

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**STABILITU INDIKUJÍCÍ HPLC METODA PRO HODNOCENÍ  
FLUOXETINU**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ 2016**

**Ondřej Černý**

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

29. 4. 2016, Hradec Králové

Ondřej Černý

Rád bych poděkoval svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D., Mgr. Tomáši Nejedlému i ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za pomoc, ochotu a příjemné pracovní prostředí.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Ondřej Černý

Školitel: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Název diplomové práce: **Stabilitu indikující HPLC metoda pro hodnocení fluoxetinu**

Tato diplomová práce měla za cíl vyvinout a validovat stabilitu indikující HPLC metodu pro hodnocení fluoxetin-hydrochloridu. Fluoxetin-hydrochlorid je léčivo ze skupiny SSRI používané při léčbě deprese různé etiologie. Základ metody byl převzat z Českého lékopisu 2009. Uvedená lékopisná metoda nebyla dostačující, protože pík rozkladného produktu fluoxetin-hydrochloridu zasahoval do tzv. mrtvého retenčního času použité kolony. Z tohoto důvodu nebylo možné provést jeho kvantitativní stanovení. Vývoj metody spočíval v úpravě mobilní fáze s využitím gradientové eluce. Mobilní fáze byla složena ze směsi methanolu, tetrahydrofuranu, roztoku triethylaminu a rozdělena do dvou zásobníků. Zásobník A představoval směs (MeOH : THF) : roztok TEA – 70 : 30 (v/v), zásobník B pak směs (MeOH : THF) : roztok TEA – 5 : 95 (v/v). Směs (MeOH : THF) byla připravena v poměru 8 : 30 (v/v). Chromatografické podmínky byly nastaveny následovně: průtoková rychlost 1,0 ml/min, teplota kolony 24 °C, nástřik 10 a 50 µl, detekce probíhala pomocí spektrofotometrického detektoru při vlnové délce  $\lambda = 215$  nm. Metoda byla validována a následně aplikována ve dvou stabilitních studiích. V experimentu č. 1 byla prokázána hydrolytická a fotolytická stabilita fluoxetin-hydrochloridu ve vodném prostředí. V experimentu č. 2 byl zaznamenán rozklad fluoxetin-hydrochloridu v 3 % roztoku peroxidu vodíku.

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Ondřej Černý

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Title of thesis: **Stability inducing HPLC method for evaluation of fluoxetine**

The purpose of this thesis was to develop and validate the stability – indicating HPLC method for evaluating Fluoxetine-hydrochloride. Fluoxetine-hydrochloride is a drug from the SSRI group used to treat depression of various etiologies. The basic method was adopted from the Czech Pharmacopoeia 2009. The given Pharmacopoeia method is not sufficient, as the peak of the degradation product Fluoxetine-hydrochloride interfered in the so – called dead retention time of the used column. Its quantitative determination was impossible for this reason. Development of the method consisted in adjustment of the mobile phase using gradient elution. The mobile phase was composed of a mixture of methanol, tetrahydrofuran and triethylamine solution, and it was divided into two containers. The container A consisted of the mixture (MeOH : THF) : TEA solution – 70: 30 (v/v) and the container B consisted of the mixture (MeOH : THF) : TEA solution – 5: 95 (v/v). The mixture (MeOH : THF) was prepared in the ratio of 8 : 30 (v/v). The chromatographic conditions were adjusted as follows: flow rate 1,0 ml/min, column temperature 24 °C, feed 10 and 50 µl; the detection was carried out using a spectrophotometric detector at the wavelength  $\lambda = 215$  nm. The method was validated and subsequently applied in two stability studies. In the experiment no. 1 was demonstrated hydrolytic and photolytic stability of fluoxetine-hydrochloride in the aqueous medium. In experiment no. 2 was detected decomposition of fluoxetine-hydrochloride in a 3 % solution of hydrogen peroxide.

# **OBSAH**

1. ÚVOD.....	10
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	14
3.1. Deprese.....	15
3.1.1. Rozdělení antidepresiv .....	15
3.2. Fluoxetin-hydrochlorid .....	16
3.2.1. Vlastnosti.....	16
3.2.2. Terapeutické indikace .....	17
3.2.3. Mechanismus účinku.....	17
3.2.4. Farmakokinetické vlastnosti .....	18
3.2.5. Nežádoucí účinky.....	18
3.2.6. Interakce .....	19
3.3. Chromatografie .....	20
3.3.1. Princip chromatografie .....	20
3.3.2. Dělení chromatografických metod.....	20
3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní hodnocení u HPLC .....	22
3.3.4. Typy elucí u HPLC .....	23
3.3.5. Základní chromatografické systémy u HPLC.....	23
3.3.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	25
3.3.6.1. Instrumentace.....	26
3.3.6.1.1. Odplyňovač.....	27
3.3.6.1.2. Směšovací zařízení.....	27
3.3.6.1.3. Vysokotlaká čerpadla .....	27
3.3.6.1.4. Dávkovací zařízení.....	28
3.3.6.1.5. Kolony.....	28
3.3.6.1.6. Detektory v kapalinové chromatografii .....	29
3.3.7. Validace chromatografických metod .....	31

3.3.7.1.	Správnost (accuracy) .....	31
3.3.7.2.	Přesnost metody (precision) .....	32
3.3.7.3.	Selektivita (specificity) .....	32
3.3.7.4.	Limit detekce (limit of detection, LOD) .....	33
3.3.7.5.	Limit kvantifikace (limit of quantitation, LOQ) .....	33
3.3.7.6.	Linearita (linearity) .....	33
3.3.7.7.	Pracovní rozsah (range) .....	34
3.3.7.8.	Robustnost (robustness) .....	34
3.4.	Stabilitní studie fluoxetin-hydrochloridu uvedené v odborné literatuře .....	35
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
4.1.	Použité chemikálie a pomůcky .....	38
4.1.1.	Chemikálie .....	38
4.1.2.	Laboratorní pomůcky .....	38
4.2.	Přístrojové vybavení .....	39
4.2.1.	HPLC sestava .....	39
4.2.2.	Kolona .....	39
4.2.3.	Přístroje .....	39
4.3.	Pracovní postup .....	40
4.3.1.	Příprava roztoku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu .....	40
4.3.2.	Příprava mobilní fáze .....	40
4.3.3.	Příprava roztoku pro experiment č. 1 .....	40
4.3.4.	Příprava roztoku pro experiment č. 2 .....	41
4.4.	Chromatografické podmínky .....	41
4.5.	Validace chromatografických metod .....	42
4.5.1.	Linearita .....	42
4.5.2.	Selektivita .....	43
4.5.3.	Detekční limit a kvantitativní limit .....	43



4.6.	Stabilitní studie .....	43
4.6.1.	Experiment č. 1 .....	43
4.6.2.	Experiment č. 2 .....	44
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	46
5.1.	Optimalizace chromatografických podmínek.....	47
5.1.1.	Isokratická eluce .....	47
5.1.2.	Gradientová eluce .....	48
5.2.	Validace chromatografických metod .....	51
5.2.1.	Linearita.....	51
5.2.2.	Selektivita .....	53
5.2.3.	Přesnost a Správnost .....	55
5.2.4.	Detekční a kvantitativní limit .....	55
5.3.	Stabilitní studie .....	56
5.3.1.	Experiment č. 1 .....	56
5.3.2.	Experiment č. 2 .....	57
6.	ZÁVĚR .....	62
7.	SEZNAM ZKRATEK .....	65
8.	SEZNAM TABULEK .....	68
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	70
10.	REFERENCE .....	72

# **1. ÚVOD**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, zkráceně HPLC (High Performance Liquid Chromatography), se dnes řadí mezi nejčastěji používané analytické metody. Své využití nalézá téměř ve všech odvětvích farmaceutického průmyslu. Principiálně se jedná o separační metodu umožňující jednak kvalitativní, ale i kvantitativní hodnocení jednotlivě zastoupených komponent směsi. Výhodou HPLC metody je bezesporu její rychlost, citlivost, potřeba minimálního množství vzorku pro analýzu, ale také možnost automatizace. (1)

Stabilitní testy, které hodnotí stabilitu léčivých přípravků ve farmacii, jsou důležité ke stanovení podmínek skladování, určení vhodnosti obalového materiálu a doby použitelnosti. Rozdělují se podle zátěžových podmínek na testy stresové, zrychlené a dlouhodobé. Cílem sledování stability je zajistit kvalitní, bezpečný a také účinný léčivý přípravek, který si zachovává všechny tyto vlastnosti po celou dobu jeho použitelnosti. (2)

Fluoxetin-hydrochlorid je antidepresivum ze skupiny SSRI, která je často první volbou v léčbě deprese. Výrazný vzestup spotřeby antidepresiv pozorujeme ve většině vyspělých zemích. Tento negativní trend lze zaznamenat i v České republice. S tímto faktem je spojena otázka negativního dopadu léčiv a jejich reziduí na životní prostředí. Týká se to nejen antidepresiv, ale také jiných, stále více používaných léčiv, jako jsou protizánětlivá léčiva, kontraceptiva či antibiotika. Díky zdokonalujícím se analytickým metodám, které jsou schopny detekovat i stopová množství látek, byla provedena řada analýz, které potvrzují rozšiřující se výskyt reziduí léčiv v odpadních, povrchových a podzemních vodách, ale také v půdách. (3) (4) (5)

## **2.ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

Zadáním a cílem diplomové práce bylo v teoretické části uvedení jednotlivých chromatografických metod se zaměřením na HPLC. Dále shrnutí informací a popsání vybraných stabilitních studií, které byly provedeny u antidepresiva fluoxetin-hydrochloridu.

V praktické části práce se řešil problém vhodnosti již stávající HPLC metody lékopisného článku *Fluoxetini-hydrochloridi* pro potřeby stability indukující HPLC metody pro hodnocení fluoxetin-hydrochloridu. Následně i její využití ve stabilitních studiích, které měly modelovat rozklad léčiva v životním prostředí.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1. Deprese

Deprese je afektivní porucha charakterizovaná patologickými změnami nálady. Mezi tyto změny se řadí např. pocity beznaděje, zoufalství, fobie, anhedonie tj. neschopnost prožitku štěstí, depresivní bludné domněnky, poruchy spánku a poruchy chuti k jídlu. V případě, že nemocný trpí pouze depresí, mluvíme o tzv. unipolární poruše. Nejpropracovanější hypotézou vzniku deprese je monoaminová hypotéza. (1) (6) (7)

### 3.1.1. Rozdělení antidepresiv

- Thymoleptika I. generace (imipramin, desipramin, klomipramin, dibenzepin, amitriptylin, nortriptylin, dosulepin, doxepin)
- Thymoleptika II. generace (maprotilin)
- Thymoleptika III. generace
  - SSRI (fluvoxamin, fluoxetin, citalopram, escitalopram, sertralin, paroxetin)
  - SARI (trazodon, nefazodon)
  - NARI (viloxazin, reboxetin, atomoxetin)
  - DARI (amineptin, tianeptin)
- Thymoleptika IV. generace
  - SNRI (venlafaxin, desvanlaxin, duloxetin, milnacipran)
  - DNRI (bupropion)
  - NaSSA (mianserin, mirtazapin)
- IMAO I. generace (iproniazid, tranylcypromin)
- IMAO II. generace (moklobenid)
- Jiná antidepresiva (agomelatin)
- Thymoprofylaktika (lithné ionty) (1)

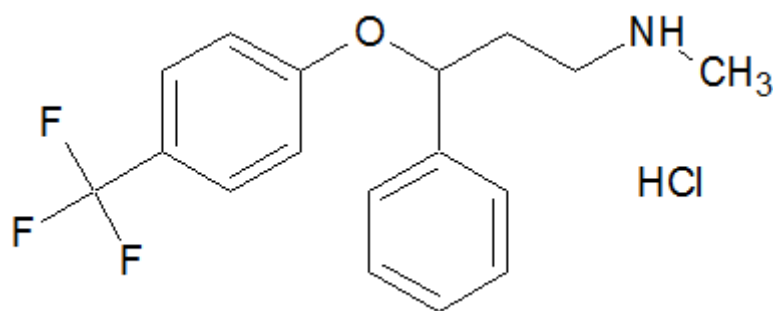
## 3.2. Fluoxetin-hydrochlorid

Fluoxetin-hydrochlorid patří mezi antidepresiva III. generace, viz rozdělení. V roce 1987 byl schválen úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Byl t.č. nejpředepisovanějším antidepresivem v USA. Fluoxetin-hydrochlorid je registrován také v ČR. (1) (7)

### 3.2.1. Vlastnosti

Lékopisný název: FLUOXETINI-HYDROCHLORIDI

Vzorec:



Obr. 1: Vzorec fluoxetin-hydrochloridu.

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{19}ClF_3NO$

$M_r$ : 345,79

CAS: 56296-78-7

Definice: Je to (3*RS*)-3-fenyl-*N*-methyl-3-[4-(trifluormethyl)fenoxy]propan-1-amin-hydrochlorid.

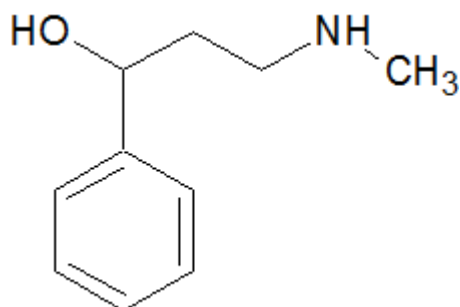
Vzhled: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

Rozpustnost: Mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v dichlormethanu. (8)



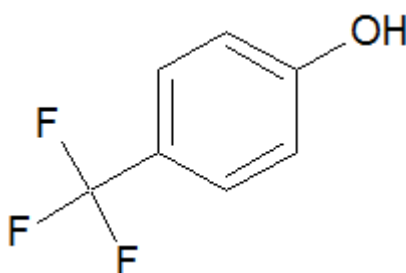
Hlavní rozkladné produkty fluoxetin-hydrochloridu:

- Imp A



Obr. 2: vzorec Imp A

- 4-trifluormethylfenol



Obr. 3: Vzorec 4-trifluormethylfenolu

### 3.2.2. Terapeutické indikace

Mezi terapeutické indikace fluoxetin-hydrochloridu se řadí deprese nejružnější etiologie, obsedantně – kompulzivní porucha a také mentální bulimie. (9)

### 3.2.3. Mechanismus účinku

Společným mechanismem účinku pro skupinu SSRI je selektivní inhibice zpětného vychytávání serotoninu z neuronálních synapsí do serotoninergních nervových zakončení. Blokáda je zprostředkována vazbou molekuly léčiva na proteinový transportér (spojený s Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> - pumpou), který je součástí membrány právě serotoninergních nervových buněk. Zablokováním serotoninového transportéru je docíleno zvýšeného množství neurotransmiteru serotoninu pro působení na

postsynaptické 5-HT-receptory i na 5-HT-autoreceptory. Zvýšená stimulace těchto receptorů vlastním neurotransmiterem má za následek jejich desenzibilizaci a postupnou down – regulaci. V případě deprese jsou tyto receptory dle monoaminové hypotézy zmnoženy (up – regulace). Z výše uvedeného vyplývá, že nástup účinku těchto antidepresiv se projeví po zahájení léčby s latencí. Léčiva z této skupiny postrádají anticholinergní nežádoucí účinky či kardiotoxicitu. Fluoxetin-hydrochlorid má i určité aktivující účinky z důvodu zbytkové blokády zpětného vychytávání noradrenalinu a dopaminu. (6) (7) (9)

### **3.2.4. Farmakokinetické vlastnosti**

Fluoxetin-hydrochlorid je stejně jako ostatní léčiva ze skupiny SSRI dobře absorbován po perorálním podání. Potrava nemá na biologickou dostupnost žádný vliv.

Vaznost na krevní bílkoviny v plazmě se pohybuje kolem 95 %, distribuční objem je 20 – 40 l/kg. Rovnovážných plazmatických koncentrací se dosahuje přibližně po 4. až 5. týdnu podávání.

Biotransformace fluoxetin-hydrochloridu probíhá v jaterních buňkách prostřednictvím cytochromoxidasového systému P450 a to především jeho izoenzymem CYP2D6. Hlavním biologicky aktivním metabolitem fluoxetin-hydrochloridu je norfluoxetin-hydrochlorid, který vzniká jeho demetylací.

Poločas eliminace fluoxetin-hydrochloridu se pohybuje v rozmezí 2 – 4 dnů, v případě jeho aktivního metabolitu, norfluoxetin-hydrochloridu, pak 7 – 15 dnů. Exkrece probíhá převážně ledvinami (60 %). (6) (7) (9)

### **3.2.5. Nežádoucí účinky**

Mezi nežádoucí účinky, společné všem zástupcům ze skupiny SSRI, patří především gastrointestinální obtíže, jako je snížení chuti k jídlu, nauzea, vomitus, průjemy anebo obstipace. Dále se může jednat např. o poruchy spánku, nervozitu, snížení libida, úzkost, poruchy pozornosti či závratě. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem, vyplývajícím z vystupňovaného účinku serotoninu na postsynaptických receptorech, je serotoninový syndrom. Nejčastější příčinou serotoninového syndromu je nevhodná

kombinace antidepresiv SSRI s dalšími léčivy ovlivňující hladinu serotoninu. Symptomy jsou centrální a jde např. o zmatenost, třes, svalové záškuby, motorickou inkoordinaci či dysartrii. (1) (6) (7) (9)

### **3.2.6. Interakce**

Léčiva ze skupiny SSRI patří mezi kompetitivní inhibitory systému cytochromu P450, tudíž ovlivňují biotransformaci jiných léčiv metabolizovaných stejnou cestou. K nejzávažnější (kontraindikované) interakci, která vyústí v serotoninový syndrom, dochází při podávání SSRI spolu s inhibitory monoaminoxidázy (MAO). Z důvodů uvedených v podkapitole 3.2.3 lze možnou záměnu za jiné antidepresivum provést až po několika týdnech od vysazení fluoxetin-hydrochloridu. V případě fluoxetin-hydrochloridu jsou potencovány interakce na úrovni izoenzymu CYP2D6, protože jeho biodegradace probíhá z převážné části touto cestou. (6) (7) (9)

## 3.3. Chromatografie

### 3.3.1. Princip chromatografie

Chromatografie je separační metoda, jejíž principem je dělení analyzovaných komponent obsažených ve vzorku mezi dvě různé nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé). Prostřednictvím mobilní fáze je analyzovaný vzorek v tomto systému unášen. Na základě opakovaných interakcí jednotlivých komponent vzorku se stacionární fází při průchodu vzorku tímto systémem dochází k jejich selektivnímu zadržování. Míra zadržování je závislá na vazebných silách těchto interakcí. Tímto způsobem se v průběhu separace jednotlivé komponenty od sebe separují. K úspěšné separaci tudíž dochází na základě různé afinity dělených komponent k mobilní a stacionární fázi. (10) (11) (12)

### 3.3.2. Dělení chromatografických metod

Chromatografické metody se rozlišují z několika hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
  - Kapalínová chromatografie (Liquid Chromatography – LC) – kde MF je kapalina
  - Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC) – kde MF je plyn
- **Podle uspořádání stacionární fáze**
  - Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
  - Plošné techniky:
    - Papírová chromatografie (Paper Chromatography – PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
    - Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu

- **Podle převládajícího separačního děje**

- **Adsorpční chromatografie**

Podstatou adsorpční separace je různá adsorbovatelnost dělených komponent na aktivní povrch adsorbentu (stacionární fáze). Pevná fáze – kapalina u kapalinové chromatografie, pevná fáze – plyn u plynové chromatografie.

- **Rozdělovací chromatografie**

Rozdělovací chromatografie je založena na odlišné rozpustnosti dělených komponent vzorku ve stacionární fázi (kapalina, která je ukotvena na nosiči) a mobilní fázi (kapalina či plyn).

- **Iontově výměnná chromatografie**

Podstatou iontově – výměnné separace je různá velikost elektrostaticky přitažlivých sil, které působí mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměniče – katexy nebo anexy) a ionty vzorku. Rozdílná afinita separovaných komponent vzorku je dána jednak hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, ale i velikostí iontů či mocenstvím iontů.

- **Gelová chromatografie**

Separace u gelové chromatografie probíhá na základě různé velikosti molekul. Komponenty vzorku se dle velikosti molekul separují na pórovité stacionární fázi, kterou tvoří gel. Menší molekuly se zdržují déle, protože pronikají do pórů gelu (molekulově síťový efekt), zatímco molekuly, které přesahují velikost pórů, prostupují bez jakéhokoliv zdržení. O separaci rozhoduje velikost pórů zvoleného gelu.

- **Afinitní chromatografie**

Afinitní chromatografie je separační metoda, kde stacionární fáze má schopnost vázat ze vzorku pouze ty komponenty, ke kterým vykazuje určitou afinitu. Chromatografická kolona takovéto separace je složena z matrice (nerozpustného nosiče), na které je navázán ligand. Na ligand jsou zachycovány pouze ty látky, které k němu mají afinitu. Ostatní komponenty vzorku projdou kolonou bez interakce. Vazba mezi ligandem a analytem je

silná, ale reverzibilní. Vazbu lze následně porušit změnou složení mobilní fáze a zachycený analyt může být eluován. (10) (11) (13)

### 3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní hodnocení u HPLC

Ke kvalitativnímu hodnocení (identifikaci) jednotlivých komponent vzorku se využívá retenčních (elučních) časů  $t_R$ . Retenční čas je čas od nastříknutí vzorku dávkovacím zařízením na kolonu k maximální hodnotě chromatografického píku. Další možností, jak lze přistoupit k identifikaci, je využití specifických detektorů, jako je NMR, MS a PDA. Detektory NMR poskytují spektra hodnocených látek, které nesou detailní informaci o struktuře molekuly. MS detektory poskytují údaje o molekulové hmotnosti látek. Principem identifikace látek u PDA detektoru je porovnávání získaných spekter z analyzovaného vzorku se spektry standardních látek. (11) (14)

Nejrozšířenějším způsobem kvantitativního hodnocení v HPLC, je stanovení pomocí plochy píku. Další možnost tohoto hodnocení vychází z určení výšky píku. Není sice tak oblíbené, ale z důvodu větší přesnosti má své opodstatnění při hodnocení symetrických píků. Koncentrace nebo množství analyzované složky se stanoví porovnáním naměřené plochy/výšky píku analyzované složky a plochy/výšky standardu o známé koncentraci. K tomuto kvantitativnímu hodnocení se využívají čtyři metody:

- metoda vnějšího standardu
- metoda přídavku standardu
- metoda vnitřního standardu
- metoda vnitřní normalizace (12) (14) (15)

### 3.3.4. Typy elucí u HPLC

Při analýze pomocní HPLC se využívá dvou typů eluce: izokratické a gradientové.

- **Izokratická**

Izokratická eluce je systém s jednou mobilní fází, jejíž složení se během analýzy nemění. Výhodou je její snadné použití a dobrá odpověď detektoru. (8) (11)

- **Gradientová**

Gradientová eluce se vyznačuje změnou kompozice mobilní fáze během analýzy, čímž se mění její eluční síla.

- Výhody gradientové eluce
  - možnost separace vzorku s velkým počtem složek
  - lepší rozlišitelnost píků na začátku a konci chromatogramu
  - lepší separace složek s podobným retenčním časem
- nevýhody gradientové eluce
  - gradientová eluce je složitější a instrumentálně náročnější metodou než isokratická eluce
  - není použitelná pro všechny typy HPLC detektorů
  - delší doba záznamu z důvodu ekvibrace kolony (15) (16)

### 3.3.5. Základní chromatografické systémy u HPLC

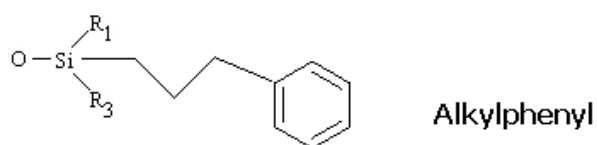
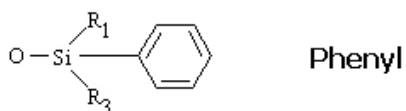
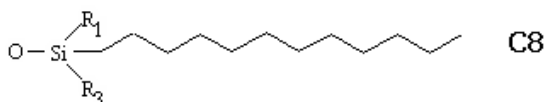
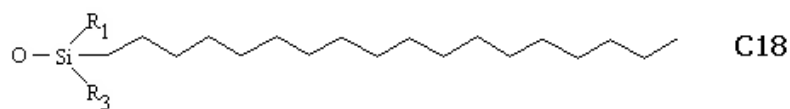
Chromatografické systémy u HPLC lze rozdělit na:

- **Systémy s reverzními fázemi (Reversed – Phase Chromatography)**

Systém s reverzními fázemi je první volbou pro většinu separačních analýz. Mobilní fáze je tvořena polárními rozpouštědly. Stacionární fáze má nepolární charakter.

Stacionární fáze se skládá nejčastěji z dlouhých uhlíkatých řetězců, které jsou silnou vazbou připojeny na povrch vhodného nosiče (zpravidla silikagelu). Nejpoužívanější je zpravidla fáze o délce 18 uhlíků, neboli C<sub>18</sub>. Příklady některých chemicky vázaných fází, které jsou používány u systémů s reverzními fázemi, jsou

uvedeny na Obr. 4. Kromě níže uvedených se využívají i polárnější fáze, jako propylaminová, propylkyanová či diolová. (10)



*Obr. 4: Výběr chemicky vázaných stacionárních fází u Reversed – Phase Chromatography.*

*R<sub>1</sub> a R<sub>3</sub> mohou být další funkční skupiny, které se mohou navázat na silanolovou skupinu. (17)*

Mobilní fáze je tvořena organickými rozpouštědly. Její eluční síla roste v závislosti na klesající polaritě těchto rozpouštědel. Dle rostoucí eluční síly lze jednotlivá rozpouštědla seřadit v řadě:

Voda < methanol < acetonitril < propan-2ol < dioxan < tetrahydrofuran (10)



- **Systémy s normálními fázemi (Normal – Phase Chromatography)**

U systémů s normálními fázemi jsou naopak používány polární stacionární fáze, mobilní fáze je pak tvořena nepolárními rozpouštědly.

Tento systém dnes sice pomalu ustupuje, ale je důležitý např. u analytů, které se v prostředí jiných systémů rozkládají či nerozpouštějí. Stacionární fázi představuje nejčastěji čistý silikagel nebo to jsou polární chemicky vázané fáze ukotvené na silikagelovém nosiči. Dle polarity jejich funkčních skupin je lze rozdělit na:

- Slabě polární fáze – diolová, nitroskupina
- Středně polární fáze – kyanová, kyanopropylová skupina
- Silně polární fáze – aminoskupina

Mobilní fáze je u tohoto systému vybírána podle eluotropické řady rozpouštědel. Tato řada začíná z eluční síly  $\epsilon^0$  pentanu, která je rovna nule,  $\epsilon_p^0 = 0$ . Polarita a tím i eluční síla mobilní fáze roste v řadě těchto vybraných rozpouštědel:

Pentan < hexan < toluen < benzen < dichlormethan < chloroform < aceton < aceton < acetonitril < pyridin < ethanol < voda. (10) (15)

### **3.3.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

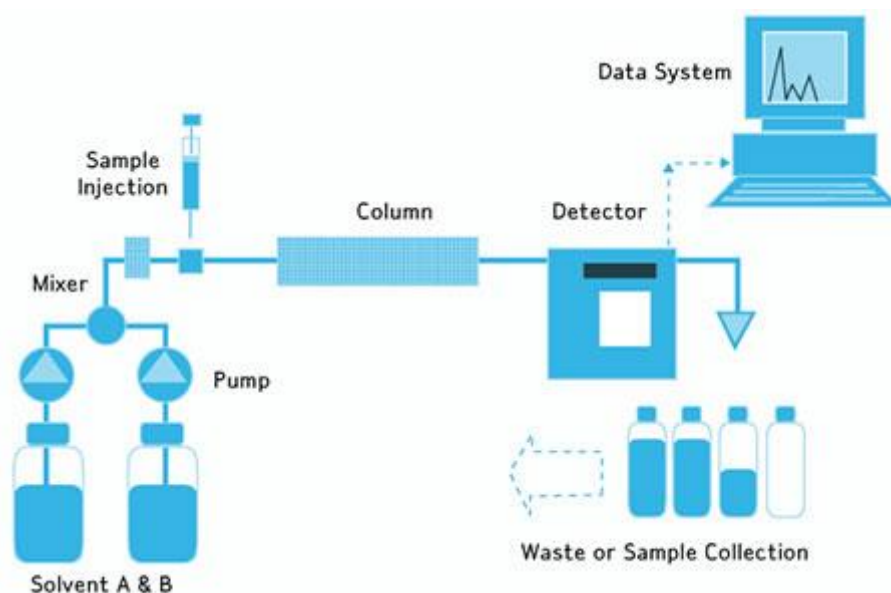
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performace Liquid Chromatography – HPLC) je forma sloupcové chromatografie. Na rozdíl od standardní sloupcové chromatografie je zde roztok vzorku čerpán pomocí mobilní fáze za vysokého tlaku skrz kolonu, která je vyplněna stacionární fází. Při průchodu vzorku kolonou dochází k jeho separaci, viz 3.3.1. (18) (19)

HPLC dnes patří mezi nejsilnější nástroje v analytické chemii. Umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci separovaných komponent ve směsi a to v širokém rozmezí polarit. Své uplatnění nachází ve většině analytických laboratořích, od farmaceutických přes forenzní až po laboratoře chemie potravin. Lze ji také nalézt ve většině lékopisných monografiích. Výhodou je její rychlost a automatizace jednotlivých kroků separace. HPLC je také velmi citlivou metodou, neboť pro stanovení lze použít velice malá množství analyzovaného vzorku. Citlivost je dále ovlivněna použitým detektorem. (11) (14) (18) (20)

### 3.3.6.1. Instrumentace

Instrumentace kapalinového chromatografu se skládá ze zásobníku/ů mobilní fáze, odplyňovače, směšovače, vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku, chromatografické kolony, detektoru, sběrné odpadní nádoby a datové stanice. Kapalinový chromatograf může mít řadu obměn. Podle potřeby lze jednotlivé komponenty přidat či naopak odebrat. (10)

V průběhu izokratické eluce je mobilní fáze přiváděna ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakového čerpadla. U gradientové eluce, kde je mobilní fáze čerpána z více zásobníků, je zapotřebí směšovače. Směšovač je umístěn před vysokotlakým čerpadlem. V případě, kdy je gradientová eluce realizována pomocí dvou vysokotlakých čerpadel, je směšovač zařazen až za vysokotlakým čerpadlem. Mobilní fáze následně směřuje přes dávkovač vzorku do chromatografické kolony, kde dochází k jeho separaci. Chromatografická kolona je na výstupu spojena s detektorem, který vysílá signály do datové stanice. Mobilní fáze, která prošla tímto systémem je jímána do odpadní nádoby. (10) Obecné schéma kapalinového chromatografu znázorňuje Obr. 5.



Obr. 5: Obecné schéma kapalinového chromatografu. (21)

### **3.3.6.1.1. Odplyňovač**

Odplyněním se eliminují bublinky rozpuštěného plynu v mobilní fázi. Je to jeden ze způsobů jak předejít problémům s nestabilitou základní linie (baseline), neopakovatelnosti retenčních časů, nestejného dávkového objemu vzorku či nestability provozu čerpadel. Neodplyněná mobilní fáze způsobuje ztrátu citlivosti detekce. V dnešní době se lze setkat se dvěma metodami odplynění, a to probublávání heliem nebo vakuovým degaserem, který patří k nejpoužívanějším. (10) (22)

### **3.3.6.1.2. Směšovací zařízení**

Toto zařízení se uplatňuje především u gradientové eluce, kdy se mění složení mobilní fáze. Směšovací zařízení mísí jednotlivé kapaliny ze zásobníků mobilní fáze podle nastaveného programu. (13)

### **3.3.6.1.3. Vysokotlaká čerpadla**

Mobilní fáze je do chromatografické kolony vedena pomocí pístového nebo membránového čerpadla (pumpy). Tato čerpadla lze rozdělit podle principu jejich fungování na:

- Čerpadla pracující při konstantním tlaku

Pohyb pístu či membrány čerpadla je zprostředkován tlakem plynu nebo hydraulické kapaliny. Např. pneumatická čerpadla.

- Čerpadla pracující při konstantním objemovém průtoku

K pohybu pístu nebo membrány čerpadla je využíván mechanický pohon. Např. čerpadla injekčního typu.

Vysokotlaké pumpy jsou vyrobeny z kvalitních materiálů, jako je nerezová ocel, titan či keramika. Jsou schopny čerpat v širokém rozsahu průtoků (0,1 – 10,0 ml) a tlaků (1 – 100 MPa), přičemž je zajištěn bezpulsní a přesný tok mobilní fáze. (10)

#### 3.3.6.1.4. Dávkovací zařízení

V současné době je dávkování roztoku vzorku upřednostňováno pomocí automatických dávkovačů, tzv. autosamplerů, které zvyšují rychlost a přesnost nanesení vzorků. Druhým typem jsou manuální smyčkové dávkovače, jejichž využití nedosahuje takové míry. Autosamplery se skládají ze zásobníků vzorků obsahující nádobky – vialky (v případě minimálního množství vzorku lze využít insertů s menším objemem, které se vkládají do vialek) a injekční stříkačky dávkovače. Vialky jsou uzavřeny pomocí pryžového septa nebo perforované zátky z polypropylenu, což umožňuje odebrání vzorku pomocí injekční stříkačky dávkovače. Spojení zásobníku a injekční stříkačky dávkovače má několik konstrukčních řešení. (10) (23)

#### 3.3.6.1.5. Kolony

Většina chromatografických kolon u HPLC metod je složena ze dvou částí – vlastního těla kolony a koncovky. Tělo kolony představuje nejčastěji rovnou trubici z nerezové oceli s vysoce leštěným vnitřním povrchem. Hladký povrch má své opodstatnění, a to při průchodu mobilní fáze kolonou. V případě nerovností dochází ve zvýšené míře k rychlejšímu toku mobilní fáze podél stěny kolony, což způsobuje její nerovnoměrnou distribuci přes celý průřez chromatografického lože kolony. Tento fakt se vysvětluje odlišnou (volnějši) strukturou náplně u stěny kolony než v jejím středu. Koncovka zajišťuje těsnost, podílí se na rovnoměrné distribuci mobilní fáze a zadržuje náplň kolony. (10) (15)

Komerčně dostupné chromatografické kolony jsou kromě nerezové ocele vyráběny ze speciálně tvrzeného skla nebo polymeru PEEK (polyetheretherketonu). Tyto materiály musí být odolné jednak vůči vysokým tlakům, ale také vůči chemickému působení mobilní fáze. (15)

K analytickým účelům se využívají kolony s vnitřním průměrem 2,1 – 5 mm, délky 10 – 300 mm a velikostí částic náplně 1 – 10  $\mu\text{m}$ . (10)

Součástí hlavní kolony může být také předkolona (umístěna mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením) a ochranná kolona (umístěna mezi dávkovacím zařízením a hlavní kolonou). Tyto kolony chrání hlavní kolonu před mechanickými nečistotami. (13)

### 3.3.6.1.6. Detektory v kapalinové chromatografii

Detektor se v systému HPLC nachází za analytickou kolonou. Jeho funkcí je monitorování určité vlastnosti roztoku, který byl eluován z chromatografické kolony. Tato informace se ve formě elektrického signálu přenáší do datového zařízení. (24)

Mezi vlastnosti ideálního detektoru patří:

- Univerzálnost (stejná citlivost ke všem eluovaným píkům)
- Vysoká citlivost (schopnost detekce i stopových koncentrací)
- Linearita (široký lineární dynamický rozsah)
- Signál nezávislý na složení mobilní fáze (především u gradientové eluce)
- Signál nezávislý na změně teploty a průtoku
- Nízký drift baseliny a úroveň šumu
- Provozní jednoduchost, spolehlivost a rychlá odezva
- Kvalitativní informace pro detekované píky (10) (15) (25)

K nejpoužívanějším detektorům se řadí spektrofotometrické detektory, v poslední dekádě pak převažuje spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Mimo tyto dva hlavní typy se lze také setkat s detektory fluorescenčními, elektrochemickými, refraktometrickými či vodivostními. Tyto detektory však mají již minoritní využití. (10) (11)

#### Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory sledují absorbanci o určitých vlnových délkách elektromagnetického záření látek vystupujících z chromatografické kolony. Základ detektoru tvoří křemenná měrná průtočná cela. Stěnou květy prochází světelný paprsek ze zdroje přes čočku a štěrbinu do fotodetektoru. Rozmezí vlnových délek (nejčastěji 190 – 800 nm) pak závisí na volbě světelného zdroje. K detekci léčiv se nejčastěji využívá UV oblasti spektra (200 – 350 nm). Viditelná oblast (350 – 700 nm) a infračervená oblast spektra se využívá daleko méně. (10) (11) (12)

Nejběžnější UV detektory:

1. **Detektory s fixní vlnovou délkou** – jednodušší konstrukce, pracuje nejčastěji s vlnovou délkou 254 nm nebo 280 nm. Při těchto vlnových délkách se absorbuje většina léčiv.
2. **Detektory s měnitelnou vlnovou délkou** – detekce je možná pouze s předem nastavenými vlnovými délkami.
3. **Detektory programovatelnou vlnovou délkou** – vlnovou délku lze měnit podle potřeby, nejčastěji od 190 do 700 nm. Nevýhodou může být nižší citlivost oproti detektorům s fixní vlnovou délkou.
4. **Detektory s diodovým polem** – výhodou je možnost okamžitého záznamu celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek. (10) (11) (12)

### **Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Hmotnostní spektrometr je jako detektor použitelný nejen u kapalinové, ale i u plynové chromatografie. Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (LC – MS) poskytuje celou řasu výhod, jako je vysoká selektivita, citlivost, možnost analýzy složitých směsí či menší potřeba vzorku. Spojení LC – MS je využíváno k určení molekulové hmotnosti, identifikaci látek i ke kvantifikaci. (10) (11) (12) (26)

Proces analýzy vzorku pomocí MS probíhá v několika krocích. Zaprvé, dochází k ionizaci vzorku (neutrální molekuly jsou v iontovém zdroji převedeny na ionty). Ionizace vzorku nastává zpravidla nárazem prudce letících elektronů nebo je využita chemická ionizace, kdy ionty vznikají chemickou reakcí. Před tímto krokem je nutné odstranit mobilní fázi z eluentu. Jako vhodné mobilní fáze jsou těkavá rozpouštědla (ACN, MeOH) s přísadkou těkavých aditiv, jako jsou kyselina mravenčí, kyselina octová, amoniak a pufr octanu či mravenčanu amonného. Druhým krokem je separace iontů dle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a jejich urychlení. Tento krok probíhá v analyzátoru, který se nachází za iontovým zdrojem a před detektorem. Poslední krok představuje detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Signál z detektoru je odeslán do datového zařízení, kde je zpracován pomocí sofistikovaného softwaru. (10) (11) (13)

### 3.3.7. Validace chromatografických metod

Validací analytické metody se rozumí proces, kterým se získávají důležité charakteristiky vyvíjené metody za účelem vhodnosti použití daného systému pro získání relevantních dat. Důležitý je výběr validačních parametrů, což je kritérium jak získat dostatek údajů, které slouží k posouzení, zda je vyvinutá metoda použitelná k zamýšleným účelům. (11) (27)

Validační postupy jsou shrnuty v dokumentu mezinárodní konference o harmonizaci. (28)

#### 3.3.7.1. Správnost (accuracy)

Správnost vyjadřuje míru shody mezi výsledky měření a správnou/referenční hodnotou. Způsob ověřování správnosti může zahrnovat tyto body:

- **analýza modelového vzorku** – placebo nebo blank se známým přídavkem stanovované látky
- **analýza vzorku s přídavkem standardní látky** – pokud není k dispozici blank či placebo
- **analýza vzorku s přídavkem známých nečistot** – při hodnocení čistoty kvantitativním testem
- **jinou, nezávislou metodou, která již byla validována.**

Správnost se vyjadřuje buď rozdílem správné a získané hodnoty nebo výtěžností (obvykle analýzou nejméně šesti vzorků). Správnost metody např. pro stanovení obsahu účinných látek je obvykle testována v rozmezí 80 – 120 % deklarovaného obsahu této látky. (11) (14) (29)

### 3.3.7.2. Přesnost metody (precision)

Přesnost metody představuje míru shody opakovaně naměřených výsledků. Míra shody se pak vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka výsledků zkoušek. Rozlišují se tři úrovně přesnosti:

- **opakovatelnost** – kdy jsou výsledky získávány opakovaným použitím stejné metody, materiálu, laboratoře a přístrojů pokud možno v co nejkratším časovém intervalu a jedním pracovníkem.
- **mezilehlá přesnost** – výsledky jsou získávány stejným postupem měření se stejným vzorkem v téže laboratoři. Měření může probíhat, na rozdíl od opakovatelnosti, v různý den, může být použito podobných přístrojů či jiné obsluhy měřicího systému.
- **Reprodukovatelnost** – měření probíhá postupem jako u mezilehlé přesnosti, ale v jiné laboratoři. (11) (14) (30)

### 3.3.7.3. Selektivita (specificity)

Selektivita metody poukazuje na schopnost poskytování signálu, který je selektivní k sledované proměnné (tj. koncentraci sledované složky vzorku). V případě dostatečně selektivní metody je vliv potenciálních interferentů (matrice) na výsledek měření zanedbatelný. Mohou jimi být např. další účinné látky, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty nebo zbytková rozpouštědla. Míru selektivity je možno prokázat:

- Porovnáním kalibračních přímků
- Porovnáním výsledků se standardem
- Porovnání výsledků s měřením bez použití interferentů (11) (29)



#### 3.3.7.4. Limit detekce (limit of detection, LOD)

Limit detekce též mez detekce je úroveň, nad kterou je signál pro naměřený vzorek věrohodně detekovatelný v porovnání se slepým pokusem. Od této úrovně lze spolehlivě provést kvalitativní stanovení. Při výpočtu LOD a LOQ, u kterého se nejčastěji vychází z poměru signálu a šumu, se využívá směrnice ( $b$ ) v jednotkách uvádějících šum (výška píku). (14) (29)

$$LOD = 3 * \text{šum} / b \quad (14)$$

#### 3.3.7.5. Limit kvantifikace (limit of quantitation, LOQ)

Limit kvantifikace neboli mez stanovitelnosti vyjadřuje úroveň, nad kterou je možno provést spolehlivě kvantitativní stanovení. U výpočtu se stejně jako u limitu detekce nejčastěji vychází z poměru signálu a šumu. (14) (29)

$$LOQ = 10 * \text{šum} / b \quad (14)$$

#### 3.3.7.6. Linearita (linearity)

Linearitou se určuje schopnost metody měřit výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Stanovení se obvykle provádí z pěti různých koncentrací a to v rozmezí např. od 50 do 150 % deklarovaného obsahu. Pro stanovení čistoty ve farmacii např. LOQ – 120 % nebo 150 % specifikačního limitu. Nejčastějším výsledkem je přímková závislost. Lineární závislost dvou náhodných proměnných je vyjádřena vztahem:

$$y = a + bx$$

kde  $a$  je úsek (posunutí) na ose  $y$ ,  $b$  je směrnici kalibrační přímky. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient ( $R$ ). Pro stanovení účinné látky platí nejčastěji podmínka, kde  $R > 0,9990$ .

V některých případech se lze setkat i s nelineární závislostí. (11) (14) (29) (31)

### **3.3.7.7. Pracovní rozsah (range)**

Validovaný rozsah je interval koncentrací analytu, u kterého je potvrzeno, že je v něm vyvinutá metoda aplikovatelná. (14) (32)

### **3.3.7.8. Robustnost (robustness)**

Robustnost analytické metody vyjadřuje míru vlivu kolísání hodnot jednotlivých parametrů na výsledky celkové analýzy. Mezi tyto vlivy se u kapalinové chromatografie řadí např. změny pH mobilní fáze, v plynové chromatografii jsou to např. změny teplot v detektoru, atd. (14) (29) (32)

### 3.4. Stabilitní studie fluoxetin-hydrochloridu uvedené v odborné literatuře

Jeffrey A. Peterson, Donald S. Risley, Philip N. Anderson a Kurt F. Hostettler zjišťovali stabilitu fluoxetin-hydrochloridu v 5 běžných farmaceutických rozpouštědlech: deionizovaná voda, prostý sirup (BP), prostý sirup (USP), aromatický elixír (USP) hroznovo – brusinkový nápoj (Cran – Grape, Ocean Spray Cranberries, Inc, Lakeville, MA). Jednotlivé vzorky s obsahem fluoxetin-hydrochloridu byly uchovávané při teplotě 5 a 30 °C. Analýza vzorků probíhala po dobu osmi týdnů. Cílem této studie bylo zjišťování degradace rozpuštěného fluoxetin-hydrochloridu. Navíc měl být sledován trend stoupající koncentrace hlavního rozkladného produktu na úkor rozkládající se molekuly fluoxetin-hydrochloridu. Chromatografické podmínky byly nastaveny zvlášť, jak pro fluoxetin-hydrochlorid tak pro rozkladný produkt  $\alpha$ -[2-(methylamino)ethyl]benzen methanol (názvosloví se v této literatuře liší, ale jedná se o námi pozorovanou Imp A). Byla použita kolona DuPont Zorbax – CN, mobilní fáze pro fluoxetin-hydrochlorid 50 : 50 – acetonitril : 1 % roztok triethylaminu (úprava pH směsi na hodnotu 6 pomocí koncentrované kyseliny fosforečné). Mobilní fáze pro rozkladný produkt 60 : 40 – acetonitril : 1 % roztok triethylaminu (úprava pH směsi na hodnotu 7 pomocí koncentrované kyseliny fosforečné). Koncentrace fluoxetin-hydrochloridu ani v jednom případě neklesla pod 95 % původní koncentrace. Nebyla zde potvrzena hypotéza zvyšující se koncentrace rozkladného produktu v závislosti na rozkladu molekuly fluoxetin-hydrochloridu. (33)

A. Maślanka, U. Hubicka J. Krzek, M. Walczak a G. Izvorski pozorovali fotodegradaci fluoxetin-hydrochloridu v pevném skupenství s příměsí kovových iontů ve formě solí: Al(III), Fe(II), Fe(III) a Cu(II). Jednotlivé vzorky obsahovaly roztok fluoxetin-hydrochloridu s přidavkem příslušné soli kovu. Porovnávací vzorek obsahoval pouze roztok fluoxetin-hydrochloridu. Z těchto vzorků bylo odpařeno rozpouštědlo (methanol) za teploty 40 °C. Po odpaření rozpouštědla následovalo ozařování vzorků světelným zdrojem v UVA oblasti ( $\lambda = 320 - 400 \text{ nm}$ ,  $1,6 \text{ W/m}^2$ ) po uvedenou dobu při 20 °C. Nakonec byly vzorky opět rozpuštěny v methanolu.

Chromatografické podmínky: TLC F<sub>254</sub> deska (20 cm x 10cm) Merck, Darmstadt, Germany no 1.05554.0001, mobilní fáze: chloroform : methanol : 25 % roztok amoniaku – 45 : 4,5 : 0,5 (v/v/v). Detekce pomocí TLC denzitometru – Scanner – 3. Bylo zjištěno, že v pevném skupenství podléhá fluoxetin-hydrochlorid fotodegradaci pouze v přítomnosti kovových iontů. Nejvíce pak za přítomnosti iontů měďnatých. Naopak samotný fluoxetin-hydrochlorid fotodegradaci nepodléhal. (34)

Jeong – Wook Kwon a Kevin L. Armbrust testovali fotodegradaci a hydrolyzu fluoxetin-hydrochloridu extrahovaného z léčivého přípravku Prozac<sup>®</sup> v různých vodných roztocích, které zahrnovaly: přírodní vodu, systém voda/sediment a médium aktivovaného kalu. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC sestavy s UV detektorem (detektor diodového pole) při vlnové délce 227 nm. Chromatografické podmínky byly nastaveny následovně: kolona Waters Nova Pak<sup>®</sup> C18 (délka, 150 mm; vnitřní průměr, 3,9 mm; velikost částic, 4 μm), mobilní fáze: acetonitril : roztok triethylaminu (10 mM) – 60 : 40 (v/v), pH bylo upraveno na hodnotu 4,8 pomocí 85 % kyseliny fosforečné. Průtok byl nastaven na 1,0 ml/min.

K analýze byla také použita sestava kapalinové chromatografie spojená s MS detektorem. Chromatografické podmínky: kolona Phenomenex Luna (délka, 250 mm; vnitřní průměr, 2 mm; velikost částic, 5 μm). Mobilní fáze: zásobník A (acetonitril), zásobník B (10 mM amonium acetát). Analýza probíhala gradientovou elucí s průtokem 0,2 ml/min. Roztoky byly ozařovány pomocí světelného zdroje s UV lampou (vlnová délka záření: 290 – 400 nm) ze vzdálenosti 50 cm při 25 °C. Vzorky byly odebírány po dobu 30 dní. Fluoxetin-hydrochlorid byl hydrolyticky i fotolyticky stabilní ve všech vodných roztocích kromě vodného roztoku s obsahem huminových kyselin. Dále bylo zjištěno, že dochází k adsorpci fluoxetin-hydrochloridu na sediment a tím ke snížení koncentrace fluoxetin-hydrochloridu ve vodné fázi. (35)

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1. Použité chemikálie a pomůcky

### 4.1.1. Chemikálie

- Fluoxetin-hydrochlorid, SVUS Pharma, Hradec Králové
- Kyselina fosforečná 85%, Lach – Ner, Česká republika
- Kyselina sírová 1M, PENTA s.r.o., Česká republika
- Methanol – Scharlau chemie S.A., Španělsko
- Peroxid vodíku 30%, MERCI s.r.o., Česká republika
- Tetrahydrofuran, Sigma – Aldrich spol. s.r.o., USA
- Triethylamin, PENTA s.r.o., Česká republika
- Voda čištěná reverzní osmózou

### 4.1.2. Laboratorní pomůcky

- Alobal
- Erlenmeyerovy baňky
- Filtry nylonové 0,45  $\mu\text{m}$
- Injekční stříkačky
- Kádinky
- Kyvety
- Laboratorní lžička
- Míchadla
- Mikropipeta a špičky
- Odměrné baňky se zábrusem
- Odměrné válce
- Pipetovací nástavec
- Pipety dělené a nedělené
- Skleněná fritá
- Skleněné tyčinky
- Stříčka
- Zátky (skleněné a plastové)
- Zkumavky

## 4.2. Přístrojové vybavení

### 4.2.1. HPLC sestava

- HPLC jednotka: LC – 20 Prominence, SCHIMADZU, Japonsko
- Řídící jednotka: CBM – 20A
- Degaser: DGU – 20A3
- Čerpadlo: LC – 20AD XR
- Autosampler: SIL – 20AC XR
- Termostat kolony: CTO – 20AC
- Chromatografický software: LCSolution v. 1.22 SP1, SCHIMADZU

### 4.2.2. Kolona

- BDS HYPERSIL C18
- Part No 28105 – 254630
- Dim. (mm) 250 x 4,6
- LOT 7786
- Particle sz. 5 µm
- SN: 0401187H

### 4.2.3. Přístroje

- Vakuová sušárna: TYP – MVS 161
- Laboratorní váhy: SARTORIUS AG GERMANY CPA225D – 0CE
- Termostat magnetického míchadla: Heidolph Instrument GmbH (Schwabach, Německo)
- Magnetická míchadla: Heidolph Hei Standard, typ: MR Hei - Standard
- pH metr: SCHOTT
- Světelný zdroj: Newport Corporation, model 60056, řady Q Arch Source, 100 Wattová xenonová bez ozónová Arch lampa, model 6257
- Ultrazvuková lázeň: KRAINTEK s.r.o. 941 44 HUL, K – 10

## 4.3. Pracovní postup

### 4.3.1. Příprava roztoku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu

Při přípravě roztoku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu se vycházelo z metody porovnávacího roztoku článku *Fluoxetini-hydrochloridi*, který byl uveden v Českém lékopisu 2009. Z této metody byly vynechány kroky s přidavkem fluoxetin-hydrochloridu CRL a jeho nečistot B a C.

Asi 8,8 mg fluoxetin-hydrochloridu bylo v ultrazvukové lázni rozpuštěno ve 2 ml destilované vody. K 0,5 ml tohoto roztoku bylo přidáno 0,5 ml kyseliny sírové 1M. Roztok byl zahříván po dobu 3 h při teplotě asi 85 °C. Tento roztok byl doplněn do 5 ml MF (MeOH : THF) : roztok TEA – 5 : 95 (v/v). Výsledný roztok obsahoval značné množství nečistoty imp A a obvykle také 4-trifluormethylfenol.

### 4.3.2. Příprava mobilní fáze

Při optimalizaci mobilní fáze se opět vycházelo z lékopisného článku *Fluoxetini-hydrochloridi*. Tato mobilní fáze byla upravena z důvodu optimalizace chromatografických podmínek. Konečná podoba mobilní fáze:

- Zásobník A: (MeOH : THF) : roztok TEA – 70 : 30 (v/v)
- Zásobník B: (MeOH : THF) : roztok TEA – 5 : 95 (v/v)

Směs: (MeOH : THF) – 8 : 30 (v/v)

Roztok TEA: k 10 ml triethylaminu bylo přidáno 980 ml vody, promíchalo se, pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0 a zředilo se vodou na 1000 ml.

### 4.3.3. Příprava roztoku pro experiment č. 1

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 44 mg fluoxetin-hydrochloridu a doplněno destilovanou vodou po rysku. Z tohoto roztoku bylo odebráno po 20 ml do třech Erlenmayerových baněk a jedné kyvety z křemenného skla.



#### 4.3.4. Příprava roztoku pro experiment č. 2

Ve skleněné kádince bylo v 600 ml destilované vody rozpuštěno přibližně 12 mg fluoxetin-hydrochloridu. K tomuto roztoku bylo následně přidáno 67 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tímto vznikl 3 % peroxidový roztok fluoxetin-hydrochloridu o přibližné koncentraci 0,018 mg/ml. Z tohoto roztoku bylo odebráno po 200 ml do třech Erlenmayerových baněk.

#### 4.4. Chromatografické podmínky

- Průtoková rychlost: 1 ml/min
- Teplota kolony: 25 °C
- Detekce: Spektrofotometrický detektor,  $\lambda = 215 \text{ nm}$
- Nástřik: 10  $\mu\text{l}$ , následně zvýšen na 50  $\mu\text{l}$  (experiment č. 2, linearita a selektivita)
- Mobilní fáze: viz příprava mobilní fáze 4.3.2
- Gradientová eluce: gradient č. 12, viz Tab. 1

Tab. 1: Průběh gradientové eluce č. 12

Čas [min]	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0 – 3	0	100
3 – 25	0 → 100	100 → 0
25 – 40	100	0
40 – 43	100 → 0	0 → 100
43 – 46	0	100

## 4.5. Validace chromatografických metod

### 4.5.1. Linearita

Pro linearitu bylo použito celkem 5 vzorků. Vzorky byly připraveny ředěním z roztoku fluoxetin-hydrochloridu o koncentraci 1 mg/ml (roztok 1) připraveného takto:

Do 20 ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 20 mg fluoxetin-hydrochloridu (přesná navážka  $m = 0,01999$  g) a následně doplněno vodou po rysku.

Zbylé vzorky byly připraveny takto:

Vzorek č. 2: 7,5 ml roztoku 1 bylo doplněno vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce.

Vzorek č. 3: 5 ml roztoku 1 bylo doplněno vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce.

Vzorek č. 4: 2,5 ml roztoku 1 bylo doplněno vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce.

Vzorek č. 5: 1 ml roztoku 1 byl doplněn vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml a doplněn vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce. Následně byl z tohoto roztoku odebrán 1 ml a doplněn vodou R po rysku v 10 ml odměrné baňce.

Koncentrace roztoků uvádí Tab. 2.

Tab. 2: Tabulka linearity roztoku fluoxetin-hydrochloridu.

Linearita	
Vzorky	koncentrace [mg/ml]
1.	1
2.	0,75
3.	0,5
4.	0,25
5.	0,001

#### 4.5.2. Selektivita

Pro selektivitu byly srovnávány záznamy roztoku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu, samotné gradientové eluce, tzn. bez nástřiku vzorku a vzorky rozpouštědel:

- H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.

#### 4.5.3. Detekční limit a kvantitativní limit

Kvantitativní limit (LOQ) byl vyjádřen jako koncentrace fluoxetin-hydrochloridu s poměrem signálu k šumu s hodnotou, která je rovna 10.

Detekční limit (LOD) byl vyjádřen jako koncentrace fluoxetin-hydrochloridu s poměrem signálu k šumu s hodnotou, která je rovna 3.

### 4.6. Stabilitní studie

#### 4.6.1. Experiment č. 1

Z roztoku pro experiment č. 1 byly připraveny celkem čtyři vzorky léčiva fluoxetin-hydrochloridu.

##### Vzorek č. 1

20 ml roztoku pro experiment č. 1 bylo převedeno do Erlenmayerovy baňky a bylo ponecháno v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. V intervalech, které znázorňuje příložená Tab. 3, byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

##### Vzorek č. 2 a 3

Po 20 ml roztoku pro experiment č. 1 bylo převedeno do Erlenmayerových baněk, které byly umístěny na magnetické míchačky s topným tělesem. Roztok vzorku

č. 2 byl zahříván na teplotu 50 °C, roztok vzorku č. 3 na teplotu 80 °C. V intervalech znázorněných v Tab. 3 byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

#### Vzorek č. 4

20 ml roztoku pro experiment č. 1 bylo převedeno do kyvety z křemenného skla. Kyveta byla ozařována světelným paprskem o intenzitě 23 000 LUX ze vzdálenosti přibližně 20 cm. V intervalech, které znázorňuje příložená Tab. 3, byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

*Tab. 3: Počty a intervaly odebíraných vzorků.*

Počet odebíraných vzorků	Časové intervaly odběrů [hod]
1.	0
2.	2,5
3.	5,75
4.	20
5.	30
6.	43

#### **4.6.2. Experiment č. 2**

Pro pokus č. 2 byl místo vody jako rozpouštědla použit 3 % roztok peroxidu vodíku. Z roztoku pro experiment č. 2 byly připraveny celkem tři vzorky fluoxetin-hydrochloridu.

#### Vzorek č. 1

200 ml roztoku pro experiment č. 2 bylo převedeno do Erlenmayerovy baňky a ponecháno v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. V intervalech, které znázorňuje příložená Tab. 4, byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

### Vzorek č. 2

200 ml roztoku pro experiment č. 2 bylo převedeno do Erlenmayerovy baňky, která byla umístěna na magnetickou míchačku s topným tělesem. Roztok vzorku byl v temnu zahříván na teplotu 50 °C. V intervalech, které znázorňuje přiložená Tab. 4, byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

### Vzorek č. 3

200 ml roztoku pro experiment č. 2 bylo převedeno do Erlenmayerovy baňky, která byla umístěna na magnetickou míchačku s topným tělesem. Baňka byla ozařována světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX ze vzdálenosti přibližně 25 cm při teplotě 50 °C. V intervalech, které znázorňuje přiložená Tab. 4, byly odebírány vzorky o objemu 200 µl do inzertu vialky a nastříkovány na HPLC.

*Tab. 4: Počty a intervaly odebíraných vzorků.*

Počet odebíraných vzorků	Časové intervaly odběrů [hod]
1.	0
2.	6,5
3.	19
4.	29,5
5.	43
6.	53,30
7.	65,5

## **5. VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 5.1. Optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimalizaci separační metody bylo modifikováno nejen složení mobilní fáze, ale také průběh gradientu. V prvním kroku byla upravena isokratická eluce, která byla poté nahrazena elucí gradientovou.

### 5.1.1. Isokratická eluce

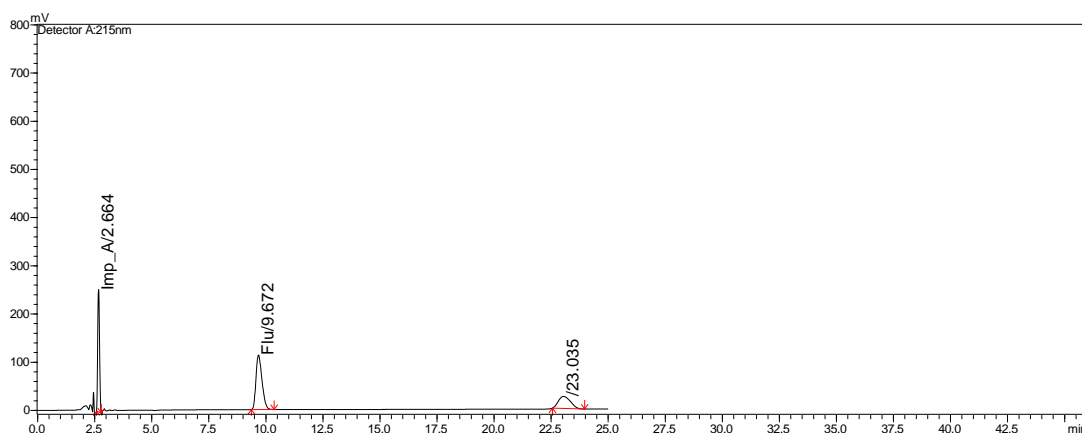
Při optimalizaci chromatografických podmínek se nejprve upravovalo složení mobilní fáze uvedené v ČL09.

*Mobilní fáze dle ČL09:* směs objemových dílů methanolu, tetrahydrofuranu a roztoku triethylaminu připraveného takto: k 10 ml triethylaminu R bylo přidáno 980 ml vody R, promíchalo se, pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 6,0 a bylo zředěno vodou R na 1000 ml, (8 : 30 : 62).

Tato mobilní fáze se jevila jako nevyhovující, protože pík Imp A zasahoval do tzv. mrtvého času kolony, viz Obr. 6. Z tohoto důvodu nebylo možné jeho přesné kvantitativní stanovení. S přihlédnutím k chemické povaze této nečistoty bylo tedy upravováno složení mobilní fáze s cílem zadržet Imp A déle na koloně.

Při vývoji byla mobilní fáze rozdělena do dvou zásobníků, A a B. Zásobník A obsahoval směs MeOH : THF : roztok TEA – 8 : 30 : 62 (v/v). Zásobník B obsahoval roztok TEA.

Bylo upravováno procentuální zastoupení roztoku TEA ve směsi (MeOH : THF : roztok TEA) postupným zvyšováním z výchozích 62 % až na výsledných 95 %. Tímto byl zkoumán vliv zvyšování hydrofility (polarity) MF na retenční čas nečistoty Imp A molekuly fluoxetin-hydrochloridu. Jednotlivé změny retenčních časů v závislosti na množství TEA v mobilní fázi uvádí Tab. 5.



Obr. 6: Chromatogram porovnávacího vzorku fluoxetin-hydrochloridu dle lékopisného článku ČL09.

1. Pík – Imp A
2. Pík – Fluoxetin-hydrochlorid
3. Pík – 4-trifluormethylfenol

Tab. 5: Závislost retenčního času nečistoty Imp A na procentuálním zastoupení roztoku TEA ve směsi (MeOH : THF : roztok TEA).

MF (MeOH : THF : roztok TEA)	t <sub>R</sub> : Imp A [min]
8 : 30 : 62	2,5
8 : 30 : 80	3,0
8 : 30 : 90	3,75
8 : 30 : 95	5,0

### 5.1.2. Gradientová eluce

Zvýšenou polaritou MF na začátku eluce se sice docílilo požadovaného posunutí píku nečistoty Imp A, ale celkově by takto zvolená MF vedla k výrazné časové náročnosti celkové analýzy díky nízké eluční síle MF. Tento problém byl tedy ve druhém kroku řešen pomocí gradientové eluce. Během vývoje optimálních podmínek bylo postupně vyzkoušeno 12 typů gradientu.

Mobilní fáze byla rozdělena do dvou zásobníků, A a B. Zásobník A obsahoval pouze organickou směs MeOH : THF v poměru 8 : 30 (v/v). Zásobník B obsahoval pufr (roztok TEA)



Nejdříve byla zkoušena gradientová eluce při zachování doby záznamu, kterou uvádí lékopisný článek. Složení MF na začátku eluce bylo podle výsledků úpravy izokratické eluce nastaveno ve prospěch roztoku TEA (95 % roztok TEA). Po eluci píku Imp A bylo procentuální složení MF měněno ve prospěch organické složky, a to od počátečních 38 % až po konečných 70 %. Tím se zvýšila eluční síla MF. Za takto nastavených podmínek docházelo ke strmým změnám gradientu, což se projevvalo driftem a šumem nulové (základní) linie. Snížení strmosti změn gradientu vedlo k postupnému prodlužování doby záznamu až na konečných 46 minut. V dalších krocích byl upravován časový průběh gradientu, který spolu s prodloužením analýzy vedl ke zvýšení citlivosti metody. Poslední změna spočívala v úpravě složení roztoků v zásobnících A a B za vzniku směsí. Zásobník A obsahoval 70 % roztok organické složky, zásobník B obsahoval 95 % roztok TEA. Tímto bylo docíleno snížení šumu základní linie způsobeného změnami ve složení MF v průběhu gradientu. Z praktických důvodů jsou zde uvedeny pouze dvě konečné úpravy gradientové eluce a MF. Průběh gradientu v časové ose spolu s jednotlivě separovanými složkami vzorku znázorňuje přiložený chromatogram, viz Obr. 7.

### ***Gradient č. 11:***

#### Složení MF:

Zásobník A obsahoval směs MeOH : THF – 8 : 30 (v/v). Zásobník B obsahoval roztok TEA. Časový průběh gradientu zobrazuje Tab. 6.

*Tab. 6: Průběh gradientové eluce č. 11*

Čas [min]	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0 – 3	5	95
3 – 25	5 → 65	95 → 35
25 – 40	65	35
40 – 43	65 → 5	35 → 95
43 – 46	5	95

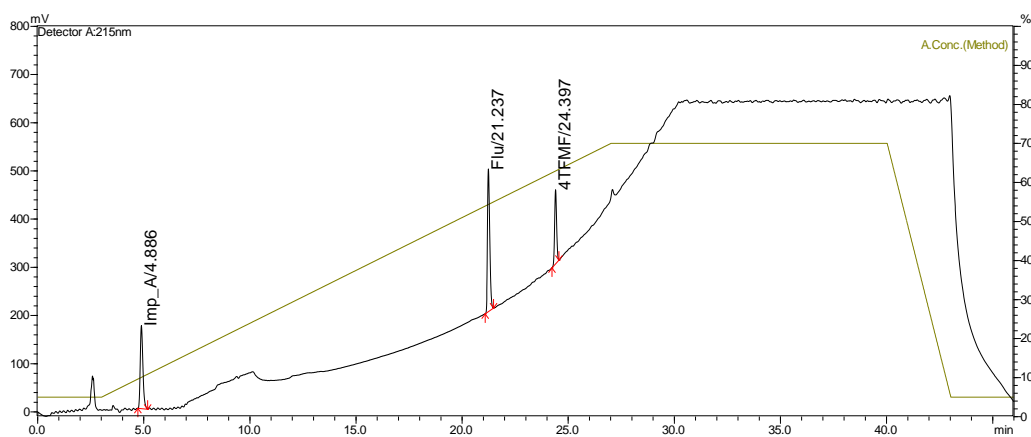
### **Gradient č. 12:**

#### Složení MF:

Zásobník A obsahoval směs (MeOH : THF) : roztok TEA – 70 : 30 (v/v).  
Zásobník B obsahoval (MeOH : THF) : roztok TEA – 5 : 95 (v/v). Časový průběh gradientu zobrazuje Tab. 7.

Tab. 7: Průběh gradientové eluce č. 12

Čas [min]	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0 – 3	0	100
3 – 25	0 → 100	100 → 0
25 – 40	100	0
40 – 43	100 → 0	0 → 100
43 – 46	0	100



Obr. 7: Průběh gradientové eluce v čase spolu se separovanými složkami vzorku.

1. Pík – Imp A
2. Pík – Fluoxetin-hydrochlorid
3. Pík – 4-trifluormethylfenol

## 5.2. Validace chromatografických metod

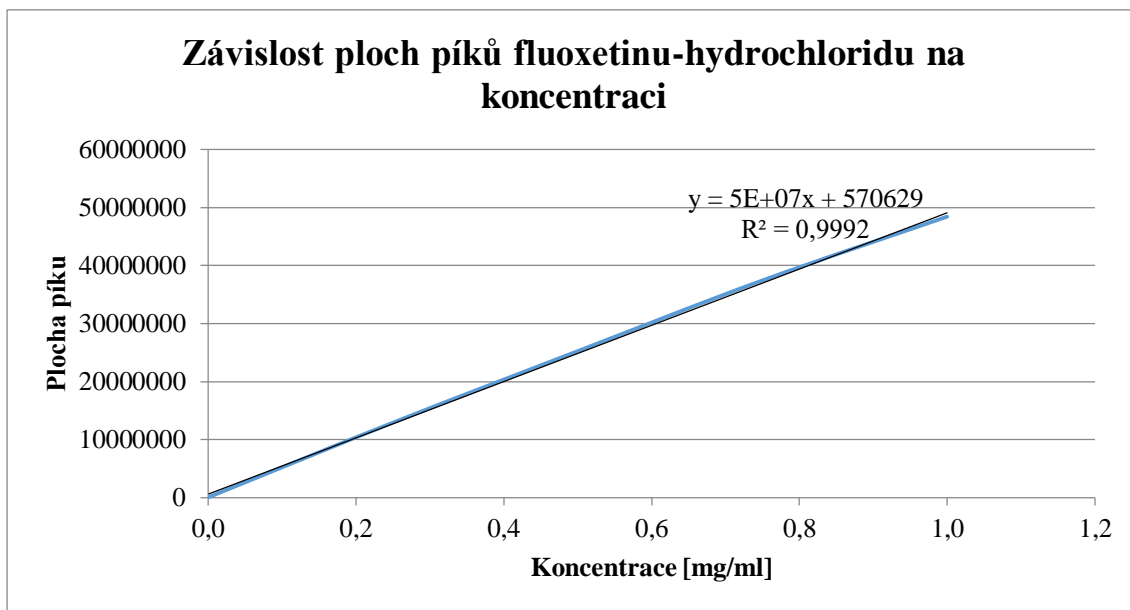
### 5.2.1. Linearita

Pro stanovení linearity bylo použito celkem pět vzorků, které byly připraveny ředěním roztoku fluoxetin-hydrochloridu o koncentraci 1 mg/ml. Jednotlivé koncentrace měřených vzorků s průměrnými hodnotami ploch píků jsou uvedeny v Tab. 8.

Koncentrace roztoků v tabulce jsou uvedeny pouze zaokrouhleně. Přesné hodnoty koncentrací použité pro vytvoření grafu byly vypočítány z přesné navážky fluoxetin-hydrochloridu. Na Obr. 8 je zobrazen graf závislosti ploch píků fluoxetin-hydrochloridu na jeho koncentraci v roztoku.

Tab. 8: Koncentrace s jednotlivými plochami píků fluoxetin-hydrochloridu.

<b>Linearita</b>		
<b>Vzorky</b>	<b>Koncentrace [mg/ml]</b>	<b>Plocha píku fluoxetin-hydrochloridu</b>
1.	1	48456512
2.	0,75	37456137
3.	0,5	25259625
4.	0,25	12936334
5.	0,001	106964



Obr. 8: Graf závislosti ploch píků fluoxetin-hydrochloridu na jeho koncentraci v roztoku.

Korelační koeficient  $R = 0,9996$

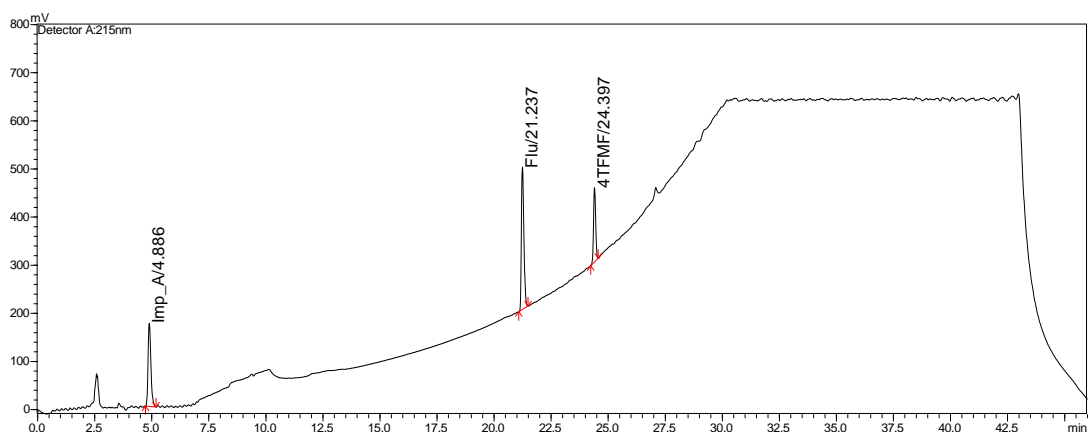
Požadavek:  $R > 0,9990$ , viz 3.3.7.6

Závěr: Vyhovuje požadavku na linearitu.

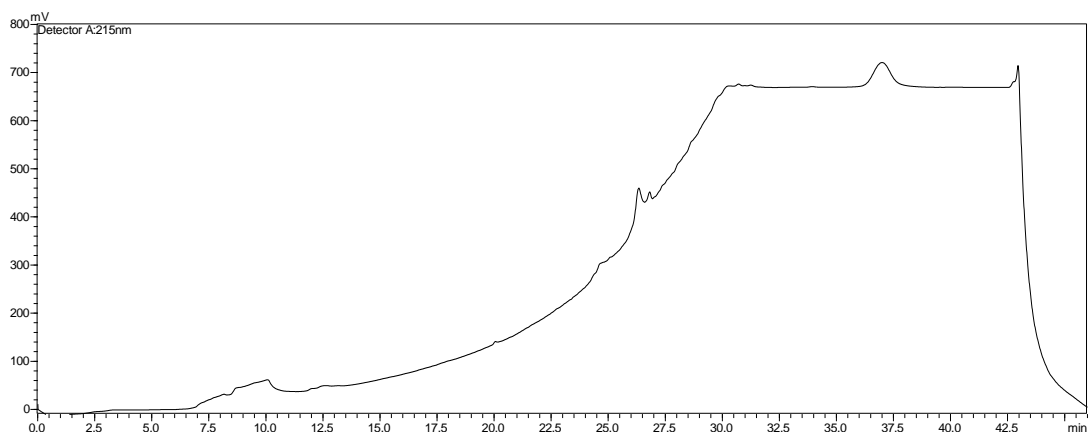
## 5.2.2. Selektivita

V testu selektivity byl porovnáván záznam vzorku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu a jeho rozkladných produktů (Obr. 9) se záznamy chromatogramů samotné gradientové eluce (Obr. 10) a uvedených rozpouštědel:

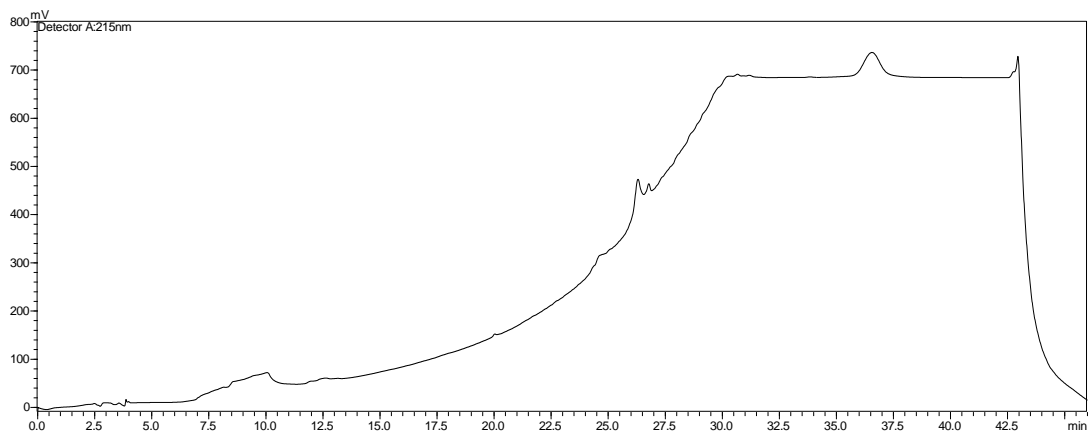
- H<sub>2</sub>O (Obr. 11)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % (Obr. 12)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M (Obr. 13)



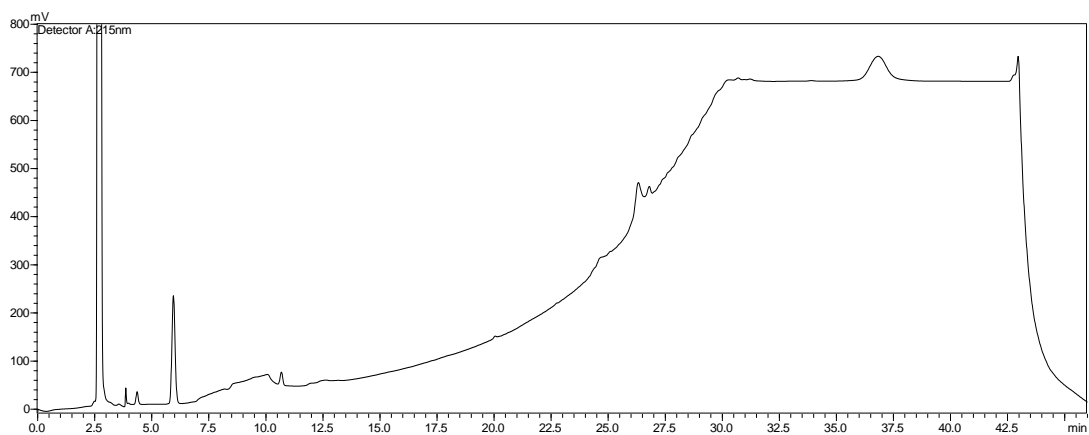
Obr. 9: Chromatogram průběhu vzorku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu a jeho rozkladných produktů.



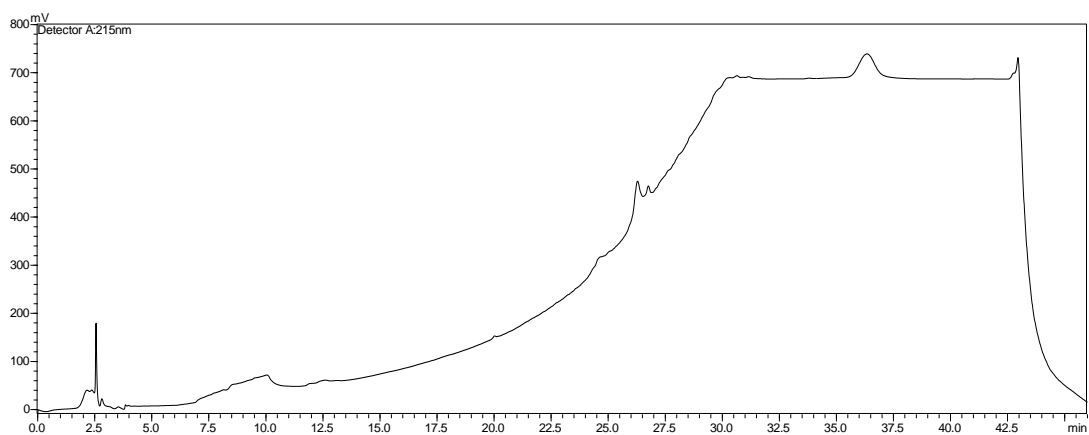
Obr. 10: Chromatogram průběhu samotné gradientové eluce.



*Obr. 11: Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem vody.*



*Obr. 12: Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem 3 % peroxidu vodíku.*



*Obr. 13: Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem kyseliny sírové 1M.*

Závěr: Z výše uvedených záznamů chromatogramů lze říci, že je tato metoda selektivní pro stanovení fluoxetin-hydrochloridu i jeho dvou hlavních rozkladných produktů.

### 5.2.3. Přesnost a Správnost

Příprava vzorku pro analýzu je velmi jednoduchá a spočívá v prosté filtraci roztoku. Standardy jednotlivých nečistot navíc nebyly k dispozici. Proto bylo ověření těchto parametrů po dohodě se školitelem vynecháno.

### 5.2.4. Detekční a kvantitativní limit

Pro limit detekce a kvantifikace byl použit roztok fluoxetin-hydrochloridu o koncentraci 0,001 mg/ml. Z chromatogramu byla následně odečtena výška šumu v okolí píku a výška píku analyzovaného vzorku. Z těchto údajů byl stanoven LOD a LOQ.

h = 12 mm h.....výška šumu

H = 53 mm H.....výška píku

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

Závěr: Poměr signálu k šumu byl 8,83. Hodnoty LOD a LOQ uvádí Tab. 9.

Tab. 9: Hodnoty LOD a LOQ.

	Vzorek	LOD	LOQ
Koncentrace (mg/ml)	0,0009995	0,000340	0,001132

### 5.3. Stabilitní studie

Stabilita molekuly fluoxetin-hydrochloridu byla pozorována ve dvou experimentech. Úkolem stabilitních studií bylo napodobit podmínky vyskytující se v přírodě a jejich vliv na stabilitu molekuly fluoxetin-hydrochloridu. Experimenty byly porovnány s výsledky studií uvedených v odborné literatuře.

#### 5.3.1. Experiment č. 1

V tomto pokusu byly zkoumány celkem čtyři vodné roztoky fluoxetin-hydrochloridu. Vzorek č. 1, který současně sloužil jako slepý vzorek, byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. Vzorky č. 2 a 3 byly zahřívány na elektricky vytápěné míchačce na teplotu 50 °C respektive 80 °C. Vzorek č. 4 byl ozařován paprskem ze světelného zdroje o intenzitě 23 000 LUX. Všechny vzorky byly těmito podmínkám vystavovány po dobu 43 hodin.

Závěr: Ve všech čtyřech případech experimentu č. 1 se neprojevila žádná změna ve velikosti píku fluoxetin-hydrochloridu ani nevznikal žádný rozkladný produkt. Tímto lze říci, že molekula léčiva byla ve vodném roztoku stabilní jednak za zvýšené teploty, ale také při ozařováním světelným paprskem. Tento fakt koresponduje s výsledky studií uvedených níže.

Jeffrey A. Peterson, Donald S. Risley, Philip N. Anderson a Kurt F. Hostettler zjistili, že molekula fluoxetin-hydrochloridu je hydrolyticky stabilní, jednak ve vodného roztoku, tak v dalších běžně používaných farmaceutických rozpouštědlech, viz kapitola 3.4.

A. Maślanka, U. Hubicka J. Krzek, M. Walczak a G. Izworski1 pozorovali fotodegradaci fluoxetin-hydrochloridu v pevném skupenství pouze u vzorků, které obsahovaly příměsi kovových iontů. Samotný fluoxetin-hydrochlorid fotodegradaci nepodléhal, viz kapitola 3.4.



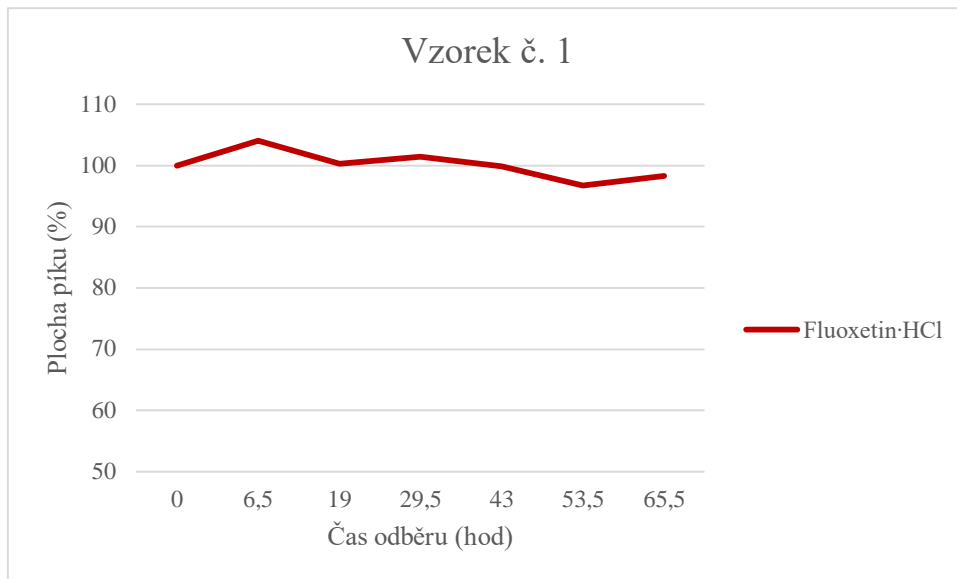
### 5.3.2. Experiment č. 2

V experimentu č. 2 byly zkoušeny celkem tři vzorky fluoxetin-hydrochloridu, které byly rozpuštěny v 3 % roztoku peroxidu vodíku. Vzorek č. 1 byl uchovávan v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. Vzorek č. 2 byl na elektricky vytápěné míchačce zahříván v temnu na teplotu 50 °C. Vzorek č. 3. byl jednak zahříván na teplotu 50 °C, ale také ozařován paprskem světelného zdroje o intenzitě 11 000 LUX. Jednotlivé odběry vzorků a velikosti ploch píků fluoxetin-hydrochloridu uvádějí následující tabulky (Tab. 10, Tab. 11 Tab. 12). V grafech (Obr. 14, Obr. 15, Obr. 16) je velikost ploch píků vyjádřena v procentech. Plocha píků v čase  $T = 0$  představuje 100 % původní koncentrace.

#### Vzorek č. 1

*Tab. 10: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, uchovávaný v temnu za laboratorních podmínek.*

Čas odběru (hod)	Plocha píku fluoxetin-hydrochloridu
0	892959
6:30	929378
19	895730
29:30	906172
43	892310
53:30	863608
65:30	878029



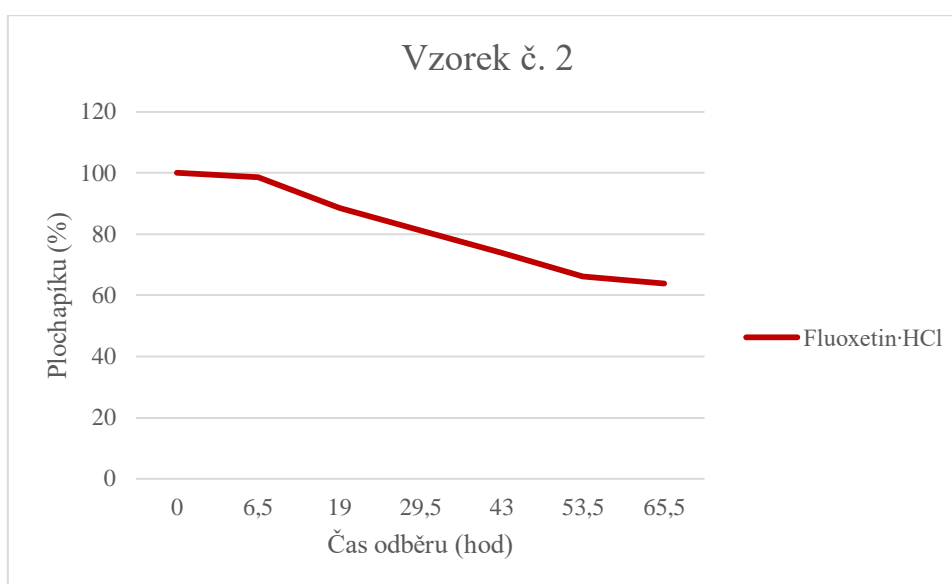
*Obr. 14: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 1 v závislosti na čase odběru.*

Závěr: Z grafu lze vyčíst, že za 65,5 hodin došlo k mírnému poklesu hodnot ploch píků fluoxetin-hydrochloridu. Z toho vyplývá, že dochází jen k velmi mírnému rozkladu fluoxetin-hydrochloridu v 3 % roztoku peroxidu vodíku v temnu za laboratorní teploty 24 °C. Po 65,5 hodinách došlo k poklesu fluoxetin-hydrochloridu přibližně na 98 % původní koncentrace.

## Vzorek č. 2

Tab. 11: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, uchovávaný v temnu při teplotě 50 °C.

Čas odběru (hod)	Plocha píku fluoxetin-hydrochloridu
0	892959
6:30	880583
19	790345
29:30	726056
43	659842
53:30	591092
65:30	570155



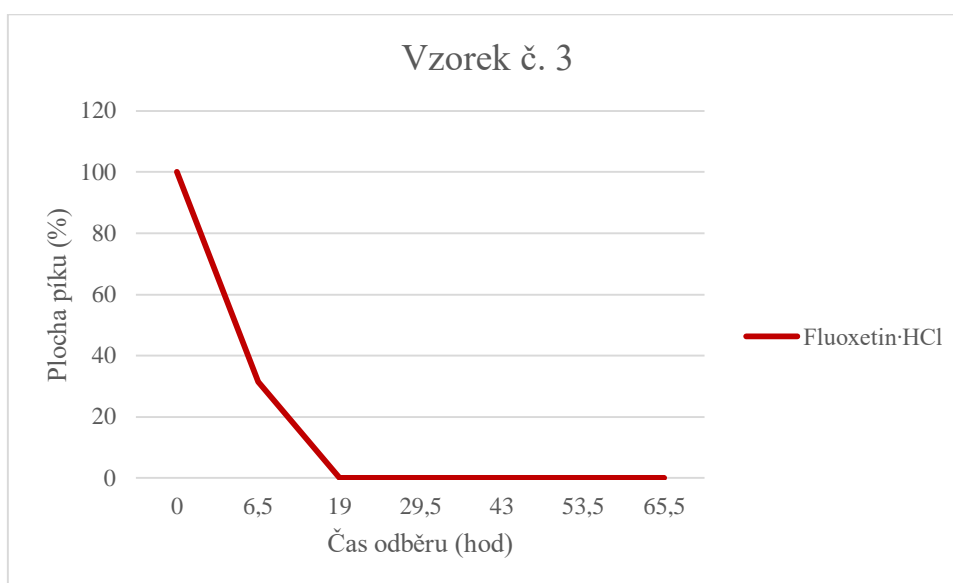
Obr. 15: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 2 v závislosti na čase odběru.

Závěr: Z grafu vyplývá, že v prostředí 3 % roztoku peroxidu vodíku uchovávaného v temnu za teploty 50 °C docházelo k postupnému rozkladu fluoxetin-hydrochloridu. Po 65,5 hodinách došlo k poklesu fluoxetin-hydrochloridu přibližně na 64 % původní koncentrace.

### Vzorek č. 3

Tab. 12: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, ozařovaný světelným zdrojem o svítivosti 11 000 LUX při teplotě 50 °C.

Čas odběru (hod)	Plocha píku fluoxetin-hydrochlorid
0	892959
6:30	281516
19	0
29:30	0
43	0
53:30	0
65:30	0



Obr. 16: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 3 v závislosti na čase odběru.

Závěr: Z grafu vyplývá, že paprsek světelného zdroje výrazně potencuje podmínky pro rozklad fluoxetin-hydrochloridu v 3 % roztoku peroxidu vodíku. Ze vzorku, který byl odebrán přibližně po 19 hodinách, nebyl v oblasti retenčního času fluoxetin-hydrochloridu detekovatelný žádný pík.

Za použitých chromatografických podmínek nebyly v jednotlivých záznamech vzorku č. 1, 2 a 3 experimentu č. 2 detekovatelné žádné píky hlavních rozkladných produktů fluoxetin-hydrochloridu, které uvádí lékopisný článek (Imp A a 4-trifluormethylfenol). Rovněž nebyly pozorovatelné ani žádné jiné píky, které by představovaly nově vznikající rozkladné produkty. Vysvětlení chemismu rozkladných procesů molekuly fluoxetin-hydrochloridu by jistě bylo zajímavé, nicméně tato problematika zasahuje již nad rámec diplomové práce.

Z uvedené literatury vyplývá, že k degradaci molekuly fluoxetin-hydrochloridu přispívá mimo oxidativního působení peroxidu vodíku, také působení huminových kyselin či přítomnost kovových iontů viz kapitola 3.4.

## **6. ZÁVĚR**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout a validovat stabilitu indikující HPLC metodu pro hodnocení léčiva fluoxetin-hydrochloridu.

V teoretické části diplomové práce byly shrnuty informace o antidepresivu fluoxetin-hydrochloridu, které se řadí do skupiny SSRI. Dále zde byly popsány jednotlivé chromatografické metody se zaměřením na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii – HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Praktická část se zabývala vývojem a validací stabilitu indikující HPLC metody pro hodnocení fluoxetin-hydrochloridu. Základ této metody byl převzat z lékopisného článku *Fluoxetini-hydrochloridi* Českého lékopisu 2009. Jelikož nebyla možná kvantifikace hlavního rozkladného produktu (Imp A) kvůli minimální retenci, byly upraveny chromatografické podmínky a zvolena gradientová eluce.

#### **Kolona:**

- Rozměry: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm.
- Stacionární fáze: reverzní fáze C18 na bázi silikagelu (5 µm).
- Teplota: 25 °C.

#### **Mobilní fáze:**

- Zásobník A: (MeOH : THF) : roztok TEA – 70 : 30 (v/v).
- Zásobník B: (MeOH : THF) : roztok TEA – 5 : 95 (v/v).
- Směs: (MeOH : THF) – 8 : 30 (v/v).
- Roztok TEA: k 10 ml triethylaminu bylo přidáno 980 ml vody, promíchalo se, pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0 a zředilo se vodou na 1000 ml.

*Tab. 13: Gradientová eluce*

Čas [min]	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0 – 3	0	100
3 – 25	0 → 100	100 → 0
25 – 40	100	0
40 – 43	100 → 0	0 → 100
43 – 46	0	100

**Průtoková rychlost:** 1 ml/min.

**Detekce:** Spektrofotometrický detektor,  $\lambda = 215$  nm.

**Nástrík:** 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l (experiment č. 2, linearita a selektivita).

Metoda vyhověla validačním požadavkům na linearitu (korelační koeficient  $R = 0,9996$ ) a selektivitu. Byla stanovena hodnota LOD = 0,0003 mg/ml a hodnota LOQ = 0,001 mg/ml. Testování přesnosti a správnosti metody bylo z důvodů uvedených v kapitole 5.2.3 vynecháno.

Tato validovaná metoda byla následně použita u dvou stabilitních studií. V experimentu č. 1 byl potvrzen údaj z literatury (33) (34), že fluoxetin-hydrochlorid (po dobu analýzy a za daných podmínek) nepodléhal ve vodném prostředí hydrolyze ani fotolýze. V experimentu č. 2 byl prokázán rozklad fluoxetin-hydrochloridu v 3 % roztoku peroxidu vodíku. Tento rozklad byl výrazně potencován ozářením světelným paprskem.



## **7. SEZNAM ZKRATEK**

ACN	Acetonitril
BP	British Pharmacopoeia
ČL 2009	Čerský lékopis 2009
DARI	Dopamine reuptake inhibitor (Inhibitor zpětného vychytávání dopaminu)
DNRI	Dopamine – norepinephrine reuptake inhibitor (inhibitor zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu)
GC	Gas Chromatography (Plynová chromatografie)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
MAO	Monoamine – oxidase inhibitor (Inhibitor monoaminoxidázy)
Imp A	Impurity A (1 <i>RS</i> )-1-fenyl-3-(methylamino)propan-1-ol
LC	Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie)
LOD	Limit of detection (Limit detekce)
LOQ	Limit of quantitation (Limit kvantifikace)
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
NARI	Noradrenalin Reuptake Inhibitor (selektivní inhibitor zpětného vychytávání noradrenalinu)
NaSSA	Noradrenergic and Specific Serotonergic Antidepressants
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Spektroskopie nukleární magnetické resonance)
PC	Paper Chromatography (Papírová chromatografie)
PDA	Photodiode Array Detector (Detektor diodového pole)
PEEK	Polyether Ether Ketone (Polyether ether keton)
Roztok TEA	Roztok triethylaminu

SARI	Serotonin antagonist and reuptake inhibitor (Inhibitor zpětného vychytávání serotoninu)
SNRI	Selective norepinephrine reuptake inhibitor (Inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu)
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (Selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu)
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography (Tenkovrstvá chromatografie)
$t_R$	Retenční čas
USP	Unique Selling Proposition (Jedinečný prodejní argument)
UV	Ultraviolet (Ultrafialové záření)

## **8. SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Průběh gradientové eluce č. 12 .....	41
Tab. 2: Tabulka linearit roztoku fluoxetin-hydrochloridu.....	42
Tab. 3: Počty a intervaly odebíraných vzorků.....	44
Tab. 4: Počty a intervaly odebíraných vzorků.....	45
Tab. 5: Závislost retenčního času nečistoty Imp A na procentuálním zastoupení roztoku TEA ve směsi (MeOH : THF : roztok TEA).....	48
Tab. 6: Průběh gradientové eluce č. 11 .....	49
Tab. 7: Průběh gradientové eluce č. 12 .....	50
Tab. 8: Koncentrace s jednotlivými plochami píků fluoxetin-hydrochloridu.....	51
Tab. 9: Hodnoty LOD a LOQ.....	55
Tab. 10: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, uchovávaný v temnu za laboratorních podmínek.....	57
Tab. 11: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, uchovávaný v temnu při teplotě 50 °C.....	59
Tab. 12: Fluoxetin-hydrochlorid rozpuštěný v 3 % roztoku peroxidu vodíku, ozařovaný světelným zdrojem o svítivosti 11 000 LUX při teplotě 50 °C.....	60
Tab. 13: Gradientová eluce.....	63

## **9. SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: Vzorec fluoxetin-hydrochloridu.....	16
Obr. 2: vzorec Imp A.....	17
Obr. 3: Vzorec 4-trifluormethylfenolu .....	17
Obr. 4: Výběr chemicky vázaných stacionárních fází u Reversed – Phase Chromatography.....	24
Obr. 5: Obecné schéma kapalinového chromatografu. (21).....	26
Obr. 6: Chromatogram porovnávacího vzorku fluoxetin-hydrochloridu dle lékopisného článku ČL09.....	48
Obr. 7: Průběh gradientové eluce v čase spolu se separovanými složkami vzorku.....	50
Obr. 8: Graf závislosti ploch píků fluoxetin-hydrochloridu na jeho koncentraci v roztoku.....	52
Obr. 9: Chromatogram průběhu vzorku hydrolyzovaného fluoxetin-hydrochloridu a jeho rozkladných produktů.....	53
Obr. 10: Chromatogram průběhu samotné gradientové eluce.....	53
Obr. 11:Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem vody.....	54
Obr. 12: Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem 3 % peroxidu vodíku. 54	
Obr. 13: Chromatogram průběhu gradientové eluce se vzorkem kyseliny sírové 1M. ...54	
Obr. 14: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 1 v závislosti na čase odběru.....	58
Obr. 15: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 2 v závislosti na čase odběru.....	59
Obr. 16: Graf zobrazující úbytek plochy píku fluoxetin-hydrochloridu u vzorku č. 3 v závislosti na čase odběru.....	60

## **10. REFERENCE**



1. DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha : Karolinum, 2013. 978-80-246-2382-5.
2. VETCHÝ, David. Stabilitní testy ve farmacii. *Praktické lékárenství*. SOLEN Medical education, 2006, 6.
3. MedicineWise, NPS. SSRI – Selective serotonin reuptake inhibitors.  
<http://www.nps.org.au/>. [Online] [Citace: 14. Duben 2016.]  
<http://www.nps.org.au/conditions/mental-health-conditions/mood-disorders/depression/for-individuals/medicines-for-depression-antidepressants/types-of-antidepressants/ssris-selective-serotonin-reuptake-inhibitors>.
4. Hodnocení vývoje distribuce vybrané skupiny léčivých přípravků.  
<http://www.sukl.cz/>. [Online] 2013. [Citace: 26. Duben 2016.]  
<http://www.sukl.cz/hodnoceni-vyvoje-distribuce-vybrane-skupiny-lecivych-12>.
5. ŠÍDLOVÁ, Petra, PODLIPNÁ, Radka a VANĚK, Tomáš. CYTOSTATICKÁ LÉČIVA V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ. *Chemické listy*. 2011, Sv. 105.
6. LINCOVÁ, Dagmar a FARGHALI, Hassan. *Základní a aplikovaná farmakologie, Druhé doplněné a přepracované vydání*. Praha : Galén, 2007. 978-80-7262-373-0.
7. ŠVESTKA, Jaromír. *Psychofarmaka v klinické praxi*. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 1995. 80-7169-169-0.
8. Grada Publishing, a.s. *Český lékopis 2009*. [CD - ROM] Praha : Grada Publishing, a.s., 2009.
9. *Výpis z databáze SPC přípravku Prozac 20 mg, tvrdé tobolky. aktualizováno 20.3.2015.*
10. NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013. 978-80-260-4243-3.
11. KLIMEŠ, Jiří a kolektiv. *Kontrolně - analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : RNDr. František Skopec, CSc. Nucleus HK®, 2011, 2011. 978-80-87009-29-1.

12. OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha : Praha: Karolinum, 2002. 80-246-0553-8.
13. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 978-80-86369-07-5.
14. NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha : Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013. 978-80-260-4244-0.
15. SNYDER, Lloyd R., KIRKLAND, Joseph J. a GLAJCH, Joseph L. *Practical HPLC method development. 2nd ed.* New York : John & Sons, 1997. 0-471-00703-X.
16. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D. <https://www.natur.cuni.cz/fakulta>. [Online] 11. Březen 2011. [Citace: 8. Duben 2016.]  
<https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>.
17. DOUŠA , Michal. Adsorbenty a chemicky vázané fáze. <http://www.hplc.cz/>. [Online] 1993 - 2013. [Citace: 13. Duben 2016.]  
[http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/stationary\\_phase.png](http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/stationary_phase.png).
18. Linde Gas a.s. *Linde Gas a.s.* [Online] [Citace: 30. Březen 2016.] [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html).
19. Labcompare. HPLC Instrument. <http://www.labcompare.com/>. [Online] 2009 - 2016 . [Citace: 1. Duben 2016.] <http://www.labcompare.com/Laboratory-Analytical-Instruments/59-High-Performance-Liquid-Chromatograph-HPLC-Instrument/>.
20. Merck Millipore Corporation. Application overview. [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com). [Online] 2016. [Citace: 1. Duben 2016.] <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/hplc/KFCb.qB.PXYAAAFaq1cQWTs.,nav>.
21. —. Application overview. [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com). [Online] 2016. [Citace: 1. Duben 2016.] [http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en\\_US/Freestyle/LW-Lab-Water/applications/HPLC/LW-LC-Overview-Image1-460x297.jpg](http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en_US/Freestyle/LW-Lab-Water/applications/HPLC/LW-LC-Overview-Image1-460x297.jpg).

22. Dolan, John W. Mobile-Phase Degassing: What, Why, and How. <http://www.chromatographyonline.com/>. [Online] 1. Červenec 2014. [Citace: 1. Duben 2016.] <http://www.chromatographyonline.com/mobile-phase-degassing-what-why-and-how?id=&sk=&date=&%0A%09%09%09&pageID=2>.
23. Labcompare. HPLC Autosampler. <http://www.labcompare.com/>. [Online] 2009-2016. [Citace: 3. Duben 2016.] <http://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/505-HPLC-Autosampler/>.
24. RAMNI, Kaushal, NAVNEET, Kaur a ASHUTOSH, Upadhyay. High performance liquid chromatography detectors - a review. <http://www.irjponline.com/>. [Online] 5. Květen 2011. [Citace: 3. Duben 2016.] [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/vol-2\\_issue-5/1.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/vol-2_issue-5/1.pdf). 2230 - 8407.
25. Prague, Institute of chemical technology. [www.vscht.cz](http://www.vscht.cz). *Detektory v HPLC*. [Online] 2014. [Citace: 4. Duben 2016.] <http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202012%20detektory.pdf>.
26. DASS, Chhabil. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. USA : Wiley - Interscience, 2007. 978-0-471-68229-5.
27. DOUŠA, Michal. Definice: Konfirmace - Kvalifikace - Validace. <http://www.hplc.cz/>. [Online] 1999 - 2013. [Citace: 4. Duben 2016.] <http://www.hplc.cz/Validace/definice.html>.
28. (ICH), The International Council for Harmonisation. <http://www.ich.org/>. *Validation of analytical procedures*. [Online] [Citace: 14. Duben 2016.] [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).
29. EffiChem. Validace metod. <http://www.effichem.cz/>. [Online] 2016. [Citace: 4. Duben 2016.] <http://www.effichem.cz/produkty/effivalidation-4-0/moduly/validace-metod/>.
30. DOUŠA, Michal. Validační program pro statistické zpracování analytických dat. <http://www.hplc.cz/>. [Online] 1999 - 2013. [Citace: 4. Duben 2016.] [http://www.hplc.cz/validace/program\\_validace.htm#\\_3.1\\_Presnost\\_metody](http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm#_3.1_Presnost_metody).

31. RILEY, Christopher M. a ROSANSKE, Thomas W. *Development and Validation of Analytical Methods*. USA : Elsevier Science Ltd, 1996. 0 08 042792 8.
32. 74, Pure Appl. Chem. HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE LABORATORY. <http://www.iupac.org/>. [Online] 2002. [Citace: 5. Duben 2016.]
33. PETERSON, Jeffrey A., a další. Stability of fluoxetine hydrochloride in fluoxetine solution diluted with common pharmaceutical diluents. *American journal of hospital pharmacy*. 1994, Sv. 51(10), 1342-5.
34. MAŠLANKA, A., a další. Determination of Fluoxetine in the Presence of Photodegradation Products Appearing During UVA Irradiation in a Solid Phase by Chromatographic–Densitometric Method, Kinetics and Identification of Photoproducts. *Acta Chromatographica*. 2013, Sv. 25, 465 - 481.
35. KWON, Jeong – Wook a ARMBRUST, Kevin L. LABORATORY PERSISTENCE AND FATE OF FLUOXETINE IN AQUATIC ENVIRONMENTS. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006, Sv. 25 (10), 2561 - 2568.