

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA ZAGORC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA ZAGORC

**OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA FARMAKOPEJSKE METODE ZA
DOLOČANJE NEČISTOTE C PAROKSETINIJEVEGA KLORIDA**

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE PHARMACOPOEIAL
METHOD FOR THE DETERMINATION OF IMPURITY C OF
PAROXETINE HYDROCHLORIDE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v sodelovanju s podjetjem Lek d.d. na oddelku Analitska Podpora pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja in somentorstvom Andreje Jamšek univ. dipl. kem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Zdenku Časarju in somentorici Andreji Jamšek univ. dipl. kem. za strokovno pomoč, trud in nasvete, ki sem jih dobila v času izdelave magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem Andreji Mihevc, Davorju Štirnu ter ostalim zaposlenim v podjetju Lek za strokovno pomoč in pomoč pri laboratorijskem delu. Iskreno se zahvaljujem tudi družini za vso podporo tekom študija ter ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Zdenka Časarja in somentorstvom Andreje Jamšek univ. dipl. kem.

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Paroksetinijev klorid	1
1.1.1	Lastnosti paroksetinijevega klorida	2
1.1.2	Nečistote paroksetinijevega klorida	2
1.1.3	Paroksetinijev klorid kot kiralna spojina	2
1.1.4	Farmakokinetika in metabolizem	2
1.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	3
1.2.1	Osnove HPLC	3
1.2.2	Sistem HPLC	4
1.2.3	Osnovni kromatografski parametri	5
1.2.4	Ločba in določanje nivojev nečistot s tehniko HPLC	7
1.2.5	Kiralna kromatografija	7
1.2.6	Kiralna stacionarna faza	8
1.3	Validacija	9
1.3.1	Dokumentacija.....	10
1.3.1.1	Validacijski protokol	10
1.3.1.2	Validacijsko poročilo	11
1.3.1.3	Revalidacija.....	11
1.3.2	Parametri validacije	11
1.3.2.1	Točnost	11
1.3.2.2	Natančnost.....	11
1.3.2.3	Rigidnost	12
1.3.2.4	Robustnost.....	12
1.3.2.5	Selektivnost / Specifičnost	12
1.3.2.6	Linearnost.....	12

1.3.2.7	Območje	13
1.3.2.8	Meja zaznavnosti.....	13
1.3.2.9	Meja vrednotenja.....	13
1.4	Farmakopeja.....	14
1.4.1	Monografija	14
2	NAMEN DELA.....	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	Materiali.....	16
3.1.1	Uporabljeni reagenti	16
3.1.2	Uporabljeni standardi in nečistote	16
3.1.3	Uporabljen vzorec.....	17
3.1.4	Oprema in inštrumenti	17
3.2	Metode	18
3.2.1	Farmakopejski kromatografski pogoji.....	18
3.2.2	Optimizacija farmakopejske metode	18
3.2.2.1	Priprava topila in mobilne faze	18
3.2.2.2	Priprava osnovnih raztopin.....	18
3.2.2.3	Priprava raztopine vzorca.....	19
3.2.2.4	Priprava vzorcev z dodatkom nečistot C in F	19
3.2.2.5	Preverjanje ustreznosti farmakopejske metode	21
3.2.3	Validacija optimizirane metode	23
3.2.3.1	Natančnost znotraj enega dneva.....	23
3.2.3.2	Meja vrednotenja in meja zaznavnosti	24
3.2.3.3	Linearnost.....	24
3.2.3.4	Točnost.....	25
3.2.3.5	Natančnost znotraj enega dneva (dodatek nečistote C).....	25

3.2.3.6	Selektivnost	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	Optimizacija farmakopejske metode	27
4.2	Validacija optimizirane metode	34
4.2.1	Natančnost znotraj enega dneva (realen vzorec)	37
4.2.2	Natančnost znotraj enega dneva (dodatek nečistote C v realen vzorec).....	38
4.2.3	Določanje meje zaznavnosti in meje vrednotenja	39
4.2.4	Linearnost	41
4.2.5	Točnost	46
4.2.6	Selektivnost	48
5	SKLEP	51
6	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula paroksetinijevega klorida ((3S,4R)-3-((benzo[d][1,3]dioksol-5-iloksi)metil)-4-(4-fluorofenil)piperidin-1-ijev klorid)).	1
Slika 2: Shematski prikaz HPLC sistema, povzeto iz reference 14.....	5
Slika 3: Shematski prikaz osnovnih kromatografskih parametrov (19).	6
Slika 4: Ločitev enantiomerov z uporabo kiralne stacionarne faze, povzeto iz reference 33.	9
Slika 5: Meja vrednotenja in meja vrednotenja z upoštevanjem razmerja signal/šum, povzeto iz reference 34.....	13
Slika 6: Strukturna formula paroksetinijevega klorida hemihidrata (41).	16
Slika 7: Strukturna formula nečistote C paroksetinijevega klorida (42).	17
Slika 8: Strukturna formula nečistote F paroksetinijevega klorida (43).....	17

Slika 9: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ob prisotnosti paroksetinijevega klorida.....	27
Slika 10: Kromatogram 1 % raztopine nečistot C in F brez prisotnosti paroksetinijevega klorida.....	28
Slika 11: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu etanola v mobilni fazi.....	29
Slika 12: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu etanola v mobilni fazi.....	30
Slika 13: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu trifluoroacetne kisline v mobilni fazi.....	30
Slika 14: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu trifluoroacetne kisline v mobilni fazi.....	31
Slika 15: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem trifluoroacetne kisline in etanola v mobilni fazi.....	31
Slika 16: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri uporabi mobilne faze z zmanjšanim deležem etanola.	32
Slika 17: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri uporabi mobilne faze, ki je predpisana v farmakopeji.	33
Slika 18: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri spremembi topila - dodatek kalijevega hidroksida.	34
Slika 19: Kromatogram 0,01 % raztopine nečistote C – DL.	40
Slika 20: Kromatogram 0,04 % raztopine nečistote C – QL.	41
Slika 21: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za prvo paralelko.	45
Slika 22: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za drugo paralelko.	45
Slika 23: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za tretjo paralelko.....	45
Slika 24: Graf potrditve linearnosti odziva v območju od 0,04 % do 2,4 % za nečistoto C.	46
Slika 25: Kromatogram vzorca paroksetinijevega klorida.	49

Slika 26: Kromatogram nečistote F paroksetinijevega klorida.	49
Slika 27: Kromatogram nečistote C paroksetinijevega klorida.	50
Slika 28: Kromatogram ločbe nečistot C in F ob prisotnosti paroksetinijevega klorida.	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Priprava raztopin za določanje linearnosti.	24
Preglednica II: Priprava raztopin za določanje točnosti.	25
Preglednica III: Validacijski parametri in kriteriji ustreznosti.	35
Preglednica IV: Izračun RSD šestih injiciranj vzorca.	37
Preglednica V: Izračun dodane koncentracije, dobljene koncentracije ter izkoristka pri 100 % specifikacijski koncentraciji nečistote C.	38
Preglednica VI: Izračun RSD šestih injiciranj raztopine vzorca z dodano nečistoto C pri 100 % specifikacijski koncentraciji nečistote C.	39
Preglednica VII: Izračun RSD, dodane koncentracije, dobljene koncentracije, izkoristka ter razmerja signal/šum pri določanju meje zaznavnosti in meje vrednotenja.	40
Preglednica VIII: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za prvo paralelko.	42
Preglednica IX: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za drugo paralelko.	42
Preglednica X: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za tretjo paralelko.	43
Preglednica XI: Izračun standardnega odklona in relativnega standardnega odklona za tri paralelke.	43
Preglednica XII: Izračun naklona umeritvene premice, odseka na osi y in determinacijskega koeficienta r^2 za vse tri paralelke.	44
Preglednica XIII: Izračun dodane koncentracije, dobljene koncentracije ter izkoristka za vrednosti od QL do 170 % specifikacijske meje nečistote C.	47

Preglednica XIV: Izračun povprečnih izkoristkov od QL do 170 % specifikacijske meje nečistote C za posamezno paralelko.....	48
--	----

POVZETEK

Paroksetinijev klorid je zdravilna učinkovina, ki jo uvrščamo v skupino selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina. Uporablja se za zdravljenje depresije, generalizirane anksiozne motnje, obsesivno-kompulzivne motnje, panične motnje in socialno anksiozne motnje. Od vseh trenutno dostopnih antidepresivov je paroksetinijev klorid najmočnejši inhibitor ponovnega privzema serotonina.

Namen magistrskega dela je bila optimizacija in validacija farmakopejske metode za določanje nečistote C paroksetinijevega klorida. Omenjena metoda se je v praksi predhodno že izkazala kot nezadostno selektivna. Uporabili smo analizo tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki je ena izmed najpogostejše uporabljenih tehnik za ločbo in analizo zmesi. Paroksetinijev klorid je kiralna spojina, zato smo uporabili normalno fazno kromatografijo ter kolono s kiralno stacionarno fazo.

V prvem koraku smo preverili ustreznost metode po postopku, ki je naveden v ameriški farmakopeji za določitev nečistote C paroksetinijevega klorida. Ugotovili smo, da se kromatografska vrhova nečistot C in F ob prisotnosti paroksetinijevega klorida v visoki koncentraciji ne ločita. Prav tako smo ugotovili, da retencijski časi nečistot C in F ter vzorca niso ponovljivi. Na začetku smo raziskali različne parametre, ki bi lahko vplivali na ustreznost analitske metode. Preverili smo vpliv spremembe topila, sestave mobilne faze, temperature kolone, dodatka kisline ter dodatka baze topilu. Pri raziskavi smo ugotovili, da dodatek kalijevega hidroksida v topilo pripomore k izboljšani ločbi kromatografskih vrhov ter ponovljivosti retencijskih časov.

Uspešnost optimizirane metode smo nato potrdili z njeno validacijo. Pri tem smo ovrednotili ključne validacijske parametre, kot so meja vrednotenja, meja zaznavnosti, linearnost, točnost, natančnost ter selektivnost.

Ključne besede: paroksetinijev klorid, tekočinska kromatografija, validacija, optimizacija, nečistota C, nečistota F

ABSTRACT

Paroxetine hydrochloride is an active substance, classified as a selective serotonin reuptake inhibitor. It is used to treat depression, generalized anxiety disorder, obsessive-compulsive disorder, panic disorder and social anxiety disorder. Of all currently available antidepressants, paroxetine hydrochloride is the strongest serotonin reuptake inhibitor.

The purpose of the thesis was an optimization and validation of the pharmacopoeial method for determination of impurity C of paroxetine hydrochloride. In practice, this method has previously proved to be insufficiently selective. A high performance liquid chromatography technique was used, which is one of the most commonly used techniques for separating and analyzing the mixtures. Paroxetine hydrochloride is a chiral compound, therefore a column with a chiral stationary phase was used.

In the first step, we checked the adequacy of the method according to the procedure given in the United State Pharmacopoeia for determination of impurity C of paroxetine hydrochloride. We found that the chromatographic peaks of the impurities C and F are not separated in the presence of highly concentrated paroxetine hydrochloride. We also found that the retention times of the impurities C, F and the sample are not repeatable. In the beginning, we investigated various parameters that could influence the adequacy of the analytical method, such as changing the solvent, the composition of the mobile phase, the temperature of the column, the addition of the acid and the addition of the base to the solvent. In our studies, it was found that the addition of potassium hydroxide to the solvent contributes to an improved separation of chromatographic peaks and retention time repeatability.

The effectiveness of the optimized method was then confirmed by performing validation of the method. We have evaluated the key validation parameters, such as determination of detection and quantitation limit, linearity, accuracy, precision and selectivity of the method.

Key words: paroxetine hydrochloride, liquid chromatography, validation, optimization, impurity C, impurity F

SEZNAM OKRAJŠAV

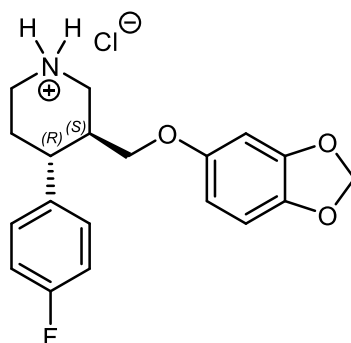
CYP	citokrom P450
DL	meja zaznavnosti (angl. <i>Limit of detection</i>)
DPV	dodatno prečiščena voda
EP	evropska farmakopeja (angl. <i>European pharmacopoeia</i>)
EtOH	etanol
HCl	klorovodikova kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High-performance liquid chromatography</i>)
ICH	Mednarodna konferenca o harmonizaciji (angl. <i>International Council for Harmonisation</i>)
konc.	koncentracija
LIN	linearnost
n.p.	ni podatka
PAROXETINE	paroksetinijev klorid
PDA	detektor s fotodiodnim nizom (angl. <i>Photodiode array detector</i>)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PRX RC C	nečistota C paroksetinijevega klorida
PRX RC F	nečistota F paroksetinijevega klorida
QL	meja vrednotenja (angl. <i>Limit of quantification</i>)
RSD	relativni standardni odklon
S/N	razmerje med signalom in šumom
SD	absolutni standardni odklon
SST	test ustreznosti sistema (angl. <i>System suitability test</i>)
T	faktor simetrije (angl. <i>Tailing factor</i>)

TEA	trietanolamin
TFA	trifluorocetna kislina
USP	ameriška farmakopeja (angl. <i>United States Pharmacopeia</i>)
V/V	volumski delež

1 UVOD

1.1 Paroksetinijev klorid

Paroksetinijev klorid je zdravilna učinkovina, ki jo uvrščamo v skupino selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina (slika 1). Pod zaščitenimi imeni jo poznamo kot Paxil ali Seroxat (1,2). Uporabljamo jo za zdravljenje depresije, generalizirane anksiozne motnje, obsesivno-kompulzivne motnje, panične motnje in socialno anksiozne motnje. Od vseh trenutno dostopnih antidepresivov je paroksetinijev klorid najmočnejši inhibitor ponovnega privzema serotonina (1).



Slika 1: Strukturna formula paroksetinijevega klorida ((3S,4R)-3-((benzo[d][1,3]dioksol-5-iloksi)metil)-4-(4-fluorofenil)piperidin-1-ijev klorid)).

Sinteza paroksetinijevega klorida poteka v več korakih. Najpogostejši postopek priprave paroksetinijevega klorida je preko uporabe *N*-zaščitenega *trans*-4-(4-fluorofenil)-3-hidroksimetilpiperidinskega intermedata (1).

Paroksetinijev klorid obstaja v dveh trdnih oblikah in sicer obliki hemihidrata in izopropil alkoholnega solvata. Oblika hemihidrata je termodinamsko bolj stabilna. Do pretvorbe termodinamsko manj stabilne oblike solvata v hemihidrat lahko pride, kadar je solvat izpostavljen vlažnim razmeram. Znano je tudi, da ima zdravilna učinkovina v obliki solvata večjo topnost kot hemihidrat pri vseh temperaturah, zato je omenjena oblika s stališča topnosti farmacevtsko bolj zaželjena (3).

V Sloveniji je paroksetinijev klorid na voljo v oblikah za peroralno uporabo in sicer v tabletah in kapsulah s takojšnjim sproščanjem (4). V Združenih državah Amerike je bil paroksetinijev klorid leta 2002 prvi uradno odobreni antidepresiv za zdravljenje socialne anksiozne motnje (5).

1.1.1 Lastnosti paroksetinijevega klorida

Paroksetinijev klorid je bel ali skoraj bel kristaliničen prah. Brezvodna oblika je higroskopska. V vodi je rahlo topen, zmerno topen je v metilen kloridu in etanolu ter dobro topen v metanolu (1, 2). Za molekulo paroksetinijevega klorida sta značilna polimorfizem in psevdopolimorfizem. To ima za posledico različna talilna območja različnih trdnih oblik paroksetinijevega klorida.

Paroksetinijev klorid v prahu je zelo stabilen, kar so dokazali s testi pri različnih stresnih pogojih (toplotni, svetlobni, vlažnostni stres). V raztopini je zdravilna učinkovina stabilna v razredčeni kislini in bazičnih raztopinah (1).

1.1.2 Nečistote paroksetinijevega klorida

Poznamo več različnih nečistot paroksetinijevega klorida. V ameriški monografiji (USP) za zdravilno učinkovino so navedene nečistote od A do G. V evropski farmakopeji (EP) 9.0 obstajata dve monografiji. Monografija EP za brezvodni paroksetinijev klorid navaja nečistote A, od C do D ter B in E kot druge specificirane nečistote, medtem ko monografija EP za paroksetinijev klorid hemihidrat kot specificirane nečistote navaja B, C in E ter F kot druge specificirane nečistote. Vse navedene nečistote nastanejo med sintezo spojine (1).

1.1.3 Paroksetinijev klorid kot kiralna spojina

Paroksetinijev klorid je kiralna spojina, zato je potreben nadzor nad njegovo enantiomerno in diastereomerno čistostjo (6). V primeru kiralnih učinkovin je znano, da lahko pride do razlik pri porazdelitvi, presnovi in izločanju določenih enantiomerov ali diastereomerov. Zato moramo spremljati vsebnost drugega enantiomera ali diastereomera. Ta se v najboljšem primeru pojavi kot neaktivna nečistota, lahko pa je odgovoren tudi za pojav neželenih učinkov. Najbolj učinkoviti tehniki za določitev enantiomerne in diastereomerne čistosti zdravil sta tekočinska kromatografija visoke ločljivosti in kapilarna elektroforeza.

Paroksetinijev klorid vsebuje dva kiralna centra in tvori štiri optične izomere, in sicer dve za *cis*- in dve za *trans*-paroksetinijev klorid. V farmacevtskih formulacijah se uporablja (-)-*trans*-paroksetinijev klorid. Največkrat je prisoten tudi (+)-*trans*-paroksetinijev klorid, ki pa je neaktiven enantiomer (7).

1.1.4 Farmakokinetika in metabolizem

Paroksetinijev klorid se dobro absorbira iz gastrointestinalnega trakta ter doseže največje plazemske koncentracije 5 - 8 ur po peroralni uporabi. Zaradi lipofilnoaminskega značaja

je porazdelitev zdravilne učinkovine v telesu obsežna. V sistemske krvnem obtoku ostane le 1 % zdravilne učinkovine. V terapevtskih koncentracijah je vezava paroksetinijevega klorida približno 95 % (1).

Največji del metabolizma preko oksidacije poteka v jetrih. Pri presnovi paroksetinijevega klorida sodelujejo encimi citokromskega sistema P450. Z urinom se izloči samo 2 % spojine. Povprečna razpolovna doba izločanja zdravilne učinkovine je 24 ur. V nespremenjeni obliki se izloči manj kot 5 % spojine. Neaktivni polarni metaboliti se izločajo z urinom in z blatom (1).

CYP2D6 je izoenzim iz družine citokromov P450 (CYP) in je pomemben pri metabolizmu paroksetinijevega klorida (4). Ker je paroksetinijev klorid zaviralec CYP2D6, obstaja velika verjetnost, da pride do farmakokinetične interakcije z drugimi učinkovinami, ki jih prav tako metabolizira omenjen encim. Plazemska koncentracija paroksetinijevega klorida se lahko ob sočasni aplikaciji encimskega inhibitorja (npr. cimetidina) poveča ali pa zmanjša ob sočasni aplikaciji induktorja encima (npr. fenobarbitala) (1).

1.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

1.2.1 Osnove HPLC

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je ena izmed najpogosteje uporabljenih tehnik za ločbo in analizo zmesi (8). Pri kromatografiji sta prisotni dve fazi, in sicer mobilna in stacionarna faza. Mobilna faza omogoča transport analita, medtem ko stacionarna faza predstavlja porozni medij skozi katerega mobilna faza potuje. Analiti so na molekularni ravni razporejeni v mobilni fazi. Zaradi različnih molekularnih lastnosti analitov prihaja do različnih interakcij s stacionarno fazo (9).

Poznamo normalno fazno in reverzno fazno kromatografijo. Pri normalno fazni kromatografiji je stacionarna faza polarna ter mobilna faza nepolarna (heksan, kloroform). Reverzno fazna kromatografija pa vključuje nepolarno stacionarno fazo ter polarno mobilno fazo (voda, metanol, acetonitril). Reverzno fazno kromatografijo uporabljamo pogosteje. Namenjena je ločevanju, identifikaciji ali kvantifikaciji spojin glede na njihovo hidrofobnost. Spojine z večjo hidrofobnostjo se izločijo kasneje, medtem ko se manj hidrofobne spojine izločijo prej. Čeprav se normalno fazna kromatografija ne uporablja pogosto, je v nekaterih primerih zaželjena. Uporabljamo jo pri spojinah, ki so preveč hidrofilne ali hidrofobne za reverzno fazno kromatografijo, za ločevanje izomerov ali kadar

je topilo za injiciranje vzorca nepolarno. Pri normalno fazni kromatografiji se bolj polarne spojine izločijo kasneje, medtem ko se manj polarne izločijo prej (10).

Do ločbe zmesi analitov pride v tako imenovanih kromatografskih kolonah. Kolone so v večini primerov cevi iz nerjavečega jekla, ki vsebujejo 1 - 5 μm velike delce rigidnega poroznega materiala. Gre za delce iz silicijevega dioksida. Pore poroznih delcev so velike 0,2 – 0,5 μm . To omogoča prehod mobilne faze skozi pore (9). Pri daljših kromatografskih kolonah pride do boljše ločbe zaradi večjega števila teoretskih podov, s katerimi opišemo učinkovitost kolone. Število teoretskih podov nam pove, kolikokrat se topljenec porazdeli med mobilno in stacionarno fazo pri potovanju skozi kolono (11). Pogosta je uporaba stacionarnih faz, pri katerih so površine silikatnih delcev prekrte s silanolnimi skupinami. Še bolj pogosto pa uporabljamo reverzno fazno kromatografijo, kjer so silanolne skupine modificirane z različnimi substituenti (npr. C8 ali C18 verige) (12, 13).

1.2.2 Sistem HPLC

Običajno HPLC sistem vsebuje naslednje sestavne dele:

→ **Rezervoar topil** je namenjen shranjevanju topil za neprekinjeno delovanje HPLC sistema. Lahko je opremljen z razplinjevalnim sistemom in filtri, ki ščitijo topila pred vplivi okolja.

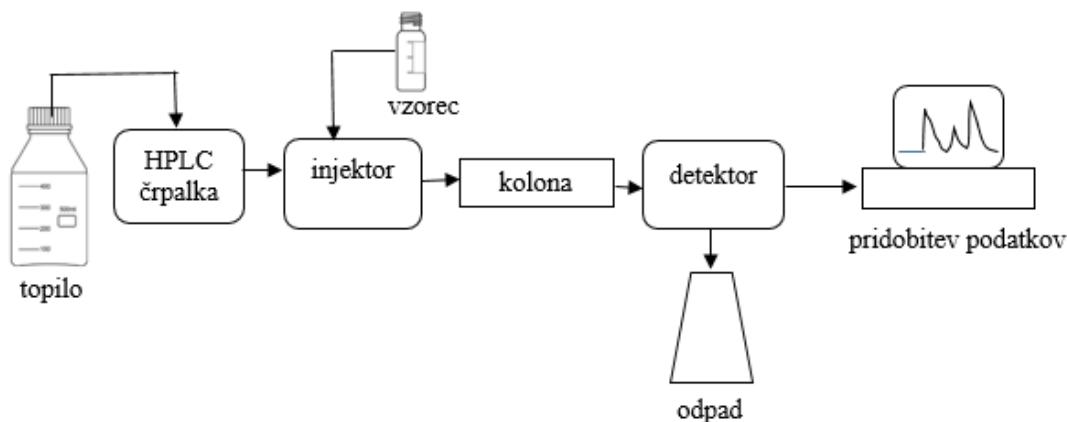
→ **Črpalka** omogoča enakomeren in neprekinjen pretok mobilne faze skozi sistem. Večina črpalk omogoča nadzorovano mešanje različnih topil iz različnih rezervoarjev.

→ **Injektor** omogoča vstop mešanice analitov v tok mobilne faze, preden vstopi v kolono. Injektorji so avtomatizirani in omogočajo injiciranja različnih volumnov vzorcev iz vial.

→ **Kolona** omogoča ločbo analitov v zmesi. V koloni pride do stika med mobilno in stacionarno fazo ter nastanka interakcij med komponentami vzorca in stacionarno fazo.

→ **Detektor** je naprava za neprekinjeno zaznavanje različnih fizikalnih ali kemijskih lastnosti iztokov iz kolone. Najpogosteje uporabljamo UV detektor, ki omogoča spremljanje in zaznavanje UV absorbance pri izbrani ali po celotni valovni dolžini. Prisotnost analita v pretočni celici povzroči spremembo v absorbanci. Kadar analit absorbira boljše od mobilne faze pridobimo pozitiven signal.

→ **Sistem za pridobivanje in nadzor podatkov** je računalniško podprt sistem za nadzor nad vsemi parametri HPLC inštrumenta (9).



Slika 2: Shematski prikaz HPLC sistema, povzeto iz reference 14.

1.2.3 Osnovni kromatografski parametri

Poznamo več različnih parametrov za vrednotenje kromatografske kolone, sistema in ločbe analitov.

→ **Retencijski faktor (k)** je merilo za zadrževanje določene spojine na določenem kromatografskem sistemu pri določenih pogojih. Neodvisen je od dimenzije kolone in pretoka mobilne faze, medtem ko imajo vsi ostali pogoji (npr. tlak, temperatura) nanj znaten vpliv (9, 15).

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (9)$$

V_0 - mrtvi volumen t_R - retencijski čas
 V_R - retencijski volumen t_0 - mrtvi čas

→ **Učinkovitost (N)** izražamo s številom teoretskih podov N, ki nam pove kolikokrat se topljenec porazdeli med stacionarno in mobilno fazo pri potovanju skozi kolono.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (9)$$

w - širina kromatografskega vrha

→ **Selektivnost (α)** je zmožnost kromatografskega sistema, da razlikuje med dvema različnima analitoma. Določimo jo kot razmerje med dvema retencijskima faktorjema.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (16)$$

→ **Ločljivost (R)** je zmožnost kolone, da loči dva analita v dva ločena pika.

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1} \quad (17)$$

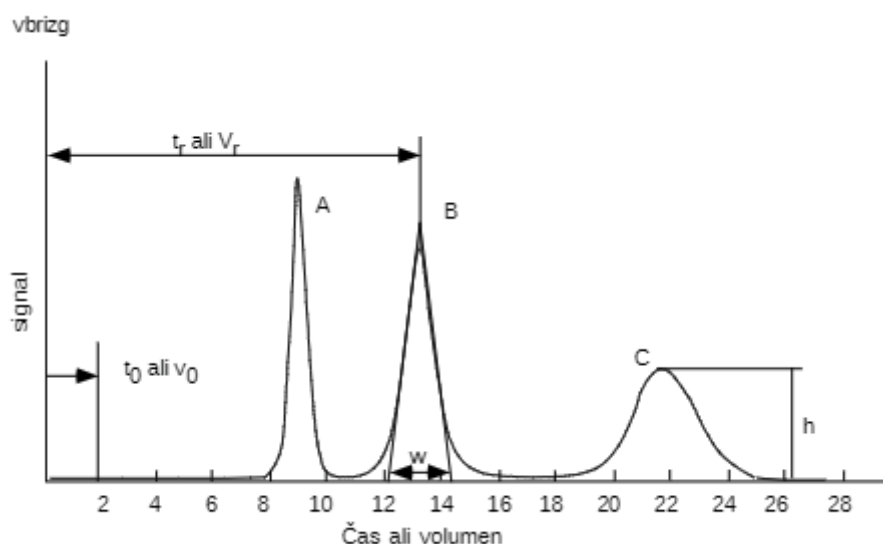
→ **Retencijski čas spojine (t_R)** je čas, ki je potreben za prepotovanje spojine skozi kolono od injektorja do detektorja.

$$t_R = (k * t_0) + t_0 \quad (17) \quad k - \text{retencijski faktor}$$

→ **Mrtvi čas (t_0)** je čas potovanja mobilne faze od injektorja do detektorja.

$$t_0 = \frac{V_0}{F} \quad (18) \quad F - \text{pretok}$$

→ **Višina kromatografskega vrha (h)**: Višino določimo z meritvijo razdalje od bazne linije do vrha signala.



Slika 3: Shematski prikaz osnovnih kromatografskih parametrov (19).

→ **Širina kromatografskega vrha (w)**: Širino merimo na dvajsetini višine vrha od bazne linije navzgor.

→ **Faktor simetrije (T)** (*ang.* tailing) je merilo za simetričnost vrha. Faktor simetrije za popolnoma simetričen vrh ima vrednost 1.

$$T = \frac{W_{0,05}}{2 * f} \quad (16) \quad \begin{array}{l} W_{0,05} - \text{širina kromatografskega vrha na 5 \% višine} \\ f - \text{čas od vrha kromatografskega vrha do 5 \% višine} \end{array}$$

→ **Površina kromatografskega vrha (A)** je sorazmerna s koncentracijo in omogoča kvantifikacijo posamezne komponente v vzorcu (9,20).

1.2.4 Ločba in določanje nivojev nečistot s tehniko HPLC

Poznane nečistote določimo kvalitativno ali kvantitativno s pomočjo referenčnega standarda nečistote. Nepoznane nečistote pa kvantitativno opredelimo tako, da primerjamo pridobljeno površino signala nečistote z referenčnim standardom glavne komponente. Referenčni standardi so dragi, zato jih, kjer je to mogoče, nadomestimo z delovnimi standardi. Na ta način pridobimo nadzor nad ločljivostjo pri preverjanju ustreznosti sistema. Preden določimo koncentracijo nečistote, moramo določiti umeritveno krivuljo, ki jo pridobimo z delovnim standardom. Nato nivo nečistote določimo s preračunom koncentracije nečistote glede na umeritveno premico (13, 21).

1.2.5 Kiralna kromatografija

Kiralnost se pojavi kot posledica prisotnosti kiralnega oziroma stereogenega centra v molekuli, ki ima štiri različne substituentne (22). Za kiralnost je značilna tridimenzionalna struktura molekul. Kiralne spojine so optično aktivne. To pomeni, da pod vplivom polarizirane svetlobe sučejo svetlobo levo ali desno, odvisno od njihove konfiguracije. Enantiomeri iste spojine imajo enake fizikalne in kemijske lastnosti.

Za zaznavanje kiralnih spojin uporabljamo specifične HPLC detektorje. Pri kiralni kromatografiji lahko poleg običajnih detektorjev uporabljamo tudi dve vrsti kiralnih detektorjev, in sicer polarimetre ter spektrometre za merjenje krožnega dikroizma (23).

Kiralno ločbo enantiomerov, vključno z zdravilnimi učinkovinami, lahko s pomočjo HPLC dosežemo s tremi osnovnimi pristopi:

- 1) Včasih je bila pogosta uporaba enantiomerno čistih kiralnih derivatizacijskih sredstev, ki pretvorijo enantiomere v diastereomere. V nadaljevanju je njihova ločba mogoča z

akiralno HPLC. Danes je zaradi možnega pojava racemizacije in zaradi časovno zamudnega procesa derivatizacije to manj zaželen pristop (24).

- 2) Eden od pristopov uporablja kiralno mobilno fazo z dodatki, včasih ob prisotnosti tretje komponente (kovinski ion). Pri tem pride do tvorbe prehodnega diastereomernega kompleksa. Nezaželeno pri omenjenem pristopu so stroškovno dragi dodatki, slaba ločba signalov ter nizka učinkovitost kolone (25, 26).
- 3) Najpogosteje uporabljen pristop pri farmacevtskih analizah vključuje kemično vezano kiralno stacionarno fazo. Pri interakciji enantiomerov analita ter kiralno stacionarno fazo pride do prehodne tvorbe diastereomerov ali kompleksacije. Intermolekularne interakcije med kiralno stacionarno fazo in analitom vključujejo vodikove interakcije, ionske interakcije, π - π interakcije, sterične interakcije, ipd. Za dosego kiralne ločbe je potrebna tritočkovna interakcija. Pri tem mora biti vsaj ena od treh točk stereospecifična (27).

Kiralna ločba je lahko reverzno fazna ali normalno fazna (22, 28). Pri reverzno fazni ločbi uporabljamo vodno mobilno fazo z organskim modifikatorjem. Normalno fazna ločba vključuje nepolarna organska topila (npr. heksan, heptan) ter polaren organski modifikator (27).

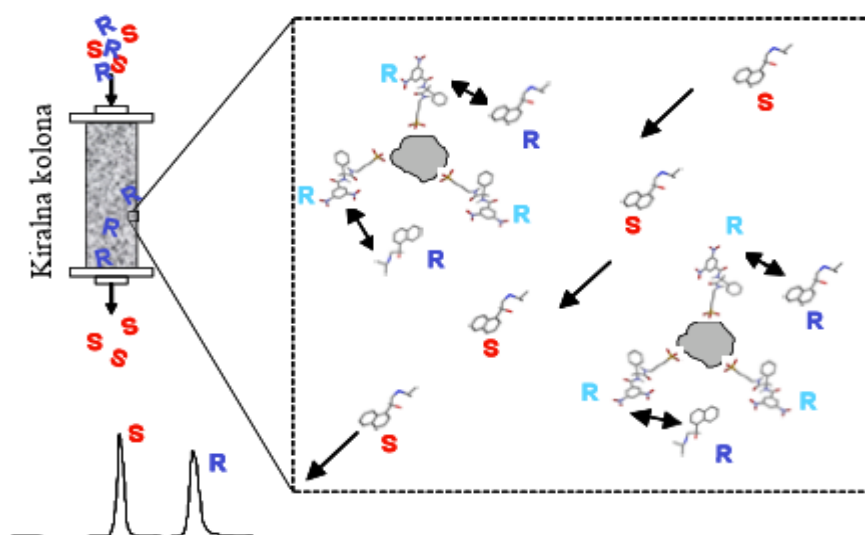
Običajno je za uspešno kiralno ločbo potrebnih veliko število dragih in časovno potratnih laboratorijskih poskusov. Temu se lahko izognemo z uporabo kiralne baze podatkov, v kateri so že zbrani podatki o strukturah molekul. ChirBase je baza podatkov, ki sta jo leta 1989 ustanovila Roussel in Piras. Njen namen je celovito združevanje vseh strukturnih, eksperimentalnih in literaturnih informacij, ki so bile pridobljene na kiralnih stacionarnih fazah (29).

1.2.6 Kiralna stacionarna faza

Prvi patent za kiralno stacionarno fazo je bil podeljen leta 1968. Danes je dostopnih nekaj sto patentov (27, 30).

Danes se največ uporabljajo kiralne stacionarne faze, ki temeljijo na polisaharidih ali makrocikličnih glikopeptidih (27). Med različnimi polisaharidi, ki so na voljo se največ uporabljata amiloza in derivati celuloze (31). Komercialno dostopne stacionarne faze, ki temeljijo na polisaharidih so Chiracel OD in OD-H, Chiralpak AD in AD-H, Chiracel OJ in

OJ-H in Chiralpak AS, AS-H. Proizvedene so s strani Daicel kemične industrije na Japonskem (27). Sintetične optično aktivne polimere, ki se uporabljajo v kiralni kromatografiji, lahko razdelimo v tri skupine: preprosti polimeri, kondenzacijski polimeri in premreženi polimeri. Velik poudarek je na polimetakrilatih s spiralno konformacijo (32).



Slika 4: Ločitev enantiomerov z uporabo kiralne stacionarne faze, povzeto iz reference 33.

1.3 Validacija

Validacijo analitskih metod v farmacevtski industriji uporabljamo za dokazovanje ustreznosti metode. Z validacijo in vsemi analiziranimi parametri potrdimo, ustreznost vseh nadaljnjih rezultatov, s katerimi potem določimo kakovost izdelkov, ki jih bolnik zaužije. Najpomembnejši koncept pri dobri proizvodni praksi je kakovost. Ta mora biti vgrajena v celoten proces proizvodnje izdelka.

Leta 1990 so Evropska unija, Združene države Amerike ter Japonska poenotile zahteve za nove farmacevtske izdelke. Tako se je začel forum za konstruktivni dialog med regulativnimi organi in industrijo, imenovan Mednarodna konferenca o harmonizaciji (ICH). Ena prvih tem poenotenja v sklopu kakovosti je bila ravno validacija analitskih metod. ICH je bila v veliko pomoč pri poenotenju izrazov in opredelitvi ter določitvi osnovnih zahtev.

Validacija analitskih metod je usmerjena v štiri najpogostejše tipe metod, in sicer identifikacijske teste, kvantitativne teste za določitev vsebnosti nečistot, limitne teste za

nadzor nad nečistotami ter kvantitativne teste za določitev vsebnosti zdravilne učinkovine v vzorcih.

Validacija specifičnega postopka mora biti dokazana preko mnogih analiz v laboratoriju. Priprava in izvedba analize morata slediti validacijskemu protokolu (34).

Za uspešno validacijo so pomembni naslednji koraki:

- priprava validacijskega protokola,
- opredelitev obsega študije,
- opredelitev parametrov delovanja in meril sprejemljivosti,
- opredelitev validacijskih poskusov,
- ustreznost opreme,
- predhodni razvoj standardnih postopkov za izvajanje metode,
- opredelitev vrste in pogostnost preskusov ustreznosti sistema,
- ustrezno dokumentiranje validacijskih analiz in rezultatov v validacijskem poročilu (34).

Poznamo tri najbolj pogosto uporabljene tipe analitskih postopkov:

a) Identifikacijski testi so namenjeni zagotavljanju identitete analita v vzorcu. To običajno dosežemo s primerjavo lastnosti vzorca in referenčnega standarda.

b) Kvantitativni in limitni testi za vrednotenje vsebnosti nečistot so namenjeni dokazovanju čistosti vzorca.

c) Kvantitativni testi za vrednotenje aktivnega dela v vzorcih zdravilne učinkovine (35).

1.3.1 Dokumentacija

1.3.1.1 Validacijski protokol

Pred začetkom eksperimentalnega dela je potrebno pripraviti ali pridobiti validacijski protokol. Napiše ga kvalificirana oseba in odobri oddelek za zagotavljanje kakovosti.

V validacijskem protokolu mora biti navedeno:

- analitska metoda za posamezen izdelek, zdravilno učinkovino ali drugo substanco,
- testni parametri za vsako analizo (tip in število raztopin, število analiz),
- kriteriji sprejemljivosti za vsak parameter,
- kakovost pomožnih snovi,
- informacije o inštrumentih in aparaturah, tipi materialov.

1.3.1.2 Validacijsko poročilo

Validacijska poročila so običajno zelo eksplicitna in vsebujejo ključne podatke glede same študije, kot npr. natančno pripravo vzorcev in standardov. Prav tako so navedeni tudi referenčni materiali s certifikati ter kalibrirani inštrumenti, ki se nato uporabljajo pri študiji. Za zdravilno učinkovino je potrebno navesti tudi serijo. Testni parametri in kriteriji sprejemljivosti ter zaključki morajo biti navedeni skupaj z rezultati. Poročilo mora vsebovati tudi potrditev ustreznosti analitske metode ter morebitne spremembe, ki bi jih bilo še potrebno vključiti v sam analitski postopek.

1.3.1.3 Revalidacija

Revalidacija metode je potrebna, kadar pride do spremembe analitske metode in novi parametri ležijo izven območja delovanja metode. Prav tako je revalidacija potrebna, če se spremeni področje uporabe (npr. delovni pogoji, sestava vzorca, spremenjen proces za pripravo vzorca), se uporabijo nove kemikalije ali referenčni standardi ali kadar se uporabi instrumente z novimi značilnostmi. Revalidacija je lahko delna ali popolna. Vsaka sprememba mora biti definirana in dokumentirana (34).

1.3.2 Parametri validacije

1.3.2.1 Točnost

Točnost analitske metode pomeni ujemanje meritve s pravo vrednostjo. Pri zdravilnih učinkovinah jo določamo z uporabo referenčnih standardov. Pri izdelku jo določamo tako, da placebo dodamo znano količino substance, ki jo analizirano. Pri sorodnih snoveh pa točnost določamo tako, da vzorcu dodamo znane količine nečistot. Pri tem rezultate primerjamo na identifikacijski / referenčni standard nečistot. Točnost mora biti zagotovljena čez celo koncentracijsko območje analitske metode (35).

1.3.2.2 Natančnost

Natančnost analitske metode izraža stopnjo ujemanja posameznih rezultatov (stopnjo razpršenosti) med paralelkami, pod predpisanimi pogoji. Za določitev natančnosti moramo uporabiti homogen vzorec. Kadar to ni možno, pripravimo sestavljen vzorec ali vzorec z dodatkom preiskovanega analita.

Natančnost lahko obravnavamo na treh nivojih:

a) Natančnost znotraj enega dneva predstavlja natančnost pod enakimi operacijskimi pogoji v kratkem časovnem intervalu. Preverjamo jo s 6-kratnim injiciranjem istega vzorca pri 100

% preiskovani koncentraciji. Pridobljene rezultate vrednotimo s pomočjo standardne deviacije ter relativne standardne deviacije površin dobljenih kromatografskih vrhov (34, 35).

b) Vmesna natančnost pomeni variacije znotraj istega laboratorija (različni dnevi, različno osebje, različna oprema).

c) Obnovljivost predstavlja natančnost med laboratoriji (kolaborativne študije za standardizacijo metodologije) (35).

1.3.2.3 Rigidnost

Rigidnost analitske metode pomeni stopnjo obnovljivosti rezultatov, ki jih dobimo z analizo istih vzorcev pri različnih pogojih (npr. različni laboratoriji, izvajalci analize, instrumenti, različni dnevi). Izraža se kot neobčutljivost metode na spremembe okolja ali instrumentalnih pogojev (34).

1.3.2.4 Robustnost

Robustnost je lastnost, ki kaže neobčutljivost na spremembe znanih kromatografskih parametrov (37). Bolj kot je metoda robustna, manj vplivajo spremembe na rezultat (35). S testi robustnosti preučujemo vpliv različnih parametrov na rezultate analiz:

- notranji parametri: temperatura, pH, delež organskega topila,
- zunanji parametri: različni analitiki, instrumenti, laboratoriji,
- osnovni parametri: stabilnost testne / referenčne raztopine, topila, mobilne faze (34).

1.3.2.5 Selektivnost / Specifičnost

Selektivnost je parameter, s katerim ocenimo istovetnost analita v prisotnosti komponent (nečistote, razgradni produkti), za katere se pričakuje, da bodo prisotne (35). Selektivnost se izvede med validacijo identifikacijskih testov, določanju nečistot ter vsebnosti. Vsebnost se določa v primerjavi z zunanjimi referenčnimi standardi. S takšnimi identifikacijskimi testi potrdimo prisotnost zdravilne učinkovine. Selektivnost je potrjena, kadar je vrh zdravilne učinkovine čist in ni interakcije s placebom oz. drugimi komponentami v retencijskem času signala zdravilne učinkovine (34).

1.3.2.6 Linearnost

O linearnosti analitskega postopka govorimo, kadar pridobimo rezultate (odzive), ki so proporcionalni koncentraciji analita v vzorcu (34). Običajno določamo linearnost z

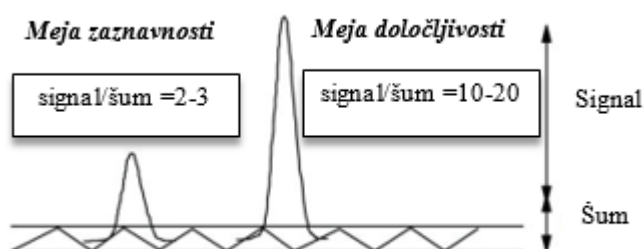
redčenjem osnovne standardne raztopine (36). Uporabljajo se sami analiti ali vzorci z dodanimi nečistotami v vsaj petih koncentracijah v celotnem območju analitske metode. Najpogosteje se linearnost vrednoti grafično, in sicer kot alternativa matematičnemu vrednotenju (26). Linearnost najlažje ocenimo vizualno, in sicer s pregledom površine signala kot funkcije koncentracije analita (35). Odstopanja od linearnosti včasih težko zaznamo. Za linearen razpon je značilno, da so odstopanja enakomerno razdeljena med pozitivnimi in negativnimi vrednostmi. Pri višjih koncentracijah analita pogosto opazimo negativno odstopanje od linearnosti (34).

1.3.2.7 Območje

Območje analitske metode je interval med zgornjimi in spodnjimi vrednostmi, katere določimo z natančnostjo, točnostjo in linearnostjo. Pogosto je izražen v istih enotah kot rezultati. Pri določanju vsebnosti je zahtevano območje med 80 in 120 procenti testne koncentracije, medtem ko se pri določanju nečistot območje razširi (34).

1.3.2.8 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti (DL) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko zaznamo, vendar je ne moremo kvantitativno ovrednotiti. Pri kromatografiji meja zaznavnosti pomeni injicirano količino vzorca, ki se kaže kot višina signala, ki je dvakrat do trikrat višja od bazne linije (34).



Slika 5: Meja vrednotenja in meja vrednotenja z upoštevanjem razmerja signal/šum, povzeto iz reference 34.

1.3.2.9 Meja vrednotenja

Meja vrednotenja (QL) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki ga še lahko kvantitativno določimo z zadovoljivo stopnjo točnosti in natančnosti. Kaže se kot višina signala, ki je desetkrat do dvajsetkrat višja od bazne linije (34, 35).

1.4 Farmakopeja

Farmakopeja je pravno zavezujoč dokument, ki vsebuje predpise za razvoj, izdelavo in preskušanje kakovosti zdravil in njihovih sestavin ter druge podatke o zdravilih in njihovi uporabi. Vloga sodobne farmakopeje je predložiti specifikacije kakovosti za izdelke, zdravilne učinkovine, pomožne snovi in splošne zahteve. Obstoje takšnih specifikacij in zahtev je potreben za pravilno delovanje in nadzor nad farmacevtskimi oblikami. Pomembnejše svetovne farmakopeje so evropska, ameriška, britanska in japonska (38, 39).

1.4.1 Monografija

Farmakopeja je sestavljena iz monografij. V farmakopeji najdemo monografije, ki se navezujejo na zdravilne učinkovine, pomožne snovi, monografije za posamezne farmacevtske oblike, monografije prehranskih dopolnil. Vsaka monografija vključuje naslednje informacije o naslovu, relativni atomski masi, molekulski masi, CAS številki (Chemical abstracts service), definiciji, izdelavi, lastnostih, identifikaciji, preskušanju, shranjevanju, označevanju, opozorilih, nečistotah, referenčnih standardih (40).

2 NAMEN DELA

Magistrsko nalogo bomo izvedli v sodelovanju s farmacevtskim podjetjem Lek d.d. V okviru magistrske naloge bomo preverili farmakopejsko USP metodo za določevanje nečistote C paroksetinijevega klorida. Analitska tehnika, ki jo bomo uporabili bo tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Omenjena analitska metoda se je v praksi že izkazala kot nezadostno selektivna. Glede na to, da se je analitska metoda že izkazala kot neustrezna je naš cilj njena optimizacija. Največji poudarek pri optimizaciji analitske metode bo izboljšanje ločbe in ponovljivosti retencijskih časov. Ustreznost optimizirane metode bomo nato potrdili z njeno validacijo, pri čemer bomo ovrednotili ključne validacijske parametre.

3 MATERIALI IN METODE

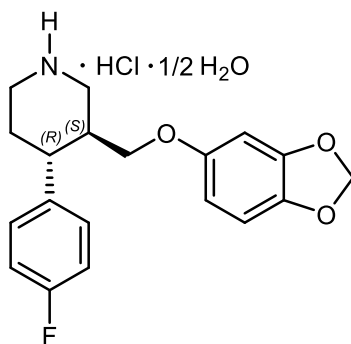
3.1 Materiali

3.1.1 Uporabljeni reagenti

- absolutni etanol (Merck, Nemčija),
- trifluoroocetna kislina (Merck, Nemčija),
- *n*-heksan (Merck, Nemčija),
- 37 % klorovodikova kislina (Merck, Nemčija),
- kalijev hidroksid (Merck, Nemčija),
- trietilamin (Merck, Nemčija),
- dodatno prečiščena voda (proizvedena v podjetju Lek d.d., Ljubljana).

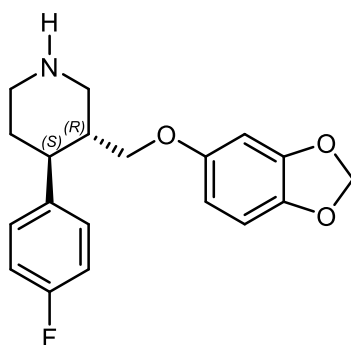
3.1.2 Uporabljeni standardi in nečistote

- Paroksetinijev klorid hemihidrat (delovni standard):
 - $C_{19}H_{20}FNO_3 \times HCl \times \frac{1}{2} H_2O$
 - Molekulska masa = 374,83 g/mol
 - Vsebnost: 97,5 %
 - Dobavitelj: U. S. Pharmacopoeial Convention (ZDA)



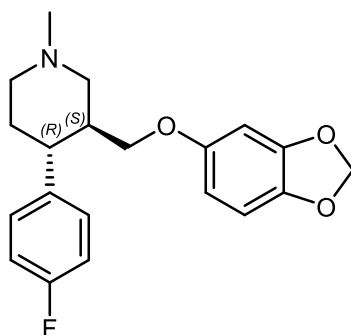
Slika 6: Strukturna formula paroksetinijevega klorida hemihidrata (41).

- Nečistota C paroksetinijevega klorida:
 - $C_{19}H_{20}FNO_3 \times HCl$
 - Molekulska masa = 365,83 g/mol
 - Vsebnost: 97 %
 - Dobavitelj: U. S. Pharmacopoeial Convention (ZDA)



Slika 7: Strukturna formula nečistote C paroksetinijevega klorida (42).

- Nečistota F paroksetinijevega klorida:
- $C_{20}H_{22}FNO_3$
- Molekulska masa = 343,39 g/mol
- Vsebnost: 100 %
- Dobavitelj: U. S. Pharmacopoeial Convention (ZDA)



Slika 8: Strukturna formula nečistote F paroksetinijevega klorida (43).

3.1.3 Uporabljen vzorec

- paroksetinijev klorid hemihidrat

3.1.4 Oprema in inštrumenti

- HPLC instrument Waters 2695,
- PDA detektor Waters 2996,
- programska oprema: Empower,
- elektronske pipete: HandyStep (BRAND), pipeta BIOHIT (e5000),
- aparatura za dodatno prečiščeno vodo: ELGA Chorus,

- ultrazvočna kopel: Branson,
- laboratorijska steklovina,
- HPLC vial,
- kolone:
 - Chiralpak AD-H, 5 μm , 250 mm $\times$ 4,6 mm; SN: ADHOCE-RL121
 - Chiralpak AD-H, 5 μm , 250 mm $\times$ 4,6 mm; SN: ADHOCE-SG107
- filtri: Millipore Millex-GV – Hydrophilic PVDF 0,22 μm .

3.2 Metode

3.2.1 Farmakopejski kromatografski pogoji

- mobilna faza: *n*-heksan : EtOH : TFA : DPV = 900 : 100 : 2 : 2 (V/V/V/V)
- topilo: *n*-heksan : EtOH = 1 : 1 (V/V)
- temperatura kolone: 30 °C
- temperatura vzorca: 22 °C
- pretok: 1,0 mL/min
- valovna dolžina: 295 nm
- volumen injiciranja: 5 μL

3.2.2 Optimizacija farmakopejske metode

3.2.2.1 Priprava topila in mobilne faze

- Topilo: *n*-heksan : EtOH = 1 : 1 (V/V)
 - V 1000 mL reagenčno steklenico smo z merilnim valjem dodali 500 mL *n*-heksana in 500 mL absolutnega etanola. Na magnetnem mešalu smo raztopino nekaj časa mešali ter nato še za nekaj časa postavili na ultrazvočno kopel.
- Mobilna faza: *n*-heksan : etanol (EtOH) : trifluorocetna kislina (TFA) : dodatno prečiščena voda (DPV) = 900 : 100 : 2 : 2 (V/V/V/V)
 - V 1000 mL reagenčno steklenico smo z merilnim valjem dodali 900 mL *n*-heksana, 100 mL absolutnega etanola, 2 mL trifluorocetne kisline in 2 mL dodatno prečiščene vode.

3.2.2.2 Priprava osnovnih raztopin

- Raztopina za določitev ustreznosti kromatografskega sistema

V 20 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 2 mg delovnega standarda paroksetinijevega klorida in 2 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Dodatna raztopina za določitev ustreznosti kromatografskega sistema

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg delovnega standarda paroksetinijevega klorida in 1 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Standardna raztopina nečistote C (2 %)

V 20 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 2 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Raztopina nečistote F (2 %)

V 20 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 2 mg nečistote F paroksetinijevega klorida. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Raztopina nečistote C (20 %)

V 5 mL merilno bučko smo zatehtali 5 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Raztopina nečistote F (20 %)

V 5 mL merilno bučko smo zatehtali 5 mg nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

Vse pripravljene raztopine smo hranili v hladilniku.

3.2.2.3 Priprava raztopine vzorca

- Raztopina vzorca (paroksetinijev klorid)

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

3.2.2.4 Priprava vzorcev z dodatkom nečistot C in F

- Priprava 2 % raztopine nečistote C z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila in 1,0 mL 20 % raztopine nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 2 % raztopine nečistote F z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila in 1,0 mL 20 % raztopine nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 2 % raztopine nečistot C in F z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila, 1,0 mL 20 % raztopine nečistote C in 1,0 mL 20 % raztopine nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 0,2 % raztopine nečistote C z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila in 1,0 mL 2 % raztopine nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 0,2 % raztopine nečistote F z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila in 1,0 mL 2 % raztopine nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 0,2 % raztopine nečistot C in F z vzorcem

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dodali smo približno 4 mL topila, 1,0 mL 2 % raztopine nečistote C in 1,0 mL 2 % raztopine nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

- Priprava 1% raztopine nečistote C in nečistote F

V HPLC vialo smo odpipetirali 0,6 mL 2 % raztopine nečistote C in 0,6 mL 2 % raztopine nečistote C.

Vse raztopine smo hranili v hladilniku.

3.2.2.5 Preverjanje ustreznosti farmakopejske metode

Vpliv spremembe deleža *n*-heksana in topila

- V vialo smo dodali 0,3 mL 0,2 % raztopine vzorca z nečistotama C in F ter 0,9 mL *n*-heksana.
- V vialo smo dodali 0,6 mL 0,2 % raztopine vzorca z nečistotama C in F ter 0,6 mL *n*-heksana.
- V vialo smo dodali 0,3 mL 0,2 % raztopine vzorca z nečistotama C in F ter 0,9 mL topila.

Vpliv spremembe mobilne faze

Spremenili smo delež etanola in trifluoroocetne kisline v mobilni fazi.

- Sprememba EtOH → *n*-heksan : EtOH : TFA : DPV = 900 : 70 : 2 : 2 (V/V/V/V)
- Sprememba TFA → *n*-heksan : EtOH : TFA : DPV = 900 : 100 : 1,4 : 2 (V/V/V/V).
- Sprememba EtOH in TFA → *n*-heksan : EtOH : TFA : DPV = 900 : 70 : 1,4 : 2 (V/V/V/V).

Vpliv spremembe temperature kolone

Sprememba temperature kolone: 30 °C → 40 °C

Vpliv spremembe temperature kolone smo preverili pri 0,2 % in 2 % raztopinah nečistot C in F ter 0,2 % in 2 % raztopinah nečistot C in F z vzorcem (priprava raztopin na strani 19 in 20).

Vpliv dodatka klorovodikove kisline na ponovljivost retencijskih časov

Pripravili smo različne koncentracije topil:

Osnovna raztopina klorovodikove kisline v etanolu → 2 mL 37 % HCl in 98,3 mL EtOH

- 1) 10 µL/ L HCl: 5 mL *n*-heksana + 4,995 mL EtOH + 0,005 mL osnovne raztopine HCl
- 2) 100 µL/ L HCl: 5 mL *n*-heksana + 4,95 mL EtOH + 0,05 mL osnovne raztopine HCl
- 3) 1 mL/ L HCl: 5 mL *n*-heksana + 4,5 mL EtOH + 0,5 mL osnovne raztopine HCl
- 4) 10 mL/ L HCl: 5 mL *n*-heksana + 5 mL osnovne raztopine HCl.

Priprava raztopin vzorca z različnimi topili:

- V 5 mL bučko smo prenesli 25 mg vzorca. Dodali smo 0,5 mL 2 % raztopine nečistote C in 0,5 mL 2 % raztopine nečistote F ter dopolnili s topilom, ki je predpisan po farmakopeji do oznake.
- V 5 mL bučko smo prenesli 25 mg vzorca. Dodali smo 0,5 mL 2 % raztopine nečistote C in 0,5 mL 2 % raztopine nečistote F ter dopolnili s topilom 4 ($c = 10 \text{ mL/L HCl}$) do oznake.

Priprava raztopin brez vzorca z različnimi topili:

- 100 μL 2 % raztopine nečistote C + 100 μL 2% raztopine nečistote F + 800 μL topila, ki je predpisan v farmakopeji.
- 100 μL 2 % raztopine nečistote C + 100 μL 2 % raztopine nečistote F + 800 μL topila 1.
- 100 μL 2 % raztopine nečistote C + 100 μL 2 % raztopine nečistote F + 800 μL topila 2.
- 100 μL 2 % raztopine nečistote C + 100 μL 2 % raztopine nečistote F + 800 μL topila 3.
- 100 μL 2 % raztopine nečistote C + 100 μL 2 % raztopine nečistote F + 800 μL topila 4.

Pripravljene raztopine smo posneli dvakrat, saj smo hkrati želeli preveriti še vpliv mobilne faze:

- Nespremenjena mobilna faza - mobilna faza predpisana v farmakopeji.
- Sprememba mobilne faze: zmanjšali smo delež EtOH za 30 % $\rightarrow n\text{-heksan} : \text{EtOH} : \text{TFA} : \text{DPV} = 450 : 35 : 1 : 1 \text{ (V/V/V/V)}$.

Vpliv dodatka kalijevega hidroksida v topilo na ponovljivost retencijskih časov

Pripravili smo raztopino kalijevega hidroksida v etanolu ($c = 4 \text{ mg/mL}$).

- Topilo: etanolni kalijev hidroksid : $n\text{-heksan} = 1 : 1 \text{ (V/V)}$

Raztopina vzorca:

- V 5 mL bučko smo prenesli 25 mg vzorca. Dodali smo 0,5 mL 2 % raztopine nečistote C in 0,5 mL 2 % raztopine nečistote F, dopolnili s pripravljenim topilom do oznake ter raztapljali v ultrazvočni kopeli. Vzorec se ni raztopil, zato smo raztopino filtrirali.

Vpliv trifluoroocetne kisline in trietilamina

Pripravili smo dve različni mobilni fazi:

- Mobilna faza brez trifluoroocetne kisline → *n*-heksan : EtOH : DPV = 450 : 50 : 1 (V/V/V).
- Mobilna faza z trietilaminom namesto trifluoroocetne kisline → *n*-heksan : EtOH : TEA : DPV = 450 : 50 : 1 : 1 (V/V/V/V).

Injicirali smo raztopino vzorca, ki je bil pripravljen s topilom, ki je vsebovalo etanolni kalijev hidroksid.

3.2.3 Validacija optimizirane metode

- Topilo: etanolni kalijev hidroksid : *n*-heksan = 1 : 1 (V/V)

Priprava raztopine etanolnega kalijevega hidroksida: 2 g kalijevega hidroksida smo raztopili v 1000 mL absolutnega etanola.

- Raztopina za določitev ustreznosti kromatografskega sistema

V 20 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 2 mg delovnega standarda paroksetinijevega klorida in 2 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

- Dodatna raztopina za določitev ustreznosti kromatografskega sistema

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg delovnega standarda paroksetinijevega klorida in 1 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

- Standardna raztopina nečistote C (2 %)

V 20 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 2 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

Vse pripravljene raztopine smo hranili v hladilniku in jih uporabili za nadaljne analize.

3.2.3.1 Natančnost znotraj enega dneva

Pripravili smo šest paralelk vzorca.

- Raztopina vzorca

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg vzorca. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

3.2.3.2 Meja vrednotenja in meja zaznavnosti

- DL/QL 4: V 100 mL bučko smo odipetirali 2,5 mL standardne raztopine nečistote C (2 %) in dopolnili s topilom do oznake.
- DL/QL 1: V 10 mL bučko smo odipetirali 2,0 mL raztopine DL/QL 4 in dopolnili s topilom do oznake.
- DL/QL 2: V 10 mL bučko smo odipetirali 4,0 mL raztopine DL/QL 4 in dopolnili s topilom do oznake.
- DL/QL 3: V 10 mL bučko smo odipetirali 8,0 mL raztopine DL/QL 4 in dopolnili s topilom do oznake.

3.2.3.3 Linearnost

Pripravili smo tri paralelke osnovne raztopine (OSR Lin 1).

Osnovna raztopina (OSR Lin 1):

- V 10 ml bučko smo zatehtali 2 mg nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

Preglednica I: Priprava raztopin za določanje linearnosti.

Raztopina	Volumen bučke [mL]	Volumen raztopine [mL]		Koncentracija nečistote C [%]	Koncentracija nečistote C [µg/mL]
Lin 1	10	4 mL	Lin 4	0,04	2,0
Lin 2	5	3 mL	Lin 4	0,06	3,0
Lin 3	5	4 mL	Lin 4	0,08	4,0
Lin 4	50	2,5 mL	Lin 7	0,10	5,0
Lin 5	10	0,6 mL	Lin 7	0,12	6,0
Lin 6	10	0,42 mL	OSR Lin 1	0,17	8,4
Lin 7	10	5 mL	OSR Lin 1	2,0	100
Lin 8	5	3 mL	OSR Lin 1	2,4	120

3.2.3.4 Točnost

Pripravili smo tri paralelke raztopin za določanje točnosti (preglednica II).

➤ Priprava raztopine vzorca

Zatehtali smo 25 mg vzorca v 5 ml bučko. Dopolnili smo do oznake z raztopino iz linearnosti (preglednica I) in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

Priprava raztopin za točnost:

Preglednica II: Priprava raztopin za določanje točnosti.

Raztopina	Dopolni do znake z raztopino:	Koncentracija nečistote C [%]	Koncentracija nečistote C [µg/mL]
QL	Lin 1	0,04	2,0
100	Lin 4	0,10	5,0
120	Lin 5	0,12	6,0
170	Lin 6	0,17	8,4

3.2.3.5 Natančnost znotraj enega dneva (dodatek nečistote C)

Pripravili smo šest paralelk vzorca.

➤ Priprava raztopine vzorca

Zatehtali smo 25 mg vzorca v 5 mL bučko. Dopolnili smo do oznake z raztopino iz linearnosti – Lin 4 (preglednica I) in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

3.2.3.6 Selektivnost

Priprava raztopin:

➤ 5 % raztopina nečistote F

V 10 mL bučko smo zatehtali 2,5 mg nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

➤ 0,2 % raztopina nečistote F

2,0 mL 5 % raztopine nečistote F smo prenesli v 50 mL bučko. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

➤ 0,1 % raztopina nečistote C

V 20 mL bučko smo prenesli 1,0 mL 2 % raztopine nečistote C. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli.

➤ Raztopina vzorca z dodanima nečistotama C in F

V 10 mL bučko smo zatehtali 50 mg vzorca. Dodali smo 3 mL topila, 1,0 mL 0,1 % raztopine nečistote C in 400 µL 0,2 % raztopine nečistote F. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

➤ Raztopina vzorca

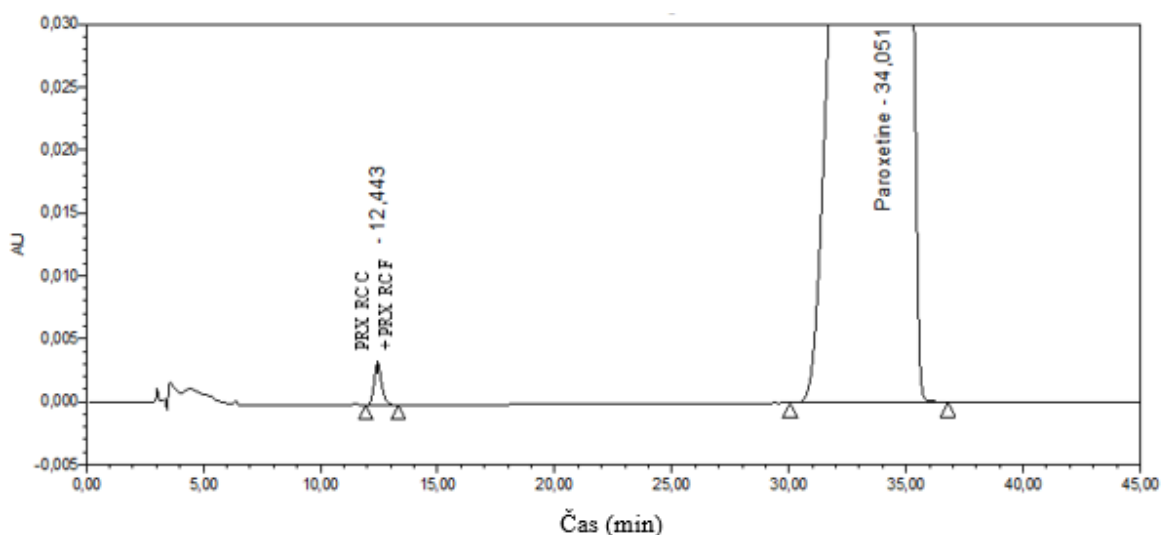
V 10 mL bučko smo zatehtali 50 mg vzorca. Dopolnili smo s topilom do oznake in raztopili s stresanjem v ultrazvočni kopeli. Raztopino smo filtrirali.

Pripravljene raztopine smo shranili in selektivnost ponovili še na drugi koloni.

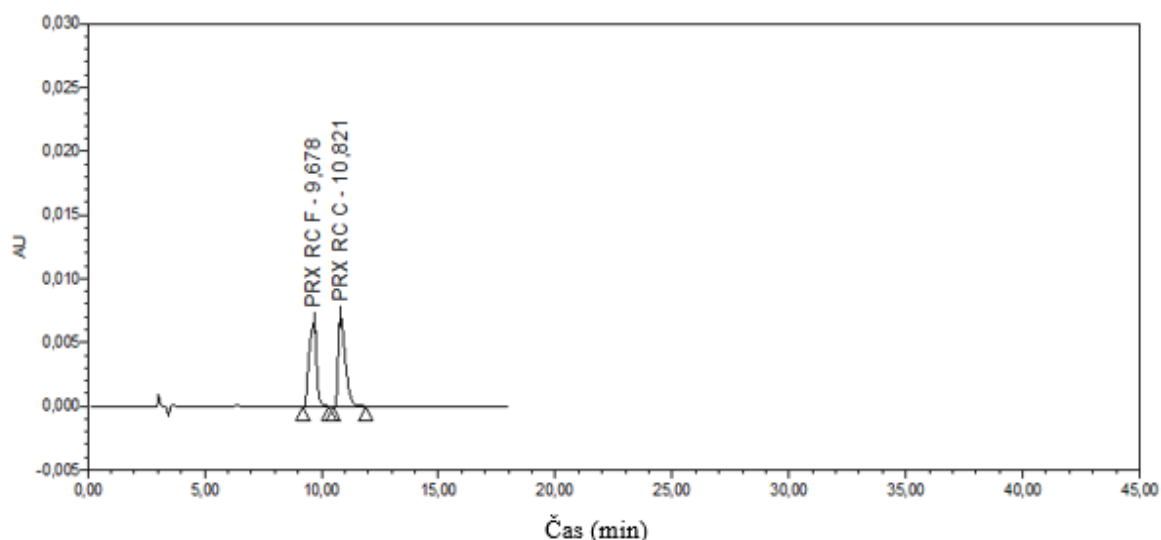
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija farmakopejske metode

Farmakopejska metoda se je v praksi v laboratorijih Lek d.d. že izkazala kot nezadostno selektivna. Pred začetkom študije smo zato tudi sami preverili ustreznost / neustreznost metode. Pripravili smo raztopine nečistot C in F, raztopini nečistot C in F z vzorcem ter raztopino vzorca. Pripravili smo raztopine nečistot C in F v različnih koncentracijah, in sicer 0,2 % raztopino, 2 % raztopino ter 1 % raztopino. Ugotovili smo, da se pri dodatku obeh nečistot (C in F) raztopini vzorca, obe nečistoti izločita z enakim retencijskim časom (slika 9). V tem primeru smo na kromatogramu opazili le en kromatografski vrh. Pri raztopini nečistot C in F brez vzorca je prišlo do ustrezne ločbe kromatografskih vrhov (Slika 10). Ugotovili smo, da njuni retencijski časi niso ponovljivi in se spreminjajo v območju ± 3 min.



Slika 9: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ob prisotnosti paroksetinijevega klorida.



Slika 10: Kromatogram 1 % raztopine nečistot C in F brez prisotnosti paroksetinijevega klorida.

V okviru raziskave smo poskušali s spreminjanjem različnih kromatografskih parametrov ločiti nečistoti C in F v raztopini vzorca, v raztopini brez vzorca pa sta bili nečistoti že ustrezno ločeni. Cilj je bil obdržati enake retencijske čase nečistot v samostojni raztopini in v raztopini vzorca, kar je sicer običajno pri vseh kromatografskih metodah. Pri raziskavi smo tako preverili naslednje parametre:

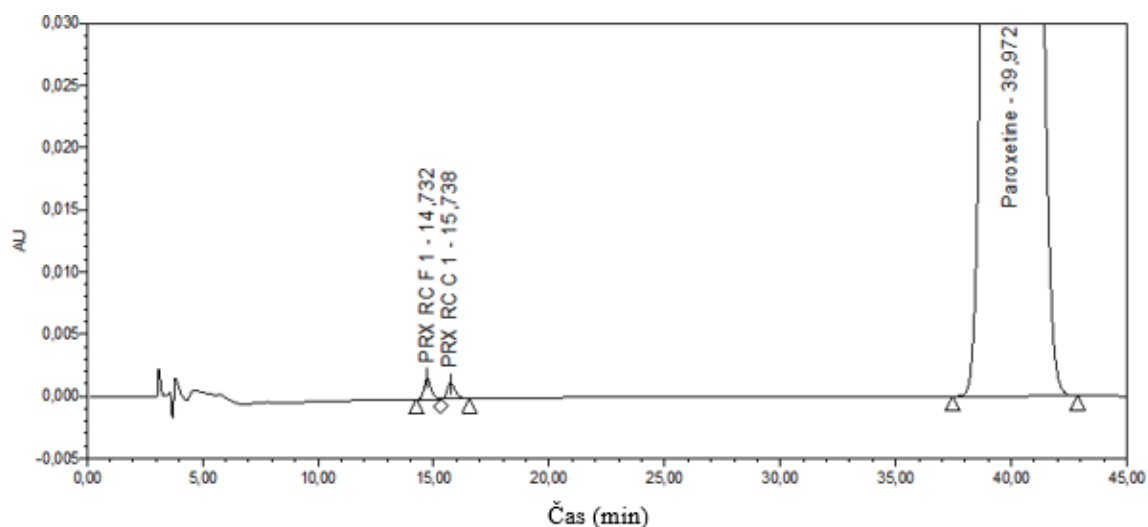
➤ Vpliv deleža *n*-heksana in topila

Preverili smo tudi kako s spreminjanjem deleža raztopine vzorca z nečistotama C in F, *n*-heksana ter topila vplivamo na ločbo kromatografskih vrhov. Pri injiciranju 0,9 mL *n*-heksana in 0,3 mL raztopine vzorca z nečistotama je prišlo do boljše ločbe kromatografskih vrhov kot pri injiciranju enakega deleža obeh raztopin. Ugotovili smo, da večji delež *n*-heksana vpliva na boljše ločbo kromatografskih vrhov. Pripravili smo tudi raztopino, kjer smo namesto *n*-heksana uporabili topilo. Injicirali smo 0,9 mL topila in 0,3 mL raztopine vzorca z nečistotama. V tem primeru je prišlo do enake ločbe kromatografskih vrhov, kot pri dodatku *n*-heksana. Kljub temu, da je pri omenjenih poskusih prišlo do nakazane ločbe kromatografskih vrhov nečistot, še vedno nismo dosegli ponovljivih retencijskih časov.

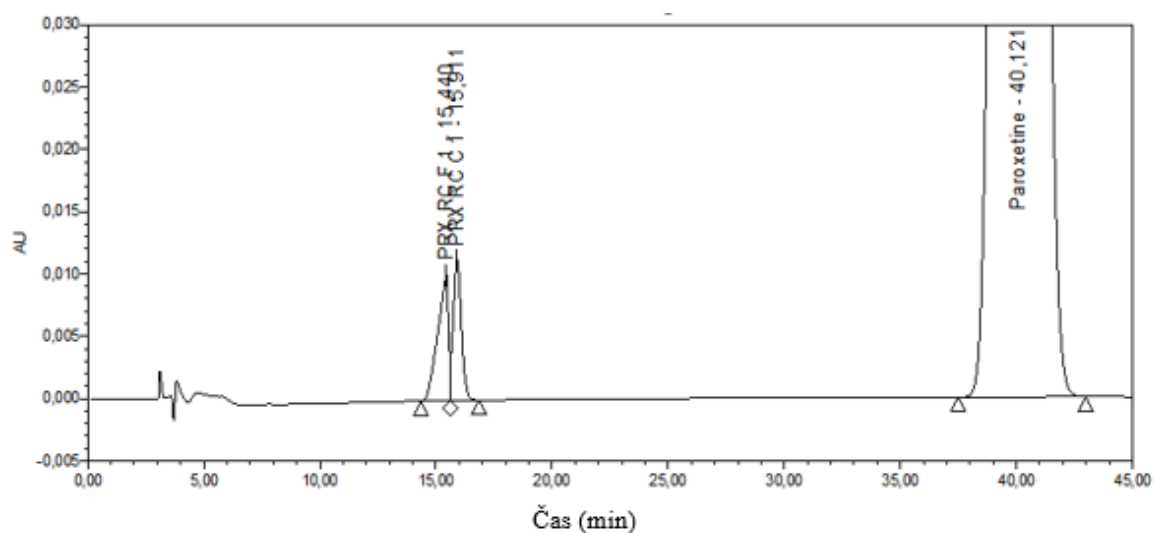
➤ Vpliv sestave mobilne faze

Preverili smo še, kako sestava mobilne faze vpliva na premikanje kromatografskih vrhov. Pripravili smo mobilno fazo z zmanjšanim deležem etanola (s 100 % na 70 %). Pri 0,2 % raztopini nečistot z vzorcem je prišlo do ločbe kromatografskih vrhov obeh nečistot (slika

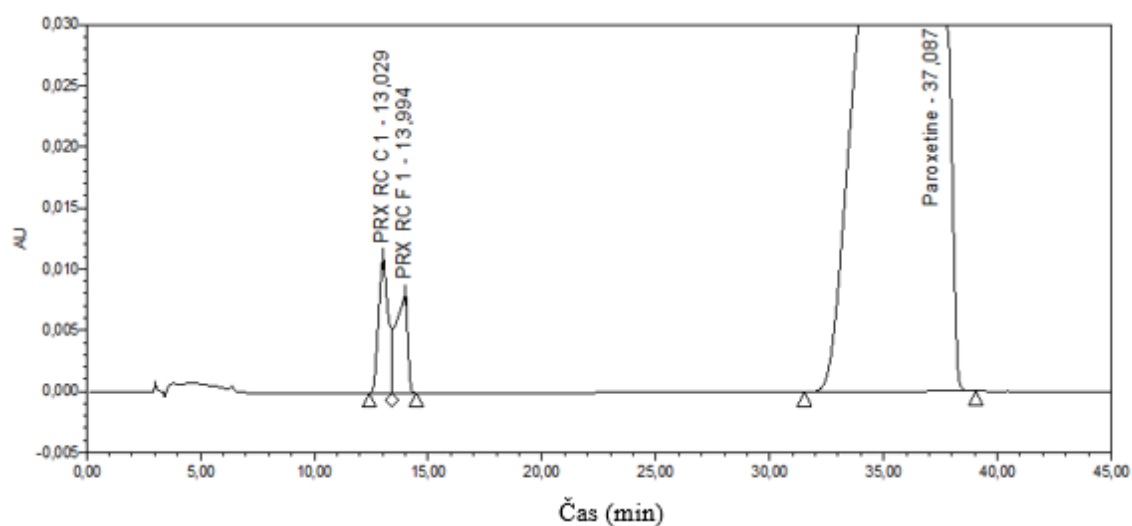
11). Pri 2 % raztopini nečistot z vzorcem pa je prišlo le do nakazane ločbe ločbe kromatografskih vrhov nečistot C in F (slika 12). Ugotavljali smo tudi vpliv spremembe deleža trifluoroocetne kisline ter obeh komponent (etanola in trifluoroocetne kisline) hkrati. Pri zmanjšanju deleža trifluoroocetne kisline (s 100 % na 70 %) smo opazili nakazano ločbo kromatografskih vrhov pri 2 % raztopini nečistot z vzorcem, medtem ko pri 0,2 % raztopini nečistot z vzorcem do ločbe ni prišlo (sliki 13 in 14). Pri zmanjšanem deležu etanola in trifluoroocetne kisline je prišlo do nakazane ločbe kromatografskih vrhov pri 0,2 % raztopini nečistot z vzorcem, medtem ko pri 2 % raztopini nečistot z vzorcem do ločbe ni prišlo (slika 15). Pripravili smo tudi mobilno fazo brez dodatka trifluoroocetne kisline (*n*-heksan : EtOH : DPV = 450 : 50 : 1 (V/V/V)). Pri tem smo opazili premik kromatografskih vrhov v desno, kar pomeni, da so bili retencijski časi daljši. Želeli smo preveriti tudi, kakšen je vpliv dodatka baze v mobilno fazo. Trifluoroocetno kislino v mobilni fazi smo zato zamenjali s trietilaminom (*n*-heksan : EtOH : TEA : DPV = 450 : 50 : 1 : 1 (V/V/V/V)). V tem primeru je prišlo do premika kromatografskih vrhov v levo, kar pomeni, da so se retencijski časi skrajšali.



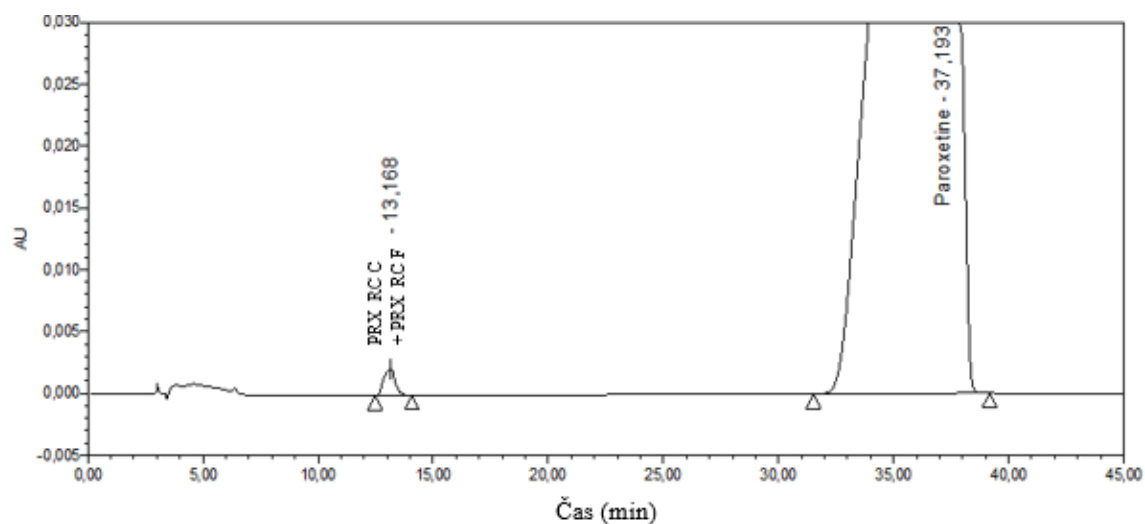
Slika 11: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu etanola v mobilni fazi.



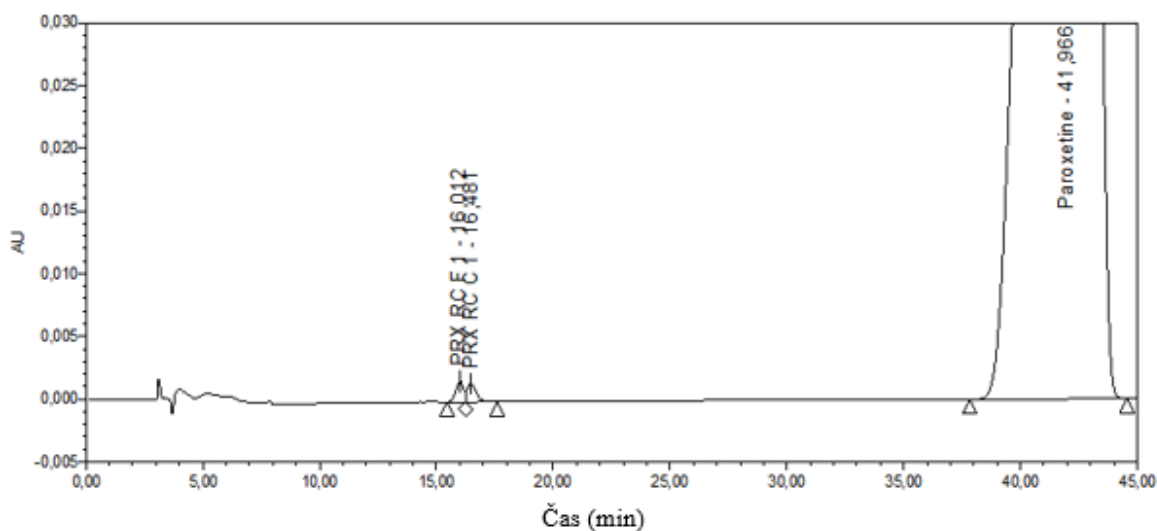
Slika 12: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu etanola v mobilni fazi.



Slika 13: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu trifluorocetne kisline v mobilni fazi.



Slika 14: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem deležu trifluoroocetne kisline v mobilni fazi.



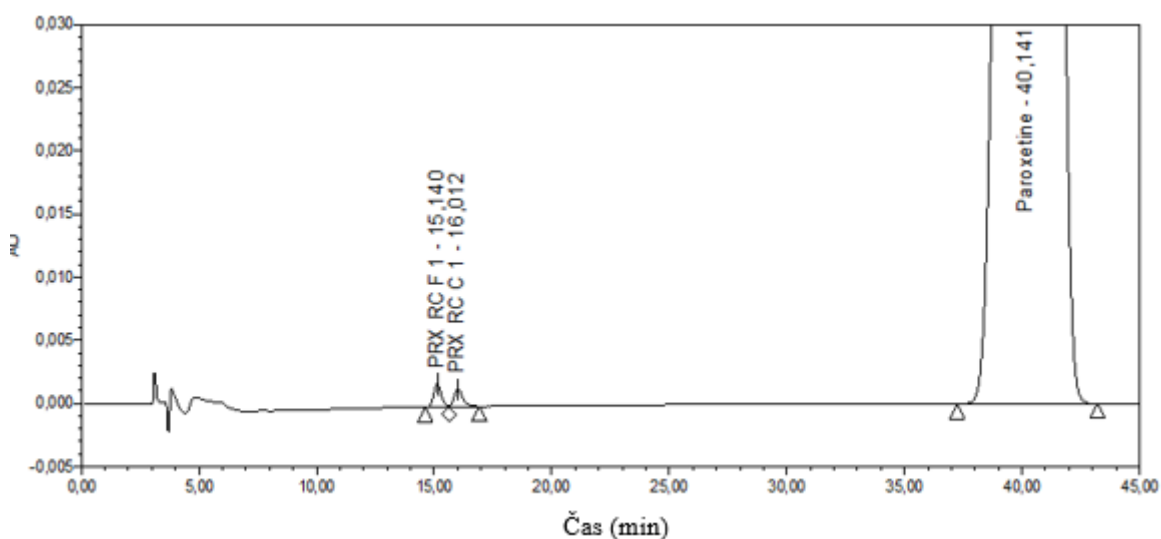
Slika 15: Kromatogram 0,2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri zmanjšanem trifluoroocetne kisline in etanola v mobilni fazi.

➤ Vpliv temperature kolone

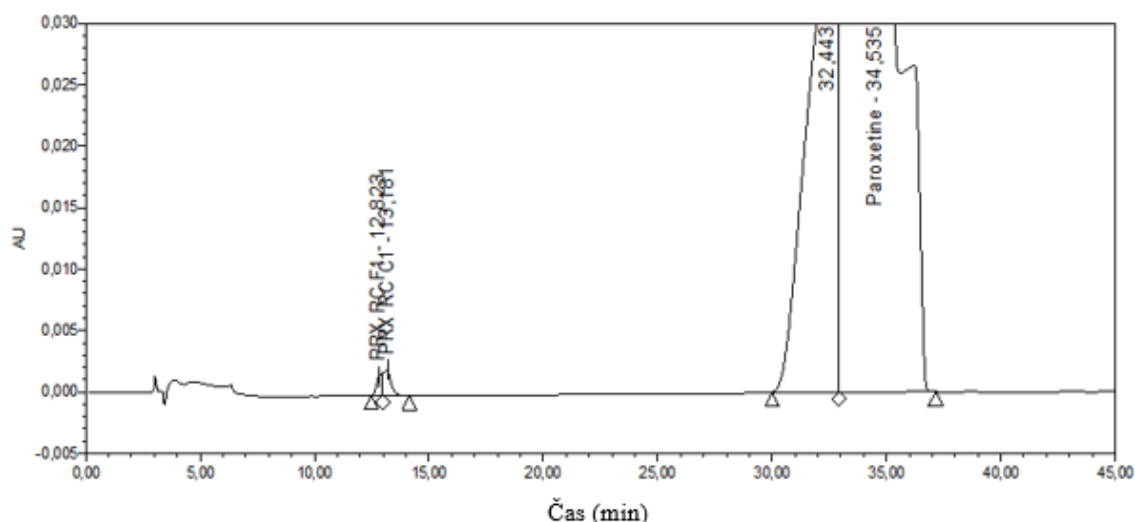
Preverili smo tudi, kako temperatura kolone vpliva na ponovljivost retencijskih časov. Temperaturo kolone smo povišali za 10 °C. Ugotovili smo, da sprememba temperature kolone iz 30 °C na 40 °C ne pripomore k izboljšanju ponovljivosti retencijskih časov. Prav tako ni prišlo do boljše ločbe kromatografskih vrhov.

➤ Vpliv dodatka kisline

Ker smo želeli preveriti vpliv dodatka kisline na premikanje kromatografskih vrhov, smo pripravili osnovne raztopine klorovodikove kisline različnih koncentracij. Pripravili smo raztopino vzorca in nečistot s topilom, ki je predpisan po farmakopejskem postopku ter raztopino vzorca in nečistot s topilom, ki je vsebovalo dodatek različnih koncentracij klorovodikove kisline. Prav tako smo pripravili tudi same raztopine nečistot s topilom, ki je predpisan po farmakopejskem postopku, ter s topilom, ki je vseboval različne koncentracije klorovodikove kisline. Pripravljene raztopine smo posneli dvakrat, in sicer z mobilno fazo, ki je predpisana v farmakopeji ter s spremenjeno mobilno fazo z zmanjšanim deležem etanola (s 100 % na 70 %). Ugotovili smo, da različne koncentracije klorovodikove kisline v topilu ne pripomorejo k izboljšanju ponovljivosti retencijskih časov. V primeru mobilne faze z zmanjšanim deležem etanola smo opazili daljše retencijske čase (slika 16). Prav tako je bila opazna nekoliko boljša ločba kromatografskih vrhov. Pri uporabi mobilne faze, ki je predpisana v farmakopeji, do ločbe kromatografskih vrhov nečistot ni prišlo (slika 17). Slednje smo opazili le pri raztopini vzorca z nečistotama, pri samih raztopinah nečistot pa je do ločbe prišlo.



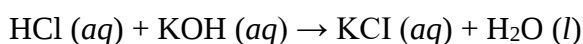
Slika 16: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri uporabi mobilne faze z zmanjšanim deležem etanola.



Slika 17: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri uporabi mobilne faze, ki je predpisana v farmakopeji.

➤ Vpliv dodatka baze v topilo

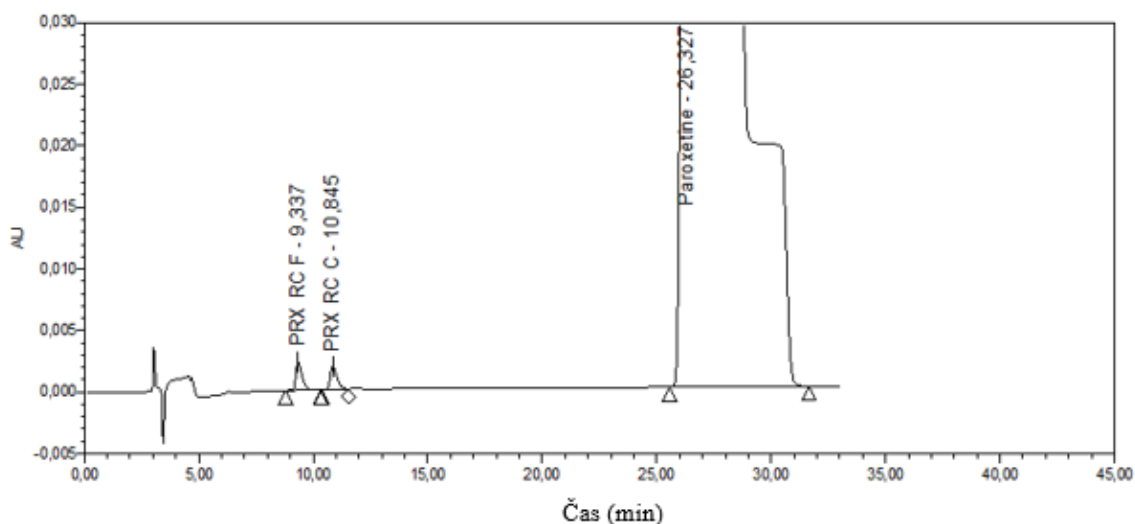
Ugotovili smo, kakšen vpliv ima dodatek kisline k topilu, zato smo želeli preveriti tudi vpliv dodatka anorganske baze. Kot topilo smo pripravili etanolno raztopino kalijevega hidroksida v *n*-heksanu. Pripravljena raztopina vzorca z nečistotama, je bila motna. Ugotovili smo, da je pojav motnosti posledica reakcije med HCl paroksetinijevega klorida ter KOH prisotnim v topilu. Pri reakciji nevtralizacije med kislino (HCl) in bazo (KOH) je namreč prišlo do nastanka KCl:



Glede na predhodne ugotovitve smo prišli do hipoteze, da sta nečistoti C in F v neionizirani obliki. Pri dodatku nečistot k vzorcu v visoki koncentraciji pride do prenosa ionov HCl iz paroksetinijevega klorida na nečistoto. Molekule nečistote postanejo s tem tudi bolj polarne. Bolj polarne molekule potrebujejo dalj časa, da prepotujejo skozi kromatografsko kolono. To ima za posledico daljše retencijske čase. Ugotovitev, da imajo nečistote drugačen retencijski čas, če so injicirane same kot, če so dodane vzorcu kaže na neustreznost kromatografske metode. Retencijski čas je v kromatografiji eden glavnih pokazateljev identifikacije. Dodaten problem, poleg premika retencijskega časa je bil v našem primeru še dejstvo, da sta nečistoti eluirali pri enakem retencijskem času. Pri dodatku KOH topilu pa

pride do nevtralizacije kislih ionov v raztopini vzorca. Nečistoti C in F ostaneta v neionizirani obliki, kar pomeni, da retencijski časi obeh nečistot ostanejo nespremenjeni.

Opisano hipotezo smo preverili z injiciranjem raztopine vzorca z nečistotama ter posameznih raztopin nečistot C in F. Ugotovili smo, da je pri uporabi spremenjenega topila (dodatek KOH) prišlo do ustrezne ločbe kromatografskih vrhov obeh nečistot (slika 18). Prav tako smo opazili, da smo s spremembo topila dosegli ustrezno ponovljivost retencijskih časov. Kromatografska vrhova nečistot sta bila namreč pri raztopini vzorca z dodanimi nečistotama C in F na istem mestu, kot če bi injicirali le posamezni nečistoti. Z dobljenimi rezultati smo potrdili našo hipotezo o vplivu baze (KOH) na ločbo kromatografskih vrhov in ponovljivost retencijskih časov.



Slika 18: Kromatogram 2 % raztopine nečistot C in F ter paroksetinijevega klorida pri spremembi topila - dodatek kalijevega hidroksida.

4.2 Validacija optimizirane metode

Po optimizaciji analitske metode smo ustreznost optimizirane metode preverili z validacijo.

Rezultate, ki smo jih pridobili pri validaciji smo primerjali na kriterije ustreznosti podane v preglednici III.

Preglednica III: Validacijski parametri in kriteriji ustreznosti.

VREDNOTENI PARAMETRI	KRITERIJI
Natančnost znotraj enega dneva	<u>RSD ($n \geq 6$):</u> $\leq 2,5 \%$ za nivo nečistot $> 5 \%$ $\leq 5 \%$ za nivo nečistot od $0,6 - 5 \%$ $\leq 10 \%$ za nivo nečistot od $0,3 - 0,5 \%$ $\leq 20 \%$ za nivo nečistot od $500 \text{ ppm} - 0,2 \%$ $\leq 30 \%$ za nivo nečistot $< 500 \text{ ppm}$
Natančnost znotraj enega dneva (dodatek nečistote v vzorec)	<u>RSD ($n \geq 6$):</u> $\leq 2,5 \%$ za nivo nečistot $> 5 \%$ $\leq 5 \%$ za nivo nečistot od $0,6 - 5 \%$ $\leq 10 \%$ za nivo nečistot od $0,3 - 0,5 \%$ $\leq 20 \%$ za nivo nečistot od $500 \text{ ppm} - 0,2 \%$ $\leq 30 \%$ za nivo nečistot $< 500 \text{ ppm}$ <u>Povprečni izkoristki:</u> $95 - 105 \%$ ($> 5 \%$) $90 - 110 \%$ ($0,6 - 5 \%$) $80 - 120 \%$ ($0,3 - 0,5 \%$) $70 - 130 \%$ ($500 \text{ ppm} - 0,2 \%$) $60 - 140 \%$ ($< 500 \text{ ppm}$)
Meja zaznavnosti in meja vrednotenja	<u>Povprečni izkoristki:</u> $95 - 105 \%$ ($> 5 \%$) $90 - 110 \%$ ($0,6 - 5 \%$) $80 - 120 \%$ ($0,3 - 0,5 \%$) $70 - 130 \%$ ($500 \text{ ppm} - 0,2 \%$) $60 - 140 \%$ ($< 500 \text{ ppm}$) Meja zaznavnosti (DL): Razmerje signal – šum $\geq 3 : 1$ ali $2 : 1$ Meja vrednotenja (QL): Razmerje signal – šum $\geq 10 : 1$

Linearnost	$r \geq 0.98$ % odseka na osi y glede na 100 % konc, standarda: $\pm 25 \%$ glede na konc. standardne raztopine $< 0.5 \%$ $\pm 10 \%$ glede na konc. standardne raztopine $0.5 - 1 \%$ $\pm 5 \%$ glede na konc. standardne raztopine $> 1 \%$
Točnost	<u>Povprečni izkoristek za vsak nivo:</u> za nivo nečistot < 500 ppm: $60 - 140 \%$ za nivo nečistot od 500 ppm – $0,2 \%$: $70 - 130 \%$ za nivo nečistot od $0,3 - 0,5 \%$: $80 - 120 \%$ za nivo nečistot od $0,6 - 5 \%$: $90 - 110 \%$ za nivo nečistot $> 5 \%$: $95 - 105 \%$ <u>RSD (n = 3):</u> $\leq 2,5 \%$ za nivo nečistot $> 5 \%$ $\leq 5 \%$ za nivo nečistot od $0,6 - 5 \%$ $\leq 10 \%$ za nivo nečistot od $0,3 - 0,5 \%$ $\leq 15 \%$ za nivo nečistot od 500 ppm – $0,2 \%$ $\leq 20 \%$ za nivo nečistot < 500 ppm
Selektivnost	Na mestu odzivov nečistot ne sme biti nobenega odziva topila, mobilne faze; nečistote morajo biti ločene med seboj in odziva zdravilne učinkovine.

Izračuni:

Dobljena koncentracija:

$$(A_{vz}/A_{st}) * c_{st} (\mu\text{g/mL}) = (A_{vz}/A_{st}) * m_{st} * (P/100)/R_{st} * 1000 * 1/F$$

- A_{vz} = površina vzorca
- A_{st} = površina standarda
- c_{st} = koncentracija standarda
- m_{st} = masa standarda
- P = vsebnost standarda (97 %)
- R_{st} = redčenje standarda (20)
- F_0 = faktor odzivnosti (1)

Dodana koncentracija:

$$m_{vz} * (P/100) / R * 1000$$

- m_{vz} = masa vzorca
- P = vsebnost standarda
- R_{vz} = redčenje vzorca

Izkoristek:

$$\text{Dobljena konc.} / \text{Dodana konc.} * 100$$

Pred začetkom validacije smo pripravili sistem ter preverili ustreznost kromatografskega sistema. Rezultati so ustrezali SST parametrom, zato smo lahko začeli z validacijo analitske metode.

Raztopina standarda:

$$\text{RSD (n=6)} \leq 10,0 \%$$

$$\text{SN} \geq 400$$

SST raztopina:

$$T \leq 2,5$$

$$R (\text{nečistota C/paroksetinijev klorid}) \geq 2,0$$

4.2.1 Natančnost znotraj enega dneva (realen vzorec)

Pripravili smo raztopino vzorca v šestih paralelkah in izračunali RSD šestih injiciranj raztopine vzorca (preglednica IV). Ugotovili smo, da v realnem vzorcu nečistota C ni prisotna.

Preglednica IV: Izračun RSD šestih injiciranj vzorca.

Št. injiciranj vzorca	Površina
1	pod QL
2	pod QL
3	pod QL
4	pod QL
5	pod QL
6	pod QL
Povprečje	n.p.
SD	n.p.
RSD	n.p.

4.2.2 Natančnost znotraj enega dneva (dodatek nečistote C v realen vzorec)

Natančnost znotraj enega dneva smo določali tako, da smo pripravili raztopine vzorcev z dodano nečistoto C pri 100 % specifikacijski koncentraciji nečistote C, ki je 0,1 %. Natančnost smo določali v šestih paralelkah (preglednica V). Dokazali smo, da vsi dobljeni rezultati ustrezajo, saj so vsi znotraj kriterija $100 \% \pm 30 \%$. Izračunali smo tudi RSD šestih injiciranj pripravljene raztopine (preglednica VI). Ugotovili smo, da rezultati ustrezajo zahtevam ($RSD \leq 20$), torej je metoda ustrezno ponovljiva znotraj enega dneva.

Preglednica V: Izračun dodane koncentracije, dobljene koncentracije ter izkoristka pri 100 % specifikacijski koncentraciji nečistote C.

% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	*Zatehta standarda nečistote C [mg]	Redčenje [mL]	Površina	Dodana konc. [µg/mL]	Dobljena konc. [µg/mL]	Izkoristek [%]
0,0977%	2,015	400	15074	4,8864	4,1159	84,23
0,0977%	2,015	400	14305	4,8864	3,9060	79,94
0,0977%	2,015	400	13701	4,8864	3,7410	76,56
0,0977%	2,015	400	13352	4,8864	3,6457	74,61
0,0977%	2,015	400	14017	4,8864	3,8273	78,33
0,0977%	2,015	400	12449	4,8864	3,3992	69,56

* Na začetku smo pripravili raztopino standarda, ki smo jo hranili v hladilniku in uporabljali skozi celotno validacijo analitske metode. Rezultati so pridobljeni z upoštevanjem zatehte omenjenega standarda.

Preglednica VI: Izračun RSD šestih injiciranj raztopine vzorca z dodano nečistoto C pri 100 % specifikacijski koncentraciji nečistote C.

Št. injiciranj vzorca	Površina
1	15074
2	14305
3	13701
4	13352
5	14017
6	12449
Povprečje	13816,33
SD	889,86
RSD	6,44

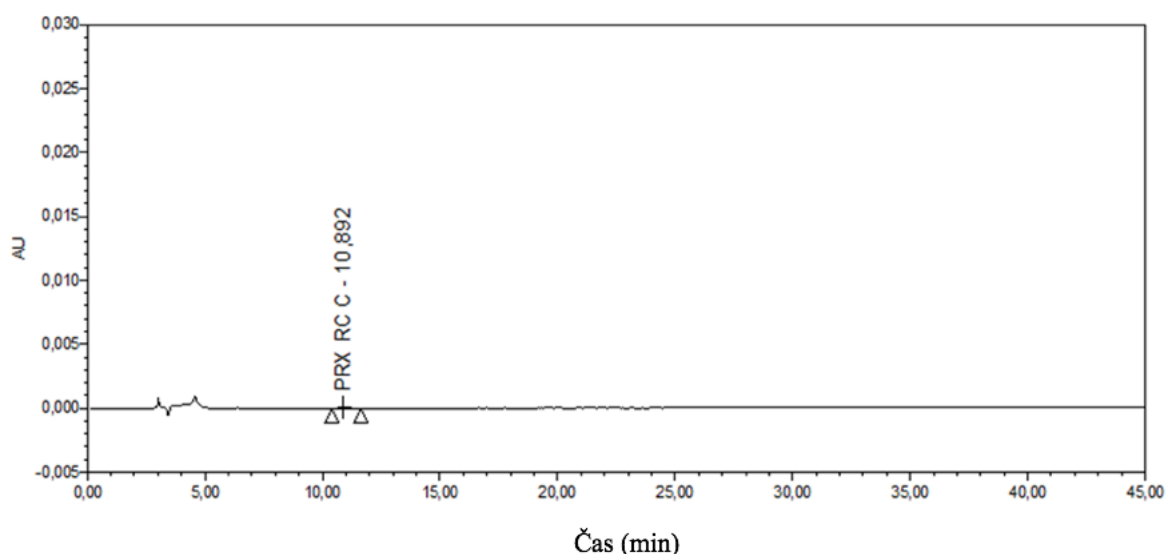
4.2.3 Določanje meje zaznavnosti in meje vrednotenja

Validacijska parametra, ki smo ju določali sta bila meja zaznavnosti (DL) in meja vrednotenja (QL). Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita v vzorcu, katerega z določeno analitsko metodo še zaznamo, ni pa nujno, da jo lahko tudi kvantitativno določimo. Meja vrednotenja pa je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo. Za določitev DL in QL smo pripravili raztopine nečistote C v koncentracijah od 0,01 % do 0,05 % (preglednica VII). Za DL smo določili koncentracijo 0,01 %, saj smo pri omenjeni koncentraciji nečistote C že zaznali kromatografski vrh (slika 19). Dobljeni rezultat S/N tudi ustreza kriteriju (razmerje signal – šum $\geq 3 : 1$). ICH smernice predpisujejo, da mora biti QL vsaj 0,05 % ali nižji. Za QL smo tako določili 0,04 % koncentracijo nečistote C, kar še vedno ustreza kriteriju (razmerje signal – šum $\geq 10 : 1$) (slika 20) (44). Pridobljeni izkoristki so bili prav tako ustrezni. Specifikacijska meja nečistote C je 0,1%. Glede na specifikacijsko mejo nečistote C so vsi izbrani parametri ustrezni.

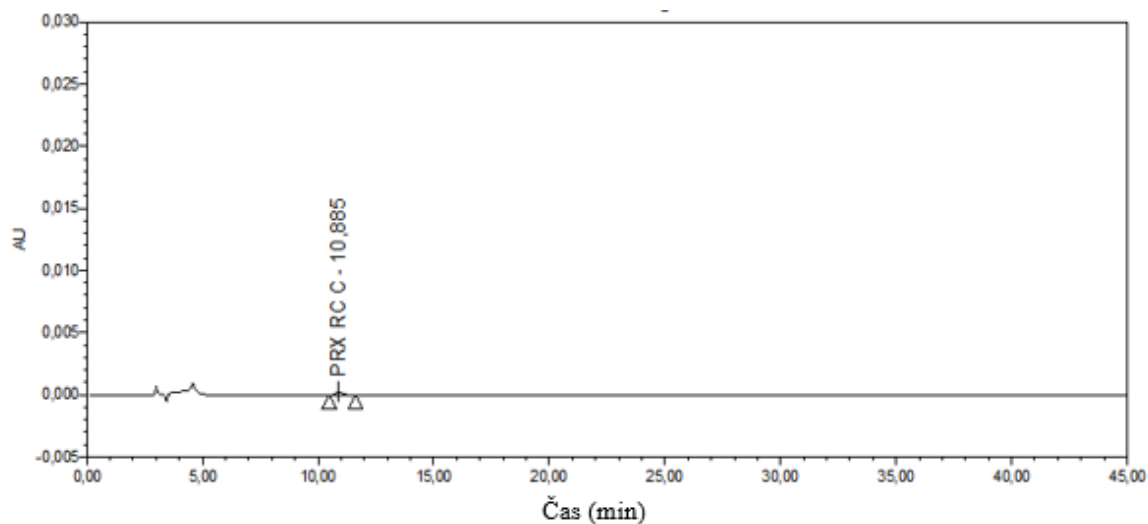
Preglednica VII: Izračun RSD, dodane koncentracije, dobljene koncentracije, izkoristka ter razmerja signal/šum pri določanju meje zaznavnosti in meje vrednotenja.

% C glede na konc. glavne uč. v vzorcu	*Zatehta standarda nečistote C [mg]	Redčenje [mL]	Število injiciranj	Povprečna površina	RSD	Dodana konc. [µg/mL]	Dobljena konc. [µg/mL]	Izkoristek [%]	S/N
0,05%	2,015	800,00	6	8046	3,95	2,4432	2,3247	95,15	89,5
0,04%	2,015	1000,00	6	6379	4,12	1,9546	1,8431	94,30	72,6
0,02%	2,015	2000,00	6	3350	5,59	0,9773	0,9679	99,04	35,4
0,01%	2,015	4000,00	6	1848	7,17	0,4886	0,5339	109,27	17,6

* Na začetku smo pripravili raztopino standarda, ki smo jo hranili v hladilniku in uporabljali skozi celotno validacijo analitske metode. Rezultati so pridobljeni z upoštevanjem zatehte omenjenega standarda.



Slika 19: Kromatogram 0,01 % raztopine nečistote C – DL.



Slika 20: Kromatogram 0,04 % raztopine nečistote C – QL.

4.2.4 Linearnost

Eden od parametrov validacije je tudi linearnost, pri čemer določamo linearnost odziva glede na koncentracijo. Pripravili smo 3 osnovne raztopine nečistote C, in sicer tako, da smo zatehtali nečistoto C v treh paralelkah. Linearnost odziva smo določali tako, da smo pripravili raztopino nečistote C v osmih različnih koncentracijah (preglednica VIII, IX in X). Za najnižjo koncentracijo smo pripravili raztopino v koncentraciji, ki smo jo določili za QL. Nato smo pripravili dodatno redčene raztopine v območju med QL in 0,12 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu. Ker je bila koncentracija standardne raztopine 2 %, smo dodatno pripravili še raztopine v območju med 0,17 % in 2,40 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu. S tem smo pokrili tudi 120 % standardne koncentracije in ugotovili linearnost skozi celotno koncentracijsko območje analitske metode.

Preglednica VIII: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za prvo paralelko.

LINEARNOST 1				
% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	Redčenje [mL]	Površina	Dobljena konc. [µg/mL]	Dodana konc. [µg/mL]
0,04	1000,00	6429	1,9516	2,0399
0,06	666,67	8492	2,9275	2,6945
0,08	500,00	11273	3,9033	3,5769
0,10	400,00	14044	4,8791	4,4561
0,12	333,33	18035	5,8549	5,7225
0,17	238,10	24654	8,1969	7,8226
2,00	20,00	279241	97,5820	88,6024
2,40	16,67	336467	117,0984	106,7600

Preglednica IX: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za drugo paralelko.

LINEARNOST 2				
% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	Redčenje [mL]	Površina	Dodana konc. [µg/mL]	Dobljena konc. [µg/mL]
0,04	1000,00	5939	1,9449	1,8844
0,06	666,67	8118	2,9173	2,5758
0,08	500,00	11789	3,8897	3,7406
0,10	400,00	14190	4,8621	4,5024
0,12	333,33	18648	5,8346	5,9170
0,17	238,10	23429	8,1684	7,4340
2,00	20,00	273464	97,2425	86,7693
2,40	16,67	345610	116,6910	109,6610

Preglednica X: Izračun dodane koncentracije in dobljene koncentracije pri določanju linearnosti odziva za tretjo paralelko.

LINEARNOST 3				
% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	Redčenje [mL]	Površina	Dobljena konc. [µg/mL]	Dodana konc. [µg/mL]
0,04	1000,00	5464	1,9400	1,7337
0,06	666,67	8591	2,9100	2,7259
0,08	500,00	11213	3,8800	3,5579
0,10	400,00	14046	4,8500	4,4568
0,12	333,33	17403	5,8200	5,5219
0,17	238,10	22741	8,1480	7,2157
2,00	20,00	279756	97,0000	88,7658
2,40	16,67	329275	116,4000	104,4780

Preglednica XI: Izračun standardnega odklona in relativnega standardnega odklona za tri paralelke.

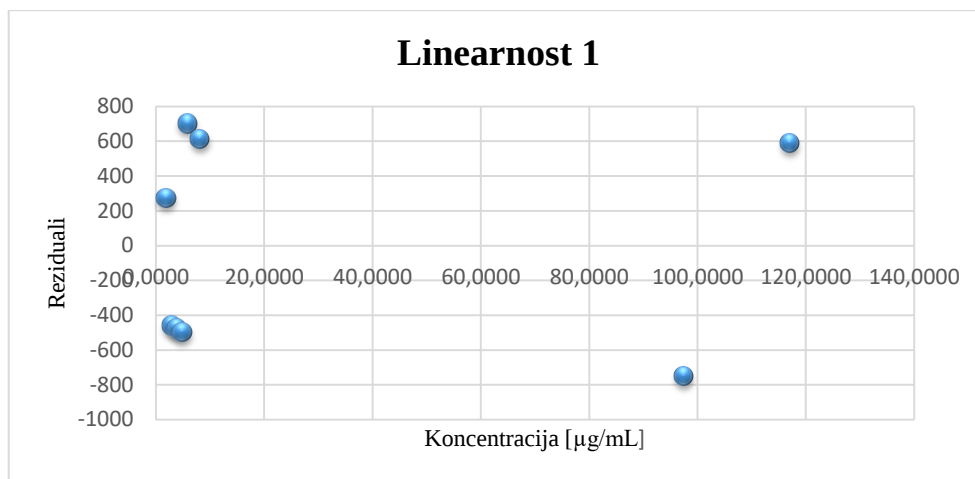
% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	Povprečje površin (n=3)	SD (n=3)	RSD (n=3)
0,04	5944	482,52	8,12
0,06	8400	249,47	2,97
0,08	11425	316,66	2,77
0,10	14093	83,72	0,59
0,12	18029	622,52	3,45
0,17	23608	968,98	4,10
2,00	277487	3493,52	1,26
2,40	337117	8186,90	2,43

Ustreznost linearnega odziva smo določili na podlagi enačbe umeritvene premice (slika 24). Parametra s katerima opisujemo odmik posameznih točk od regresijske premice sta korelacijski koeficient in odsek na osi y. Pri linearni regresiji, korelacijski koeficient r izraža delež variance odvisne spremenljivke, ki je pojasnjena z neodvisno spremenljivko (45). Pri tem odvisno spremenljivko predstavlja ploščina kromatografskega vrha ter neodvisno

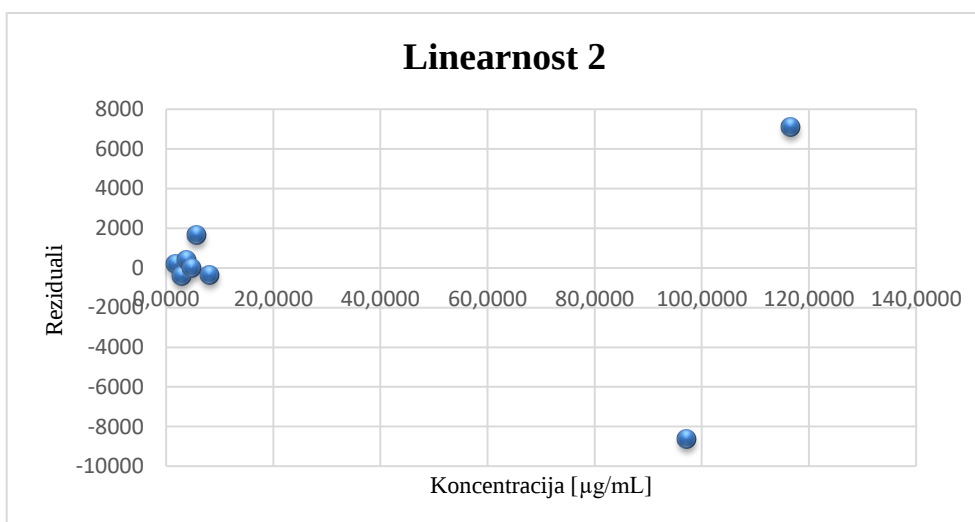
spremenljivko koncentracija. Glede na vrednosti r podane v preglednici XII lahko zaključimo, da je metoda linearna, saj vse vrednosti ustrezajo kriteriju $r \geq 0,98$. S tem smo dokazali, da je metoda linearna v območju med 0,04 % in 2,40 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu. Ustrezni so tudi vsi odseki na y-osi, saj le ti ne smejo presegati 5 % odziva pri 100 % koncentraciji specifikacijske meje. Preglednica XI prikazuje izračun standardnega odklona in relativnega standardnega odklona za vse tri paralelke. Na sliki 21, 22 in 23 so prikazani reziduali v odvisnosti od koncentracijo za vsako paralelko. Ustrezni so vsi parametri (izkoristek, RSD), saj so vse vrednosti znotraj kriterijev ($100 \% \pm 30 \%$).

Preglednica XII: Izračun naklona umeritvene premice, odseka na osi y in determinacijskega koeficienta r za vse tri paralelke.

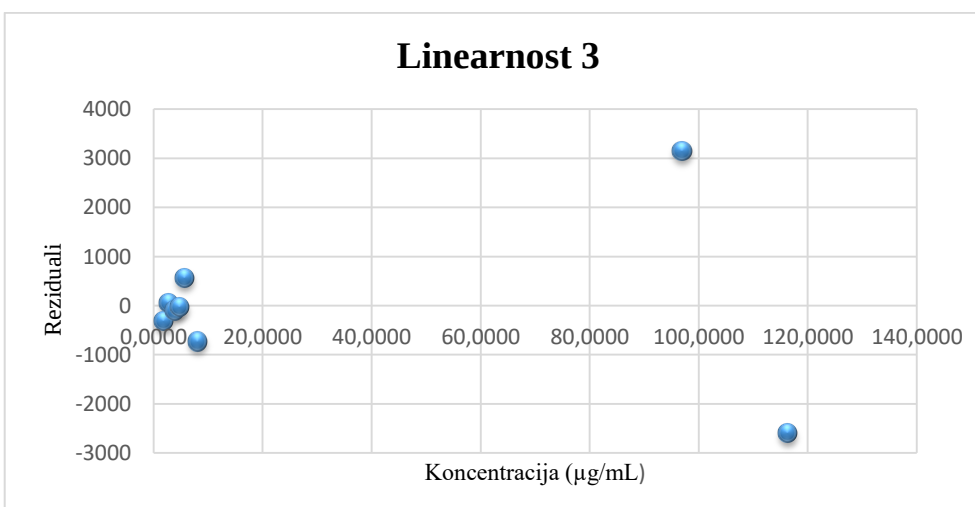
LINEARNOST 1		LINEARNOST 2		LINEARNOST 3	
Naklon	2863,4694	Naklon	2899,9755	Naklon	2848,9392
Odsek na osi y	568,5108	Odsek na osi y	87,1051	Odsek na osi y	255,3485
r	1,0000	r	0,9995	r	0,9999
r²	1,0000	r²	0,9990	r²	0,9999
Reziduali	272,0277	Reziduali	211,8775	Reziduali	- 318,2906
	- 459,2030		- 429,1312		45,2383
	- 472,4337		421,8601		- 96,2328
	- 495,6645		2,8514		- 26,7038
	701,1048		1640,8427		566,8251
	613,9510		- 346,1781		- 727,5054
	- 750,5839		-8623,9740		3153,5453
	590,8015		7121,8518		- 2596,8760



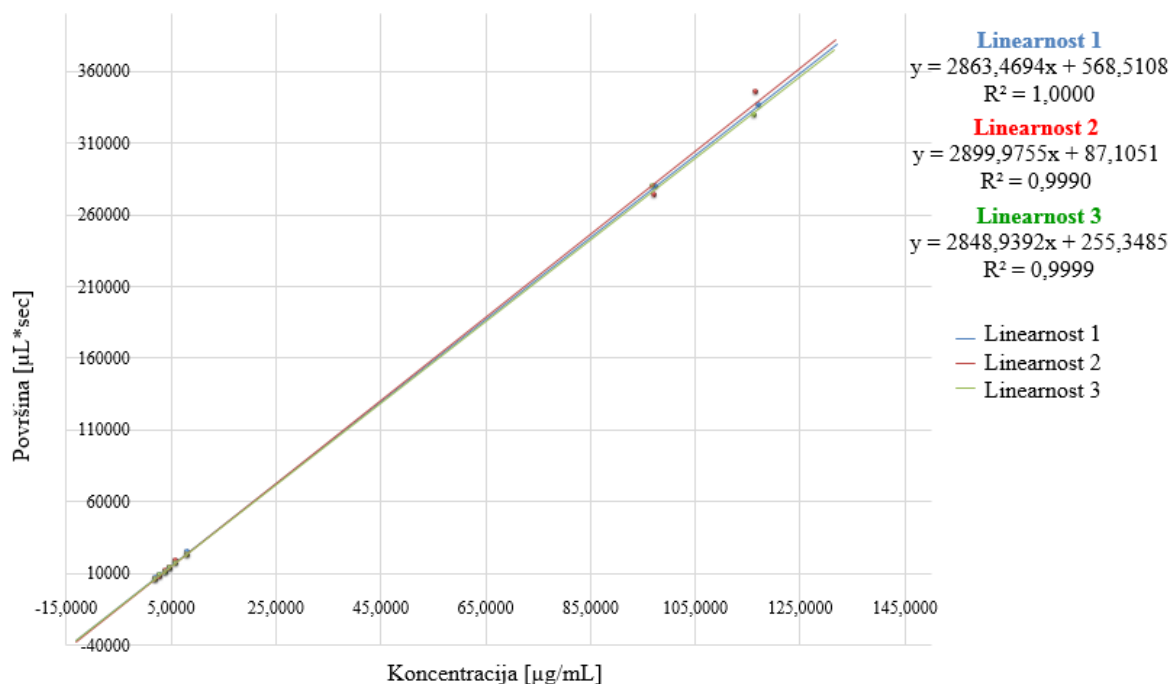
Slika 21: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za prvo paralelko.



Slika 22: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za drugo paralelko.



Slika 23: Prikaz rezidualov v odvisnosti od koncentracije za tretjo paralelko.



Slika 24: Graf potrditve linearnosti odziva v območju od 0,04 % do 2,4 % za nečistoto C.

4.2.5 Točnost

Točnost metode smo dokazovali tako, da smo pripravili raztopino vzorca v štirih različnih koncentracijah (preglednica XIII). Za najnižjo koncentracijo smo pripravili raztopino v koncentraciji, ki smo jo določili za QL. Nato smo pripravili raztopine v območju med QL in 0,17 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu. Točnost smo določali v treh paralelkah. Ustrezni so vsi parametri (izkoristek, RSD), saj so vse vrednosti znotraj kriterijev ($100 \% \pm 30 \%$). Preglednica XIV prikazuje izračune povprečnih izkoristkov od QL do 170 % specifikacijske meje nečistote C za posamezno paralelko.

Preglednica XIII: Izračun dodane koncentracije, dobljene koncentracije ter izkoristka za vrednosti od QL do 170 % specifikacijske meje nečistote C.

	% C glede na konc. glavne učinkovine v vzorcu	*Zatehta nečistote C [mg]	Redčenje [mL]	Površina	Dodana konc. [µg/mL]	Dobljena konc. [µg/mL]	Izkoristek [%]
QL: 1. paral.	0,04%	2,012	1000,00	6741	1,9516	1,8406	94,31
QL: 2. paral.	0,04%	2,005	1000,00	6339	1,9449	1,7309	89,00
QL: 3. paral.	0,04%	2,000	1000,00	5684	1,9400	1,5520	80,00
100%: 1. paral.	0,10%	2,012	400,00	15074	4,8791	4,1159	84,36
100%: 2. paral.	0,10%	2,005	400,00	14305	4,8621	3,9060	80,34
100%: 3. paral.	0,10%	2,000	400,00	13701	4,8500	3,7410	77,13
120 %: 1. paral.	0,12%	2,012	333,33	17117	5,8549	4,6738	79,83
120 %: 2. paral.	0,12%	2,005	333,33	15393	5,8346	4,2030	72,04
120 %: 3. paral.	0,12%	2,000	333,33	17225	5,8200	4,7033	80,81
170 %: 1. paral.	0,17%	2,012	238,10	23242	8,1969	6,3462	77,42
170 %: 2. paral.	0,17%	2,005	238,10	24142	8,1684	6,5919	80,70
170 %: 3. paral.	0,17%	2,000	238,10	22664	8,1480	6,1884	75,95

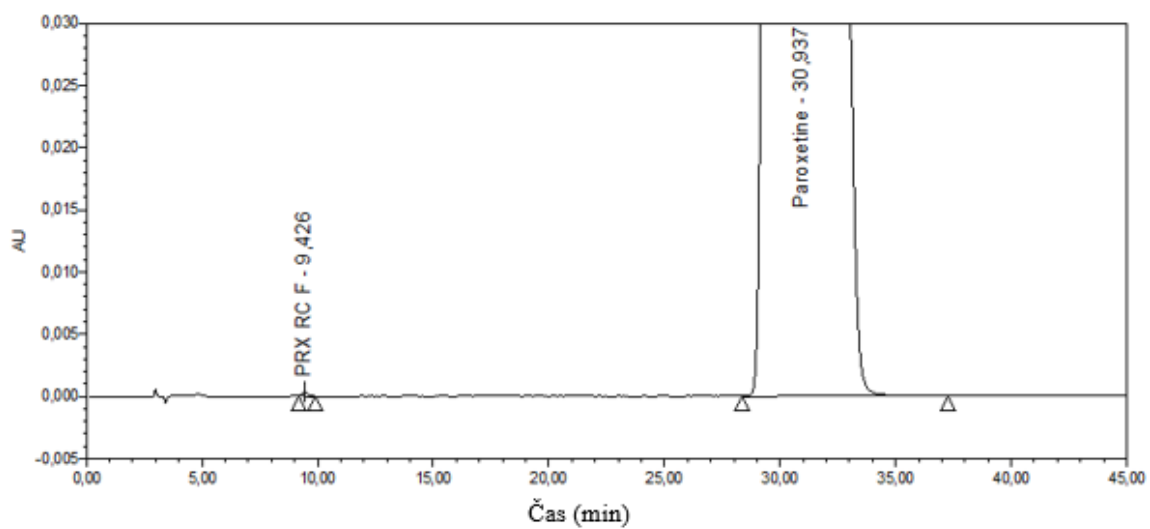
* Pri določanju linearnosti smo pripravili tri osnovne raztopine nečistote C za vsako paralelko. Omenjene raztopine smo nato uporabili pri pripravi posamezne raztopine vzorca za določanje točnosti.

Preglednica XIV: Izračun povprečnih izkoristkov od QL do 170 % specifikacijske meje nečistote C za posamezno paralelko.

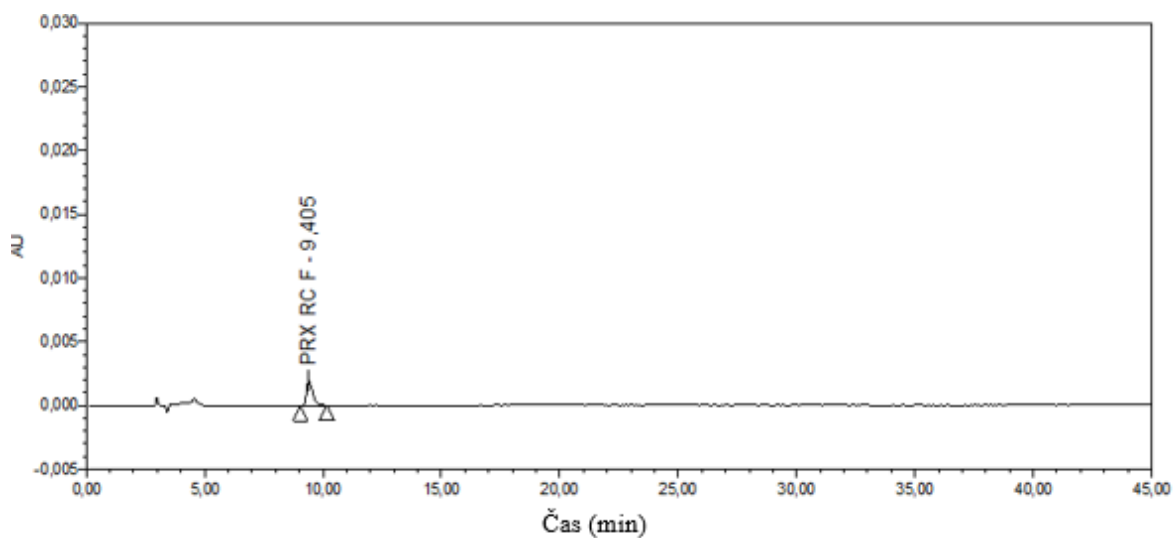
Povprečni izkoristki C za QL, 100 %, 120 % in 170 %		
QL	x (%)	87,77
	SD	7,23
	RSD (%)	8,24
100 %	x (%)	80,61
	SD	3,62
	RSD (%)	4,49
120 %	x (%)	77,56
	SD	4,81
	RSD (%)	6,20
170 %	x (%)	78,02
	SD	2,43
	RSD (%)	3,11

4.2.6 Selektivnost

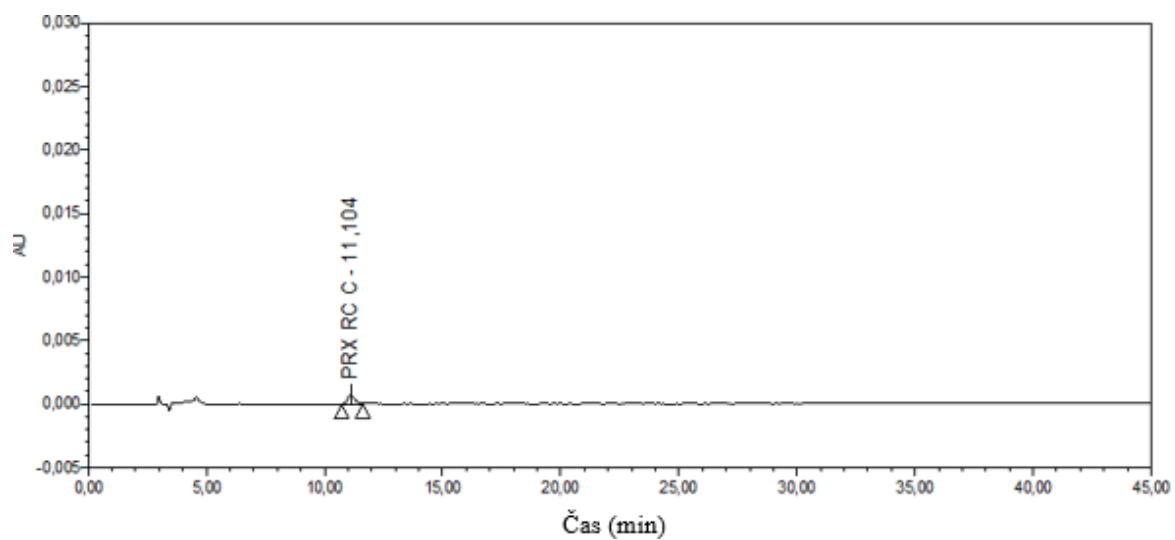
Pripravili smo raztopine nečistote C, nečistote F, raztopino vzorca z obema nečistotama ter raztopino vzorca. Ugotovili smo, da tudi sama zdravilna učinkovina paroksetinijev klorid že vsebuje nečistoto F (slika 25). Ta se je namreč pojavljala skozi celotno analizo. Prav tako smo ugotovili, da s spremenjenim topilom (dodatek KOH) dosežemo zahtevano selektivnost, saj sta kromatografska vrha nečistot C in F ustrezno ločena (slika 28). Naš cilj je bil tudi doseči ponovljivost retencijskih časov. Injicirali smo posamezni raztopini nečistot C in F ter raztopino obeh nečistot skupaj z vzorcem. Dokazali smo ponovljivost retencijskih časov, saj sta se kromatografska vrha posameznih nečistot C in F pojavila ob istem retencijskem času kot v primeru nečistot C in F s paroksetinijevim kloridom (slika 26 in 27). Ustrezno selektivnost smo preverili tudi na koloni z drugo serijsko številko. Pri tem je prišlo do primerljive ločbe in ponovljivosti retencijskih časov.



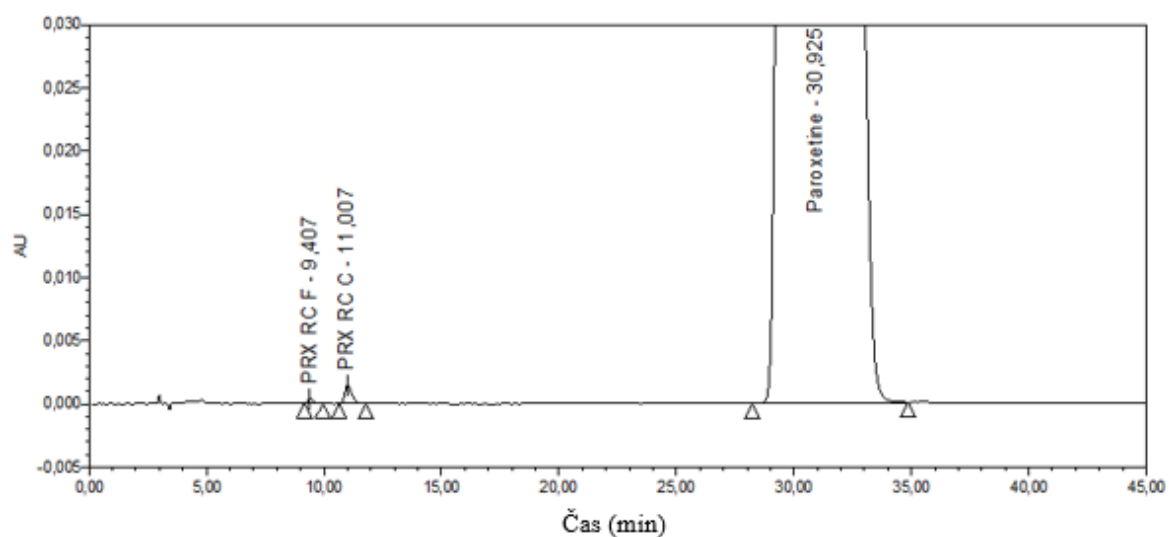
Slika 25: Kromatogram vzorca paroksetinijevega klorida.



Slika 26: Kromatogram nečistote F paroksetinijevega klorida.



Slika 27: Kromatogram nečistote C paroksetinijevega klorida.



Slika 28: Kromatogram ločbe nečistot C in F ob prisotnosti paroksetinijevega klorida.

5 SKLEP

Cilj magistrskega dela je bila optimizacija farmakopejske metode za določitev nečistote C paroksetinijevega klorida, ki se je v praksi izkazala kot neselektivna. V prvem koraku smo preverili analitsko metodo in tudi sami ugotovili, da ni ustrezna. Kromatografska vrhova nečistot C in F sta se namreč eluirala z istim retencijskim časom. Prav tako smo ugotovili, da retencijski časi nečistot ter vzorca niso ponovljivi. Raziskali smo vpliv različnih parametrov, ki bi lahko vplivali na neustreznost analitske metode. Prišli smo do zaključka, da dodatek KOH topilu pripomore k izboljšani ločbi in ponovljivosti retencijskih časov.

Ustreznost optimizirane metode smo preverili z validacijo. Pri tem smo ovrednotili nekaj ključnih validacijskih parametrov ter prišli do naslednjih zaključkov:

- Metoda je natančna.
- Za mejo zaznavnosti smo določili koncentracijo 0,01 % ter za mejo vrednotenja 0,04 % koncentracijo nečistote C.
- Metoda je linearna v območju med 0,04 % in 2,40 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu.
- Metoda je točna v območju med 0,04 % in 0,17 % nečistote C glede na koncentracijo glavne učinkovine v vzorcu..
- Metoda je selektivna, saj na mestu odzivov nečistote C ni bilo nobenega drugega odziva. Nečistoti C in F sta bili med seboj zadovoljivo ločeni. Prav tako pa je prišlo tudi do ustrezne ločbe med nečistotama ter zdravilno učinkovino.

Glede na ustreznost validacijskih parametrov lahko zaključimo, da je bila metoda ustrezno optimizirana. Največji problem je predstavljala ločba nečistot C in F, ki pa smo ga zadovoljivo rešili. Prav tako smo odpravili tudi težavo glede ponovljivosti retencijskih časov. Za zagotovo potrditev uspešne validacije bi bilo v prihodnje smiselno izvesti tudi ostale validacijske parametre (npr. rigidnost).

Takšno metodo bi lahko v prihodnosti uporabili za določitev nečistote C paroksetinijevega klorida ter s tem nadomestili obstoječo farmakopejsko metodo. Kot taka, bi se lahko analitska metoda uporabljala v farmacevtski industriji za izvajanje rutinskih analiz z zadovoljivo kakovostjo dobljenih rezultatov.

6 LITERATURA

- 1 Germann D, Ma G, Han F, Tikhomirova A: Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Toronto, 2013: 367-406.
- 2 Lambropoulos J, George AS, Nick VL: Method development and validation for the HPLC assay (potencz and related substances) for 20 mg paroxetine tablets. J Pharm Biomed Anal 1999; 19:793-802.
- 3 Sugi K, Itaya N, Katsura T, Igi M, Yamazaki S, Ishibashi T, Yamaoka T, Kawada Y, Tagami Y, Otsuki M, Ohshima T: Improved synthesis of Paroxetine Hydrochloride propan-2-ol solvate through one of metabolites in humans, and characterization of the solvate crystals. Chem Pharm Bull 2000; 48: 529-536.
- 4 Locatelli I: Pomen farmakokinetike pri napovedovanju kliničnih učinkov antidepressivov in antipsihotikov. Farm Vestn 2014; 65: 24-30.
- 5 Venkatachalam A, Chatterjee VS: Stability-indicating high performance thin layer chromatography determination of paroxetine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations. Anal Chim Acta 2007; 598: 312-317.
- 6 Zukowski J, Brightwell M, De Biasi V: Chiral HPLC method for chiral purity determination on paroxetine drug substance. Chirality 2003; 15: 600-604.
- 7 Lisowska-Kuźmich M, Kantor-Boruta M, Jończyk A, Jarończyk M, Ocios-Bębenek A, Mazurek AP, Chilmonczyk Z, Jarosz M: New validated HPLC methodology for the determination of (–)-trans-paroxetine and its enantiomer in pharmaceutical formulations with use of ovomucoid chiral stationary phase. Anal Bioanal Chem 2014; 406: 3697-3702.
- 8 Gilbert MT: High performance liquid chromatography, Butterworth-Heinemann, Wright, Bristol, 1987: 1-367.
- 9 Kazakevich Y, LoBrutto R: HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2007: 140-568.
- 10 <https://jordilabs.com/lab-testing/technique/lc/hplc/rp-np/> (Dostopno dne: 01.05.2018).
- 11 https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/theoretical_plate.html (Dostopno dne: 02. 04. 2018).
- 12 Görög S: Identification and determination of impurities in drugs, Elsevier, Amsterdam, 2000: 210-235.
- 13 Dolan JW: Column packing- What's at bottom of it? LC-GC 1998; 16: 350-354.

- 14 14. Czaplicki S: Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds, Chapter 4, InTech 2012: 99-115.
- 15 Felinger A, Boros B, Ohmacht R: Effect of pressure on retention factors in HPLC using a non-porous stationary phase. *Chromatographia* 2002; 56: 61-64.
- 16 <http://www.chromatographyonline.com/how-do-your-peaks-measure?id=&sk=&date=&&pageID=1> (Dostopno dne: 01.05.2018).
- 17 http://www.chromacademy.com/lms/sco2/Theory_Of_HPLC_Chromatographic_Parameters.pdf (Dostopno dne: 01.05.2018).
- 18 Dolan JW: Column dead time as a diagnostic tool. *LCGC* 2014; 32: 24-29.
- 19 Veber M: Kromatografija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2000: 26.
- 20 Fornstedt T, Forssén P, Westerlund D: Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015: 1-24.
- 21 Riley CM, Rosanske TW, Rabel Riley SS: Specification of Drug Substances and Products, Elsevier, Amsterdam, 2014: 109-142.
- 22 Borman P, Houghtflower B, Cattnach K, Crane K, Freebairn K, Jonas G, Mutton I, Patel A, Sanders M, Thompson D: Comparative performances of selected chiral HPLC, SFC and CE systems with a chemically diverse dample set, *Chirality* 2003; 15: S1-S12.
- 23 <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/chiral-chromatography/faq.html> (Dostopno dne: 29.12.2017).
- 24 Fujimoto Y, Ishi K, Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Shimizu R: New derivatization reagents for the resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1987; 402: 344-348.
- 25 Pettersson C, Gioeli C: Improved resolution of enantiomers of naproxen by the simultaneous use of a chiral stationary phase and a chiral additive in the mobile phase. *J Chromatogr A* 1988; 435: 225-228.
- 26 Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T: Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert-butyloxycarbonyl-L-cysteine and O-phthalaldehyde. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1992; 582: 41-48.

- 27 Wang X, Li W, Rasmussen H: Chiral separations. Elsevier Inc., San Diego, 2007; 8: 111-144.
- 28 FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, Chirality 4, 1992: 338.
- 29 Piras P, Roussel C, Pierrot-Sanders J: Reviewing mobile phases used on Chiralcel OD through an application of data mining tools to CHIRBASE database. J Chromatogr A 2001; 906: 443-458.
- 30 Zhao Y, Woo G, Thomas S, Semin D, Sandra P: Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A 2003; 1003: 157-166.
- 31 <http://chiraltch.com/chiral-stationary-phases/> (Dostopno dne: 29. 12. 2017).
- 32 Nakano T: Optically active synthetic polymers as chiral stationary phases in HPLC. J Chromatogr A 2001; 906: 205-225.
- 33 <http://faculty.chem.queensu.ca/people/faculty/horton/research2.html> (Dostopno dne: 28. 12. 2017).
- 34 Lopez Garcia P, Buffoni E, Pereira Gomes F, Vilchez Quero JS: Analytical method validation, Wide spectra of quality control, InTech, 2011: 3-22.
- 35 ICH Guidance for Industry Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2005: 1-13.
- 36 Chan Chow C, Lee YC, Lam H, Zhang XM: Analytical method validation and instrument performance verification, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2004: 11-26.
- 37 Kumar Sahu P, Ramiseti Rao N, Cecchi T, Swain S, Patro Sekhar C, Panda J: An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. J Pharm Biomed Anal 2018; 147: 590-611.
- 38 Review of world pharmacopoeias, Working document QAS/12.512/Rev.1, 2013, 3-20.
- 39 <http://www.jazmp.si/farmakopeja/> (Dostopno dne: 28. 12. 2017).
- 40 <http://www.uspnf.com/> (Dostopno dne: 28.12. 2017).
- 41 <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=922d17f7-58c7-7b82-5f80-b808a9db5da2&type=display> (Dostopno dne: 09.06.2018).
- 42 <https://www.lgcstandards.com/FR/en/Paroxetine-impurity-D-3R-4S-3-1-3-benzodioxol-5-yloxy-methyl-4-4-fluorophenyl-piperidine-trans-paroxetine-/p/EPY0000256> (Dostopno dne: 09.06.2018).

- 43 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/usp/1500273?lang=en®ion=SI>
(Dostopno dne: 09.06.2018).
- 44 WHO. The United States Pharmacopeia vol. 39, Chromatography, United States Pharmacopeial convention, Inc. Rockville 2016: 459-471.
- 45 https://stattrek.com/statistics/dictionary.aspx?definition=coefficient_of_determination
(Dostopno dne: 14.08.2018).