

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace HPLC metody pro analýzu léčivého přípravku**

**Dexamethasoni acetate solutio**

(diplomová práce)

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Zuzana Saifrová

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

2. 5. 2013

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení práce, za trpělivost, cenné rady a za čas, který mi věnovala. Děkuji také ostatním pracovníkům katedry za vstřícnost a ochotu při práci v laboratořích.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Zuzana Saifrová

Školitel: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro analýzu léčivého přípravku Dexamethasoni acetate solutio

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj a následnou validaci metody pro stanovení dexamethason-acetátu a jeho nečistoty v léčivém přípravku Dexamethasoni acetate solutio. Při vývoji se vycházelo z metody uvedené jako zkouška na čistotu dexamethason-acetátu v Českém lékopisu 2009. Použita byla metoda HPLC s UV-VIS detekcí při 254 nm. Vývoj metody spočíval v úpravě některých podmínek analýzy, optimalizováno bylo zejména složení mobilní fáze a parametry chromatografické kolony. Byla přitom sledována především délka analýzy a dále rozlišení a symetrie píků stanovované látky a její nečistoty. V konečné verzi metody byla zvolena isokratická eluce s mobilní fází ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 o průtoku 1,5 ml/min a byla použita kolona HS-C18 100 × 4,6 mm. Vzorky byly rozpouštěny přímo v mobilní fázi a nastříkovány na kolonu v objemu 10 µl. Došlo k významnému zkrácení analýzy a validace dokázala, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití a dává přesné a správné výsledky.

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Zuzana Saifrová

Supervisor: Ludmila Matysová

Title of Diploma Thesis: Development and validation of HPLC method for analysis of pharmaceutical preparation Dexamethasoni acetate solutio.

This diploma thesis was aimed on development and subsequent validation of method for determination of dexamethasone acetate and its impurity in pharmaceutical preparation Dexamethasoni acetate solutio. The development was based on method referred as the test of impurities of dexamethasone acetate described in Czech Pharmacopoeia 2009. The HPLC method with UV-VIS detection set at 254 nm was used. The development was based on modification of some conditions of analysis, especially composition of mobile phase and parameters of the chromatographic column were optimised. The length of analysis and also resolution and symmetry of peaks of the active substance and its impurity were mainly observed. In the final version of the method isocratic elution with mobile phase ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 and with flow 1,5 ml/min was chosen and the column HS-C18 100 × 4,6 mm was used. The samples were soluted right in the mobile phase and injected on the column in volume of 10 µl. Significant shortening of analysis was achieved and validation approved that this method is appropriate for intended use and that it provides accurate and precise results.

## SEZNAM ZKRATEK

ACN – acetonitril

CAS – Chemical Abstract Service

ČL – Český lékopis

D – dexamethason

DA – dexamethason-acetát

EP – ethylparaben

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IS – vnitřní standard

MF – mobilní fáze

MP – methylparaben

$M_r$  – relativní molekulová hmotnost

PP – propylparaben

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV-VIS – ultrafialová a viditelná oblast spektra

# OBSAH

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | ÚVOD.....  | 10 |
| 2       | CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....                      | 11 |
| 3       | TEORETICKÁ ČÁST .....                              | 12 |
| 3.1     | Léčivý přípravek.....                              | 12 |
| 3.1.1   | Účinná látka – dexamethason-acetát .....           | 12 |
| 3.2     | Chromatografické metody .....                      | 13 |
| 3.2.1   | Principy chromatografie.....                       | 13 |
| 3.2.2   | Rozdělení chromatografie .....                     | 14 |
| 3.3     | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....        | 15 |
| 3.3.1   | Uspořádání kapalinového chromatografu.....         | 16 |
| 3.3.1.1 | Chromatografické kolony .....                      | 17 |
| 3.3.1.2 | Detektory.....                                     | 17 |
| 3.3.2   | Systémy fází pro HPLC .....                        | 18 |
| 3.3.2.1 | Stacionární fáze .....                             | 18 |
| 3.3.2.2 | Mobilní fáze.....                                  | 19 |
| 3.3.3   | Typy eluce .....                                   | 19 |
| 3.3.4   | Kvalitativní analýza.....                          | 20 |
| 3.3.5   | Kvantitativní analýza.....                         | 20 |
| 3.4     | Validace analytické metody.....                    | 21 |
| 3.4.1   | Test způsobilosti chromatografického systému ..... | 21 |
| 3.4.2   | Validace.....                                      | 22 |
| 3.4.2.1 | Přesnost.....                                      | 22 |
| 3.4.2.2 | Linearita .....                                    | 22 |
| 3.4.2.3 | Správnost.....                                     | 23 |
| 3.4.2.4 | Selektivita.....                                   | 23 |
| 3.4.2.5 | Robustnost.....                                    | 24 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.4.2.6 | Detekční limit .....   | 24 |
| 3.4.2.7 | Kvantitativní limit .....                                    | 24 |
| 3.5     | Rešerše.....   | 25 |
| 4       | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                    | 26 |
| 4.1     | Materiál .....   | 26 |
| 4.1.1   | Chemikálie.....  | 26 |
| 4.1.2   | Pomůcky a přístroje.....                                     | 27 |
| 4.2     | Obecné pracovní postupy .....                                | 28 |
| 4.2.1   | Příprava roztoků k analýze .....                             | 28 |
| 4.2.1.1 | Příprava zásobních roztoků .....                             | 28 |
| 4.2.1.2 | Příprava výsledného zkušného roztoku .....                   | 28 |
| 4.2.1.3 | Příprava roztoků vnitřních standardů .....                   | 29 |
| 4.2.1.4 | Příprava roztoku pro stanovení parametru opakovatelnosti ... | 29 |
| 4.2.1.5 | Příprava roztoku pro stanovení parametru přesnosti .....     | 29 |
| 4.2.1.6 | Příprava roztoků pro stanovení parametru linearity .....     | 30 |
| 4.2.1.7 | Příprava roztoku pro stanovení parametru správnosti .....    | 30 |
| 4.2.2   | Příprava mobilní fáze.....                                   | 31 |
| 4.2.3   | Příprava chromatografu před měřením.....                     | 31 |
| 5       | VÝSLEDKY A DISKUZE .....                                     | 32 |
| 5.1     | Vývoj metody .....   | 32 |
| 5.1.1   | Výběr vnitřního standardu .....                              | 35 |
| 5.2     | Validace analytické metody.....                              | 38 |
| 5.2.1   | Test vhodnosti chromatografického systému .....              | 38 |
| 5.2.1.1 | Účinnost chromatografické kolony .....                       | 38 |
| 5.2.1.2 | Faktor symetrie píku $A_S$ .....                             | 38 |
| 5.2.1.3 | Rozlišení chromatografických píků RS .....                   | 39 |
| 5.2.1.4 | Opakovatelnost analýzy .....                                 | 40 |



|         |  |    |
|---------|--|----|
| 5.2.2   | Validace analytické metody .....                             | 41 |
| 5.2.2.1 | Přesnost.....  | 41 |
| 5.2.2.2 | Linearita .....  | 42 |
| 5.2.2.3 | Správnost.....   | 44 |
| 5.2.2.4 | Selektivita.....   | 45 |
| 5.2.2.5 | Robustnost.....  | 47 |
| 5.2.2.6 | Detekční a kvantitativní limit nečistoty dexamethasonu ..... | 49 |
| 6       | ZÁVĚR.....   | 50 |
| 7       | ZDROJE.....  | 51 |

# 1 ÚVOD

Dexamethasoni acetate solutio 1% je lékopisný přípravek hojně využívaný k magistraliter přípravě. Účinnou látkou je dexamethason-acetát – sůl středně silného lokálního glukokortikoidu. Přípravek je součástí mnoha topických přípravků určených k léčbě neinfekčních kožních onemocnění jako jsou např. různé typy dermatitid, psoriáza či intertrigo. Kvůli své náchylnosti k rozkladu musí být uchováván při snížené teplotě (1-5 °C) a je nutné kontrolovat jeho stálost ve stabilitních testech. Pro tyto účely bylo nutné vyvinout vhodnou metodu ke stanovení a kvantifikaci jak účinné látky, tak rozkladného produktu dexamethasonu v tomto přípravku.

S ohledem na původní metodu v ČL a vzhledem k povaze přípravku a požadovaným cílům analýzy bylo vhodné využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Je to separační analytická metoda, jejíž výhodou je vysoká citlivost, malá spotřeba vzorku a v neposlední řadě možnost jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzy, včetně zkoušek na čistotu.

## 2 CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce je vývoj a následná validace HPLC metody pro analýzu přípravku Dexamethasoni acetatis solutio.

Nejdříve bude výchozí metoda pomocí roztoků standardů optimalizována tak, aby podávala kvalitní výsledky a došlo ke zkrácení analýzy. Následovat bude výběr vhodného vnitřního standardu a poté bude metoda aplikována přímo na léčivý přípravek.

Součástí práce bude také validace nové metody, hodnotit se bude vzhledem k požadavkům přesnost, linearita, správnost, selektivita a robustnost a dále také detekční a kvantitativní limit nečistoty.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Léčivý přípravek

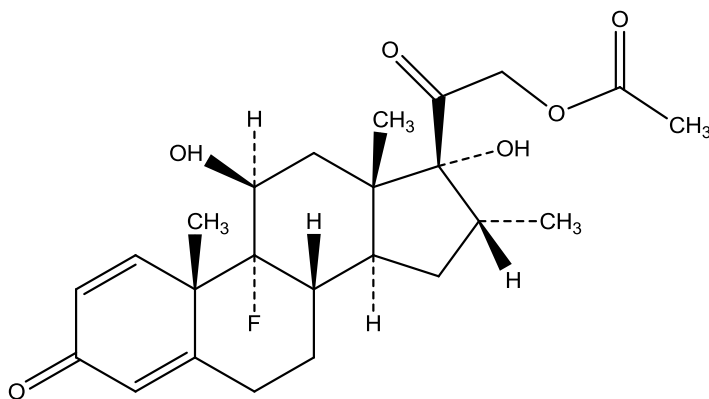
**Přípravek:** Dexamethasoni acetatas solutio 1%

**Složení:** účinná látka – dexamethason-acetát (1 g/100 g)

pomocné látky – propylenglykol

**Vzhled:** čirá viskózní bezbarvá hygroskopická kapalina

#### 3.1.1 Účinná látka – dexamethason-acetát



Obrázek 1 Molekula dexamethason-acetátu

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

9-fluor-11 $\beta$ ,17 – dihydroxy-16 $\alpha$ -methyl-3,20-dioxo-pregna-1,4-dien-21-yl-acetát

**Mr:** 434,50

CAS 1177-87-3

**Obsah:** 97,0% až 103,0% sloučeniny  $C_{24}H_{31}FO_6$ , počítáno na vysušenou látku

**Vzhled:** bílý nebo téměř bílý krystalický prášek

**Rozpustnost:** prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a ethanolu 60%, těžce rozpustný v dichlormethanu [1]

**Použití:** Dexamethason acetát je sůl fluorovaného glukokortikoidu se slabým protizánětlivým, protisvědčivým a vasokonstrikčním účinkem. Lokálně z intaktní kůže se vstřebává 1-4% látky, z intertriginózních míst až 36% a biotransformuje se v játrech na neúčinné metabolity.

Využívá se především v následujících indikacích: akutní, subakutní či chronická neinfekční kožní onemocnění, atopická, seboroická, kontaktní a jiné dermatitidy, psoriáza, intertrigo, pruritus [2].

## **3.2 Chromatografické metody**

Chromatografie patří mezi separační analytické metody, při kterých se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. To je výhodné k jeho dalšímu hodnocení a to jak kvantitativnímu, tak kvalitativnímu. U separačních metod vyžadujeme co nejvyšší selektivitu, rozsah použitelnosti a frakcionační kapacitu. Poslední parametr udává maximální počet složek, které mohou být separovány v průběhu jediné operace. U chromatografických metod dosahují hodnoty frakcionační kapacity kolem sta a více, proto tyto metody nalézají široké využití v analýze léčivých přípravků i biologických vzorků [3].

### **3.2.1 Principy chromatografie**

Principem metody je dělení analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi – nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen soustavou přes fázi stacionární, kterou jsou jeho složky více či méně poutány. Mobilní fáze složky vzorku z fáze stacionární vymývá (eluuje) a ty se tímto postupně separují. Separace probíhá tedy na základě různé afinity látek k oběma fázím. Dochází zde k opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi oběma fázemi. Na konec stacionární fáze se tak nejpozději dostávají ty, které jí jsou nejvíce zadržované.

Pomocí chromatografických metod se účinně separují jednotlivé složky obsažené ve vzorku, který je možné následně analyzovat jak kvalitativně tak kvantitativně [3, 4].

### 3.2.2 Rozdělení chromatografie

Chromatografické metody mohou být rozděleny podle několika různých parametrů. Primárně podle skupenství mobilní fáze na chromatografii plynovou či kapalinovou. Kapalinová chromatografie může být realizována buď v plošném uspořádání (v podobě tenkovrstvé či papírové chromatografie) nebo v kolonovém uspořádání. Lze ji také dělit podle děje, který převládá při separaci na chromatografii rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou či afinitní [4].

- a) rozdělovací chromatografie – využívá rozdílné rozpustnosti (tudíž i rozdílné distribuce) látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami
- b) adsorpční chromatografie – využívá rozdílné adsorbovatelnosti molekul analytů na povrch adsorbentu s aktivními centry
- c) iontově-výměnná chromatografie – využívá rozdílné afinity dělených látek v podobě iontů k aktivním skupinám povrchu iontoměniče
- d) gelová chromatografie – využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti
- e) afinitní chromatografie – metoda izolace biologicky aktivních látek, využívá schopnosti některých látek specificky a reverzibilně vázat látky jiné, kolona je naplněna nosičem s navázaným ligandem, biologicky aktivní látka se zachytí a tyto specificky sorbované látky jsou následně eluovány vhodným činidlem či rozpuštěním ligandu, má pouze omezené využití

[4-7]

### 3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

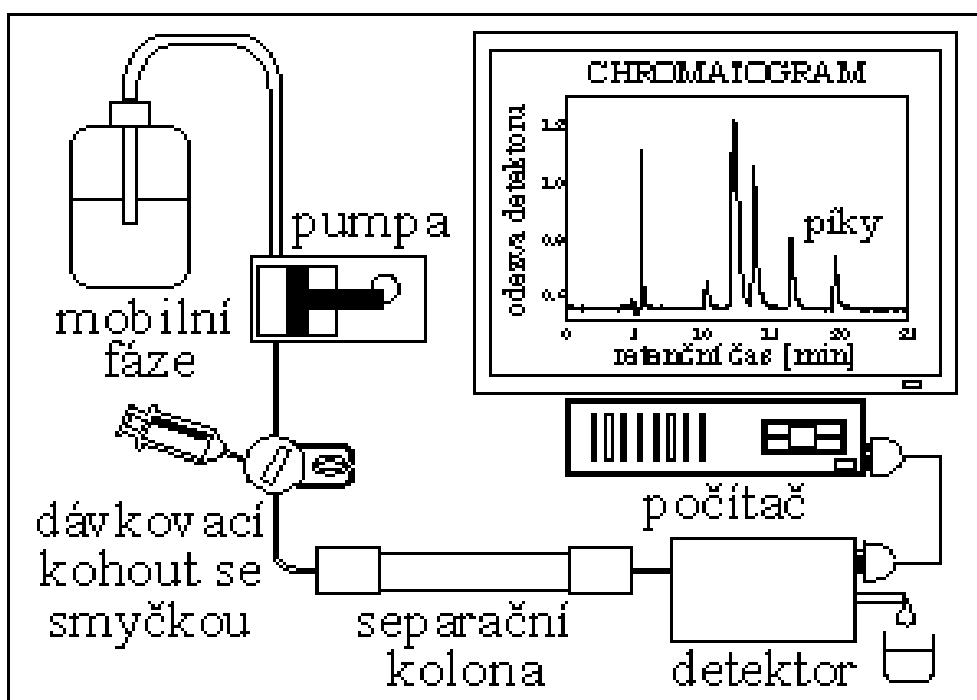
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je jedna z nejprogresivnějších analytických separačních metod. Vyvíjí se od základního kolonového uspořádání, kdy mobilní fáze protékala pouze samospádem, přes HPLC s výkonnými čerpadly, vysoce účinnými stacionárními fázemi a citlivými detektory, až po nejmodernější UHPLC, která je nyní v popředí zájmu a kterou se dá docílit až několikanásobné zkrácení doby analýzy a zmenšení spotřeby mobilní fáze [3, 4].

K separaci při HPLC dochází díky interakcím složek vzorku se stacionární fází naplněnou v koloně a jí pod vysokým tlakem procházející kapalnou fází mobilní. Jsou zde využitelné všechny dříve popsané možnosti mechanismů separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, využití síťového efektu gelu či chromatografie afinitní [4].

HPLC má mnoho předností. Jak už bylo řečeno, umožňuje zároveň analýzu kvalitativní i kvantitativní, je k ní potřeba jen minimální množství vzorku a analýza je rychlá a citlivá. Na rozdíl od plynové chromatografie je HPLC vhodná i k analýze netěkavých či tepelně nestálých vzorků [4].

### 3.3.1 Uspořádání kapalinového chromatografu

Součástí přístroje je vždy jeden či více zásobníků mobilní fáze. Ta musí být nejdříve odplyněna, aby se zabránilo vzniku bublin, což zajišťuje degasser. Mobilní fáze je pomocí pumpy čerpána do systému pod stálým vysokým tlakem (až 40 MPa). Vzorek je nadávkován pomocí dávkovacího zařízení, které může být manuální nebo automatické. Dále pokračuje kolonou, uvnitř které je navázána stacionární fáze v podobě sorbentu, může být použit i regulátor teploty. Mobilní fáze a vzorek prochází obvykle konstantní rychlostí kolonou a dále směs pokračuje do detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Výsledkem měření je chromatogram, což je grafický či jiný záznam odezvy detektoru. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii. [3, 4, 8]



Obrázek 2 Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu [5]



### 3.3.1.1 Chromatografické kolony

Kolony jsou zhotoveny zpravidla z oceli, skla či plastu, délka se pohybuje v průměru od 5 do 30 cm, jejich průměr od 2 do 8 mm. Klasická kolona se skládá z chemicky inertního pláště, který je odolný vůči vysokým tlakům a je uzavřen porézní kovovou fritou. Ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze a zároveň umožňuje proudění fáze mobilní. Oba konce kolony jsou uzavřeny převlečeným ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, do které je navrtán vstup pro šroub s kapilárou. Náplň kolony musí být absolutně homogenní a rovnoměrná, z tohoto důvodu se nyní používají kolony naplněné a testované přímo výrobcem [8].

### 3.3.1.2 Detektory

Na detektory pro HPLC jsou kladeny vysoké nároky, co se týká univerzálnosti, citlivosti a lineárnosti závislosti odezvy detektoru na koncentraci v širokém koncentračním rozmezí. Tyto nároky nemohou být nikdy dokonale splněny jedním detektorem, proto se v HPLC využívá několik druhů detekce. Nejběžněji používanými detektory jsou spektrofotometry pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS), jelikož jsou citlivé ( $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml) a lze je použít i u gradientové eluce. Mohou mít buď fixní, nebo proměnnou vlnovou délku, dále se využívají scanning UV detektory a mezi nejmodernější patří diode array detektory. K detekci se ale dají též použít fluorescenční spektrofotometry, diferenční refraktometry, elektrochemické detektory, hmotnostní spektrometry, detektory na bázi rozptylu světla, měření radioaktivity či jiné speciální druhy [3, 4].

### 3.3.2 Systémy fází pro HPLC

- a) chromatografie s normálními fázemi – stacionární fáze je polární a mobilní fáze nepolární, přestože je nazvána „normální“ není používána nejčastěji
- b) chromatografie s reverzními fázemi – zde je stacionární fáze nepolární a mobilní polární

[12]

#### 3.3.2.1 Stacionární fáze

V HPLC se nejčastěji používají chemicky vázané stacionární fáze – modifikovaný silikagel. Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce ( $C_8$  nebo  $C_{18}$ ), jde o nepolární navázané skupiny stacionární fáze (reverse phase). Radikál může také obsahovat tříuhlíkatý řetězec zakončený například  $-NH_2$  nebo  $-CN$  skupinou, zde se jedná o středně polární stacionární fázi. Méně často se jako sorbenty využívají polární silikagel či oxid hlinitý [3].

Klasické kolony se sorbentem tvořeným částicemi velkými 3-5  $\mu m$  mají výbornou separační účinnost, avšak s klesající velikostí částic stoupá zpětný tlak a tím je omezená maximální průtoková rychlost. Tomu se lze vyhnout použitím monolitických kolon. Jejich sorbent je tvořen jediným kusem pórovitého materiálu vyplňujícím celý vnitřek kolony. Má dvě různé velikosti pórů, což zaručuje jak rychlý tok MF, tak velký povrch a tím vysokou separační kapacitu [8].

Při použití mobilní fáze s vyšším pH může docházet k rozpouštění silikagelu a tak zkrácení životnosti kolony. Pro tyto případy byly vyvinuty alternativní kolony na bázi oxidů kovů, zvláště oxidu zirkoničitého. Tyto mají se silikagelovými kolonami srovnatelnou účinnost, zároveň jsou chemicky i tepelně velmi stabilní a lze je použít v celém rozsahu pracovního pH (1-14) a to jak v normálním tak reverzním módu [10].

V poslední době jsou komerčně také dostupné hybridní organicko-anorganické fáze na bázi silikagelu, na jehož povrchu je část OH-skupin nahrazena

skupinami methylovými. Tyto stacionární fáze spojují pevnost silikagelu a stabilitu polymeru. Vykazují podobně jako předchozí velkou pH flexibilitu (rozsah pH 1-12) a jen o málo nižší separační účinnost [11].

### 3.3.2.2 Mobilní fáze

Výběr mobilní fáze závisí na povaze analyzovaných látek, použité fázi stacionární a dané metodě. Mobilní fáze by měla v detektoru dávat minimální signál a neměla by ovlivňovat výsledek měření. Velmi důležité je odplynění mobilní fáze. Degasser bývá většinou součástí HPLC sestavy. Pokud by došlo k zavzdušnění systému či průniku nečistot z mobilní fáze, mohl by se zvýšit tlakový spád v koloně, zvýšit šum základní linie, retenční časy by mohly více kolísat a byly by tak nereproduktivní, nebo by mohly píky dostat abnormální profil [4, 9].

### 3.3.3 Typy eluce

HPLC analýzu lze provádět dvěma možnými způsoby, co se složení mobilní fáze týká, a to elucí isokratickou a elucí gradientovou. Při isokratické eluci je složení mobilní fáze po celou dobu analýzy stejné. Tato metoda je vhodná pro směsi látek, které mají velice podobné eluční parametry a používá se nejčastěji. Druhým typem je eluce gradientová, zde se v průběhu analýzy k jedné mobilní fázi plynule přidává rostoucí množství mobilní fáze druhé – s větším elučním účinkem. Tvoří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze, což je vhodné pro analýzu látek, u kterých se eluční parametry liší [3, 4].

### **3.3.4 Kvalitativní analýza**

Kvalitativně je vzorek posuzován podle retenčního objemu či retenčního času, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu po maximum chromatografického píku. Je to veličina relativní, závislá na podmínkách analýzy, jako je povaha mobilní fáze, průtoková rychlost, typ stacionární fáze atd. Je proto nutné tuto veličinu porovnávat se standardem [13].

### **3.3.5 Kvantitativní analýza**

Kvantitativní analýza spočívá v nalezení vztahu mezi plochou nebo výškou chromatografického píku a množstvím eluované látky. Existuje několik metod kvantitativní analýzy – metoda vnitřního/vnějšího standardu, metoda normalizace či kalibrační postup. U metody vnějšího standardu se porovnává odezva píku zkoušeného vzorku s odezvou píku u porovnávacího roztoku. U metody vnitřního standardu se pak přidává vnitřní standard ve stejném množství do měřeného i porovnávacího vzorku a porovnává se poměr ploch stanovované látky a vnitřního standardu u obou. Vnitřní standard musí být látka, která je eluována samostatně, nejlépe v blízkosti látky analyzované, je stálá, nesmí reagovat se vzorkem a nesmí mít nečistoty s podobným retenčním časem jako vzorek. Při postupu metodou normalizace se vypočítá procentuální obsah analyzované látky z celkové plochy všech píků ve vzorku, krom píků rozpouštědel, přidaných činidel a píků zanedbatelných. Při kalibračním postupu se obsah zkoušené látky stanoví na základě kalibrační závislosti koncentrace na odezvě [13].

### 3.4 Validace analytické metody

Každá analytická metoda musí být validována a součástí všech chromatografických metod musí být test způsobilosti chromatografického systému. Validace je důležitým prvkem kontroly kvality a dokládá vhodnost, přesnost a spolehlivost dané metody v daném případě. Je to série experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky, je vhodná pro zamýšlené použití a splňuje na začátku definované požadavky. Dalším cílem validačního procesu je také určit kritéria, která musí být splněna, aby bylo možné určitý zkušební postup spolehlivě použít, a to i v různých laboratořích. Pak při dalším použití nově validované metody se již neprovádí celá validace, pouze se testují tato kritéria, která se obecně nazývají test způsobilosti chromatografického systému [14, 17].

#### 3.4.1 Test způsobilosti chromatografického systému

U chromatografických metod je nutné použít podmínky, které zajistí účinnost a separační schopnost daného systému, a to i kdyby se mírně lišily od těch popsaných v postupu. Právě pro snadné nalezení těchto podmínek je součástí každé chromatografické metody test způsobilosti, který se provádí vždy při jakékoli změně systému, před novou sérií měření či před použitím v jiné laboratoři.

Součástí testu způsobilosti systému jsou údaje o požadavcích na opakovatelnost analýzy a na rozlišení dvou píků. Ty pak mohou být doplněny o požadavky na počet teoretických pater (účinnost kolony), asymetrii píku, mez detekce nebo minimální či maximální retenční čas [14]. Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky vypočítané pro řadu po sobě jdoucích měření pro šest nástřiků roztoku standardů. Hodnota relativní směrodatné odchylky by neměla překročit 1 %. Účinnost kolony se vypočítá jako zdánlivý počet teoretických pater  $N$  z dat získaných v závislosti na metodě za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických. Dalším měřeným parametrem je faktor symetrie píku.

Ideální symetrii značí hodnota 1, pokud dochází k „tailingu“ (chvostování), faktor symetrie je větší než 1, pokud k „frontingu“ (čelní asymetrie), faktor je menší než 1. Hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 0,8 – 1,5 [18].

### 3.4.2 Validace

Proces validace nelze zcela zobecnit, jelikož existuje mnoho analytických metod, jejichž součástí validace je, a každá metoda si vyžaduje alespoň částečně specifický způsob. V případě stanovení účinné látky a nečistot v léčivém přípravku pomocí HPLC jsou hlavními analytickými parametry ověřovanými při validaci přesnost, linearita, správnost, selektivita, robustnost a detekční a kvantitativní limit [14].

#### 3.4.2.1 Přesnost

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody prováděné opakovaně s jedním vzorkem. Rozlišuje se zde stanovení opakovatelnosti, kdy se metoda provádí jedním analytikem, ve stejné laboratoři, na tomtéž přístroji, se stejnými činidly a s jedním zhomogenizovaným vzorkem, a stanovení reprodukovatelnosti, kdy se jeden zhomogenizovaný vzorek analyzuje v různých laboratořích. Může se také stanovit intermediární přesnost, která spočívá v provedení metody s jedním zhomogenizovaným vzorkem v téže laboratoři, ale v jiný den, jiným analytikem a s jiným přístrojovým vybavením. Přesnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka vypočítaná z ploch píků nejméně šesti analýz šesti roztoků vzorku. Tyto analýzy musí být provedené kompletním postupem, včetně přípravy vzorku. Relativní směrodatná odchylka musí být menší než 5% [14, 16, 17].

#### 3.4.2.2 Linearita

Linearita označuje schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Dokládá se buď graficky, jako závislost výsledků na koncentraci látky, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Zde se uvádí korelační koeficient vyjadřující míru linearitu, směrnice,

kteřá je mírou citlivosti, y-úsek a chyby stanovení všech zmíněných hodnot. Je požadováno potvrzení linearity v rozmezí 50-150% (dle ICH 80-120%) deklarovaného obsahu, v analýzách pěti různých koncentrací standardní látky. Míra linearity vyjádřená korelačním koeficientem by se v tomto případě měla co nejvíce přibližovat hodnotě 1, pokud jde, jako v našem případě, o přímou závislost hodnot [14, 16].

#### 3.4.2.3 Správnost

Správnost je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Zjistit zmíněnou správnou hodnotu je problematické, používá se k tomu zpravidla jedna ze tří metod. Buď se hodnota zjistí jinou, nezávislou metodou, jejíž správnost je již ověřena, nebo analýzou placebo s přidavkem standardu nebo v případě, že placebo není k dispozici, analýzou vzorku s přidavkem standardu. Správnost se v našem případě hodnotila druhou uvedenou metodou a vyjádřila se jako výtěžnost. Ta by se měla pohybovat v intervalu  $100 \pm 5 \%$  s relativní směrodatnou odchylkou menší než 5 % [14].

#### 3.4.2.4 Selektivita

Selektivita ukazuje schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek. Těmito mohou být další účinné složky kombinovaných přípravků, výchozí a pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné a vedlejší produkty, rozpouštědla a jiné neznámé látky. Metoda pro stanovení účinné látky nemůže být výše uvedenými rušena. Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placebo či různými jinými nečistotami. U naší metody není nutné předložit číselné vyjádření selektivity, ale požaduje se doložení chromatogramů placebo, známých vedlejších a rozkladných produktů, nebo vzorku po rozkladu teplem, hydrolyzou atd. [14, 16]

#### 3.4.2.5 Robustnost

Robustnost vlastně opisuje reprodukovatelnost výsledků z parametru přesnost. Jde o míru reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenizovaného vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Popisuje schopnost metody dávat přesné a správné výsledky i při mírně pozměněných pracovních podmínkách, ke kterým za daných okolností nutně dochází, i když je popsáný postup zachován. Robustnost popisuje míru vlivu těchto změn podmínek na výsledky analýzy. Uvádí se především změny pH, teploty, šarže činidel, kolony, složení mobilní fáze, atd. [14]

#### 3.4.2.6 Detekční limit

Detekční limit odpovídá nejmenší koncentraci analytu, která ještě vyvolá odezvu měřicího systému statisticky významně odlišnou od šumu. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovované kvantitativně [15].

#### 3.4.2.7 Kvantitativní limit

Hodnota kvantitativního limitu je požadována u metod, které mají umožnit i stanovení obsahu nečistot. Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. U instrumentálních metod se tyto limity stanovují na základě šumu. Jedním z možných způsobů je stanovení směrodatné odchylky odezvy slepého vzorku, její trojnásobek pak odpovídá detekčnímu limitu, desetinásobek kvantitativnímu limitu [14, 17].



### 3.5 Rešerše

Před vlastním vývojem metody pro stanovení dexamethason-acetátu v propylenglykolu byla provedena rešerše v oblasti již používaných metod v obdobných případech. Nejčastěji se jednalo o metody využití pro analýzu přípravků s jiným vehikulem, přípravky kombinované a rovněž metody pro stanovení čisté baze – dexamethasonu.

Dexamethason-acetát byl samostatně pomocí HPLC stanovován v krému a v mikroemulzi. Metody byly téměř totožné. V obou případech byla shodně použita mobilní fáze methanol:voda 65:35 s průtokem 1.0 ml/min a nástřikem 20  $\mu$ l, ocelová kolona C18, 250 $\times$ 4.6 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m a také UV detekce. Drobný rozdíl byl pouze v nastavené vlnové délce detekce – v případě emulze se jednalo o 239 nm (retenční čas 6,7 min), v případě krému 254 nm (retenční čas 8,52 min) [19, 20].

V kombinovaném přípravku – čípcích – byl DA stanovován také s kolonou C18, 250 $\times$ 4.6 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m. Byla použita mobilní fáze acetonitril:voda 50:50 s pH nastaveným 85% kyselinou fosforečnou na hodnotu 2,5 a se stejným průtokem jako v předchozích případech. UV detekce probíhala ve dvou vlnových délkách a to při 240 a 290 nm [21].

Analýza dexamethasonu v koňském séru za přítomnosti dalších látek probíhala také za využití ocelové kolony C18, 250 $\times$ 4.6 mm s velikostí částic 5  $\mu$ m a UV detekce při 254 nm. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody v poměru 51:49 s obsahem 0,1 % kyseliny trifluoroctové (ion-párující agens kvůli zachycení bílkovin přítomných v séru). Retenční čas se pohyboval okolo 4. minuty [22].

Jako výchozí byla nakonec brána metoda uvedená v ČL 2009 u dexamethason-acetátu jako zkouška na čistotu – stanovení příbuzných látek. Použitá kolona byla rovněž C18, 250 $\times$ 4.6 mm, s velikostí částic 3  $\mu$ m, mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody v poměru 38:62, průtok a nástřik byly totožné jako v předchozích případech. UV detekce byla rovněž nastavena na 254 nm [23].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Dexamethasoni acetat ČL 2009, š. 100501, Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové, Retest date 05.2013

Dexamethasonum Ph. Eur. 6.0, š. 090511, Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové, Retest date 05.2014

Propylenglycolum ČL 2009, š. 11109-T54, Fagron Olomouc, expirace 31.7.2014

Dexamethasoni acetatis solutio 1%, Nemocniční lékárna FN Hradec Králové, datum přípravy 13.6.2012

Ethylparaben 99%, š. 35129-021, Aldrich, Německo

Acetonitril, CHROMASOLV gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo, š. SZBA 044S

Ultračistá voda, čištěná systémem MILLI Q, Millipore, Bedford, MA, USA

#### **4.1.2 Pomůcky a přístroje**

HPLC chromatograf Waters Breeze

Waters 1525 binary HPLC Pump

Waters 2427 dual  $\alpha$  Absorbance detector

717 plus Autosampler

program Breeze version 3.30 SPA, copyright © 2002 Waters corporation

analytické váhy 2004 MP Sartorius, Německo

běžné laboratorní vybavení a sklo

## 4.2 Obecné pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava roztoků k analýze

O přípravě jednotlivých roztoků, které byly využity při vývoji metody, bude pojednáno přímo v příslušné kapitole. Roztoky standardů vznikaly stále stejnými postupy a to navážkou substance do odměrné baňky a doplněním MF, pouze s rozdílem výsledných koncentrací látek a složení doplňovaných MF.

#### 4.2.1.1 Příprava zásobních roztoků

Kromě roztoků vzniklých přímo navážkou substancí a doplněním MF bylo využíváno následujících zásobních roztoků. Ty musely být vytvořeny vždy zvlášť pro každou použitou mobilní fázi.

Zásobní roztok nečistoty – dexamethasonu – byl připraven navážením přibližně přesně 50 mg do 100ml odměrné baňky a doplněn mobilní fází. Baňka byla vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně do úplného rozpuštění látky.

Zásobní roztok vnitřního standardu byl připraven rozpuštěním přibližně přesně 50 mg ethylparabenu v mobilní fázi v odměrné baňce o objemu 100 ml. Do konečných zkoušených roztoků rovněž ve 100ml odměrných baňkách byly následně přidávány 2 ml tohoto zásobního roztoku, aby koncentrace odpovídala 1mg/ 100 ml.

#### 4.2.1.2 Příprava výsledného zkušného roztoku

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 25 mg dexamethason-acetátu, byl přidán 1 ml zásobního roztoku dexamethasonu, 2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (viz kap. 3.2.1.1) a tato směs byla doplněna mobilní fází využívanou v konkrétní analýze. Baňka byla vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně do úplného rozpuštění látky.

#### 4.2.1.3 Příprava roztoků vnitřních standardů

Byly připraveny zvlášť vzorky methylparabenu, ethylparabenu a propylparabenu stejným způsobem. Bylo naváženo přibližně přesně 20 mg látky do 50ml odměrné baňky, doplněno do objemu mobilní fáze a rozpuštěno v ultrazvukové lázni. Bylo odebráno 10 ml tohoto roztoku a převedeno do 100ml odměrné baňky a opět doplněno mobilní fází. Vznikl tak roztok o koncentraci 4 mg/100 ml, který se dávkoval na kolonu.

#### 4.2.1.4 Příprava roztoku pro stanovení parametru opakovatelnosti

Roztok byl připraven navážkou přibližně přesně 0,5 mg dexamethasonu a 25,0 mg dexamethason-acetátu do 100ml odměrné baňky, přidají se 2 ml zásobního roztoku ethylparabenu (viz kap. 3.2.1.1) a doplní do objemu konečnou mobilní fází.

#### 4.2.1.5 Příprava roztoku pro stanovení parametru přesnosti

Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo odváženo zhruba přesně množství vzorku odpovídající 1 mg dexamethason-acetátu (0,1000 g vzorku) a 20 ml roztoku vnitřního standardu (EP) v mobilní fázi o koncentraci 0,2 mg/100 ml. Ten byl připraven přímo navážkou 0,2 mg ethylparabenu do 100ml odměrné baňky, která byla doplněna mobilní fází. Roztok vzorku s IS byl vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně.

#### 4.2.1.6 Příprava roztoků pro stanovení parametru linearity

Nejdříve byl připraven roztok A o koncentraci 200 mg/100 ml a to přímým navážením dexamethason-acetátu do 100ml odměrné baňky a doplněním do objemu mobilní fází. Tento zásobní roztok byl používán pouze k přípravě dalších roztoků, nejdříve dvou roztoků č. 6 o nejvyšší koncentraci (50 mg/100 ml). První, který byl také následně používán pro zhotovení dalších roztoků, byl připraven převedením 25 ml roztoku A do 100ml odměrné baňky a doplněním MF do objemu. Do druhého, použitého k vlastní analýze, byly k 25 ml roztoku A přidány ještě 2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (viz kap. 3.2.1.1) a následovalo doplnění MF jako u předchozího. Roztok č. 5 o koncentraci 40 mg/100 ml byl připraven převedením 20 ml zásobního roztoku A do 100ml odměrné baňky, přidáním 2 ml zásobního roztoku ethylparabenu a doplněním MF. Roztok č. 4 (30 mg/100 ml) byl zhotoven převedením 30 ml roztoku č. 6 a 1 ml zásobního roztoku ethylparabenu do 50ml odměrné baňky a doplněním MF. Roztok č. 3 (25 mg/100 ml) byl připraven obdobně, jen roztoku č. 6 bylo 25 ml. Roztoky č. 1 a 2 (o koncentraci 10 a 20 mg/100 ml) byly vytvořeny opět podobným způsobem s rozdílem množství použitého zásobního roztoku A, které činilo 2,5 ml u roztoku č. 1 a 5 ml u roztoku č. 2.

#### 4.2.1.7 Příprava roztoku pro stanovení parametru správnosti

Do 200ml odměrné baňky byl připraven zásobní roztok navážením zhruba přesně 50 mg standardu dexamethason-acetátu, 1 mg standardu dexamethasonu, přidáním 4 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněním MF do objemu. Pro každý vzorek se do centrifugační zkumavky navážilo přibližně přesně 0,5000 g placebo (propylenglykolu) a smísilo s 20 ml výše uvedeného zásobního roztoku standardů.

#### **4.2.2 Příprava mobilní fáze**

V kádince se smísil acetonitril s částí vody R a po ustálení směsi se tato vodou doplnila na konečný objem, tedy 500 ml. Výsledná mobilní fáze byla tvořena 250 ml vody a 250 ml acetonitrilu. MF byla poté vakuově filtrována za použití 0,45 $\mu$ m-filtru, aby se zamezilo vstupu mechanických nečistot do chromatografického systému. Stejně probíhala příprava všech mobilních fází s rozdílem poměrů vody k acetonitrilu.

#### **4.2.3 Příprava chromatografu před měřením**

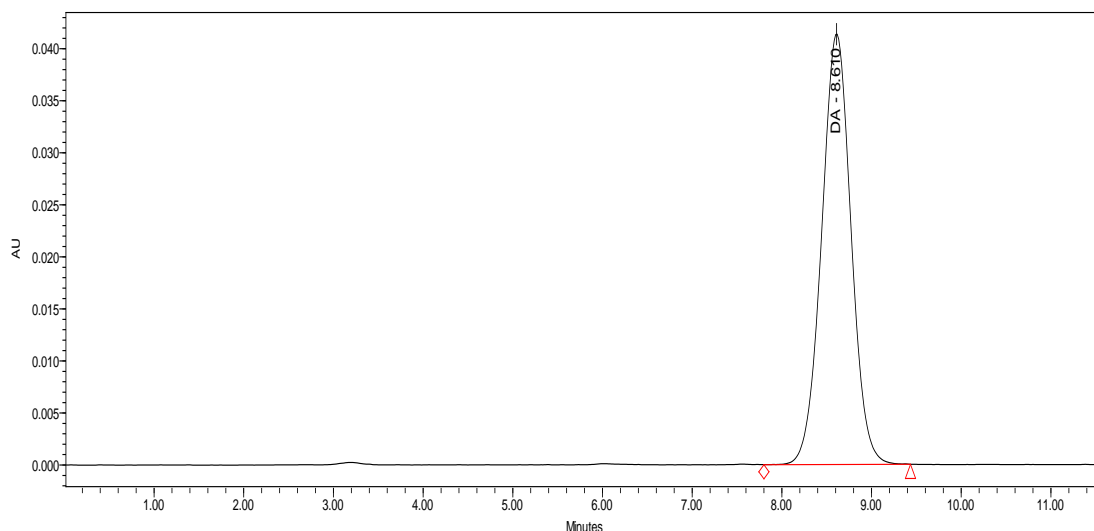
Před každou první analýzou a při každé změně MF byl při laboratorní teplotě propláchnut analytický přístroj novou MF. Ta se jím následně nechala protékat při určeném průtoku 10 – 15 minut do uvedení kolony do rovnováhy, při čemž bylo dosaženo stability základní linie. Poté se dávkoval na chromatografickou kolonu analyzovaný roztok.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Vývoj metody

Při vývoji metody se vycházelo z metody pro zkoušku na čistotu substance dexamethason-acetátu uvedenou v ČL 2009 [23]. V úvodu byly respektovány všechny podmínky a parametry analýzy včetně složení mobilní fáze, pouze jako standard nečistoty byl použit rozkladný produkt účinné látky – dexamethason.

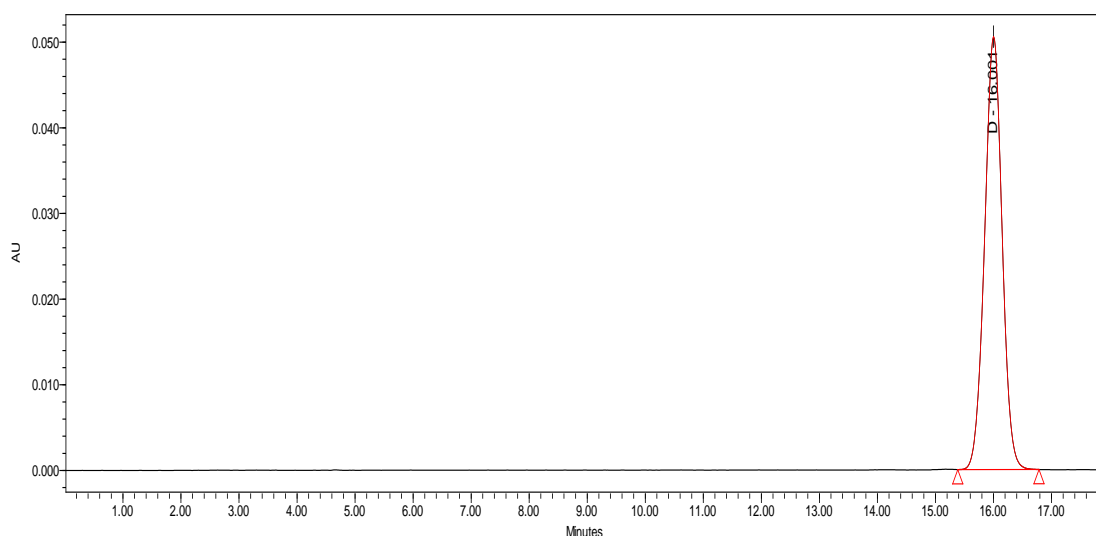
Nejdříve se dexamethason a dexamethason-acetát analyzovaly samostatně v roztocích o koncentraci 20 mg/100 ml za použití téže mobilní fáze, kterou udává lékopisná metoda (ACN:H<sub>2</sub>O 38:62), o průtoku 1 ml/min a s nástřikem 10  $\mu$ l. Retenční časy látek se pohybovaly kolem 8 minut (viz Obrázek 3) a byly příliš blízko u sebe.



Obrázek 3 Chromatogram standardu dexamethason-acetátu (MF ACN: H<sub>2</sub>O 38:62)

Po úpravě mobilní fáze na poměr ACN:H<sub>2</sub>O 30:70 se retenční časy obou látek výrazně prodloužily (viz Obrázek 4), dexamethason-acetát se za 25 minut analýzy dokonce neeluoval vůbec.

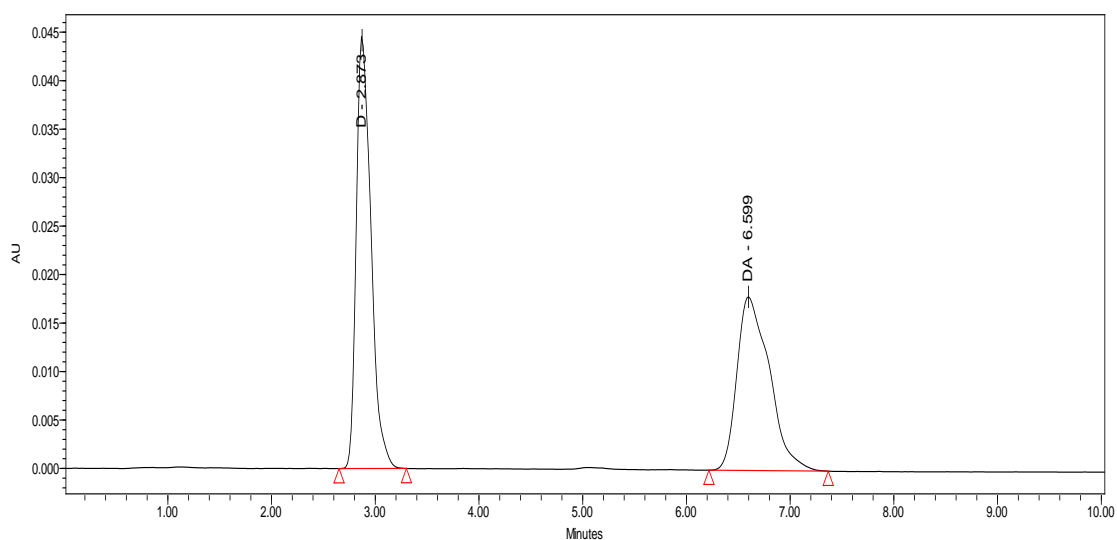




**Obrázek 4 Chromatogram standardu dexamethasonu (MF ACN: H<sub>2</sub>O 30:70)**

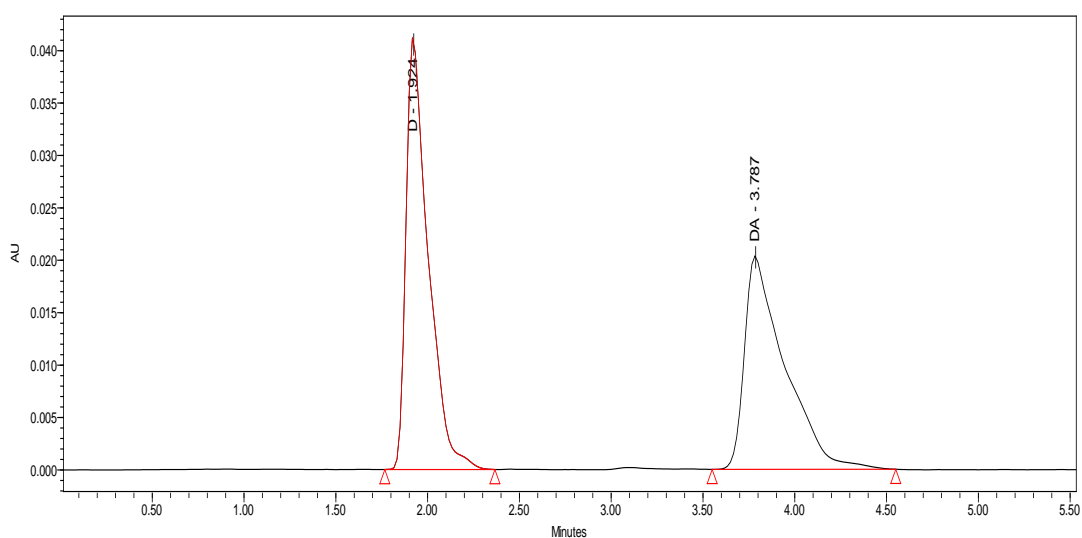
Zvýšení průtoku na 1,2 ml/min a analýza obou látek v jednom roztoku (vždy v poměru 1:1) nepřinesly žádné zlepšení, píky nebyly oddělené na základní linii - látky se nedostatečně separovaly. Úprava poměru ve složení MF na ACN:H<sub>2</sub>O 25:75 a další zvýšení průtoku na 1,5 ml/min měly podobný efekt jako v prvním případě, dexamethason-acetát se opět neeluoval po celý čas analýzy.

Následovala výměna kolony za kratší verzi (HS-C18 150×4,6 mm) a několik změn poměru acetonitrilu a vody v mobilní fázi. Až při zvýšení objemu acetonitrilu na úkor vody v MF na složení ACN:H<sub>2</sub>O 45:55 se retenční čas obou látek zkrátil a píky se významně přiblížily, i když neměly ještě vyhovující tvary (viz Obrázek 5).

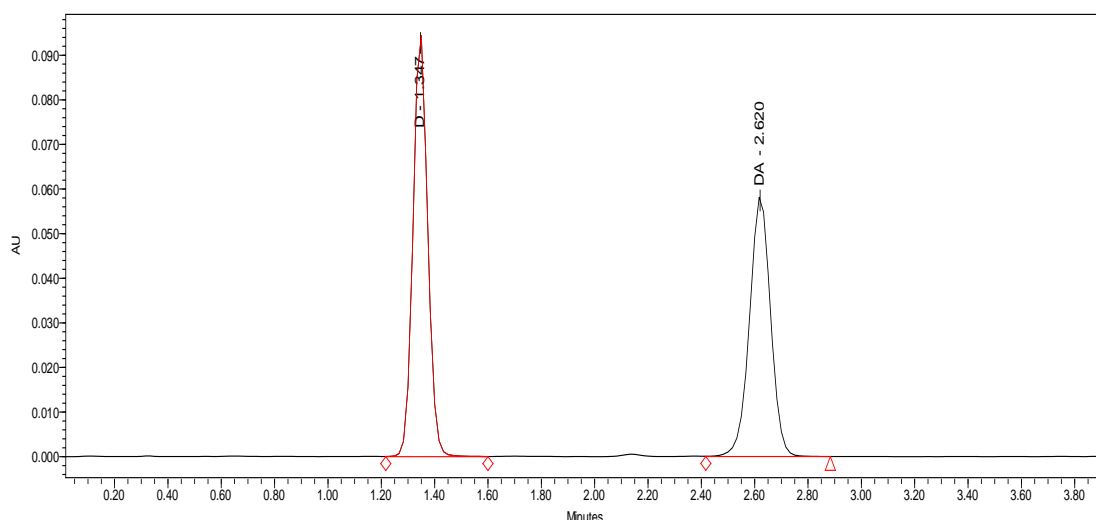


**Obrázek 5 Chromatogram standardů D a DA (MF ACN: H<sub>2</sub>O 45:55)**

Analýza s mobilní fází ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 již poskytovala lepší výsledky vzhledem k rychlosti analýzy (viz Obrázek 6) a další změny v poměru složení MF ve prospěch acetonitrilu již k lepším tvarům píku dexamethason-acetátu nevedly. Až při dalším zkrácení kolony (HS-C18 100×4,6 mm) a již vyzkoušené mobilní fázi ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 bylo dosaženo jak optimálních retenčních časů obou látek, tak píků v dostačující kvalitě (viz Obrázek 7).



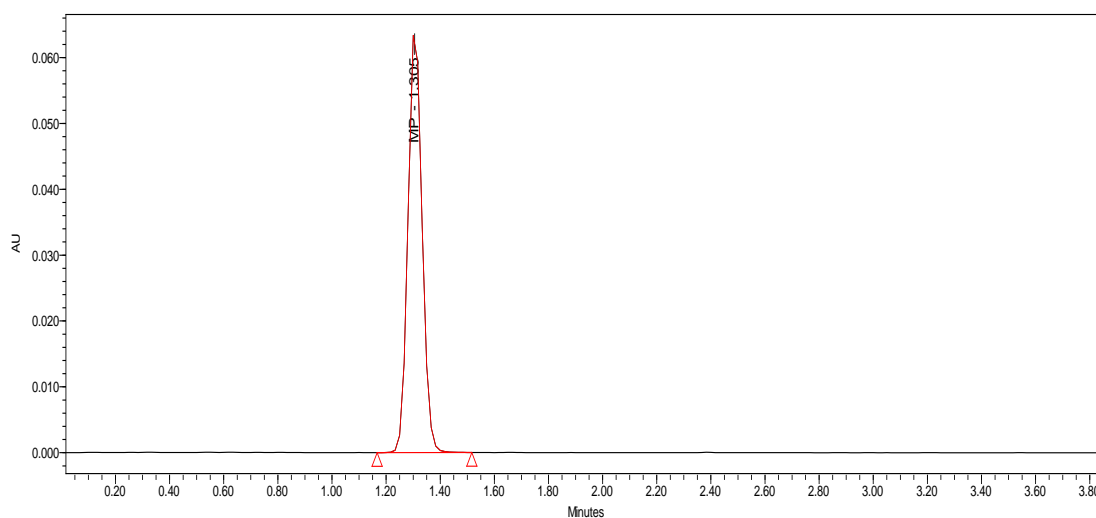
**Obrázek 6 Chromatogram standardů D a DA (MF ACN: H<sub>2</sub>O 50:50)**



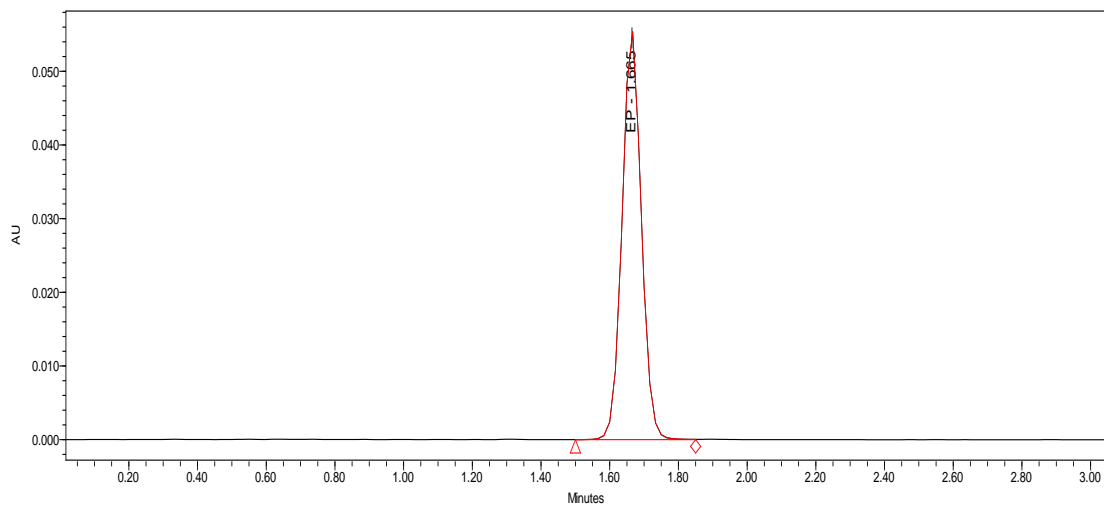
Obrázek 7 Chromatogram standardů D a DA při užití kratší kolony (MF ACN: H2O 50:50)

### 5.1.1 Výběr vnitřního standardu

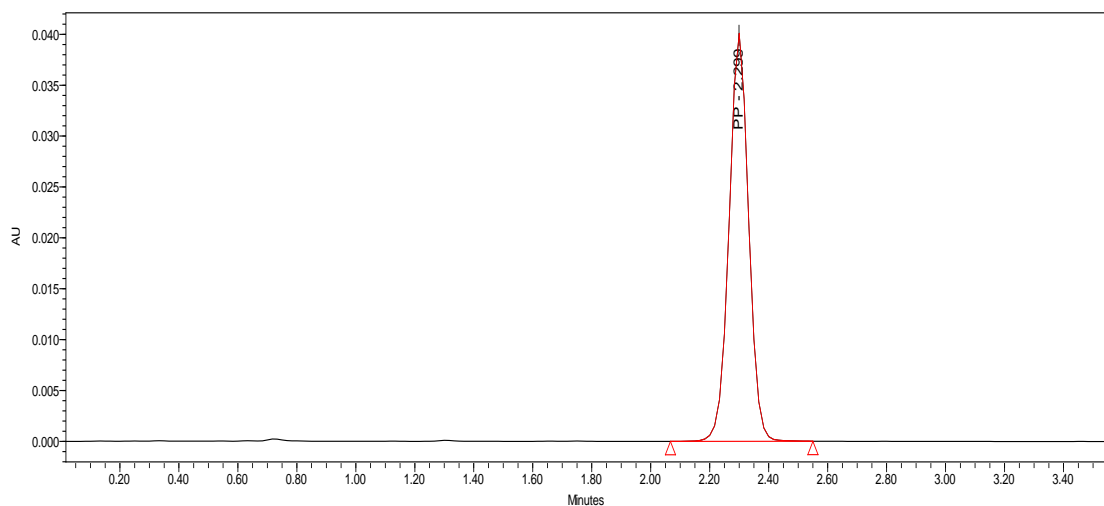
Po dosažení optimálních výsledků analýzy, co se retenčních časů a tvaru píků týká, následoval výběr vnitřního standardu. S ohledem na požadované vlastnosti vnitřního standardu (viz kap. 2.3.5 Kvantitativní analýza) přicházely v úvahu tři látky z řady esterů kyseliny *para*-hydroxybenzoové – parabenů, a to methylparaben, ethylparaben a propylparaben (příprava analyzovaných roztoků viz kapitola 4.2.1.3). Jednotlivé parabeny pak byly hodnoceny dle vhodnosti retenčního času vzhledem k retenčním časům dexamethasonu a dexamethason-acetátu.



Obrázek 8 Výběr vnitřního standardu - chromatogram methylparabenu

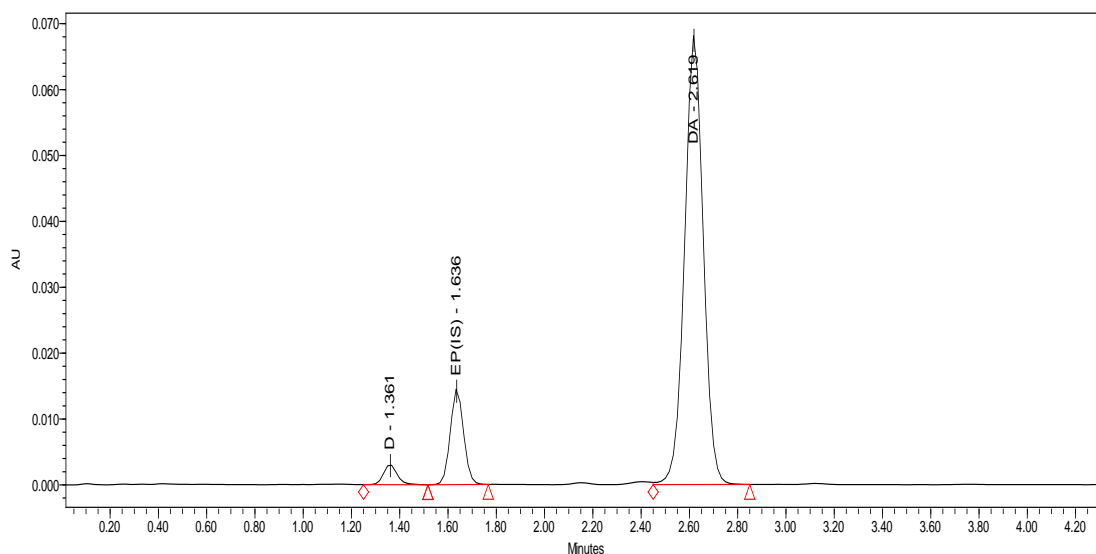


**Obrázek 9 Výběr vnitřního standardu - chromatogram ethylparabenu**



**Obrázek 10 Výběr vnitřního standardu - chromatogram propylparabenu**

Jak je z chromatogramů patrné, k analýze zkoumaného léčivého přípravku byl nejvhodnějším vnitřním standardem ethylparaben (viz Obrázek 11).



**Obrázek 11 Chromatogram standardů s vybraným IS ethylparabenem**

Ve výsledné metodě byla tedy použita izokratická eluce s mobilní fází ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 o průtoku 1,5 ml/min, stacionární fází byl modifikovaný silikagel HS-C18 o velikosti částic 5 μm v koloně o rozměrech 100×4,6 mm. Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi a nastříkovány na kolonu v objemu 10 μl.

## 5.2 Validace analytické metody

### 5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

#### 5.2.1.1 Účinnost chromatografické kolony

Vypočítá se podle vzorce:

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

N – zdánlivý počet teoretických pater,  $t_R$  – retenční čas (min),  $w_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky (min)

Byla použita data ze tří měření u hodnocení opakovatelnosti (příprava vzorků viz níže)

Tabulka 1 Zdánlivý počet teoretických pater

|   | $N_D$ | $N_{DA}$ | $N_{EP}$ |
|---|-------|----------|----------|
| 1 | 2374  | 4849     | 3298     |
| 2 | 2270  | 4981     | 3619     |
| 3 | 2595  | 4933     | 3407     |

**Požadavek:**  $N > 900$

**VYHOVUJE**

#### 5.2.1.2 Faktor symetrie píku $A_S$

Vypočítá se dle vzorce:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky,  $w_{0,05}$  – šířka píku v 1/20 jeho výšky

Data rovněž využita ze tří měření u hodnocení opakovatelnosti.

**Tabulka 2 Faktor symetrie píku**

|   | D     | DA    | EP    |
|---|-------|-------|-------|
| 1 | 0,984 | 0,973 | 1,078 |
| 2 | 1,034 | 0,987 | 1,035 |
| 3 | 1,024 | 0,977 | 1,067 |

**Požadavek:**  $A_S = 0,8 - 1,5$  [18]**VYHOVUJE**

## 5.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků RS

Mezi píky dvou analyzovaných složek se vypočítá dle vzorce:

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

$t_{R2}$ ,  $t_{R1}$  – retenční časy dvou sousedních píků,  $t_{R2} > t_{R1}$ ,  $w_{h1,2}$  – šířky píků v poloviční výšce

Data rovněž využita z měření u hodnocení opakovatelnosti.

**Tabulka 3 Rozlišení chromatografických píků**

| $R_S$ | D    | DA  | EP   |
|-------|------|-----|------|
| 1     | 13,5 | 7,8 | 2,6  |
| 2     | *    | 7,9 | 2,5  |
| 3     | *    | 7,8 | 2,5  |
| 4     | *    | 7,8 | 2,55 |
| 5     | *    | 7,8 | 2,55 |
| 6     | *    | 7,7 | 2,55 |

\* pík není integrovatelný, určováno až od plochy 5000 AU

Protože vyvinutá metoda je dále využívána ve stabilitních testech uvedeného přípravku, byla v rámci kontrolní laboratoře validována na kvalifikovaném přístroji a tento parametr vyhovuje uvedenému limitu i pro nečistotu dexamethason.

#### 5.2.1.4 Opakovatelnost analýzy

Roztok analyzovaných látek se dávkuje na kolonu šestkrát v koncentraci  $D = 0,5\text{mg}/100\text{ml}$ ,  $DA = 25,0\text{mg}/100\text{ml}$ ,  $EP = 1,0\text{mg}/100\text{ml}$  (příprava viz kap. 4.2.1.4)

Tabulka 4 Opakovatelnost - retenční časy a plochy píků

|         | $t_D$  | $A_D$  | $t_{DA}$ | $A_{DA}$ | $t_{EP}$ | $A_{EP}$ |
|---------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|
| 1       | 1,231  | 11543  | 2,426    | 372826   | 1,487    | 51165    |
| 2       | 1,244  | 11414  | 2,437    | 371625   | 1,5      | 51314    |
| 3       | 1,251  | 11300  | 2,446    | 374003   | 1,51     | 51573    |
| 4       | 1,25   | 11195  | 2,443    | 371118   | 1,505    | 50706    |
| 5       | 1,249  | 11418  | 2,443    | 377130   | 1,504    | 51767    |
| 6       | 1,223  | 11456  | 2,416    | 379499   | 1,481    | 51848    |
| průměr  | 1,2413 | 11388  | 2,4352   | 374367   | 1,4978   | 51396    |
| SD      | 0,0116 | 122,65 | 0,0118   | 3303,1   | 0,0113   | 426,49   |
| RSD (%) | 0,94   | 1,08   | 0,48     | 0,88     | 0,76     | 0,83     |

**Požadavek:**  $RSD < 1\%$

**VYHOVUJE**



## 5.2.2 Validace analytické metody

### 5.2.2.1 Přesnost

Byl analyzován zkoušený vzorek - roztok dexamethason-acetátu v propylenglykolu s přidáním vnitřním standardem (příprava viz kap. 4.2.1.5). Bylo připraveno 6 roztoků, každý byl dávkován na kolonu třikrát. Poměry ploch píků DA/EP byly přepočteny na 0,1000 g roztoku.

Tabulka 5 Přesnost - přepočet plochy píku na navážku

|   | navážka (g) | $A_{vz}$ | na 0,1 g |
|---|-------------|----------|----------|
| 1 | 0,09696     | 258893,5 | 267010,6 |
| 2 | 0,14073     | 375764   | 267010,6 |
| 3 | 0,11779     | 307068   | 260691,1 |
| 4 | 0,10309     | 247342   | 239928,2 |
| 5 | 0,10455     | 260828,7 | 249477,5 |
| 6 | 0,13142     | 350749,7 | 266892,2 |

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Aritmetický průměr $A_{vz}$ | 258501,7 |
| SD                          | 11370,2  |
| RSD                         | 4,40 %   |

Požadavek: RSD < 5%

**VYHOVUJE**

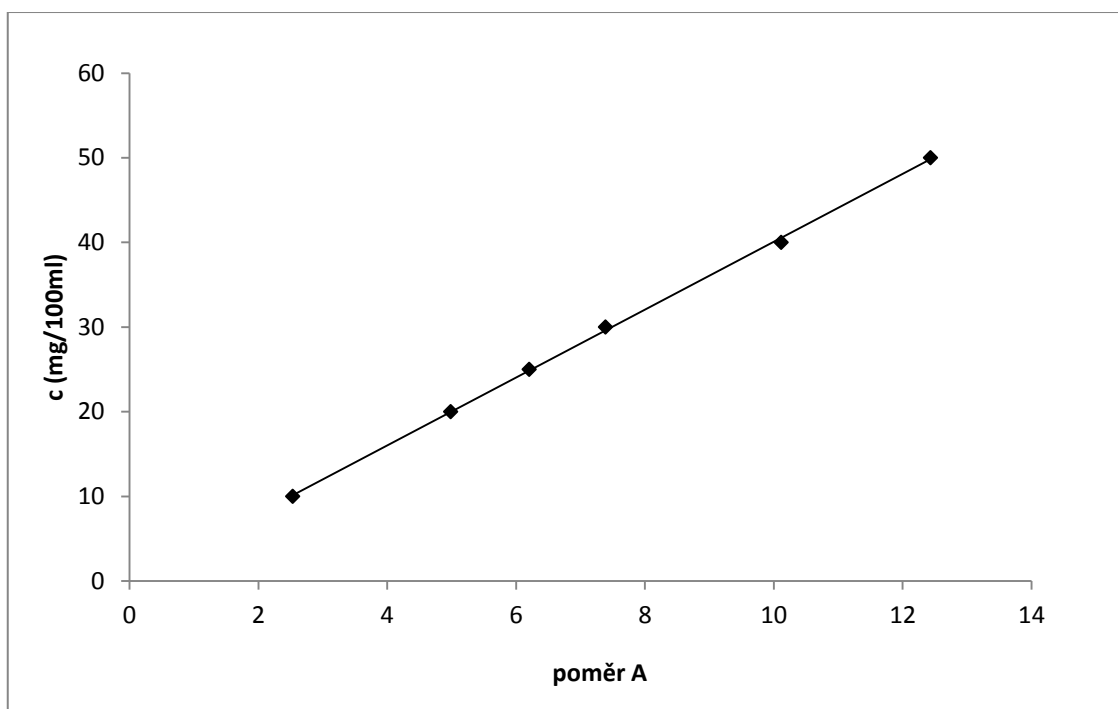
### 5.2.2.2 Linearita

Pro hodnocení linearity byla využita metoda vnitřního standardu, zde byl použit ethylparaben. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků s různou koncentrací dexamethason acetátu - tři vzorky s vyšší, jeden se standardní a dva s nižší koncentrací - a s koncentrací ethylparabenu 1mg/100 ml (příprava viz kap. 4.2.1.6)

Každý kalibrační roztok byl třikrát dávkován na kolonu a pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry poměrů ploch DA/EP. Závislost hodnoty poměru ploch na koncentraci dexamethason-acetátu v roztoku byla vyhodnocena metodou lineární regrese za pomoci Excel šablony LinReg.

**Tabulka 6 Linearita**

|   | c (mg/100ml) | poměr ploch A |
|---|--------------|---------------|
| 1 | 10           | 2,533         |
| 2 | 20           | 4,985         |
| 3 | 25           | 6,204         |
| 4 | 30           | 7,388         |
| 5 | 40           | 10,115        |
| 6 | 50           | 12,433        |



Obrázek 12 Graf závislosti poměru ploch píků DA/EP na koncentraci DA v roztoku

Regresní funkce:  $y = kx + q$

**Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:**

|  |                   |
|--|-------------------|
| Směrnice $k$   | $4,007 \pm 0,045$ |
| Absolutní člen $q$   | $0,014 \pm 0,358$ |
| Koeficient korelace $R$  | 0,99975           |
| Reziduální odchylka $s_{rez}$                                    | 0,358             |
| Závislost $y$ na $x$ byla prokázána na hladině významnosti 0,001 |                   |

**VYHOVUJE**

### 5.2.2.3 Správnost

Proměřovalo se 6 různých vzorků, každý byl na kolonu nastříknut třikrát (příprava viz kap. 4.2.1.7). Výtěžnost  $R_i$  byla vypočítána podle vzorce:

$$R_i = 100 \times c_i/c_0$$

$c_i$  – koncentrace stanovená dle HPLC,  $c_0$  – koncentrace vložená

**Tabulka 7 Správnost**

|   | $c_0$<br>mg/100ml | poměr<br>plocha/IS | $c_i$<br>mg/100ml | standard | $R_i$ (%) |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|----------|-----------|
| 1 | 24,68             | 7,370              | 25,66             | 7,088    | 103,99    |
| 2 | 24,68             | 7,350              | 25,59             | 7,088    | 103,69    |
| 3 | 24,68             | 7,363              | 25,64             | 7,088    | 103,88    |
| 4 | 24,68             | 7,359              | 25,62             | 7,088    | 103,82    |
| 5 | 24,68             | 7,368              | 25,65             | 7,088    | 103,95    |
| 6 | 24,68             | 7,365              | 25,65             | 7,088    | 103,91    |

Aritmetický průměr  $R_i$       103,87 %  
SD                                      0,1  
RSD                                      0,10 %

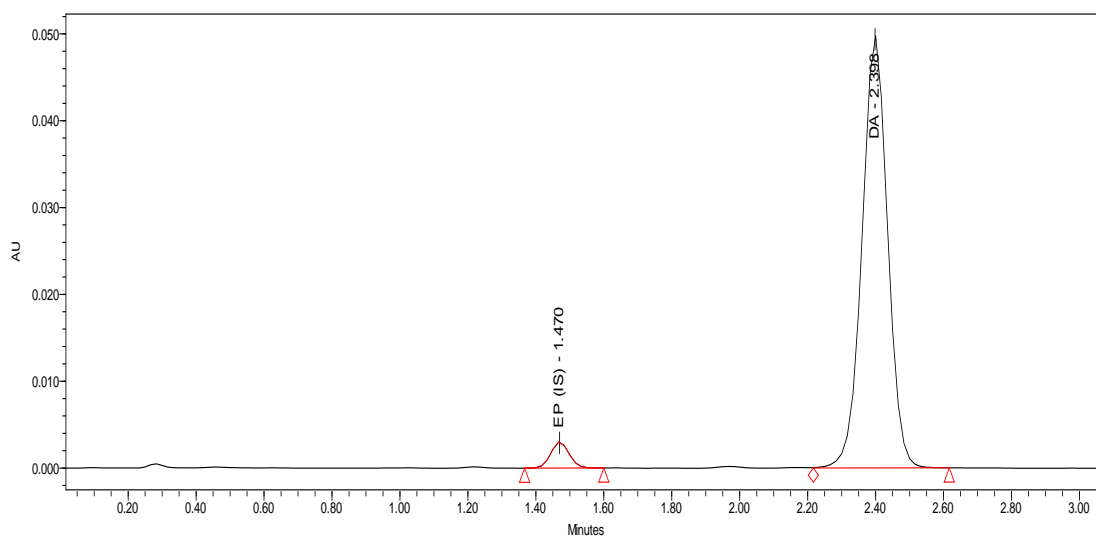
**Požadavek:** R v intervalu  $100 \pm 5 \%$

RSD < 5 %

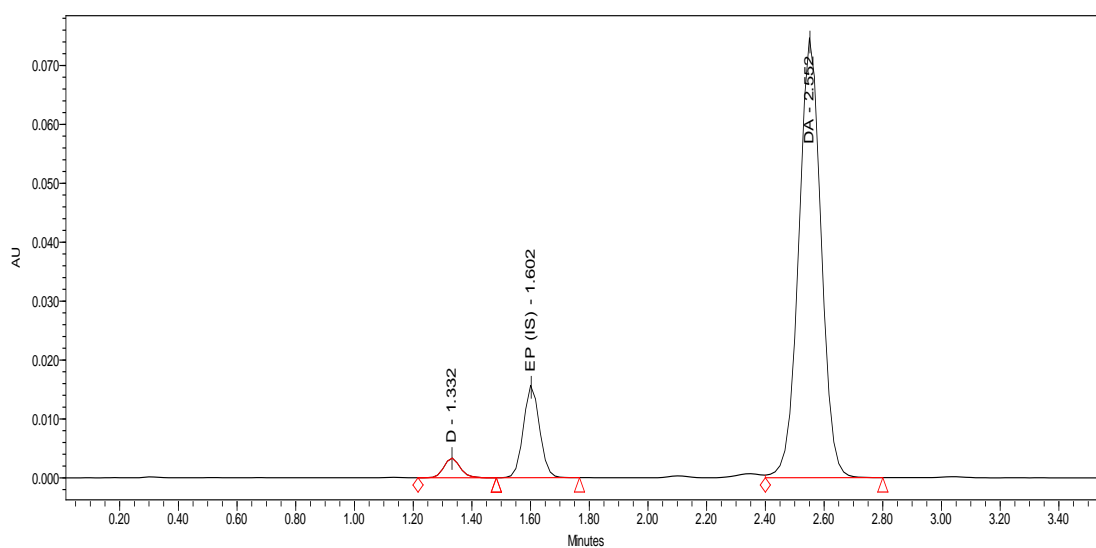
**VYHOVUJE**

#### 5.2.2.4 Selektivita

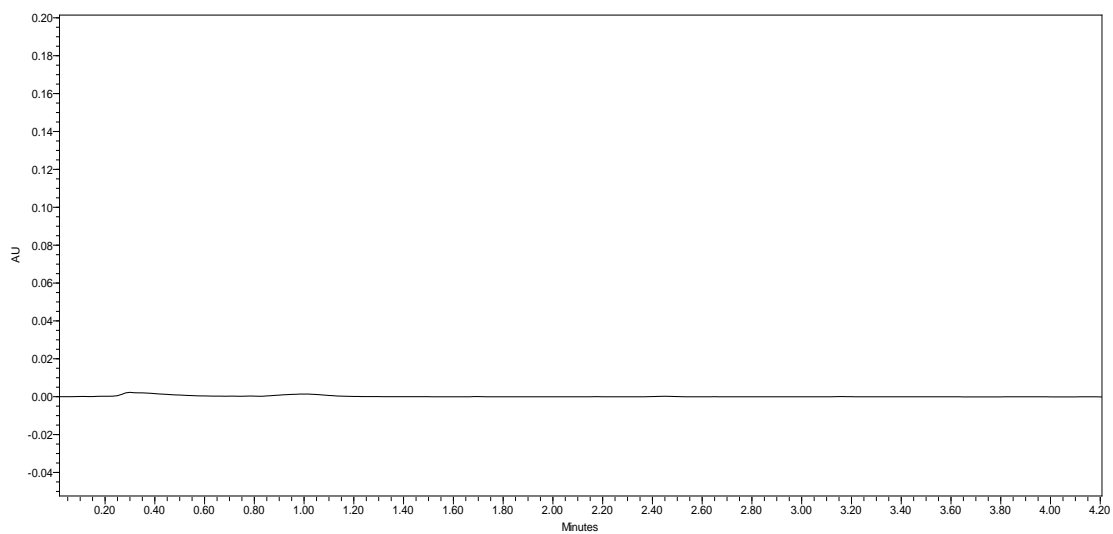
Zkouškou na selektivitu se ověřuje schopnost metody změřit správně a specificky stanovenou látku v přítomnosti látek jiných. Zde byly porovnávány chromatogramy roztoků standardů, vzorku a placebo a bylo zjištěno, že ani rozkladný produkt ani složky placebo neruší svou přítomností analýzu přípravku.



Obrázek 13 Chromatogram vzorku s přidaným IS



Obrázek 14 Chromatogram standardů D, EP (IS) a DA



**Obrázek 15 Chromatogram placebo**

### 5.2.2.5 Robustnost

Byl hodnocen vliv složení mobilní fáze na plochu píku (viz Tabulka 8) a retenční čas (viz Tabulka 9 a Obrázek 16 a 17). Použit byl standardní roztok obsahující dexamethason acetát, dexamethason a ethylparaben v odpovídajících koncentracích. Postup přípravy mobilních fází popisuje kapitola 4.2.2, rozdíly byly pouze v množství jednotlivých složek.

**Tabulka 8 Vliv složení mobilní fáze na plochu píku**

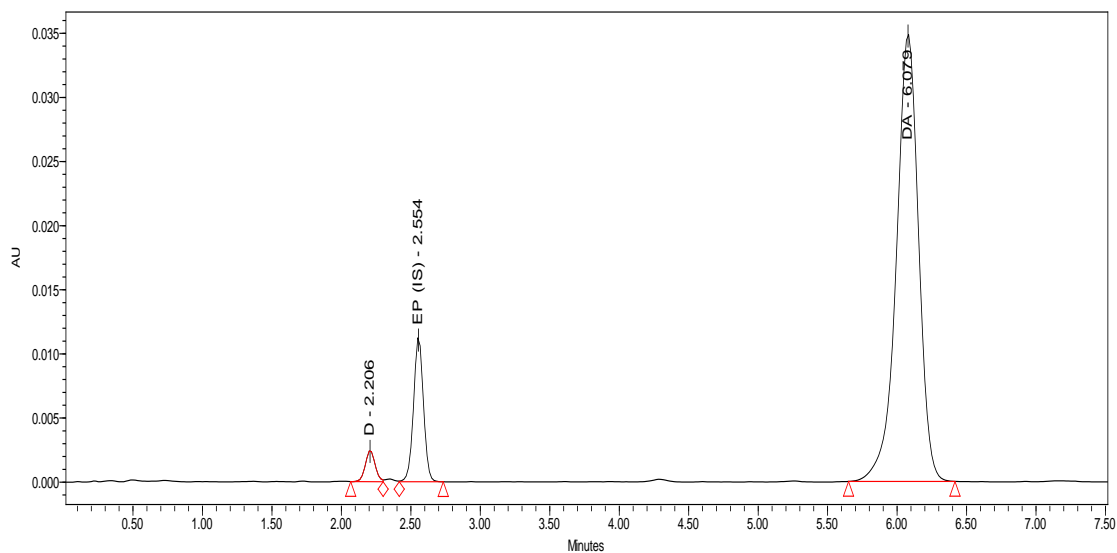
|                      | DA             |                    | D              |                    | EP             |                    |
|----------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| ACN:H <sub>2</sub> O | A <sub>i</sub> | A <sub>r</sub> (%) | A <sub>i</sub> | A <sub>r</sub> (%) | A <sub>i</sub> | A <sub>r</sub> (%) |
| 40:60                | 392965         | 104,9              | 12756          | 112,0              | 57093          | 111,1              |
| 45:55                | 373762         | 99,8               | 11968          | 105,1              | 55600          | 108,2              |
| 50:50                | 374367         | 100                | 11388          | 100                | 51396          | 100                |
| 55:45                | 366527         | 97,9               | 11966          | 105,1              | 56644          | 110,2              |
| 60:40                | 377583         | 100,9              | 12723          | 111,7              | 59074          | 114,9              |

Plochy píku dexamethason-acetátu, dexamethasonu a ethylparabenu se v závislosti na složení mobilní fáze měnily jen v malém rozmezí, čím větší byl rozdíl mezi objemy jednotlivých složek MF, tím se plochy píku zvětšovaly.

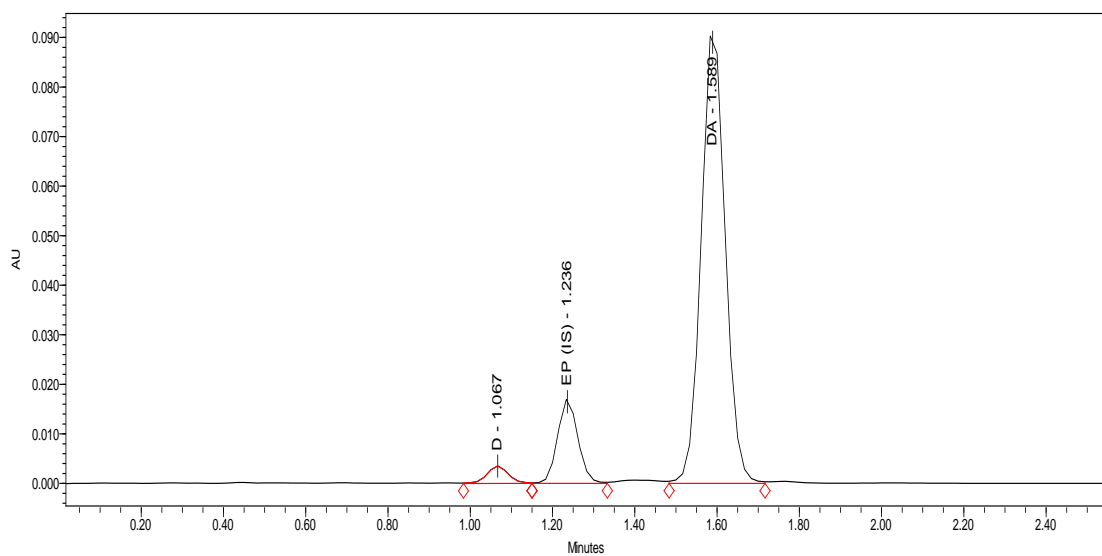
**Tabulka 9 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas**

|                      | DA             | D              | EP             |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| ACN:H <sub>2</sub> O | t <sub>R</sub> | t <sub>R</sub> | t <sub>R</sub> |
| 40:60                | 6,079          | 2,207          | 2,554          |
| 45:55                | 3,861          | 1,681          | 2,023          |
| 50:50                | 2,435          | 1,239          | 1,498          |
| 55:45                | 1,97           | 1,183          | 1,4            |
| 60:40                | 1,59           | 1,067          | 1,237          |

Retenční čas všech složek se zkracoval s rostoucím podílem acetonitrilu v MF. Mobilní fáze s největším podílem acetonitrilu by tedy byla v analýzách jednotlivých složek výhodou, při současném stanovení substancí však retenční časy byly příliš blízko u sebe.



Obrázek 16 Vliv složení MF na retenční čas (ACN: H<sub>2</sub>O 40:60)



Obrázek 17 Vliv složení MF na retenční čas (ACN: H<sub>2</sub>O 60:40)



### 5.2.2.6 Detekční a kvantitativní limit nečistoty dexamethasonu

Podle chromatogramu placebo byly určeny šумы na základní linii. Následně byl proměřen vzorek placebo se standardy v zavedené koncentraci a data použita pro výpočet limitů.

|               |               |
|---------------|---------------|
| rozmezí $t_R$ | 1,25-1,50 min |
| šum $r^-$     | -0,0000146    |
| šum $r^+$     | 0,0000626     |
| plocha píku A | 13359         |
| koncentrace c | 5 mg/l        |
| výška píku h  | 0,00336       |

Vypočítat detekční a kvantitativní limit lze podle vzorce:

$$S_n = \frac{(r^+ - r^-)}{5} = 0,00001544$$

$$K = A/h = 3975892,8$$

$$a = A/c = 2402,7$$

$$**DL = 3 \times S_n \times \frac{K}{a} = 0,0766 mg/l**$$

$$**KL = 10 \times S_n \times \frac{K}{a} = 0,2555 mg/l**$$

## 6 ZÁVĚR

Úkolem této práce bylo vyvinout a validovat metodu pro analýzu přípravku Dexamethasoni acetatis solutio pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Zvolená analýza probíhala při laboratorní teplotě za využití izokratické eluce. Při vývoji metody se jako nejvýhodnější mobilní fáze ukázala směs acetonitrilu a vody v poměru 50:50, která proudila systémem s průtokem 1,5 ml/min. Stacionární fází byl modifikovaný silikagel HS-C18 s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  v koloně o rozměrech 100×4,6 mm. Zkoušený vzorek se rozpouštěl v mobilní fázi a byl dávkován na kolonu nástřikem 10  $\mu\text{l}$ .

Trvání analýzy se oproti výchozí metodě významně zkrátilo – retenční čas dexamethason-acetátu se ve výsledku pohyboval kolem 2,5 minuty oproti původním 22 minutám.

Byl proveden test účinnosti chromatografického systému a validace metody, čímž bylo dokázáno, že poskytuje přesné a reprodukovatelné výsledky a je tak vhodná pro zamýšlené použití.

V současné době je již metoda používaná při stabilitních testech uvedeného léčivého přípravku.

## 7 ZDROJE

- [1] Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 3968 s. ISBN 978-802-4729-947, str. 2198
- [2] SUCHOPÁR, Josef. Remedia compendium. 4. vyd. Editor Štěpánka Valentová. Praha: Panax, 2009, XIII, 946 s. ISBN 978-809-0280-649
- [3] KARLÍČEK, Rolf. Analytická chemie pro farmaceuty. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 281 s. ISBN 80-246-0348-9
- [4] KLIMEŠ, Jiří. Kontrola léčiv I. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2008, 149 s. ISBN 978-80-246-1613-1
- [5] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [online]. 2004 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [6] COUFAL, Pavel. Affinity Chromatography, AC. [online]. [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ac.pdf>
- [7] POUSTKA, Jan. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. In: [online]. 2007, 2011 [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20HPLC%20TEOR%20MF%20SF%20092011.pdf>
- [8] DOUŠA, Michal. HPLC.cz. [online]. 1999, 2011 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [9] DOUŠA, Michal. Příprava mobilní fáze v HPLC. HPLC.cz [online]. 1999, 2011 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/prep\\_solvent.htm](http://www.hplc.cz/Tip/prep_solvent.htm)
- [10] JANDERA, Pavel. HPLC 01 POKROKY VE VÝVOJI KOLON PRO HPLC - SOUČASNÝ STAV A PERSPEKTIVY. In: [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: [www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC\\_01.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc)
- [11] Chromservis - více o chromatografii. CHROMSERVIS S.R.O. [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://chromservis.cz/section/chromatography?lang=CZ>

- [12] CLARK, Jim. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - HPLC. [online]. 2007 [cit. 2013-03-31].  
Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- [13] SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER F. J., Fundamentals of Analytical Chemistry. 7. vyd. New York: Saunders College Publishing, 1996, 660 - 709. ISBN 0-03-005938-0
- [14] ŠABARTOVÁ J., Věstník SÚKL 1/1994, Státní ústav pro kontrolu léčiv (1993), Validace analytických metod v kontrole léčiv, 6
- [15] KOCOUREK, Vladimír. Kvalita v laboratorní a kontrolní praxi: Validace analytických metod. In: [online]. Praha, 2011 [cit. 2013-03-31].  
Dostupné z: [http://web.vscht.cz/kocourev/files/QA\\_validace-print.pdf](http://web.vscht.cz/kocourev/files/QA_validace-print.pdf)
- [16] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [online]. 1994, 2005 [cit. 2013-04-03].  
Dostupné z: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- [17] AHMED, Ishaq. Analytical Method Validation and Validation of HPLC. In: Slideshare [online]. 2012 [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://www.slideshare.net/venkybunnyt/analytical-method-validation-and-validation-of-hplc>
- [18] Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 167-169. ISBN 978-802-4729-947
- [19] GARCIA, C. V., A. R. BREIER, M. STEPPE, E. E. S. SCHAPOVAL a T. P. OPPE. Determination of dexamethasone acetate in cream by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2003, roč. 31, č. 3 [cit. 2013-03-31].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502006957>

- [20] URBAN, M. C. C., R. M. MAINARDES a M. P. D. GREMIÃO.  
Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences [online]. 2009, roč. 45, č. 1 [cit. 2013-03-31].  
Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v45n1/10.pdf>
- [21] ZIVANOVIC, Lj., M. ZECEVIC, S. MARKOVIC, S. PETROVIC a I. IVANOVIC. Validation of liquid chromatographic method for analysis of lidocaine hydrochloride, dexamethasone acetate, calcium dobesilate, butylhydroxyanisol and degradation product hydroquinone in suppositories and ointment. Journal of Chromatography A [online]. 2005, č. 1088 [cit. 2013-03-31].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305008113>
- [22] GRIPPA, E., L. SANTINI, G. CASTELLANO, M. T. GATTO, M. G. LEONE a L. SASO. Simultaneous determination of hydrocortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine serum by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]. 2000, č. 738 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434799004788>
- [23] Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 3968 s.  
ISBN 978-802-4729-947, str. 2199