



**Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**



Gyógyszeranalitika Ph.D. program

Programvezető: Prof. Dr. Dombi György

Gyógyszeranalitikai Intézet

**Témavezetők:**

Prof. Dr. Dombi György

Dr. Szakonyi Gerda

**dr. Kalmár Éva**

**KIHÍVÁSOK AZ ÖSSZETETT GYÓGYSZERKÉ-  
SZÍTMÉNYEK HPLC HATÓANYAGTARTALOM  
VIZSGÁLATÁNAK FEJLESZTÉSÉBEN ÉS  
VALIDÁLÁSÁBAN**

Szeged  
2014



## 1. Bevezetés és célkitűzések

Az analitikai kémia egyik legtöbb kihívást rejtő ága a gyógyszeranalitika. Az analitikusok feladata a kutatás fejlesztés során a hatóanyagok, ill. azokat tartalmazó gyógyszerkészítmények mennyiségi és minőségi ellenőrzésére alkalmas, validált módszerek fejlesztése. Az így kifejlesztett módszerekkel történik gyógyszerünk gyártásközi, és hatósági rutinellenőrzése is. A gyógyszeranalitikai vizsgálatok döntő része műszeres analitikai módszerekkel történik, melyek közül a leggyakoribb a HPLC technika, melyet kiegészít a tömegspektrometria, a spektrofotometria, az NMR és egyéb vizsgálati módszerek. A HPLC gyógyszeriparban betöltött domináns szerepe miatt, rendkívüli léptékben fejlődik nap, mint nap. Jelenleg, különösen a kutatásban egyre inkább átveszi a helyét az UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). A héjszerkezetű oszlopok területe, a legújabb detektálási technikák, a kétdimenziós kromatográfia vagy éppen a csatolt technikák alkalmazása is számos érdekes problémát és kihívást rejt. Mindamellet nem felejtethjük el, hogy a fejlődés/fejlesztés igen költséges, az új készülékek, a korszerű oszlopok is igen drágák, emiatt a kisebb hazai gyógyszergyártó cégek és az ellenőrző hatóságok analitikai laboratóriumai eszközparkjukkal nem tudják naprakészen követni a műszeres analitika fejlődését. Ezért célom volt olyan reprodukálható, költséghatékony,

ugyanakkor gyors és pontos HPLC analitikai módszerek fejlesztése, melyek alkalmazása a legtöbb felhasználó számára elérhető.

A hatóanyagtartalom meghatározására történő HPLC módszerfejlesztés egyik legtöbb kihívást rejtő része az összetett gyógyszerkészítmények mintaelőkészítése. Ennek bemutatására két példát is választottam jelen munkámban. Az egyik fejlesztésben a problémát a többkomponensű készítmény 3 különböző tulajdonságú hatóanyagának elválasztása jelenti, míg a másik kihívás az eredetileg is összetett gyógyszerformaként kezelt kúpából történő optimális hatóanyag visszanyerés különböző vivőanyagok esetén.

A kúpok jelentős része Magyarországon még ma is magisztrális készítmény. A legtöbbet a klinikák gyógyszerházaik készítik főleg gyermekgyógyászati alkalmazásra. A magisztrálisan készített gyógyszerek előállításuk olcsó, emellett személyre szabott terápiára is alkalmazhatók. Ezeknek a készítményeknek a rendszeres, hatósági ellenőrzése jelenleg nem megoldott. Munkámmal szeretném felhívni a figyelmet ennek a kérdésnek a fontosságára, valamint a készítés során felmerülő technológiai hibák következményeinek bemutatásával szeretnék hozzájárulni, a gyógyszerházi gyógyszerkészítés minőségének javításához.

---

## 2. Módszerek

### Alkalmazott műszerek és technikák

A HPLC méréseket egy Shimadzu Prominence HPLC rendszeren (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) hajtottam végre, mely egy LC-20AD pumpából, egy 4-utas keverőszelepből, egy CTO-20A kolonna termosztátból, egy DGU-20ASR gázmentesítőből és egy SPD-M20A UV/VIS PDA 10 mm-es optikai úthosszú cellával felszerelt detektorból állt. A mintákat egy 20 µl-es hurokkal felszerelt Rheodyne 6-portos manuális injektor szelepen keresztül injektáltuk. Az elválasztást Hypersil ODS (C18) 150x4,6 mm, 5 µm (Thermo Scientific, Keystone, UK), Luna C18(2), 150x4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) és Zorbax SB-C18 150x4,6 mm, 3,5 µm (Agilent, Santa Clara, CA, USA) oszlopokon vizsgáltam a módszerfejlesztések során. Az adatgyűjtést és a kromatogramok integrálását LCSolution (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) kromatográfiai adatgyűjtő és értékelő programmal végeztem. Az eredményeket LC Solution és Microsoft Office Excel 2007 programok segítségével dolgoztam fel. A vizsgált vegyületek log D vs. pH görbéit a Pallas intelligens kromatográfiai szoftver segítségével határoztam meg.

A spektrofotometriás méréseket egy Shimadzu UV-1601 UV/VIS két-fényutas spektrofotométeren végeztem. A mérések során 10 mm optikai úthosszú kvareküvetttákat használtam. A

spektrofotometriás adatokat Microsoft Excel programmal értékelttem.

A  $^1\text{H}$  NMR spektrumokat egy BRUKER Avance DRX 500 spektrométeren vettük fel szobahőmérsékleten deutérium lock-kal. A kísérletek során nem alkalmaztunk vízelnyomást. A vivőfrekvenciát (O1) 7,01 ppm-nek választottuk és egy 16,00 ppm széles tartományt vizsgáltunk, a gerjesztést  $30^\circ$ -os impulzussal végeztük ( $\text{PW}_{90}=12,5 \mu\text{s}$ ), az impulzusok késleltetése 3 mp volt, az adatgyűjtési idő 2,05 mp-e alatt 8 tranzienszt gyűjtöttünk 32K adatpontba. A spektrumok feldolgozása során 0,3 Hz-es exponenciális szűrést alkalmaztunk, nullákkal töltöttük fel a spektrumokat 64K adatpontra és komplex Fourier transzformációt végeztünk. Az adatgyűjtés és a feldolgozás Bruker XWIN-NMR 3.1 programmal történt.

A cerimetriás titrálás mintaelőkészítése során egy kúpot olvasztottam meg  $40^\circ\text{C}$ -os vízfürdőn. Az olvadékból háromszor 0,20-0,30 g-ot mértem titráló lombikokba. Minden mintához 10,0 ml 15% kénsav oldatot adtam és az elegyet  $40^\circ\text{C}$ -ra melegítettem, hogy a hatóanyagot kioldjam a kúpalapból. Ezután szobahőmérsékletre hűtöttem a mintákat és 15 ml desztillált vizet adtam hozzájuk. Keverés és 1 csepp ferroin indikátor hozzáadása után 0,05 M cérium(IV)-szulfáttal titráltam, amíg az oldat színe na-

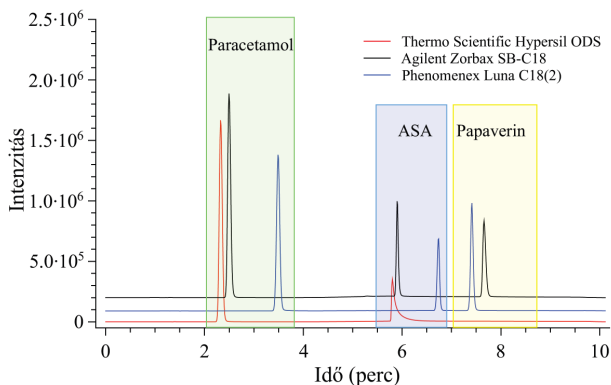
---

rancsból zöldbe csapott át és a zöld szín legalább 1 percig megmaradt.

### **3. Eredmények**

#### **I rész. HPLC módszerfejlesztés és validálás hatóanyagtartalom meghatározásra**

1. HPLC módszert fejlesztettem és validáltam hatóanyagtartalom meghatározásra három hatóanyagot tartalmazó osztott por gyógyszerkészítményre.
  - 1.1. A mobil fázis lehetséges pH- ját predikációs szoftver segítségével a paracetamol, acetil-szalicilsav (ASA) és papaverin logD vs. pH függvénye alapján határoztam meg. Ez alapján pH  $3,4 \pm 0,05$  bizonyult a legoptimálisabbnak a mozgó fázis esetén.
  - 1.2. Meghatároztam a megfelelő visszatartás és csúcsalak eléréséhez szükséges eluens szerves- vizes arányát és az alkalmazott gradienst.
  - 1.3. Különböző állófázisokat hasonlítottam össze az eltérő polaritású hatóanyagok elválasztásához. A vizsgált 3 analitikai kolonnából (ODS Hypersil, Luna C18, Zorbax SB-C18) a Zorbax SB-C18 bizonyult a legalkalmasabbnak az elválasztás kromatográfias paramétereinek alapján.



**1. ábra A három állófázis összehasonlítása.**

1.4. A kifejlesztett hatóanyagtartalom meghatározási módszer validálása az alábbi teljesítményjellemzők vizsgálatával történt: linearitás, pontosság (ismételhetőség, közbenső pontosság), oldószer specifikusság, robusztusság. A kifejlesztett módszer a validálási követelményeknek megfelelt.

2. HPLC módszert fejlesztettem és validáltam hatóanyagtartalom meghatározásra aminofenazon (AMFZ) és paracetamol esetén.

2.1. RP-HPLC módszert fejlesztettem AMFZ hatóanyagtartalom meghatározásra.

2.2. RP-HPLC módszert fejlesztettem paracetamol hatóanyagtartalom meghatározásra.

2.3. Az AMFZ és paracetamol vizsgálatára fejlesztett módszert validáltam az alábbi teljesítményjellemzők vizsgálata-

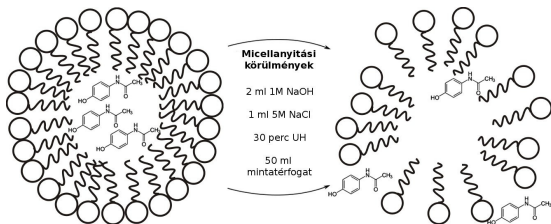


---

tával: linearitás, pontosság (ismételhetőség, közbenső pontosság), torzítatlanság – kiemelten magas szinten is AMFZ esetén –, specifikusság az oldószerre és mátrixkomponensekre nézve, robusztusság. A kifejlesztett módszerek a validálási követelményeknek megfeleltek.

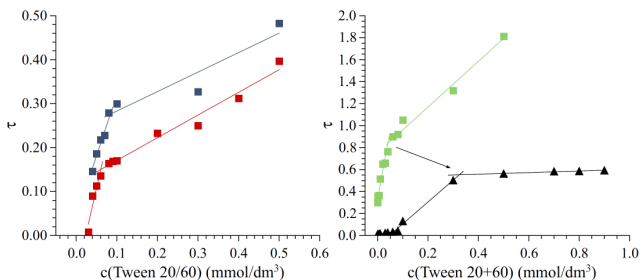
## **II rész. Kúpok mintaelőkészítési eljárásának fejlesztési kihívásai**

3. Mintaelőkészítési eljárást dolgoztam ki három különböző kúp mátrixból történő vizsgálatra.
  - 3.1. Adeps solidus lipofil kúpalapból történő visszanyerés fagyasztásos módszerrel.
  - 3.2. Massa macrogoli hidrofíl kúpalapból történő visszanyerés egyszerű oldással.
  - 3.3. W35TT tenzid tartalmú kúpalapból történő visszanyerés optimalítása micellanyitással. A pH, a só koncentráció változtatás, és az UH, valamint ezek együttes alkalmazásának visszanyerésre gyakorolt hatását is vizsgáltam. A micellanyitás 100 mM NaCl, 40 mM NaOH és 30 min UH kombinációjával valósítottam meg.



2. ábra A micellanyítás körülményei

3.4. W35TT kúp tenzid komponenseinek (Tween 20, Tween 60, valamint Tween 20+60) CMC értékeit meghatároztam turbidimetriás módszerrel metanol-víz rendszerben. Tween 20+60 CMC értékét a micellanyítás körülményei között is megvizsgáltam.



3. ábra A Tween 20 (■), Tween 60 (●), Tween 20 + 60 (■) és Tween 20 + 60 sóval és bázissal (▲) rendszerek turbidimetriás CMC meghatározása

3.5. Adeps solidus, valamint W35TT mátrixú kúpok összehasonlító kioldódás vizsgálatát végeztem a kifejlesztett HPLC módszerrel. Megállapítottam, hogy a kioldódás gyorsabb W35TT mátrixból, 900 ml kioldóközegben, mely alacsonyabb CMC értéket jelent, mint a fiziológiás

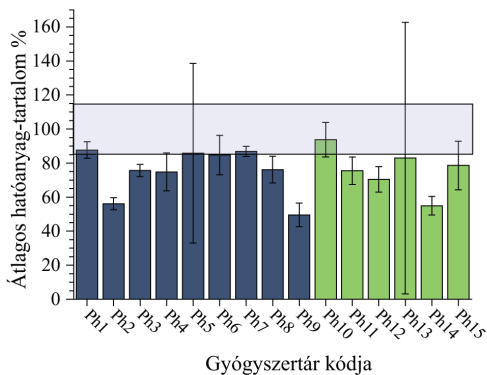
---

végbélfolyadék térfogat (2 ml), vagy a fejlesztett mintaelőkészítési módszer során használt 50 ml.

- 3.6. A micellanyitáshoz használt rendszer (100 mM NaCl, 40 mM NaOH és 30 min UH) AMFZ és paracetamol szerkezetére gyakorolt hatását vizsgáltam NMR spektroszkópiával. A vizsgált hatóanyag NMR spektrumai alapján az alkalmazott só és lúg koncentráció nem eredményez szerkezetváltozást a hatóanyagban.

### **III. rész Magisztrális kúpok hatóanyagtartalmának ellenőrzése**

4. Magisztrális kúp készítmények dózis egységesség vizsgálatát végeztem el és azonosítottam a készítési eljárás során előforduló lehetséges hibákat.
- 4.1. Összehasonlítottam a cerimetriás titrálás és a HPLC vizsgálat eredményeit. Megállapítható, hogy a cerimetriás titrálás és a HPLC módszer egyenértékűként használható a hatóanyagtartalom meghatározásra.
- 4.2. 15 magyar közforgalmú gyógyszerár által készített egyenként 10 db AMFZ tartalmú kúpot tartalmazó min-ták dózis egységességét ellenőriztem.



**4. ábra** A minták átlagos hatóanyag tartalma szórásokkal. A Ph1-Ph9 minták vizsgálata HPLC-vel, a Ph10-Ph15 minták vizsgálata cerimetriás titrálással történt.

4.3. Azonosítottam a kiszorítási faktor ( $f$ ) hatását a hatóanyagtartalomra. Erősen ajánlott, hogy a leggyakrabban használt hatóanyagokra határozzák meg az  $f$  értéket és alkalmazzák is a napi gyógyszerkészítési gyakorlatban.

4.4 A keverés hatásának vizsgálata a homogenitásra és a minták teljes hatóanyagtartalmára azt mutatta, hogy a keverés hiánya esetén a minták homogenitása nem megfelelő, valamint alacsony átlagos hatóanyagtartalmat eredményez attól függően, hogy a készítés melyik fázisában maradt el a keverés.

---

## 4. Összefoglalás és következtetések

### I. rész

A bemutatott eredmények alapján tisztán látható, hogy a fejlesztés során legnagyobb kihívást, a mindhárom vegyületet jó csúcsszimmetriával és felbontással elválasztható állófázis azonosítása jelentette. A Hypersil ODS állófázis túl nagy visszatartásúnak bizonyult a papaverin esetén és a fejlesztés során nyilvánvalóvá vált, hogy nincs lehetőség megfelelő csúcsalak elérésére sem. Egy állófázis ekvivalencia táblázat adatai alapján kiválasztottam a Zorbax SB-C18 és Luna C18 fázisokat, melyek nagyobb hidrofobicitással és nagyobb szelektivitással rendelkeztek. A fázisok nagyobb hidrofobicitása indokolta a gradiens program végső szerves módosító tartalmának csökkentését. Így sikerült elérni, hogy mindhárom vegyület 10 percen belül eluálódott és mindkét állófázison elvált. A másik problémát az ASA alacsony vízoldhatósága jelentette, amely ugyan metanolban és acetonitrilben (ACN) korlátlanul oldódik, de az emiatti szerves tartalom növelés a paracetamol túl korai elúcióját okozta (a holtidőben eluálódott), ellenben a szerves tartalom túlzott csökkentésének hatására az ASA kiválna az oldatból és ez a jelenség a HPLC vezetékeinek elzáródását okozhatja. A végső módszer a két fent említett tényező összehangolásával született meg. A retenció és oldhatóság kö-

zötti ellentétet a gradiens kezdeti szakaszán alkalmazott 7% ACN tartalommal sikerült feloldani. A Zorbax SB-C18 fázison a csúcs-szimmetria és a szelektivitás jobbnak bizonyult, ezért a végső módszer és a validálás során ezt a kolonnát használtam. A magasabb hőmérsékletű elválasztás lehetővé tette, hogy kifejlesszek egy gyors és hatékony módszert, meglehetősen alacsony nyomás-esséssel (a futás során a nyomásesés nem haladta meg a 100 bar-t), mely hosszabb kolonna élettartamot tesz lehetővé. A módszer validálását az érvényes ICH irányelveknek megfelelően végeztem el. Az eredmények megfeleltek az irányelvekben megfogalmazott követelményeknek.

## **II. rész**

A bemutatott adatok alapján elmondható, hogy sikeresen kifejlesztettem és validáltam egy gyors, hatékony és robusztus mintaelőkészítési eljárást és HPLC módszert AMFZ tartalmú kúpok dózis egységességének rendszeres ellenőrzésére. A kúpok előállításánál használható különböző kúpalapokból hármat vettem figyelembe. A módszer kellően egyszerű ahhoz, hogy általánosan használható legyen különböző kúpalapokkal készített AMFZ tartalmú kúpok rendszeres minőségellenőrzésére.

Megfelelő mintaelőkészítési eljárást dolgoztam ki Tween 20 és Tween 60 tartalmú Adeps solidus compositus alapú kúpokra is.

---

Bizonyítottam, hogy micellák képződnek a mintaoldatban és sikeresen destabilizáltam a rendszert 100 mM NaCl, 40 mM NaOH koncentráció és 30 perc UH kezeléssel, hogy a két fizikai-kémiai tulajdonságaiban is eltérő hatóanyagot teljes mértékben felszabadítsam. Amennyiben rendelkezésre áll megfelelő kromatográfias módszer, a kifejlesztett mintaelőkészítési eljárás alkalmazható más felületaktív anyagot tartalmazó kúpalapba foglalt hatóanyag ellenőrzésére is. Ez a probléma ugyanakkor felveti a kérdést, hogy a micella képződés hogyan befolyásolja a hatóanyag felszabadulását terápiás alkalmazás során. Mivel a probléma a mintaelőkészítés során a kúp megolvasztásakor jelentkezik, felmerül a kérdés, hogy ez a jelenség nem okoz-e homogenitási problémákat az ipari öntéses technológiával nagy mennyiségben történő kúpelőállítás során a CMC-nél magasabb tenzid koncentráció tartományban is.

### **III rész**

A magyarországi gyógyszerárakban ismert körülmények között előállított gyermekkúpok vizsgálati eredményei rámutatnak arra, hogy súlyos hibák fordulhatnak elő abban az esetben, ha a kúpkészítési szabályokat figyelmen kívül hagyják. Ezek a technológiai hiányosságok az adagolási egységek hatóanyagtartalmát nagymértékben befolyásolhatják. Ezzel szemben, ha a kúpokat a

helyes gyógyszergyártási gyakorlatot szigorúan követve állítják elő, azok dózis egységessége megfelel az európai gyógyszerkönyv 7,8-as kiadásában megadott követelményeknek. Mivel a magiszt-rális kúpokot gyakran alkalmazzák a közép-európai klinikai gyógyszerészi gyakorlatban azok alacsony költsége miatt, ezért szorgalmazom a *f* használatát a kúpkészítés során, továbbá sokat segítene, ha ezeket az értékeket feltüntetnék az európai és a nemzeti gyógyszerkönyvekben a leggyakrabban alkalmazott hatóanyagokra és kúpalapokra.



---

## 5. Publikációk

### Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

**É. Kalmár**, K. Ueno, P. Forgó, G. Szakonyi, G. Dombi  
Novel sample preparation method for surfactant containing suppositories; effect of micelle formation on drug recovery  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013 (83) 149-156

IF: 2.947\*

**É. Kalmár**, J. Lasher, T. Tarry, A. Myers, G. Szakonyi, G. Dombi, G. Baki and K. Alexander  
Dosage uniformity problems which occur due to technological errors in extemporaneously prepared suppositories in hospitals and pharmacies

*Saudi Pharmaceutical Journal, közlésre elfogadva*

IF: 0.954\*

**É. Kalmár**, A. Gyuricza, E. Kunos-Tóth, G. Szakonyi, G. Dombi  
Simultaneous quantification of paracetamol, acetylsalicylic acid and papaverine with validated HPLC method  
*Journal of Chromatographic Sciences, közlésre elfogadva*

IF: 0.749\*

**É. Kalmár**, B. Kormányos, G. Szakonyi, G. Dombi  
Validated HPLC determination of 4-dimethylaminoantipyrine in fundamentally different suppository bases  
*Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, közlésre elfogadva*

IF: 0.338\*

\* 2012-es adatok

**Az értekezés témájához kapcsolódó előadások****Kalmár É.:**

Kromatográfiai technikák - Gyógyszerfejlesztés analitikai problémái

QP3 Továbbképzés

2013. április 16., Szeged (előadás)

**Kalmár É.:**

Tenzid tartalmú kúpok analitikai problémái és megoldásai

KEN XXXV. Kémiai Előadói Napok

2012. október 29-31., Szeged (előadás)

**É. Kalmár, B. Kormányos, G. Szakonyi, G. Dombi**

Fast efficient and robust UHPLC determination of 4-dimethylaminoantipyrine from different types of suppository vehicles

4<sup>th</sup> ISMCK International Student Medical Congress

2012. június 21-24, Kassa, Szlovákia (előadás)

**É. Kalmár, B. Kormányos, G. Szakonyi, G. Dombi**

Fast and robust HPLC method for aminophenazone assay from distinct suppository bases

TÁMOP- From molecule to drug

2012. május 24-25., Szeged (poszter)

**Kalmár É.:**

Aminofenazon tartalmú magisztrális gyermekkúpok hatóanyag-tartalmának ellenőrzése

X. Clauder Ottó Emlékverseny

2011. október 13-14., Budapest (előadás)