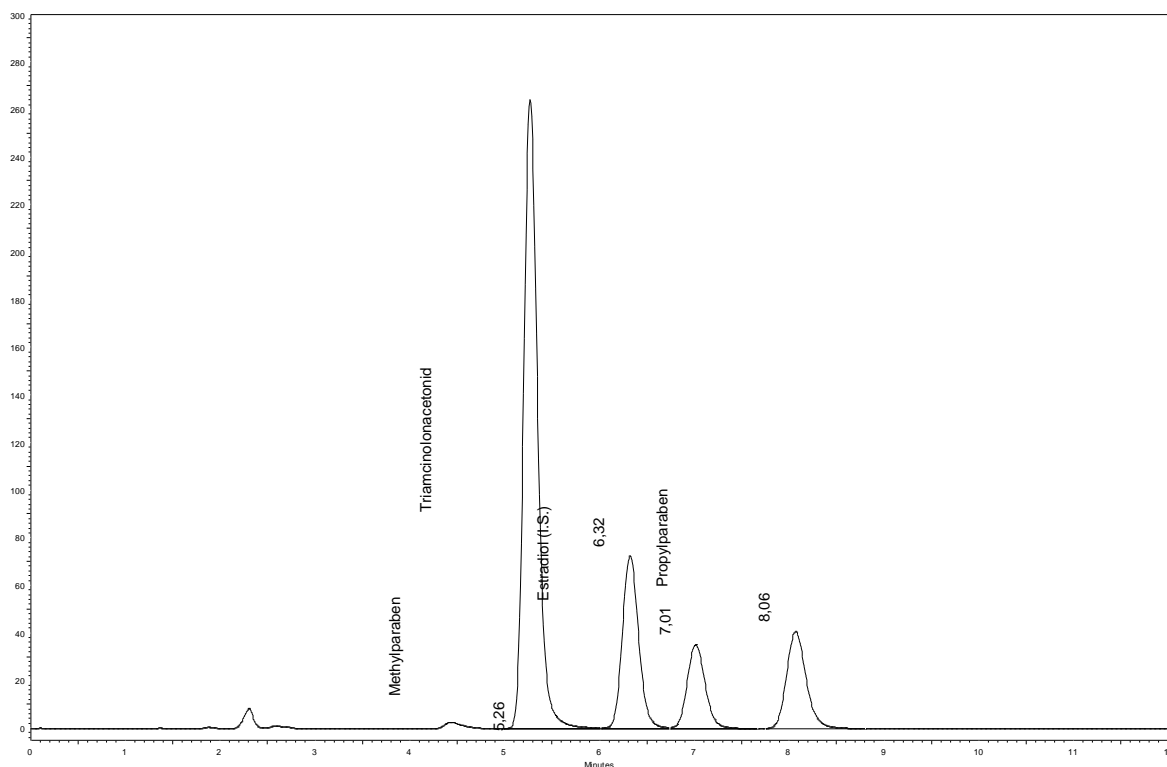
Obr.35.: Chromatogram standardních látek s přidavkem vnitřního standardu a nečistoty



Obr.36.: Chromatogram placeba



Obr.37.: Chromatogram přípravku Triamcinolon krém HBF s přidavkem interního standardu estradiolu



#### 4.2.6 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u roztoku o složení:

Estradiol	c = 4,977 mg/100 ml
Methylparaben	c = 5,261 mg/100 ml
Propylparaben	c = 1,253 mg/100 ml
Triamcinolon	c = 0,586 mg/100 ml
Triamcinolonacetonid	c = 2,563 mg/100 ml

##### 4.2.6.1 Vliv složení mobilní fáze na stanovení obsahu analytu

Vliv složení mobilní fáze byl testován při poměrech H<sub>2</sub>O:ACN (v/v) = 45:55, 50:50, 55:45, 60:40 a 65:35.

#### 4.2.6.1.1 Vliv složení MF na plochu chromatografického píku

Byly získány výsledky uvedené v Tab.23. – Tab.26. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení MF byla počítána podle vzorce:

$$A_R(\%) = \frac{100 \cdot A_i}{A_{55:45}}$$

Tab.23.: Vliv složení MF na plochu píku - methylparaben

<b>Methylparaben</b>		
<b>MF – H<sub>2</sub>O : ACN (v:v)</b>	<b>A<sub>i</sub></b>	<b>A<sub>R</sub>(%)</b>
<b>65 : 35</b>	2490717	99,70
<b>60 : 40</b>	2499962	100,07
<b>55 : 45</b>	2498272	100,00
<b>50 : 50</b>	2492224	99,76
<b>45 : 55</b>	2430864	97,30

Tab.24.: Vliv složení MF na plochu píku - propylparaben

<b>Propylparaben</b>		
<b>MF – H<sub>2</sub>O : ACN (v:v)</b>	<b>A<sub>i</sub></b>	<b>A<sub>R</sub>(%)</b>
<b>65 : 35</b>	507812	98,81
<b>60 : 40</b>	508105	98,87
<b>55 : 45</b>	513914	100,00
<b>50 : 50</b>	521587	101,49
<b>45 : 55</b>	532196	103,56



Tab.25.: Vliv složení MF na plochu píku - triamcinolon

<b>Triamcinolon</b>		
<b>MF – H<sub>2</sub>O : ACN (v:v)</b>	<b>A<sub>i</sub></b>	<b>A<sub>R</sub>(%)</b>
<b>65 : 35</b>	216607	97,30
<b>60 : 40</b>	218716	98,25
<b>55 : 45</b>	222616	100,00
<b>50 : 50</b>	225678	101,38
<b>45 : 55</b>	228807	102,78

Tab.26.: Vliv složení MF na plochu píku – triamcinolon-acetonid

<b>Triamcinolon-acetonid</b>		
<b>MF – H<sub>2</sub>O : ACN (v:v)</b>	<b>A<sub>i</sub></b>	<b>A<sub>R</sub>(%)</b>
<b>65 : 35</b>	900116	99,10
<b>60 : 40</b>	899106	98,99
<b>55 : 45</b>	908304	100,00
<b>50 : 50</b>	916584	100,91
<b>45 : 55</b>	969266	106,71

Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení MF se pohybovala v rozmezí 97,30 až 100,07 % pro methylparaben, 98,81 až 103,56 % u propylparabenu, 97,30 až 102,78 % pro triamcinolon a 98,99 až 106,71 % u triamcinolon-acetonidu. V uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze ovlivňují stanovení triamcinolon-acetonidu, jeho degradačního produktu triamcinolonu a konzervačních přísad methylparabenu a propylparabenu jen velmi málo.

#### 4.2.6.1.2 Vliv složení MF na retenční čas

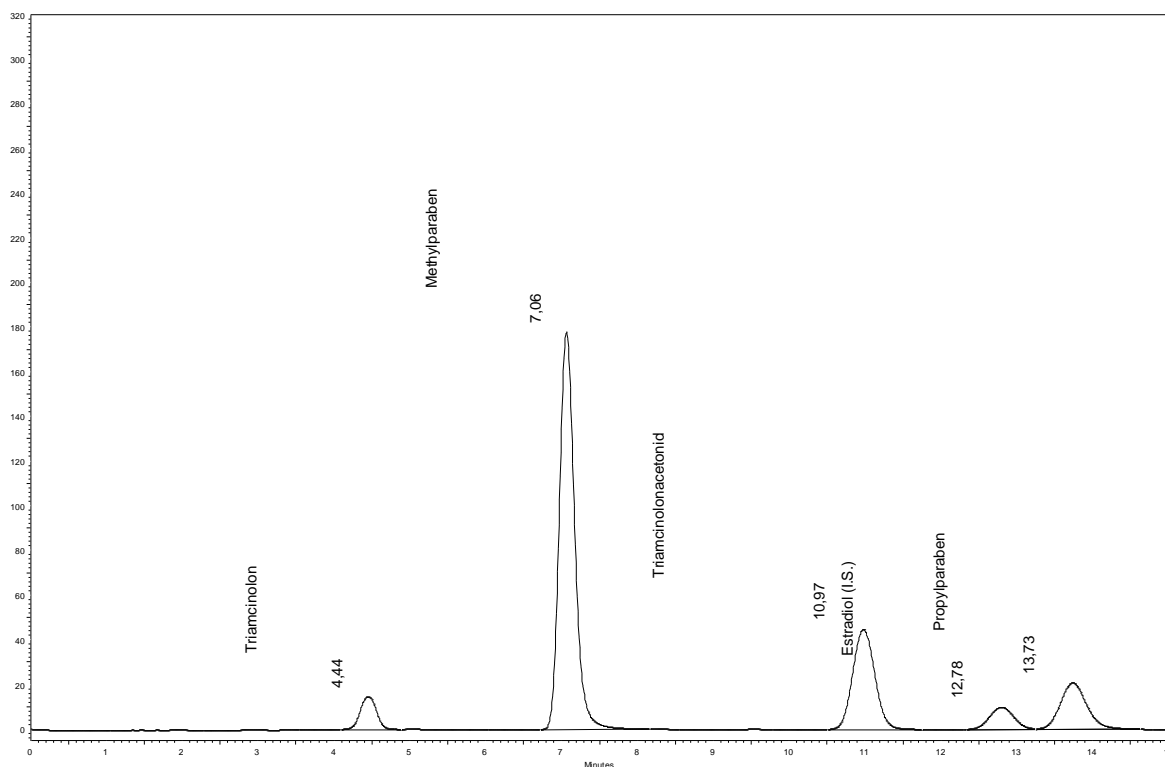
Složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy (viz Tab.27.). Při zvyšování podílu vody separace účinné látky, obou konzervačních přísad, vnitřního standardu i nečistoty (viz Obr.38.) je až k základní linii, pouze

dochází k prodloužení trvání analýzy. Oproti tomu při snižování podílu vody nedochází k dokonalé separaci (viz Obr.39.), proto je doporučeno použití mobilní fáze H<sub>2</sub>O : ACN = 55 : 45 (v/v).

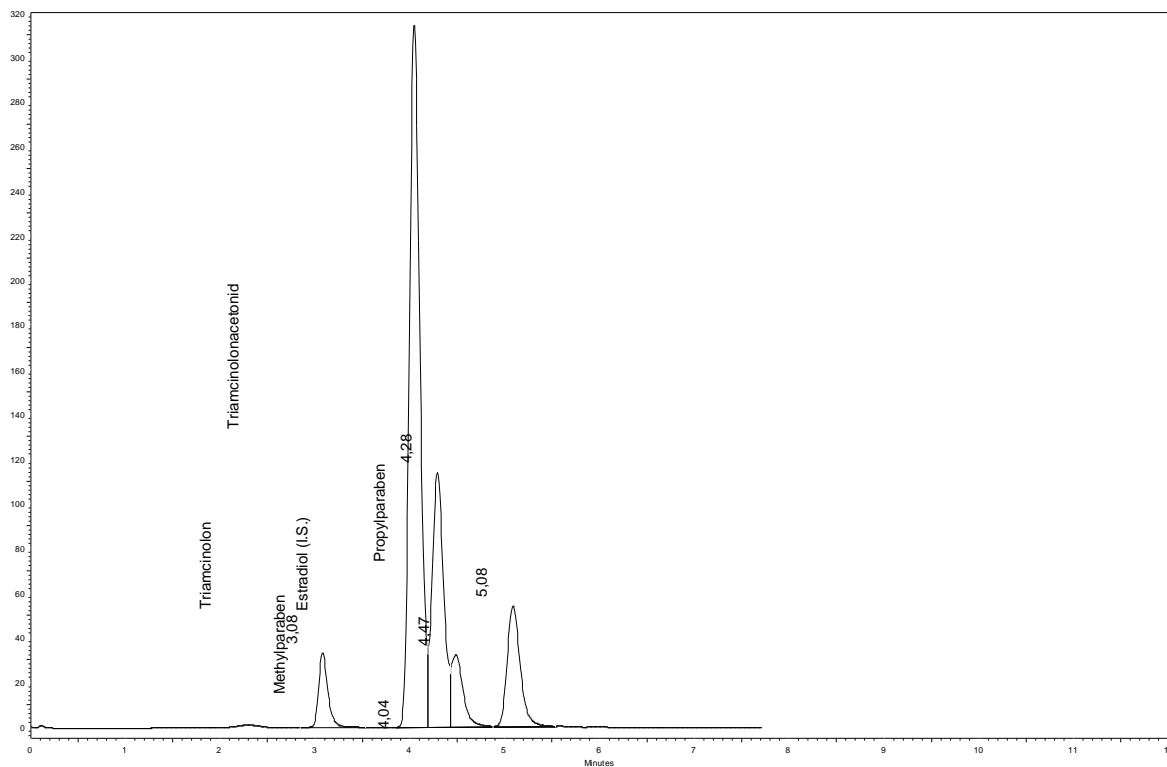
Tab.27.: Vliv složení MF na retenční čas

MF H <sub>2</sub> O : ACN	TC	MP	TA	PP
	<i>t<sub>R</sub></i> (min)			
<b>65 : 35</b>	4,45	7,07	11,01	13,79
<b>60 : 40</b>	3,91	6,05	8,09	10,40
<b>55 : 45</b>	3,52	5,18	6,22	7,90
<b>50 : 50</b>	3,29	4,64	5,21	6,47
<b>45 : 55</b>	3,08	4,04	4,28	5,08

Obr.38.: Chromatogram separace látek při složení MF H<sub>2</sub>O:ACN – 65:35 (v/v)



Obr.39.: Chromatogram separace látek při složení MF H<sub>2</sub>O:ACN – 45:55 (v/v)



#### 4.2.6.2 Stabilita roztoků

Stabilita u roztoku standardů o složení:

Estradiol	c = 4,851 mg/100 ml
Methylparaben	c = 4,865 mg/100 ml
Propylparaben	c = 1,331 mg/100 ml
Triamcinolon	c = 0,544 mg/100 ml
Triamcinolonacetonid	c = 2,533 mg/100 ml,

byla testována za uchování:

- 1) za snížené teploty (4 °C), chráněné před světlem
- 2) za laboratorní teploty (25 °C) a přístupu světla

Výsledky uspořádané v Tab.28. až Tab.31. jsou průměrem ze tří měření . Výpočet odchylky  $S_T(\%)$  byl proveden podle vzorce uvedeného v Kap. 2.6.2.8.

Tab.28.: Stabilita roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání - methylparaben

<b>Methylparaben</b>				
<b>t (hod)</b>	<b>A (4°C)</b>	<b><math>S_{T4°C}(\%)</math></b>	<b>A (25°C)</b>	<b><math>S_{T25°C}(\%)</math></b>
<b>0</b>	2325252	0,00	2325252	0,00
<b>24</b>	2298495	1,15	2307462	0,77
<b>48</b>	2336503	0,48	2316691	0,37
<b>72</b>	2313535	0,50	2327885	0,11

Tab.29.: Stabilita roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání – propylparaben

<b>Propylparaben</b>				
<b>t (hod)</b>	<b>A (4°C)</b>	<b><math>S_{T4°C}(\%)</math></b>	<b>A (25°C)</b>	<b><math>S_{T25°C}(\%)</math></b>
<b>0</b>	538961	0,00	538961	0,00
<b>24</b>	529643	1,73	534497	0,83
<b>48</b>	548683	1,80	534357	0,85
<b>72</b>	531750	1,34	534109	0,90

Tab.30.: Stabilita roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání – triamcinolon

<b>Triamcinolon</b>				
<b>t (hod)</b>	<b>A (4°C)</b>	<b><math>S_{T4°C}(\%)</math></b>	<b>A (25°C)</b>	<b><math>S_{T25°C}(\%)</math></b>
<b>0</b>	208908	0,00	208908	0,00
<b>24</b>	209910	0,48	210225	0,63
<b>48</b>	211363	1,18	210655	0,84
<b>72</b>	208549	0,17	208386	0,25

Tab.31.: Stabilita roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání – triamcinolon-acetonid

Triamcinolon-acetonid				
t (hod)	A (4°C)	S <sub>T4°C</sub> (%)	A (25°C)	S <sub>T25°C</sub> (%)
0	968015	0,00	968015	0,00
24	979331	1,17	977628	0,99
48	941232	2,77	968425	0,04
72	948642	2,00	957756	1,06

Jak vyplývá z Tab.28. až Tab.31. požadavek, aby  $S_T(\%) < 1\%$  není splněn u žádné sledované látky, roztoky standardních látek jsou nestabilní a proto je nutné je připravovat vždy čerstvé. (pozn. Vzhledem k mohutnému kolísání laboratorní teploty (a tím i teploty na koloně) během čtyř dní, po které byla stabilita sledována, výsledky mohou být značně zkresleny a tudíž nemusí být relevantní).

#### 4.2.7 Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ)

Byly provedeny tři analýzy vzorku placebo a ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované nečistoty byla změřena největší kladná ( $r^+$ ) a záporná ( $r^-$ ) amplituda šumu, z tohoto šumu byla odhadnuta jeho směrodatná odchylka  $s_n$  podle vzorce:

$$s_n = \frac{r^+ - r^-}{5}$$

Dále bylo provedeno šest analýz vzorku placebo s přidavkem nečistoty triamcinolonu ( $c = 5,56 \text{ mg/l}$ ).

LOD byl vypočten podle vzorců:

$$LOD = 3s_n \cdot \frac{K}{b_1}$$

$$K = \frac{A}{h}, \quad \text{kde } A \text{ je plocha píku a } h \text{ je výška píku v AU}$$

$$b_1 = \frac{A}{c}, \quad \text{kde } A \text{ je plocha píku a } c \text{ je koncentrace analytu v mg/l}$$

LOQ byl vypočten podle vzorce:

$$LOQ = 10s_n \cdot \frac{K}{b_1}$$

Výsledky jsou uvedeny v Tab.32.

Tab.32.: Detekční a kvantitativní limit

Triamcinolon	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
$s_n = 0,01449$ $K = 8902,23$ $b_1 = 37786,46$	0,0102	0,0341

Nejnižší detekovatelná koncentrace nečistoty triamcinolonu za použití předkládané HPLC metody je 0,0102 mg/l, kvantitativní limit představuje koncentrace 0,0341 mg/l.

## **5 Závěr**

- Byly zpracovány literární údaje týkající se chromatografických metod s důrazem na HPLC s přímou detekcí a proces validace
- Byla zpracována stručná rešerše metod hodnocení triamcinolon-acetonidu
- Byly nalezeny tyto optimální chromatografické podmínky pro HPLC stanovení léčivé látky triamcinolon-acetonidu, konzervací methylparabenu a propylparabenu a nečistoty triamcinolonu
  - Analytická kolona: Supelco Discovery HSF5 (150 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m)
  - Detekce: UV při 240 nm
  - Mobilní fáze: voda : acetonitril (55:45 v/v)
  - Vnitřní standard: estradiol
  - Objem nástřiku: 10  $\mu$ l
  - Průtoková rychlost  $f_m$ : 0,6 ml/min
  - Režim: izokratický
  - Teplota: laboratorní
- Byla testována způsobilost chromatografického systému. Opakovatelnost vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka  $s_R$  byla nižší než 1%. Požadavek na účinnost kolony vyjádřen jako počet teoretických pater  $N$  byl splněn u všech sledovaných látek ( $N > 1500$ ). Asymetrie chromatografických píků vyjádřena faktorem  $T$  byla menší než 1,2. Rozlišení chromatografických píků  $R_{ij}$  bylo větší než 2.
- Byla hodnocena přesnost metody a požadavek na směrodatnou odchylku  $s_R < 5\%$  byl splněn.



- U testování parametru lineariry odezvy bylo vyhověno požadavku na hodnotu korelačního koeficientu  $R > 0,9990$  u všech látek.
- Správnost stanovení byla vyjádřena veličinou výtěžnosti  $R_i(\%)$ . Požadavek, aby se hodnota výtěžnosti pohybovala v rozmezí  $100 \pm 5\%$  byl splněn u všech analyzovaných látek.
- Parametr selektivity byl ověřen porovnáním chromatogramů roztoku standardů, placebo a přípravku Triamcinolon krém HBF. Separace všech píků je až k základní linii, chromatogram placebo neinterferoval s píky standardních látek.
- Testování robustnosti prokázalo vhodnost zvolené mobilní fáze, složené z vody a acetonitrilu o poměru 55:45 (v/v)..
- Při testování stability nebyl splněn požadavek, aby  $S_T(\%) < 1\%$  u žádné sledované látky, roztoky standardních látek jsou nestabilní a proto je nutné je připravovat vždy čerstvé.
- Všechny sledované validační parametry předkládané metody vyhovují požadavkům na ně kladeným. Tato metoda bude používána při rutinní kontrole kvality přípravku Triamcinolon krém HBF.

## **6 Použitá literatura**

- [1] Mikro-verze AISLP – ČR 2007.2 pro MS Windows
- [2] příbalový leták přípravku Triamcinolon krém HBF
- [3] Doležal, P.: Krémy-Cremores, In: Doležal, P. a kol.: Technologie přípravy nesterilních léčiv, Karolinum, Praha, 2003, 49-63
- [4] Chalabala, M. et al.: Technologie léků, 2. vydání, Galén, Praha, 2001, 408
- [5] Pharmindex Kompendium 2001, MediMedia Information, spol. s r.o., Praha, 2001, 1648-1651
- [6] Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha 2005
- [7] United States Pharmacopoeia 28, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2005, 1958-1962
- [8] British Pharmacopoeia 2004, HMSO, Norwich, UK, 2004, 1967-1969
- [9] European Pharmacopoeia 5, Council of Europe, 67075 Strasbourg Ceres, France, 2005, 2064-2066
- [10] The Pharmacopoeia of Japan XIV
- [11] Hadašová E., Jezdinský J.: Glukokortikoidy, In: Lincová, D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha, 2002, 372-378
- [12] Hájková R., Solich P., Pospíšilová M., Šícha J. (2002) Anal Chim Acta 467:91-96
- [13] Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha, 2004
- [14] Klimeš, J. a kol.: Důkazy pomocí chromatografických metod, In: Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha, 2002, 22-40
- [15] Karlíček, R. a kol.: Separační metody, In: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001, 265-281
- [16] Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, 10, 25-26
- [17] SeQuant: A practical guide to HILIC, A tutorial and application book, SeQuant AB, 2005
- [18] [www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf-04/07](http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf-04/07)

- [19] <http://www.tosohbiosep.com/Products/HPLCColumns/ByMode/-04/07>
- [20] [www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn\\_nbn\\_se\\_umu\\_diva-153-1fulltext.pdf-04/07](http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_umu_diva-153-1fulltext.pdf-04/07)
- [21] <http://www.waters.com/WatersDivision/Contentd.asp?watersit=JDRS-6UUGMP-04/07>
- [22] <http://www.ymc-europe.com/ymceurope/news/HILIC.html-04/07>
- [23] [http://www.labcompliance.com/methods/meth\\_val.htm-04/07](http://www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm-04/07)
- [24] <http://sweb.cz/HPLC/Suma/Validace.htm-04/07>
- [25] Věstník SÚKL 1/1994, SÚKL, Praha, 1994
- [26] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995, p.11260
- [27] International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, US FDA Federal Register, Vol. 62, March 1997, p.27463
- [28] Matysová L., Hájková R., Šícha J., Solich P. (2003) Anal Bioanal Chem 376:440-443
- [29] Nováková L., Matysová L., Solich P. (2006) Talanta 68:908-918
- [30] Sudsakorn S., Kaplan L., Williams D.A. (2006) J Pharm Biomed Anal 40(5):1273-1280
- [31] Xu Y. M., Wong G. Y. (1999) J Liq Chromatogr Relat Technol 22(13):2071-2091
- [32] Kumar V., Mostafa S., Kayo M.W., Goldberg E.P., Derendorf H. (2006) Pharmazie 61(11):908-911
- [33] Bévalot F., Gaillard Y., Lhermitte M. A., Pépin G.: Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, 24 April 1999
- [34] Tang P.W., Law W.C., Wan T.S.M. (2001) J Chromatogr B Biomed Appl 754(1):229-244