

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie**

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát disertační práce



**Mgr. Jiří Vojta**

*Využití kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze a příprava monolitických  
stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii*

Školitel: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Školitel-konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

Praha, 2015

Tato disertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2011 až 2015 během mého Ph.D. studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43, Praha 2 a za mého působení ve společnosti Zentiva, k.s., U kabelovny 130, 102 37, Praha 10 na pozici PhD Cont.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSMT 0021620857), Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 349511) a projektů SVV Univerzity Karlovy v Praze.

Školitel: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Školitel-konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

## Abstrakt

V rámci první části této práce byly vyvinuty analytické metody pro stanovení nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích. Vývoj metod zahrnoval optimalizaci přípravy vzorků i jejich chromatografického stanovení. Metody byly zvalidovány dle platné mezinárodní směrnice International Conference on Harmonization (ICH) a byla potvrzena jejich aplikovatelnost pro stanovení nečistot ve stabilitních vzorcích léčivých přípravků. Nečistoty paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu v přítomnosti čtvrté účinné látky fenpiverin bromidu byly separovány iontově párovou reverzní chromatografií s gradientovou elucí. Byla použita kolona Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm vyhřátá na teplotu 35 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 220 nm pro nečistotu K paracetamolu, 245 nm pro paracetamol a jeho ostatní nečistoty a 285 nm pro kodein, pitofenon a jejich nečistoty. Pro separaci a stanovení nečistot valsartanu, amlodipin besilátu a hydrochlorothiazidu byla vyvinuta UHPLC metoda v reverzním chromatografickém módu s gradientovou elucí. Byla použita kolona Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm vyhřátá na teplotu 30 °C. Detekční metoda byla zvolena spektrofotometrická s vlnovými délkami 225 nm pro valsartan, jeho nečistoty a nečistotu D amlodipin besilátu, 360 nm a 271 nm pro amlodipin, respektive hydrochlorothiazid a jejich nečistoty.

Ve druhé části práce byly připraveny monolitické stacionární fáze ve formě tenké vrstvy na skleněném nosiči. Polymerizační směsi obsahovaly glycidyl-methakrylát a 2-hydroxyethyl-methakrylát (monomery), ethylenglykol-dimethakrylát (síťovací činidlo), dekan-1-ol, cyklohexan-1-ol, propan-1-ol a butan-1,4-diol (porogenní složky) v různých poměrech a 2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenon (iniciátor). Polymerizace monolitů (UV iniciace, 254 nm) probíhala mezi plexisklovou destičkou a silanizovaným mikroskopickým sklíčkem oddělenými teflonovým těsněním s definovanou tloušťkou 25, 50, 76 a 127 μm. Sledovanými charakteristikami monolitických vrstev byly zejména jejich mechanická odolnost a rychlost vztlínání hexanu v závislosti na složení polymerizační směsi. Vybraná monolitická vrstva byla testována jako stacionární fáze pro hmotnostní detekci s desorpční atmosférickou fotoionizací (DAPPI).

## Obsah

Abstrakt .....	3
Seznam zkratk a symbolů .....	5
Cíle práce .....	7
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	8
1.1 Stanovení obsahu nečistot v kombinovaných léčivých přípravcích .....	8
1.2 Příprava monolitických tenkých vrstev .....	11
<b>2. Výsledky a diskuze</b> .....	12
2.1 Stanovení obsahu nečistot v přípravku Spasmopan® .....	12
2.2 Stanovení obsahu nečistot v tabletách kombinujících amlodipin besilát, valsartan a hydrochlorothiazid .....	17
2.3 Příprava monolitických tenkých vrstev .....	20
<b>3. Závěr</b> .....	25
Literatura .....	26
Životopis .....	31
Seznam publikací, patentů, přednášek a plakátových sdělení .....	32

## Seznam zkratek a symbolů

API	účinná látka
°C	stupeň Celsia
C <sub>18</sub>	oktadecyl
C <sub>8</sub>	oktyl
DAPPI	desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku
DESI	desorpční elektrosprej
DMPAP	2,2-dimethoxy-2-fenyl-acetofenon
<i>d<sub>p</sub></i>	průměr částice
EDMA	ethylenglykol-dimethakrylát
GMA	glycidyl-methakrylát
HEMA	2-hydroxyethyl-methakrylát
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICH	International Conference on Harmonization
LC	kapalinová chromatografie
$\lambda$	vlnová délka
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
<i>M</i>	molární koncentrace
<i>mM</i>	milimolární koncentrace
<i>M<sub>r</sub></i>	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
mg	miligram
min	minuta
mm	milimetr
mmol/L	milimol na litr
mL	mililitr
mL/min	mililitr za minutu
$\mu\text{m}$	mikrometr
$\mu\text{L}$	mikrolitr

nečistota 07.....	(S)-2-(N- {[2'-kyanobifenyl-4-yl]methyl} pentanamido)-3-methylbutanová kyselina
nečistota 09.....	(S)-3-methyl-2- {[2'-(1H-tetrazol-5-yl)bifenyl-4-yl]methylamino} butanová kyselina
nečistota KHBB.....	2-(4-hydroxybenzoyl) benzoová kyselina
nečistota MeKHBB.....	methyl ester 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoové kyseliny
nečistota X.....	2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl] benzoová kyselina
nečistota PEE.....	2-(1-piperidinyl)-ethyl ester 2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzoyl]benzoové kyseliny
nm.....	nanometr
NMR.....	nukleární magnetická resonance
Ph. Eur.....	Evropský lékopis
<i>R</i> .....	chromatografické rozlišení
<i>t</i> .....	čas
TLC.....	tenkovrstvá chromatografie
TOF.....	analyzátor doby letu
U.....	napětí
UHPLC.....	ultra účinná kapalinová chromatografie
USP.....	Americký lékopis
UV.....	ultrafialová oblast spektra
% hm. ....	procento hmotnosti

## Cíle práce

Cílem první části této práce byl vývoj analytických metod pro stanovení nečistot účinných látek v kombinovaných léčivých přípravcích. Pro tento účel byly vybrány dva léčivé přípravky:

- Spasmopan<sup>®</sup>, léková forma čípky kombinující účinné látky paracetamol v obsahu 500 mg, kodein fosfát hemihydrát v obsahu 19,2 mg, pitofenon hydrochlorid v obsahu 10 mg a fempiverin bromid v obsahu 0,1 mg na jeden čípek.
- Potahované tablety kombinující účinné látky valsartan v obsahu 320 mg, amlodipin besilát v obsahu 10 mg a hydrochlorothiazid v obsahu 25 mg na jednu potahovanou tabletu.

Vývoj metod zahrnoval paralelní optimalizaci přípravy vzorku a chromatografických podmínek. Při přípravě vzorku byly nejdůležitějšími faktory výtěžnost, opakovatelnost, stabilita analytů, kompatibilita s chromatografickými podmínkami, jednoduchost a časová nenáročnost. Vlastní chromatografické metody byly optimalizovány z hlediska selektivity, preciznosti, přesnosti, rozsahu, citlivosti, robustnosti a byly zvalidovány dle platné mezinárodní směrnice ICH. Vhodnost metod pro stabilitní studie léčivých přípravků byla potvrzena analýzou expirované šarže Spasmopanu<sup>®</sup> a degradační studie v případě potahovaných tablet.

Cílem druhé části práce byla příprava monolitických stacionárních fází pro tenkovrstvou chromatografii s hmotnostní detekcí analytů pomocí desorpční fotoionizační techniky DAPPI. Na základě publikovaných prací byl vyvinut postup přípravy monolitických tenkých vrstev v podmínkách naší laboratoře. Monolity byly připraveny na bázi methakrylátu z důvodu možnosti iniciace UV zářením a předpokládaného použití v normálním chromatografickém módu. Klíčovými sledovanými parametry byla mechanická odolnost nutná pro desorpční ionizační techniku a rychlost vztlínání mobilní fáze umožňující chromatografickou analýzu.

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Stanovení obsahu nečistot v kombinovaných léčivých přípravcích

Kapalinová chromatografie (LC) je dnes nejčastěji používanou metodou ve farmaceutické analýze pro stanovení obsahu a čistoty účinných látek jak samotných, tak i jako složek v léčivých přípravcích [1]. Masivní rozvoj HPLC v druhé polovině 20. století vedl ke standardizaci této metody ve farmaceutické analýze a zejména díky její selektivitě a citlivosti umožnil zvýšit nároky na kvalitu léčiv. Metodika LC, včetně požadavků na chromatografický systém, zahrnující parametry HPLC i UHPLC, je obecně popsána v Evropském lékopisu [2].

Zkouška čistoty účinných látek (API) a léčivých přípravků je v dnešní době jednou ze základních součástí kompletní farmaceutické analýzy a jako taková je vyžadována registračními autoritami. Podle směrnice ICH lze nečistoty v léčivech a léčivých přípravcích rozdělit na organické, anorganické a zbytková rozpouštědla [3]. Anorganické nečistoty (např. těžké kovy, soli) a zbytková rozpouštědla (např. acetonitril, methanol, aceton) jsou zpravidla známé látky (i toxikologicky) vstupující do syntézy a výroby. Na stanovení těchto nečistot lze tedy po verifikaci aplikovat standardizované postupy a limity uvedené v lékopisech a z pohledu analytické chemie jsou tyto nečistoty výrazně menším problémem než nečistoty organické [4, 5].

Organické nečistoty jsou převážně vstupní reaktanty, meziprodukty, vedlejší produkty a degradační produkty. Struktura nečistot může být odvozena z předpokládané syntetické cesty. Směrnice ICH udávají postup pro výpočet identifikačního a kvalifikačního limitu. Pokud se nečistota vyskytuje nad daným limitem, musí být exaktně identifikována, případně musí být kvalifikována její biologická bezpečnost [3, 6]. Pokud je API uvedena v lékopisu zpravidla jsou u ní uvedeny i nečistoty určité syntetické cesty a případně i degradační produkty a jejich limity [7 - 11]. Rozdílné postupy syntézy, složení a formulace konečných léčivých přípravků u jednotlivých výrobců však znamenají, že vždy je nutné lékopisnou metodu verifikovat pro danou API a ve většině případů vyvinout a zvalidovat metodou vlastní.



Spasmopan<sup>®</sup> je léčivý přípravek kombinující v čípkové lékové formě čtyři účinné látky: paracetamol, kodein fosfát hemihydrát, pitofenon hydrochlorid a fempiverin bromid. Spasmopan<sup>®</sup> se užívá na tlumení bolestivých křečí trávicího traktu a močového měchýře. Kombinuje analgetické a antipyretické účinky paracetamolu [12] s analgetickými a antimotolickými účinky kodeinu [13] a spasmolytickými účinky pitofenonu a fempiverinu [14]. Český, Evropský, Britský, Americký i Japonský lékopis obsahují monografie pouze pro paracetamol a kodein fosfát hemihydrát [7 - 11].

Paracetamol je obecně používán ve vysokých dávkách a může být hepatotoxický [15]. Lékopisné limity pro jeho nečistoty 4-aminofenol, 4-nitrofenol a 4-chloracetanilid jsou tedy velmi nízké (0,005 %, 0,05 % a 0,001 %) [7 - 11]. V lékových formách musí být kontrolován především obsah nefrotoxického 4-aminofenolu [16] jako hlavního degradačního produktu paracetamolu [17]. Přestože paracetamol byl analyzován mnoha různými metodami jako micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC) [18], mikroemulzní kapalinovou a elektrokinetickou chromatografií [19], fluorimetrickou spektroskopií [20, 21], NMR [22, 23] a TLC [24, 25], HPLC metody s UV spektrometrickou detekcí byly pravděpodobně nejčastěji používanými [26 - 31]. Pro chromatografické stanovení 4-aminofenolu byla rovněž použita ampérometrická detekce [32]. Byly vyvinuty stabilitu indikující HPLC metody na kvantifikaci účinných látek pro kombinace kodein fosfátu, paracetamolu a chlorfeniraminu [10, 33 - 35] a pro analýzu kombinace ibuprofenu, kodeinu a jejich nečistot byla validována MEKC metoda [36]. Jelikož metoda na stanovení čistoty kodeinu je definována lékopisně, a přestože neseparuje nečistoty 10-hydroxykodein a morfin [8], výzkum byl soustředěn na stanovení kodeinu samotného, především ve směsi alkaloidů [37 - 41]. Pitofenon hydrochlorid byl analyzován pouze jako součást screeningových testů [42 - 45] a obsahovými metodami spektrofotometrickými [46, 47] a chromatografickými [48 - 51]. Na rozdíl od paracetamolu a kodeinu, metoda na stanovení čistoty pitofenonu nebyla dosud publikována.

Vysoký krevní tlak je jedním z globálních zdravotních problémů dnešní doby. Je klíčovým faktorem způsobujícím infarkt myokardu a mozkovou mrtvici, a nepřímým způsobem také způsobuje úmrtí 9,4 milionu lidí ročně po celém světě [52]. U většiny pacientů léčba kombinující více přístupů ke snížení hypertenze přináší lepší kontrolu krevního tlaku než terapie pouze jednou účinnou látkou [53]. Valsartan působí jako antagonist angiotensinového receptoru II v renin-angiotensinovém systému, jeho přítomností dochází k vazodilataci a snížení krevního tlaku. Hydrochlorothiazid se řadí do skupiny diuretik a snižuje krevní tlak prostým snížením celkového objemu tekutiny v těle [12]. Amlodipin rovněž způsobuje vazodilatační efekt, ovšem skrze blokaci kalciových kanálů [54].

Všechny tři API jsou široce používané a příslušné lékopisy obsahují jejich monografie definující HPLC metody pro stanovení jejich čistoty [7 - 11]. Pro léčivé přípravky kombinující valsartan, amlodipin a hydrochlorothiazid byly dosud publikovány pouze HPLC metody na stanovení obsahu účinných látek [55]. Retenční pořadí těchto tří API v reverzní chromatografii závisí na pH pufru v mobilní fázi. V silně kyselém pH hydrochlorothiazid eluuje jako první, následuje amlodipin a nakonec valsartan [56 - 64]. Při použití pufru s mírně kyselým nebo neutrálním pH se retenční pořadí amlodipinu a valsartanu obrátí [65 - 68]. V závislosti na konkrétní metodě v neutrálním nebo zásaditém prostředí se retence valsartanu sníží natolik, že eluuje jako první, hydrochlorothiazid pak jako druhý a amlodipin jako poslední [69, 70]. Pouze dvě obsahové metody byly publikovány jako stabilitu indikující, přestože nebyla poskytnuta data o spektrální čistotě píků či identifikace degradačních produktů [57, 71]. Obsah amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu v trojkombinaci byl stanoven i spektrofotometrickými metodami [63, 72 - 74]. Stabilitu indikující metoda na stanovení obsahu nečistot a žádná UHPLC metoda obecně dosud nebyla publikována pro trojkombinaci účinných látek valsartan, hydrochlorothiazid, amlodipin [55]. V USP bude pravděpodobně uvedena příslušná monografie s HPLC metodou, aktuální verze však obsahuje informaci pouze o separační koloně a žádné další detaily [9].

## 1.2 Příprava monolitických tenkých vrstev

Tenké vrstvy jsou jedním ze směrů stále se rozvíjející chemie a technologie monolitických stacionárních fází [75]. Monolitické stacionární fáze jsou moderní separační média s všestrannou aplikační oblastí. Na rozdíl od sférických stacionárních fází jsou vytvořeny z jednoho kusu pórovitého materiálu, který zcela vyplňuje tělo kolony či kanálek čipu.

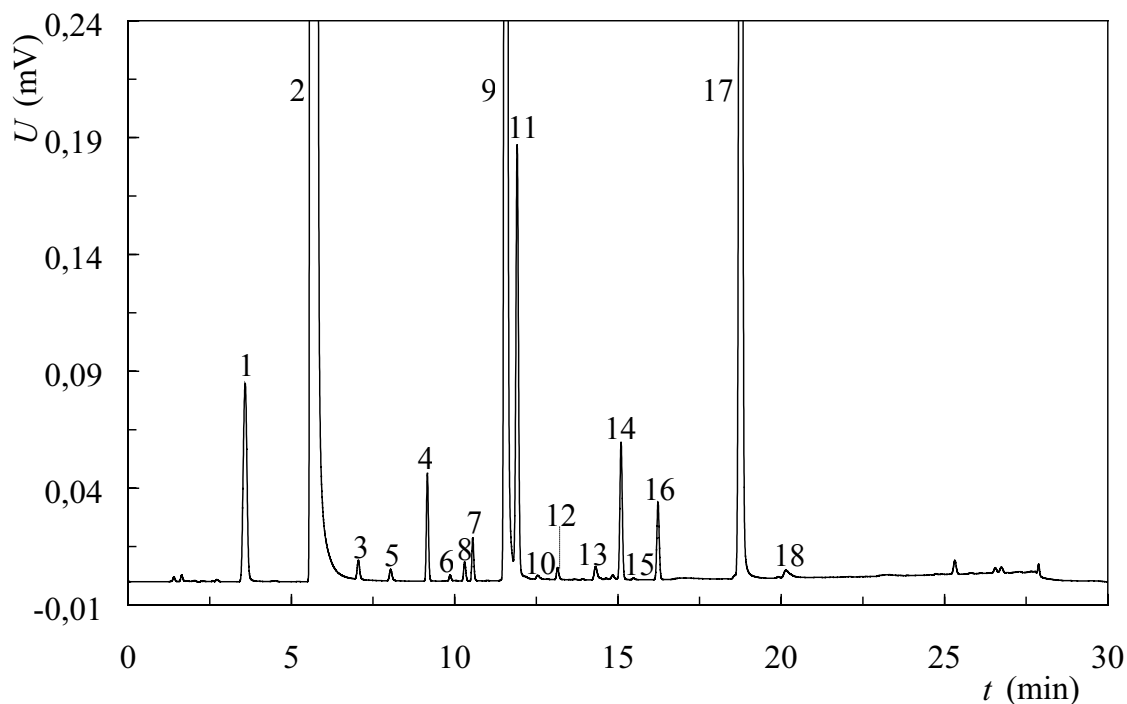
Příprava organických monolitů pro tenkovrstvou chromatografii započala až v roce 2004, kdy Švec, Fréchet a kol. představili vzorkovací destičku modifikovanou zpolymerizovanými monolity pro MALDI-TOF detekci [76]. Monolitická fáze oproti klasické matici (2,5-dihydroxybenzoová kyselina) poskytovala méně interferující pozadí pro ionizaci malých molekul a delší trvanlivost vzorkovací destičky v porovnání se silikagelovou maticí [76]. V roce 2007 pak byla popsána příprava monolitické tenké vrstvy na bázi methakrylátu mezi dvěma sklíčky oddělenými teflonovým těsněním [77]. Polymerizace byla iniciována UV zářením. Složení polymerizační směsi (butylmethakrylát 24 %, ethylen dimethakrylát 16 %, dekan-1-ol 40 % a cyklohexanol 20 %) bylo převzato z přípravy kapilárních kolon. Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu však odhalila rozdílnou morfologii svrchní vrstvy monolitu, která byla v kontaktu s nemodifikovaným krycím sklíčkem. Oproti globulární struktuře v jeho středu byla svrchní vrstva monolitu na pohled kompaktní a méně porézní [77].

Hladký povrch monolitu byl vhodný pro separaci a následnou ionizaci barviv a makromolekul technikou MALDI [77], ale jeho úhel smáčení vodou byl  $77^\circ$  [78]. Požadovaných superhydrofóbních vlastností povrchu bylo dosaženo při použití silanizovaného krycího sklíčka. V tomto případě byl povrch monolitu hrubý s globulární strukturou a úhel smáčení byl  $154^\circ$ . Přestože obě sklíčka tvořící formu byla silanizována, monolit byl přednostně přichycen ke sklíčku, které bylo blíže ke zdroji UV záření, zatímco na krycím sklíčku zůstal pouze slabý film monolitu. Monolit byl dále z části modifikován hydrofilními monomery a použit pro dvoudimenzionální chromatografii peptidů s ionizací technikou DESI a MS detekcí [78]. Obdobným postupem byly pro spojení TLC-MS připraveny monolity i na bázi glycidylmethakrylátu [79] a styrenu [80].

## 2. Výsledky a diskuze

### 2.1 Stanovení obsahu nečistot v přípravku Spasmopan®

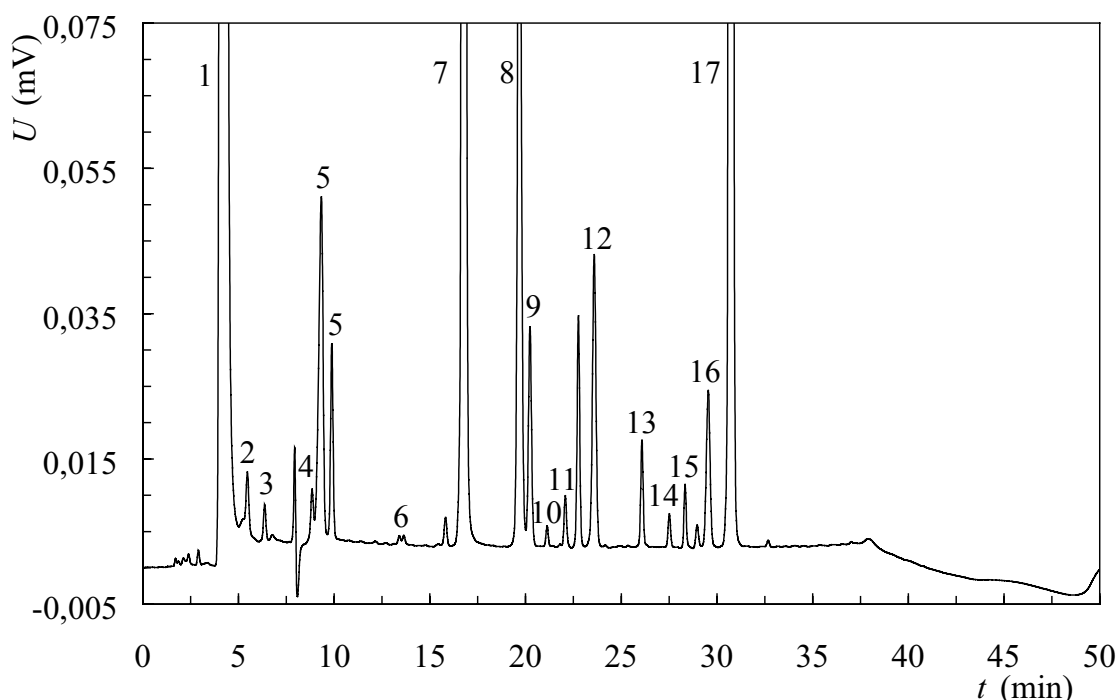
Přestože lékopisné metody na stanovení nečistot paracetamolu a kodeinu jsou založeny na iontové párové chromatografii [8, 9], prvotním záměrem byl vývoj rychlé chromatografické metody bez iontově párového činidla z důvodu jeho potenciálních interferujících nečistot. K vývoji metody byl použit vzorek připravený ze dvou čípků Spasmopanu® rozpuštěných v 50% acetonitrilu (viz dále) a spikovaný nečistotami paracetamolu F, J, K (dle Ph. Eur. [8]) a pitofenonu KHBB, MeKHBB, X a PEE (viz seznam zkratek). Nečistoty kodein fosfát hemihydrátu A, C a E (dle Ph. Eur. [8]) byly ve vzorku obsaženy z jeho výroby. Rozdělení všech nečistot a účinných látek bylo dosaženo při použití separační kolony ACE 3 C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm, 3 μm a gradientové eluce 10mM fosforečnanového pufru o pH 7,0, acetonitrilu a methanolu. Chromatografický záznam a instrumentální podmínky této analýzy jsou uvedeny na obrázku 1. Předběžné testování metody však prokázalo její nerobustnost zejména s ohledem na změny pH pufru ( $\pm 0,1$ ) a obsahu methanolu během gradientového programu ( $\pm 2$  %). Jelikož všechny složky vzorku byly separovány během 20 minut, oddělení píků v kritických oblastech (píky 4 - 7 a 9 - 14, obr. 1) bylo dosaženo pouze za specifických podmínek. Při použití této metody byl navíc pík nečistoty PEE pitofenonu výrazně rozmytý (USP tailing factor = 2.2). Za stejných instrumentálních podmínek byly testovány i další separační kolony srovnatelných rozměrů (Gemini C<sub>18</sub>, YMC ODS-A, Zorbax ODS-A, Kinetex C<sub>18</sub> a Zorbax Eclipse C<sub>18</sub>), ale všechny poskytly eluční profily podobné koloně ACE 3, ovšem s některými neoddělenými analyty. Jediná kolona, která poskytla výrazně odlišnou selektivitu (zejména pro nečistoty paracetamolu), byla Zorbax Aqua C<sub>18</sub>, avšak při jejím použití nebyla oddělena většina analytů.



**Obr. 1** Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu J (hladina 0,2%), F (hladina 0,3 %) a K (hladina 0,2%) a nečistotami pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE na hladině 0,2 %. Analyzováno na HPLC systému Waters Alliance 2695. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: ACE 3 (C<sub>18</sub>) 150 x 4,6 mm, 3 μm. Teplota kolony: 25 °C. Objem nástřiku: 5 μL. Detekce: UV, λ = 225 nm. Mobilní fáze: 10mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufr o pH 7,0. Průtok: 0,8 mL/min. Gradient: [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)] 0/5/5, 5/15/5, 25/85/0, 26/5/5, 35/5/5. Identifikace píků: 1 - nečistota K, 2 - paracetamol, 3, 5, 8 - neznámé nečistoty paracetamolu, 4 - nečistota KHBB, 6 - nečistota E, 7 - nečistota X, 9 - kodein, 10 - nečistota C, 11 - nečistota F, 12 - fempiverin, 13 - nečistota A, 14 - nečistota J, 15 - neznámá nečistota kodeinu, 16 - nečistota MeKHBB, 17 - pitofenon, 18 - nečistota PEE. Neidentifikované píky pocházejí z rozpouštědla vzorku a mobilní fáze.

Jelikož vývoj metody v reverzním chromatografickém módu nebyl úspěšný, byla testována iontově párová chromatografická metoda pro analýzu léčivého přípravku kombinujícího pouze paracetamol a kodein [nepublikovaná data]. Analýza byla provedena na koloně Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 μm) při 35 °C s gradientovou elucí pufru o pH 2,5 z oktansulfonátu sodného (1,33 g/L) a kyseliny fosforečné, acetonitrilu a methanolu dle programu [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. Při aplikaci této metody však většina píků spikovaného vzorku nebyla rozdělena, jelikož téměř všechny analyty eluovaly v rozmezí 26. a 44. minuty.

Z podmínek metody byla zachována kolona, její teplota a pufr a byl měněn gradientový program. Několik kritických separačních párů jako například nečistota K paracetamolu a jeho minoritní neznámá nečistota, nečistoty kodeinu C a A a fempiverin a nečistota X pitofenonu byly během vývoje sledovány pro dosažení dostatečného rozlišení. Gradient s počátečními podmínkami obsahujícími 80 % pufru vedl ke slabé retenci nečistoty K paracetamolu, která koeluovala s píky z rozpouštědla vzorku a další neznámou nečistotou paracetamolu. Srovnatelně s metodou v reverzním chromatografickém módu byla retence kodeinu a jeho nečistot velmi závislá na poměru methanolu a acetonitrilu v mobilní fázi (větší objem methanolu vedl k silnější retenci). Po testování několika gradientových programů byly vyvinuty finální podmínky metody s gradientovým programem, který oproti výchozí metodě neobsahoval methanol a jeho první polovina byla strmější. Všechny nečistoty byly dostatečně separovány ( $R \geq 1,7$ ), přičemž rozdíl od chromatografie v reverzním módu bylo dosaženo lepšího tvaru píků všech nečistot ( $1,0 \leq \text{USP tailing factor} \leq 1,1$ ). Na obrázku 2 je znázorněn chromatogram spikovaného vzorku analyzovaného za konečných chromatografických podmínek.



**Obr. 2** Analýza vzorku Spasmopanu® spikovaného nečistotami paracetamolu F, J a K a pitofenonu KHBB, X, MeKHBB a PEE na hladině 0,2 %. Rozpouštědlo vzorku: 50% acetonitril. Kolona: Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm. Teplota kolony: 35 °C. Objem nástřiku: 10 μL. Detekce: UV, λ = 220 nm. Mobilní fáze: složka A - pufr: oktansulfonát sodný monohydrát (1,44 g/L), pH 2,5 upraveno 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; složka B - acetonitril; složka C - methanol. Průtok: 1,0 mL/min. Gradientová eluce [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. Identifikace píků: 1 - paracetamol, 2, 3, 4 - neznámé nečistoty paracetamolu, 5 - nečistota K, 6 - nečistota E, 7 - kodein, 8 - nečistota F, 9 - nečistota KHBB, 10 - nečistota C, 11 - nečistota A, 12 - nečistota J, 13 - nečistota X, 14 - nečistota MeKHBB, 15 - fenpiverin, 16 - nečistota PEE, 17 - pitofenon.

Píky nečistoty K paracetamolu a nečistoty E kodeinu byly deformovány z důvodu použití 50% acetonitrilu jako rozpouštědla vzorku. Při použití kompatibilního rozpouštědla byly píky jednolité v retenčních časech druhých vrcholů, a v případě nečistoty K tak lépe oddělné od neznámé nečistoty paracetamolu (pík číslo 4, obr. 2). Pík před touto neznámou nečistotou pocházel z rozpouštědla vzorku a vymizel po přidání oktansulfonátového pufru do rozpouštědla vzorku a ekvilibraci kolony. Neoznačený pík mezi nečistotami A kodeinu a J paracetamolu (píky číslo 11, 12, obr. 2) byl identifikován jako degradační nečistota ze standardu nečistoty F. Tento degradační produkt se v čerstvě připraveném vzorku nevyskytoval. V tomto retenčním čase standardně eluovala neznámá nečistota kodeinu (pík číslo 15, obr. 1). Selektivita

metody pro nečistotu B kodeinu (eluuující před nečistotou E) byla ověřena až před vlastní validací z důvodu nedostupnosti referenčního materiálu. Ostatní neidentifikované píky pocházely z rozpouštědla vzorku a mobilní fáze. Na základě UV spekter byly zvoleny detekční vlnové délky 220 nm pro nečistotu K, 245 nm pro paracetamol a jeho nečistoty a 285 nm pro kodein, pitofenon a jejich nečistoty.

Čípek je z hlediska analýzy komplikovanou lékovou formou, jelikož obsahuje značné množství nepolárních složek placeba, které musí být odstraněny z důvodu ochrany separační kolony. Jelikož čípky tají při 37 °C, k rozpuštění vzorku v rozpouštědle (voda/organická složka) byla použita vyhřátá ultrazvuková lázeň. Vzorek byl následně ochlazen po dobu 1 hodiny při 4 °C pro precipitaci složek placeba. Jako rozpouštědlo vzorku byl testován čistý methanol, acetonitril, isopropanol a jejich směsi s vodou v poměru 1:1. Směs acetonitrilu a vody poskytla nejvyšší účinnost a zároveň při jejím použití došlo ke kompletní precipitaci složek placeba na rozdíl od vzorků připravených v čistých rozpouštědlech. Poměr vody a acetonitrilu byl změněn na 8:2, ve kterém již nebyly deformovány píky nečistot K paracetamolu a E kodeinu. Snížení obsahu acetonitrilu však vedlo k delšímu času (2,5 hodiny) potřebnému pro precipitaci placeba při 4 °C.

Následně byl tedy vyvinut postup obsahující odstranění složek placeba vytřepáním rozpuštěného vzorku do hexanu. Dva čípky byly nejprve rozpuštěny v ultrazvukové lázni při 37 °C v 10 mL 50% acetonitrilu. Vzorek byl následně třepán s 20 mL hexanu a naředěn 15 mL vody tak, aby vodná fáze obsahovala 20 % acetonitrilu. Nebyl pozorován kvantitativní rozdíl mezi vzorky připravenými oběma metodami odstranění placeba. Pro vyrovnání základní linie a zvýšení výtežnosti byla voda nahrazena oktansulfonátovým pufrům o pH 2,5 z mobilní fáze. Rozpouštědlo vzorku připravené z pufru o tomto pH zapříčinilo nestabilitu paracetamolu, který hydrolyzoval na nečistotu K. Při použití pufru o hodnotě pH 3,5 a vyšší, však obsah nečistoty K klesal z důvodu jejího vlastního rozkladu. Nečistota K byla stabilní pouze v 50% methanolu jako rozpouštědle vzorku. V tomto případě však nebyl stabilní kodein a obsah jeho nečistoty C narůstal velmi rychle (nárůst plochy píku o 54 % za 6 hodin). Nakonec byl zvolen pufr o hodnotě pH 3,0 pro přípravu rozpouštědla vzorku, při jehož



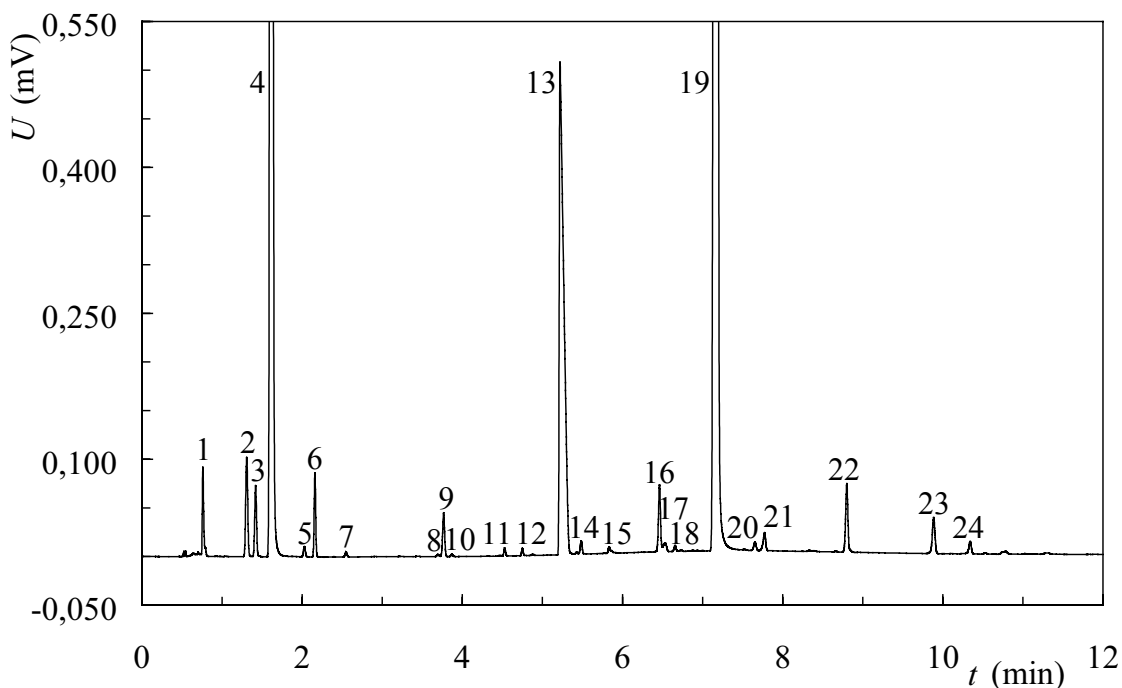
použití byl vzorek stabilní po dobu 24 hodin při 10 °C. Vyvinutou metodou byl analyzován vzorek Spasmopanu® čtyři roky po jeho výrobě (dva roky po expiraci). Porovnáním výsledků této analýzy s analýzami vstupních surovin pro tuto konkrétní šarži byla nečistota X potvrzena jako hlavní degradační produkt pitofenonu, jelikož její obsah se zvýšil o 0,3 %. Žádné další významné degradanty ve vzorku identifikovány nebyly, čímž byla prokázána stabilita paracetamolu a kodeinu v čípkové lékové formě. Test na spektrální čistotu píků byl v expirovaném vzorku vyhovující pro všechny čtyři účinné látky. Metoda tedy byla vhodná pro analýzu stabilitních vzorků Spasmopanu®. Analytická metoda byla zvalidována dle směrnice ICH [81] v rozsahu 0,003 % - 0,017 % pro nečistotu K paracetamolu; 0,05 % - 0,17 % pro ostatní neznámé nečistoty paracetamolu; 0,10 % - 1,51 % pro nečistotu A kodeinu; 0,10 % - 0,65 % pro nečistoty B a E kodeinu; 0,10 % - 0,40 % pro nečistotu C kodeinu a 0,10 % - 0,30 % pro ostatní neznámé nečistoty kodeinu; 0,10 % - 0,65 % pro nečistotu X pitofenonu a 0,10 % - 0,30 % pro ostatní neznámé nečistoty pitofenonu.

## **2.2 Stanovení obsahu nečistot v tabletách kombinujících amlodipin besilát, valsartan a hydrochlorothiazid**

Vývoj metody na stanovení obsahu nečistot amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu byl založen na separačním mechanismu v reverzní fázi. Byla zvolena gradientová eluce pufru v kyselé oblasti pH a acetonitrilu. Metody pro stanovení jednotlivých API v této kombinaci byly publikovány při použití pufrů z celé škály hodnot pH. V kyselé oblasti bylo dosaženo píků s nejlepší symetrií. Pro vývoj metody byl použit vzorek tablet rozpuštěných pomocí ultrazvukové lázně v 60% methanolu a spikovaný nečistotami A, B, C, hydrochlorothiazidu (dle Ph. Eur [8]), nečistotami A, B, D, E, F, G amlodipin besilátu (dle Ph. Eur [8]) a nečistotami valsartanu B a C (dle Ph. Eur. [8]) a 07 a 09 (viz seznam zkratek). Pro dosažení dostatečné retence polárního hydrochlorothiazidu a jeho nečistot musel gradientový program začínat na nízkém obsahu acetonitrilu. První slibné separace všech nečistot bylo dosaženo na koloně Acquity UPLC BEH C<sub>8</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) při 25 °C s gradientovou elucí 10 mM fosforečnanového pufru o pH 2,5 a acetonitrilu. Gradient

začínal na obsahu 95 % pufru a 5 % acetonitrilu a obsah acetonitrilu lineárně vzrůstal za 7 minut na 65 % při průtoku 0,4 mL/min. Dávkován byl 1,0 µL vzorku. Za těchto podmínek však nebylo dosaženo dostatečné citlivosti pro amlodipin a jeho nečistoty. Při použití dvojnásobného objemu nástřiku vzorku došlo k deformaci píků hydrochlorothiazidu a jeho nečistot B a A eluujících na počátku chromatogramu. Metoda také uspokojivě neseparovala všechny studované analyty. Nečistota B amlodipinu eluovala na chvostu píku valsartanu (píky číslo 19 a 20, obr. 3), ale tato částečná koeluce by byla vyřešena použitím rozdílných vlnových délek pro valsartan (225 nm) a amlodipin (360 nm). Minoritní neznámé nečistoty (obsah < 0,05 %) valsartanu koeluovaly s amlodipinem a částečně i s valsartanovou nečistotou C (píky číslo 13, 14 a 16, 17, obr. 3).

Zvýšení obsahu acetonitrilu v počátečních podmínkách na 10 % či 15 % vedlo ke koeluci nečistot B a A hydrochlorothiazidu a nemělo pozitivní vliv na jejich deformaci při objemu nástřiku 2,0 µL. Vyšší obsah acetonitrilu vedl ke koeluci nečistot hydrochlorothiazidu A a B. Dostatečného rozdělení všech analytů bylo dosaženo zpomalením nárůstu obsahu acetonitrilu během gradientového programu, zvýšením teploty na 30 °C a použitím kolony Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD (100 x 3,0 mm, 1,8 µm). Větší průměr a objem kolony umožnily zvýšení objemu nástřiku vzorku, a tak dosažení dostatečné citlivosti metody. Detekční vlnové délky byly zvoleny na základě UV spekter: 225 nm pro valsartan jeho nečistoty a nečistotu D amlodipinu, 360 nm pro amlodipin a jeho ostatní nečistoty a 271 nm pro hydrochlorothiazid a jeho nečistoty. Použitím různých vlnových délek byla zvýšena selektivita metody především pro analýzu amlodipinových nečistot, jelikož valsartan prakticky neabsorbuje záření o vlnové délce 360 nm. Při stanovení nečistot amlodipinu tedy byly prakticky eliminovány minoritní nečistoty valsartanu (obsah < 0,05 %), jejichž zastoupení je v praxi velmi variabilní dle konkrétní šarže API. Na obrázku 3 je znázorněn chromatogram spikovaného vzorku analyzovaného výslednou chromatografickou metodou.



**Obr. 3** Chromatogram analýzy vzorku tablet kombinujících amlodipin besilát (AMLO), valsartan (VALS) a hydrochlorothiazid (HCTZ) spikovaný nečistotami A, B, C (HCTZ) na hladině 1,0 %, nečistotami A, B, D, E, F, G (AMLO) na hladině 0,2 %, respektive 0,5 % pro nečistotu D a nečistotami B, C, 07 a 09 (VALS) na hladině 0,2 %, respektive 0,3 % pro nečistotu C. Rozpouštědlo vzorku: 1,6%  $H_3PO_4$ , acetonitril, methanol v objemovém poměru 4/3/3. Analyzováno na systému Waters UPLC H-Class. Kolona: Zorbax Eclipse  $C_8$  RRHD 100 x 3,0 mm, 1,8  $\mu m$ . Teplota kolony: 30 °C. Detekce: UV,  $\lambda = 225$  nm. Mobilní fáze: 10 mmol/L  $NH_4H_2PO_4/H_3PO_4$  pH 2,5 a acetonitril dle gradientového programu [t(min)/acetonitril(%)]: 0/15, 11/75, 12/75, 12,5/15 a 15/15. Průtok: 0,8 mL/min. Objem nástřiku: 2,0  $\mu L$ . Identifikace píků: 1 - besilát (AMLO), 2 - nečistota B (HCTZ), 3 - nečistota A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5,7,8 - neznámé nečistoty (HCTZ), 6 - nečistota 09 (VALS), 9 - nečistota C (HCTZ), 10, 14, 17, 18 - neznámé nečistoty (VALS), 11 - nečistota D (AMLO), 12 - nečistota F (AMLO), 13 AMLO, 15 - nečistota E (AMLO), 16 - nečistota C (VALS), 19 - VALS, 20 - nečistota B (AMLO), 21 - nečistota G (AMLO), 22 - nečistota 07 (VALS), 23 - nečistota B (VALS), 24 - nečistota A (AMLO). Neidentifikované píky pocházejí z rozpouštědla vzorku a mobilní fáze.

V prvotně použitém rozpouštědle vzorku (60% methanol) byl hydrochlorothiazid nestabilní, jelikož obsah jeho nečistoty B narůstal velmi rychle (nárůst 65 % plochy píku za 18 hodin při laboratorní teplotě). Zároveň byla v tomto rozpouštědle výtěžnost nečistoty C hydrochlorothiazidu pouze 49 % při měření na hladině 0,1 %. Hydrochlorothiazid byl stabilizován použitím 1,6%  $H_3PO_4$  místo vody v 60%

methanolu. Výtěžnost nečistoty C se zvýšila na 100 % při použití 80% methanolu či 60% acetonitrilu jako rozpouštědel vzorku. V těchto případech ovšem došlo k deformaci píků nečistot B a A hydrochlorothiazidu vlivem eluční síly rozpouštědel. Kombinací obou přístupů bylo vyvinuto konečné rozpouštědlo vzorku obsahující 1,6% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, acetonitril a methanol v objemovém poměru 4/3/3. Při použití tohoto rozpouštědla byl vzorek stabilní po dobu 48 hodin při 10 °C a výtěžnost nečistoty C byla 100 % na hladině 0,1 %.

Vhodnost metody pro analýzu stabilitních vzorků byla ověřena provedením cílené degradační studie. Vzorky zhomogenizovaných tablet byly vystaveny dennímu světlu (18 hodin pro již rozpuštěný vzorek), zvýšené teplotě (65 °C, 18 hodin) a vlhkosti (65 °C, 1 mL H<sub>2</sub>O, 18 hodin) a kyselému (50 °C, 3 mL 0,5M HCl, 2 hodiny), zásaditému (50 °C, 2 mL 0,2M NaOH, 2 hodiny) a oxidačnímu (50 °C, 3 mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 hodiny) prostředí. Degradační produkty byly uspokojivě separovány ( $R \geq 1,2$ ) a test spektrální čistoty píků účinných látek byl ve všech případech vyhovující. Byly potvrzeny hlavní degradační produkty jednotlivých účinných látek (nečistota B hydrochlorothiazidu, nečistota D amlodipinu a nečistota 09 valsartanu).

Analytická metoda byla zvalidována dle směrnice ICH [81] v rozsahu 0,05 % - 1,20 % pro nečistoty A a B hydrochlorothiazidu, 0,10 % - 1,24 % pro nečistotu C hydrochlorothiazidu a 0,05 % - 0,30 % pro ostatní neznámé nečistoty hydrochlorothiazidu, 0,10 % - 0,66 % pro nečistotu D amlodipinu a 0,10 % - 0,30 % pro ostatní neznámé nečistoty amlodipinu, 0,05 % - 0,41 % pro nečistotu C valsartanu a 0,05 % - 0,30 % pro ostatní neznámé nečistoty valsartanu.

### **2.3 Příprava monolitických tenkých vrstev**

Monolitické stacionární fáze byly připraveny na broušených mikroskopických sklíčkách o rozměrech 76 x 21 x 1 mm. Druhou část formy tvořilo extrudované akrylátové plexisklo Plexiglas XT o tloušťce 3 mm nařezané na destičky o rozměrech 76 x 21 mm. K oddělení sklíčka a plexisklové destičky bylo použito těsnění Teflon FEP o tloušťkách 25, 50, 76 a 127 μm nařezané na proužky o rozměrech 85 x 4 mm. Části formy byly k sobě upevněny po stranách s těsněním čtyřmi kancelářskými svorkami.

Krycí část formy musela být z plexiskla, jelikož při použití mikroskopického podložního skla (silanizovaného i nesilanizovaného), se monolitické vrstvy navazovaly na obě části formy. Po polymerizaci nebylo možné formu rozebrat bez poničení monolitické fáze. V první fázi přípravy bylo mikroskopické podložní sklíčko silanizováno, aby se k němu mohl kovalentně navázat vznikající monolit. Sklíčko bylo nejprve vloženo do 1M roztoku NaOH ve vodě při laboratorní teplotě na dobu 3 hodiny. Poté bylo důkladně opláchnuto vodou, vloženo na 30 minut do vodného roztoku 0,5M HCl, znovu důkladně opláchnuto vodou a vysušeno při 120 °C po dobu 60 minut. Suché sklíčko bylo ponořeno na 2 hodiny do 20% roztoku 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátu v methanolu. Reakce proběhla při laboratorní teplotě a za nepřístupu světla. Silanizované sklíčko bylo důkladně opláchnuto methanolem a vodou a vysušeno za nepřístupu světla při laboratorní teplotě po dobu minimálně 16 hodin. Nebylo-li sklíčko důkladně opláchnuto vodou, zůstaly na něm rezidua ze silanizační reakce. Nečistoty na sklíčku zpomalovaly v určitých místech profil kapaliny a vytvářely v naplněné formě bublinky vzduchu a připravený monolit nebyl homogenní. Forma byla ve svislé poloze naplněna polymerizační směsí z pipety. Naplněná forma byla sklíčkem vzhůru vložena pod UV lampu (30 W, 254 nm) ve vzdálenosti 50 mm od zdroje záření. Polymerizace typicky probíhala po dobu 25 minut, poté byla forma rozebrána a vzniklý monolit byl promyt methanolem a hexanem.

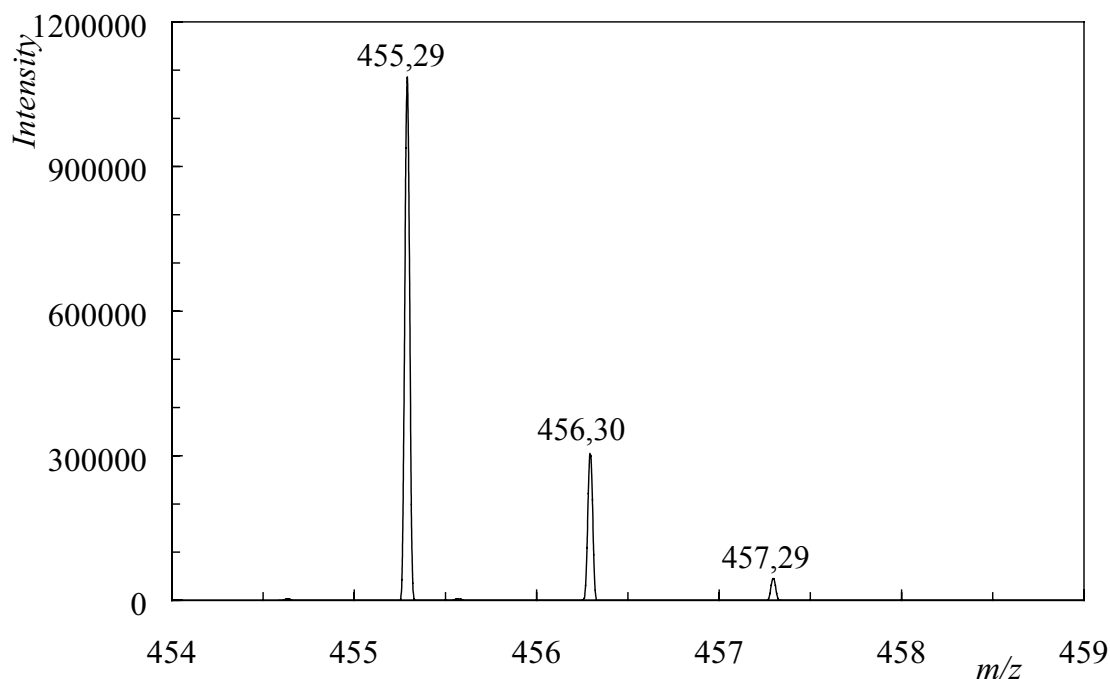
Polymerizační směs byla připravena do 5,0mL tmavé vialky. Všechny složky směsi byly odvažovány. Iniciátor DMPAP byl nejprve rozpuštěn v monomerech (GMA, HEMA, EDMA) v zastoupení 1 % hm. vůči monomerům a poté byly přidány porogenní složky (cyklohexanol, propan-1-ol, dekan-1-ol, butan-1,4-diol). Směs byla ultrazvukována po dobu 10 minut a probublávána dusíkem po dobu 15 minut. Hotová směs byla uchovávána při 4 °C. V tabulce 1 jsou uvedena složení a vlastnosti směsí S1 až S14 připravených a testovaných v rámci této práce.

**Tabulka 1** Složení polymerizačních směsí v % hm. pro přípravu monoliitických TLC destiček. Iniciátor DMPAP v zastoupení 1 % hm. vůči monomerům (GMA, HEMA, EDMA). Čas potřebný k navzlínání hexanu destičkou v minutách a její mechanická odolnost testovaná prostým otěrem.

Komponenta	GMA	HEMA	EDMA	cyklohexanol	dekan-1-ol	propan-1-ol	butan-1,4-diol	čas vzlínání	mechanická
Směs	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(% hm.)	(min)	odolnost
S1	24	-	16	20	40	-	-	-	Ne
S2	24	-	16	-	-	40	20	-	Ne
S3	-	24	16	-	-	40	20	30	Ano
S4	-	24	16	20	40	-	-	2	Ne
S5	-	24	16	-	-	30	30	30	Ano
S6	-	24	16	-	-	20	40	30	Ano
S7	-	32	8	-	-	40	20	30	Ano
S8	-	16	24	-	-	40	20	30	Ano
S9	-	24	16	20	-	40	-	30	Ano
S10	-	24	16	-	40	-	20	2	Ne
S11	-	24	16	-	30	30	-	2	Ne
S12	-	24	16	-	20	40	-	15	Ne
S13	-	24	16	-	10	50	-	30	Ano
S14	-	24	16	30	-	-	30	25	Ne

Z dat uvedených v tabulce 1 je patrné, že monolitickou destičku, která by byla mechanicky odolná, a tedy vhodná pro DAPPI ionizaci, a zároveň dobře propustná pro vztlínání mobilní fáze, se nepodařilo připravit. Mechanická odolnost, lesklý a hladký povrch a pravděpodobně nízká porozita, díky které vztlínal hexan velmi pomalu, byla dána přítomností propan-1-olu v porogenní směsi. Naopak mechanicky neodolný monolit, kterým hexan navztlínal během dvou minut, byl připraven, pokud byl v porogenní směsi použit dekan-1-ol. Při použití porogenních směsí obsahujících kombinaci propan-1-olu a dekan-1-olu (směsi S11 až S13) byly připraveny vrstvy, které se zvyšujícím se zastoupením propan-1-olu byly mechanicky odolné, avšak se snižující se rychlostí vztlínání hexanu. Nebyl pozorován vliv tloušťky monolitické vrstvy na její vlastnosti s výjimkou použití 25 $\mu$ m těsnění, kdy nebylo možné naplnit formu bez přítomnosti bublin vzduchu.

K testování ionizace technikou DAPPI byla proto použita 50 $\mu$ m stacionární fáze připravená z polymerizační směsi S3 (viz tabulka 1). Tato destička vykazovala dobrou mechanickou odolnost, a tak byla minimalizována pravděpodobnost poškození MS detektoru. Na obrázku 4 je znázorněno hmotnostní spektrum verapamilu získané ionizací technikou DAPPI z monolitické tenké vrstvy.



**Obrázek 4** Hmotnostní spektrum 10mM verapamilu ( $M_r = 454$ ). Dávkovaný objem: 1,0  $\mu\text{L}$ . Ionizace DAPPI v pozitivním módu z monolitické TLC destičky S3. Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Výkon na sprejovacím mikročipu = 4,5 W. Teplota spreje 250 °C - 300 °C na povrchu destičky. Sprej: toluen 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  a dusík 180  $\text{mL}/\text{min}$ . Sprejovací úhel: 45 °. Teplota a napětí kapiláry: 340 °C, 7,0 V. Napětí ve fragmentační části iontové optiky (Tube lens voltage): 44,9 V.

Ionizací technikou DAPPI bylo naměřeno hmotnostní spektrum odpovídající molekulovému aduktu  $[\text{verapamil}+\text{H}]^+$ . Z monolitické tenké vrstvy byl získán přibližně desetkrát větší signál než z komerční silikagelové TLC destičky (Merck TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> MS-grade). Účinnější ionizace byla pravděpodobně zapříčiněna menší tloušťkou monolitické stacionární fáze (50  $\mu\text{m}$ ) oproti silikagelové destičce (cca 195  $\mu\text{m}$ ). Díky tenčí vrstvě stacionární fáze bylo pro desorpční sprej k dispozici více analytu a byl naměřen větší signál. Vysoká teplota při ionizaci monolitickou stacionární fází nijak viditelně nepoškodila, a byla tak potvrzena její vhodnost pro techniku DAPPI.



### 3. Závěr

V první části práce byly vyvinuty a validovány metody pro stanovení čistoty léčivých přípravků kombinujících více účinných látek. Metoda pro stanovení obsahu nečistot v paracetamolu, kodein fosfát hemihydrátu a pitofenon hydrochloridu v přítomnosti fempiverin bromidu byla založena na iontově párové chromatografii a standardní HPLC instrumentaci. Byl vyvinut postup přípravy vzorku z čípkové lékové formy zajišťující dostatečnou výtěžnost nečistot a stabilitu vzorku. Separace všech nečistot bylo dosaženo i při použití chromatografie v reverzním módu, avšak tato metoda byla potvrzena jako nerobustní s ohledem na změny pH a obsahu methanolu v mobilní fázi. Analýzou vzorku čtyři roky po jeho výrobě byl potvrzen hlavní degradační produkt pitofenon hydrochloridu a aplikovatelnost metody pro analýzu stabilitních vzorků léčivého přípravku Spasmopan<sup>®</sup>. Obsah nečistot v tabletách kombinujících amlodipin besilát, valsartan a hydrochlorothiazid byl stanoven UHPLC metodou v reverzním separačním módu. Postup přípravy vzorku z potahovaných tablet byl vyvinut s ohledem na dostatečnou výtěžnost nečistot, kompatibilitu s gradientovou elucí a stabilitu vzorku. Cílenou degradační studií byly potvrzeny hlavní degradační produkty všech tří účinných látek a aplikovatelnost metody pro analýzu stabilitních vzorků kombinovaných tablet.

V rámci druhé části práce byla metodika přípravy monolitických stacionárních fází ve formě tenkých vrstev realizována v podmínkách laboratoří Katedry analytické chemie PřF UK. Po optimalizaci jednotlivých fází přípravy byly získány homogenní stacionární fáze navázané na silanizované mikroskopické sklíčko. Připravené monolitické vrstvy byly na bázi methakrylátových monomerů a polymerizace byla iniciována UV zářením. Byly připraveny mechanicky odolné destičky s hladkým a lesklým povrchem, avšak se špatnou propustností pro mobilní fázi. Stacionární fáze vhodné pro průtok mobilní fáze byly mechanicky velmi neodolné a nevhodné pro ionizaci analytů metodou DAPPI. Z mechanicky odolné monolitické tenké vrstvy byl ionizován verapamil metodikou DAPPI s vyšší účinností než z komerční silikagelové TLC destičky.

## Literatura

- [1] S. Ahuja, S. Scypinsky (Ed.): Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 415 – 443.
- [2] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015. Chapter 2.2.49.
- [3] ICH Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances, 2006.
- [4] ICH Q3C (R5) Guideline for Residual Solvents, 2011.
- [5] S. Görög; J. Pharm. Biomed. 48 (2008) 247 – 253.
- [6] ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products, 2006.
- [7] Český Lékopis 2009, Státní ústav pro kontrolu léčiv.
- [8] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015.
- [9] USP 37 Second supplement, The United States Pharmacopoeial Convention.
- [10] British Pharmacopoeia 2015, The British Pharmacopoeia Secretariat.
- [11] Japanese Pharmacopoeia 16, Ministri of Health, Labour and Welfare, Japan.
- [12] H. Lüllman, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger: Color Atlas of Pharmacology, 2nd ed., Thieme, New York, 2000.
- [13] M. J. Neal: Medical Pharmacology at a Glance, 7th ed., Wiley, Hoboken, 2012.
- [14] S. K. Kulkarni, I. Ninan, A. Sighn; Indian J. Pharma. col. 30 (1998) 323 – 325, CAN 130:148241.
- [15] A. M. Larson, J. Polson, R. J. Fontana, T. J. Davern, E. Lalani, L. S. Hynan, J. S. Reisch, F. V. Schiødt, G. Ostapowicz, O. Shakil, W. M. Lee; Hepatology 42 (2005) 1364 – 1372.
- [16] L. M. Flower, R. B. Moore, J. R. Foster, E. A. Lock; Hum. Exp. Toxicol. 10 (1991) 451 – 459, CAN 116:209251.
- [17] X. Feng, Q. Zhang, P. Cong, Z. Zhu; Anal. Methods 5 (2013) 5286 – 5293.
- [18] T. Nemeth, P. Jankovics, J. Nemeth-Palotas, H. Kozegi-Szalai; J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 746 – 749.
- [19] E. McEvoy, S. Donegan, J. Power, K. Altria; Chromatographia 68 (2008) 49 – 56.
- [20] G. Milch, E. Szabo; J. Pharm. Biomed. Anal. 9 (1991) 1107 – 1113.

- [21] B. Dejaegher, M. S. Bloomfield, J. Smeyers-Verbeke, Y. V. Heyd; *Talanta* 75 (2008) 258 – 265.
- [22] J. Forshed, F. O. Andersson, S. P. Jacobsson; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 495 – 505.
- [23] S. L. Eldridge, V. K. Almeida, A. K. Korir, C. K. Larive; *Anal. Chem.* 79 (2007) 8446 – 8453.
- [24] E. A. Abdelaleem, N. S. Abdelwahab; *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 187 – 191.
- [25] D. A. Shash, J. P. Rana, S. L. Baldania, U. K. Chhalotiya, K. K. Bhatt; *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 27 (2014) 52 – 57.
- [26] I. U. Khan, M. Ashfaq, S. N. Razzaq, I. Mariam; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1437 – 1450.
- [27] M. S. Ali, S. Raffiuddin, M. Ghori, A. R. Kahtri; *J. AOAC Int.* 90 (2007) 82 – 93.
- [28] M. Kamberi, C. M. Riley, X. Ma, C. C. Huang; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 123 – 128.
- [29] O. Calinescu, I. A. Badea, L. Vladescu, V. Meltzer, E. Pincu; *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 335 – 342.
- [30] R. N. Rao, A. Narasaraju; *Anal. Sci.* 22 (2006) 287 – 292.
- [31] M. Crevar, B. Ivkovic, S. Vladimirov, V. Kuntic, Z. Vujic; *Acta Chim. Slov.* 55 (2008) 665 – 670.
- [32] E. Wyszeccka-Kaszuba, M. Warowna-Grzeskiewicz, Z. Fijalek; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1081 – 1086.
- [33] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart, A. M. McLaughl; *J. Chromatogr.* 354 (1986) 355–366.
- [34] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart; *J. Chromatogr.* 348 (1985) 253 – 263.
- [35] R. Kommana, P. Basappa; *Chromatogr. Res. Int.* (2013), 4047277p.
- [36] K. Persson-Stubberud, O. Astrom; *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95 – 102.
- [37] Z. Budvari-Barany, G. Szasz, K. Gymessi-Forras; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3257 – 3268.

- [38] A. Kulikov, U. Artem, A. P. Biochenko, A. G. Verushkin; *Anal. Methods* 3 (2011) 2749 – 2757.
- [39] L. Krenn, B. Boros, R. Ohmacht, L. Jelinek; *Chromatographia* 51 (2000) S175 – S178.
- [40] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 687 – 693.
- [41] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1083 – 1089.
- [42] I. Ojanpera, J. Vartivaara, A. Ruohonen, E. Vuori; *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1435 – 1446.
- [43] H. Schuetz, A. Pielmeyer, G. Weiler; *Aerzt. Lab.* 36 (1990) 113 – 123, CAN113:110560.
- [44] T. Daldrup, P. Michalke, W. Boehme; *Chromatogr. Newsl.* 10 (1982) 1 – 7, CAN98:84433.
- [45] T. Daldrup, F. Susanto, P. Michalke; *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 308 (1981) 413 – 427, CAN 96:29498.
- [46] B. Morelli; *Anal. Lett.* 31 (1998) 2431 – 2445.
- [47] B. Morelli; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 423 – 433.
- [48] T. Galaon, M. Radulescu, V. David, A. Medvedovici; *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 1360 – 1368.
- [49] D. Radulovic, L. Zivarovic, D. Zivanov-Stakic; *Acta Pol. Pharm.* 46 (1989) 506 – 509, CAN 113:158810.
- [50] D. Agbaba, O. Grozdanovic, L. Popovic, S. Vladimirov, D. Zivanov-Stakic; *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9 (1996) 116 – 119, CAN 125:96252.
- [51] D. Radulovic, Z. Blagojevic; *Arh. Farm.* 32 (1982) 3 – 7, CAN 97:98433.
- [52] A Global Brief on Hypertension, World Health Organization, Geneva, 2013.
- [53] Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 1462 – 1536.
- [54] G. A. McKay, R. M. Walters: *LectureNotes, Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 9th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2013.
- [55] J. Vojta, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 36 – 44.

- [56] R. A. Shaalan, T. S. Belal; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 215 – 230.
- [57] S. E. K. Tekkeli; *J. Anal. Methods Chem.* (2013), Article Number 179627.
- [58] D. Jothieswari, K. Anandakumar, S. D. Vijaya, B. Vijayakumar, D. Priya, R. B. Stephen; *J. Pharm. Biomed. Sci.* 5 (12) (2012).
- [59] B. N. Deepthi, D. N. Rao, M. P. Rao, S. R. Beeravalli, Y. R. Krishna, V. Rao, L. S. Koundilya; *Int. J. Univ. Pharm. Biosci.* 2 (2013) 174 – 185.
- [60] S. M. El-Gizawy, O. H. Abdelmageed, M. A. Omar, S. M. Deryea, A. M. Abdel-Megied; *Am. J. Anal. Chem.* 3 (2012) 422 – 430.
- [61] R. N. Sharma, S. S. Pancholi; *Acta Pharm. (Zagreb)* 62 (2012) 45 – 58.
- [62] K. R. Ulavapally, J. Sriramulu, V. R. Pyreddy, V. Bobbarala; *J. Pharm. Res.* 4 (2011) 894 – 896.
- [63] M. Sharma, C. Kothari, O. Sherikar, P. Mehta; *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 27 – 35.
- [64] C. Vishnuvardhan, P. Radhakrishnanand, S. G. Navalgund, K. R. Atcha, N. Satheshkumar; *Chromatographia* 77 (2014) 265 – 275.
- [65] S. E. Vignaduzzo, P. M. Castellano, T. S. Kaufman; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 2383 – 2395.
- [66] S. J. Varghese, T. K. Ravi; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 981 – 994.
- [67] W. M. Ebeid, E. F. Elkady, A. A. El-Zaher, R. I. El-Bagary, G. Patonay; *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 748 – 757.
- [68] R. S. Ch. Phani, K. R. S. Prasad, U. R. Mallu; *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 440 – 454.
- [69] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany; *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 345 – 356.
- [70] M. Younus, T. K. Reddy, Y. R. Reddy, M. F. Arif; *J. Pharm. Res.* 3 (2010) 2647 – 2650.
- [71] A. Hemke, M. Bhure, V. Anjankar, K. Gupta; *Int. J. Pharm. Technol.* 5 (2013) 5383 – 5392.
- [72] M. B. Nikam, H. Dhamane, A. Aligave, M. S. Kondawar; *Int. J. Pharm. Technol.* 2 (2010) 642 – 650.

- [73] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany; *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 215 – 223.
- [74] V. R. Galande, K. G. Baheti, S. Indraksha, M. H. Dehghan; *Indian J. Pharm. Sci.* 74 (2012) 18 – 23.
- [75] F. Svec, Y. Lv; *Anal. Chem.* 87 (2015) 250 – 273.
- [76] D. S. Peterson, Q. Luo, E. F. Hilder, F. Svec, J. M. J. Fréchet; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1504 – 1512.
- [77] R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Svec; *Anal. Chem* 79 (2007) 486 – 493.
- [78] Y. Han, P. Levkin, I. Abarientos, H. Liu, F. Svec, J. M. J. Fréchet; *Anal. Chem* 82 (2010) 2520 – 2528.
- [79] I. Urbanova, F. Svec; *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2345 – 2351.
- [80] Y. Lv, Z. Lin, T. Tan, F. Svec; *J. Chromatogr. A* 1316 (2013) 154 – 159.
- [81] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

## Životopis

### Osobní údaje

---

Jména a příjmení	Jiří Vojta
Místo narození	Praha
Kontakt	jiri.vojta@natur.cuni.cz

### Vzdělání

---

2011 - dosud	Doktorské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta; Obor: Analytická chemie
2009 - 2011	Magisterské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta; Obor: Klinická a toxikologická analýza; Dosažený titul: Mgr.
2006 - 2009	Bakalářské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta; Obor: Klinická a toxikologická analýza; Dosažený titul: Bc.

### Pracovní zkušenosti

---

2015 - dosud	Ferring-Léčiva a.s. Pozice: Analytik v oddělení QC Náplň práce: HPLC/UHPLC analýzy léčivých přípravků, analytický vývoj.
2011 - 2015	Zentiva, k. s. Pozice: PhD Cont (50% úvazek) Náplň práce: HPLC/UHPLC analýzy léčivých přípravků. Vývoj a validace analytických metod. Degradční studie.
2010 - 2011	Zentiva, k.s Pozice: Laborant v oddělení QC (50% úvazek) Náplň práce: Příprava vzorků a roztoků k HPLC/UHPLC analýze léčivých přípravků.

### Ostatní

---

Jazyky	Angličtina (FCE, 2014)
Software	Empower: certifikáty Basic a Advanced

## Seznam publikací, patentů, přednášek a plakátových sdělení

### Publikace

1. M. Franc, **J. Vojta**, J. Sobotníková, P. Coufal, Z. Bosáková: Performance and lifetime of slurry packed capillary columns for high performance liquid chromatography, Chem. Papers 68 (2014) 22 – 28.
2. **J. Vojta**, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková: Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií, Chem. Listy 108 (2014) 127 – 134.
3. **J. Vojta**, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 85 – 92.
4. **J. Vojta**, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková: A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 109 (2015) 36 – 44.

### Patenty

1. P. Coufal, A. Kubičková, V. Kubiček, M. Franc, **J. Vojta**, E. Tesařová, Z. Bosáková: Postkolonová derivatizace tuhým derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC, Patent 305127, Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.

### Přednášky

1. **J. Vojta**: Vývoj a testování kapilárních kolon na bázi iontoměniče; Zentiva k.s., Praha, Česká republika, 11. 10. 2011.
2. **J. Vojta**: Monolitické kapilární kolony; Seminář katedry analytické chemie, Chemický ústav PřF UK, Praha, Česká republika, 18. 10. 2011.



3. **J. Vojta**, A. Musilová (Svobodová), P. Coufal: New capillary monolithic column for isocratic separation of small molecules; 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry", Praha, Česká republika, 25. 9. 2012.
4. **J.Vojta**: Monolithic material in separation science; Advances in separation method, Chemický ústav PŘF UK, Praha, Česká republika, 15. 4. 2013.

#### **Plakátová sdělení**

1. A. Svobodová, **J. Vojta**, E. Tesařová, P. Coufal: Influence of Methacrylic Acid Addition on the Separation Performance of Polystyrene-based Monolith; 63. Zjazd Chemikov, Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9. 9. 2011.
2. **J. Vojta**, A. Svobodová, P. Coufal: Effect of Increasing Amount of Methacrylic Acid in Monolithic Columns for CLC and CEC Analysis of Small Molecules; 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Polsko, 9. – 13. 9. 2012.
3. **J. Vojta**, A. Kubičková, M. Franc, P. Coufal: On-Line Post-Column Derivatization of Amino Acids in Capillary Liquid Chromatography; HPLC 2013, 39th International Symposium of Chromatography and Related Techniques, Amsterdam, Nizozemsko, 16 – 20. 6. 2013.

**Charles University in Prague, Faculty of Science**  
**Department of Analytical Chemistry**

Ph.D. study program: Analytical Chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**Mgr. Jiří Vojta**

*Use of liquid chromatography in pharmaceutical analysis and preparation of monolithic stationary phases for thin-layer chromatography*

Supervisor: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Supervisor-consultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

Prague, 2015

The thesis summarizes the results obtained in the years 2011 - 2015 during my Ph.D. studies at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague and during my employment at the position of PhD Cont at the Zentiva, k.s. company.

This work was financially supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (project MSMT 0021620857), the Grant Agency of Charles University in Prague (project GAUK 349511) and the SVV projects of Charles University in Prague.

Supervisor:                      prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.  
Department of Analytical Chemistry  
Faculty of Science, Charles University in Prague

Supervisor-consultant:      doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.  
Department of Analytical Chemistry  
Faculty of Science, Charles University in Prague

## **Abstract**

In the first part of this work, analytical methods for determination of impurities of active pharmaceutical ingredients (API) in combined pharmaceutical dosage forms were developed and validated. Development of the methods covered both the optimization of sample preparation procedure and chromatographic conditions. The methods were validated according to International Conference on Harmonization guideline and both of them were confirmed to be able to analyze stability samples. Impurities in paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride in the presence of fourth API fenpiverinium bromide were separated by using ion-pair reversed phase chromatography with gradient elution. Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 µm heated to 35 °C was used as a separation column. A diode array detector was used. The detection wavelengths were set as follows: 220 nm for paracetamol impurity K, 245 nm for paracetamol and its other impurities and 285 nm for codeine, pitophenone and their impurities. Impurities in valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide were separated by reversed phase UHPLC method with gradient elution. Chromatographic column Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD, 100 x 3,0 mm, 1,8 µm heated to 30 °C and spectrophotometric detection were used. The detection wavelengths were set as follows: 225 nm for valsartan, its impurities and for impurity D of amlodipine besylate, 360 nm and 271 nm for amlodipine, respectively hydrochlorothiazide and their impurities.

In the second part of this work, thin-layer monolithic stationary phases were prepared on a glass holder. Polymerization mixtures contained glycidyl-methacrylate and 2-hydroxyethyl-methacrylate (monomers), ethyleneglycol-dimethacrylate (cross-linker), decan-1-ol, cyclohexan-1-ol, propan-1-ol and butan-1,4-diol (porogens) in different ratios and 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone as an initiator. Monolithic layers were prepared in-situ (UV initiation, 254 nm) between plexiglass and silanized glass layers separated by teflon gasket with defined thickness of 25, 50, 76 and 127 µm. The main examined characteristic of the monolithic layers were their mechanical stability and speed of capillary action of hexane depending on composition of polymerization mixture. The selected monolithic layer was tested as a stationary phase for mass detection with desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI).

## Table of contents

Abstract.....	3
List of abbreviations and symbols.....	5
Aims of the work.....	7
<b>1. Introduction.....</b>	<b>8</b>
1.1 Determination of impurities in combined pharmaceutical dosage forms.....	8
1.2 Preparation of monolithic thin layers.....	11
<b>2. Results and discussion.....</b>	<b>12</b>
2.1 Determination of impurities in Spasmopan®.....	12
2.2 Determination of impurities in valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothizide in combined tablets.....	17
2.3 Preparation of monolithic thin layers.....	20
<b>3. Conclusion.....</b>	<b>25</b>
References.....	26
Curriculum vitae.....	31
List of publications, patents, lectures and posters.....	32

## List of abbreviations

API.....	active pharmaceutical ingredient
°C .....	Celsius degree
C <sub>18</sub> .....	octadecyl
C <sub>8</sub> .....	octyl
DAPPI .....	desorption atmospheric pressure photoionization
DESI.....	desorption electrospray
DMPAP .....	2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone
<i>d<sub>p</sub></i> .....	particle size
EDMA .....	ethyleneglycol-dimethacrylate
GMA.....	glycidyl-methacrylate
HEMA .....	2-hydroxyethyl-methacrylate
HPLC.....	high performance liquid chromatography
ICH.....	International Conference on Harmonization
impurity 07 .....	(S)-2-(N-{[2'-cyanobiphenyl-4-yl]methyl} pentanamido)-3-methylbutanoic acid
impurity 09 .....	(S)-3-methyl-2-{[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4- yl]methylamino}butanoic acid
impurity KHBB.....	2-(4-hydroxybenzoyl) benzoic acid
impurity MeKHBB.....	methyl ester of 2-(4-hydroxybenzoyl) benzoic acid
impurity X .....	2-[4-[2-(1-piperidinyloxy)]benzoyl] benzoic acid
impurity PEE.....	2-(1-piperidinyloxy)-ethyl ester of 2-[4-[2-(1- piperidinyloxy)]benzoyl]benzoic acid
LC.....	liquid chromatography
λ.....	wavelength
MALDI.....	matrix assisted laser desorption and ionization
MEKC .....	micellar electrokinetic chromatography
<i>M</i> .....	molar concentration
mM.....	milimolar concentration
<i>M<sub>r</sub></i> .....	relative molecule weight

MS	.....	mass spectrometry
mg	.....	milligram
min	.....	minuta
mm	.....	millimetr
mL	.....	mililiter
mmol/L	.....	millimol per liter
mL/min	.....	milliliter per minute
m/z	.....	weight per charge
µm	.....	mikrometer
µL	.....	mikroliter
nm	.....	nanometer
NMR	.....	nuclear magnetic resonance
Ph. Eur	.....	European Pharmacopoeia
<i>R</i>	.....	resolution
<i>t</i>	.....	time
TLC	.....	thin-layer chromatography
TOF	.....	time-of-flight analyzer
UHPLC	.....	ultra high performance liquid chromatography
USP	.....	United States Pharmacopeial Convention
UV	.....	ultraviolet

## **Aims of the work**

The aim of the first part of this work was to develop analytical methods for determination of impurities of active pharmaceutical ingredients in combined pharmaceutical dosage forms. Two medicaments were chosen for this purpose:

- Spasmopan<sup>®</sup>, suppository dosage form, which combines paracetamol in content of 500 mg, codeine phosphate hemihydrate in content of 19,2 mg, pitophenone hydrochloride in content of 10 mg and fempiverinium bromide in content of 0,1 mg per one suppository.
- Film-coated tablets, which combine valsartan in content of 320 mg, amlodipine besylate in content of 10 mg and hydrochlorothiazide in content of 25 mg per one tablet.

Development of the method covered optimization of both the sample preparation procedure as well as chromatographic conditions. The key factors of the sample preparation procedure were accuracy, repeatability, stability of the solutions, compatibility with chromatographic conditions, simplicity and procedure time. Chromatographic methods were optimized to achieve satisfactory selectivity, precision, accuracy, range, sensitivity and robustness of methods. Methods were validated according to ICH guideline. The ability of the methods to analyze stability samples were confirmed by analysis of the expired batch of Spasmopan<sup>®</sup> and by forced degradation study in the case of film-coated tablets.

The aim of the second part of this work was to prepare monolithic thin-layer stationary phases, which would be suitable for mass spectrometry detection employing desorption photoionization technique (DAPPI). The procedure of preparation of monolithic thin layers was developed (inspired by published papers) in environment of our laboratory. Prepared monoliths were methacrylate-based, because of possibility of UV initiation and supposed application in normal chromatographic mode. The key monitored characteristic were mechanical stability (necessary for DAPPI) and the speed of capillary action of hexane as a mobile phase for chromatographic separation.



# 1. Introduction

## 1.1 Determination of impurities in combined pharmaceutical dosage forms

Liquid chromatography (LC) is probably the most widely used method for determination of active pharmaceutical ingredients (API) and their impurities in pharmaceutical analysis [1]. Massive development of HPLC during the second half of 20th century led to standardization of this method in the field of pharmaceutical analysis. Selectivity and sensitivity of HPLC enabled the increased demands on quality of APIs and medicaments. Methodology of LC including characteristic of HPLC and UHPLC is generally described in European Pharmacopoeia [2].

Purity testing method of API and medicaments is one of the necessary parts of pharmaceutical analysis and it is required by registration authorities. According to ICH guideline the impurities of API and medicaments could be categorized as organic impurities, inorganic impurities and residual solvents [3]. Inorganic impurities (e.g., heavy metals, salts) and residual solvents (e.g., acetonitrile, methanol, acetone) are generally known substances (even toxicologically) entering into synthesis and manufactory. Standardized methods (after verification) and limits from pharmacopoeias could be used for determination of this impurities. Therefore, determination of this impurities is not as challenging as determination of organic impurities [4,5].

Organic impurities are reactants, intermediates, side products and degradation products. The structures of impurities could be estimated from supposed synthesis pathway. ICH guidelines describe calculation of identification and qualification limits. If the content of impurity is higher than the specified limit, it must be scientifically identified or its biological safety must be qualified [3, 6]. Monographs in pharmacopoeias usually content impurities of specified synthesis pathway and sometimes even degradation products and their limits [7 - 11]. Variations in procedures of APIs synthesis, content and formulation methodologies of medicaments of different manufactures mean that pharmacopoeia's methods must be verified and in the most cases a new analytical method must be developed and validated.

Spasmopan<sup>®</sup> is a suppository dosage form, which combines four active pharmaceutical ingredients: paracetamol, codeine phosphate hemihydrate, pitophenone hydrochloride and fempiverinium bromide. Paracetamol is a widely used analgesic and antipyretic substance [12]. In combination with the analgesic and antispasmodic effect of codeine [13] and with the spasmolytic effect of pitophenone hydrochloride and fempiverinium bromide [14], paracetamol is used for treating pain and spasms in the gastrointestinal system or bladder. Monographs are devoted to paracetamol and codeine phosphate hemihydrate in Czech, European, British, American and Japanese Pharmacopoeias [7 - 11].

As paracetamol is generally used in high doses and could be hepatotoxic [15], the limits for the content of its main related substances 4-aminophenol, 4-nitrophenol and 4-chloroacetanilid are not more than 0,005%, 0,05% and 0,001%, respectively [7 - 11]. In dosage form, especially 4-aminophenol needs to be monitored because it is the main degradation product of paracetamol [16] and could be nephrotoxic [17]. Although paracetamol has been analyzed by variation of methods such as micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [18], micro emulsion liquid and micro emulsion electrokinetic chromatography [19], fluorimetric spectroscopy [20, 21], NMR spectroscopy [22, 23] and TLC [24, 25], HPLC methods with UV detection have probably been the most widely used [26 - 31]. Amperometric detection coupled with HPLC separation was also employed for determination of 4-aminophenol [32]. Codeine, paracetamol and chlorpheniramine in combined dosage forms were determined by stability-indicating HPLC methods [10, 33 - 35] and MEKC method was validated for a combination of ibuprofen, codeine and their impurities [36]. However, analytical methods have been focused rather on determination of codeine itself, especially in mixtures of opium alkaloids [37 - 41], than on its impurities, as the related substances method is defined by European Pharmacopoeia [8]. This method, however, does not separate morphine and 10-hydroxycodone. Pitophenone was analyzed as a part of screening tests [42 - 45] and determined by spectrophotometric [46 - 47] and chromatographic methods [48 - 51]. Unlike paracetamol and codeine no method has been published to date for the determination of pitophenone hydrochloride impurities.

High blood pressure is a global health issue. It indirectly contributes to the deaths of 9.4 million people every year all around the world as it is a key factor in deaths due to heart disease and stroke [52]. Combined treatment of hypertension allows better control of blood pressure compared with monotherapy in the majority of patients [53]. Valsartan reduces blood pressure through renin-angiotensin system. It causes vasodilatation as an antagonist of the angiotensin II receptor. Hydrochlorothiazide treats the symptoms of hypertension through its diuretic effect [12]. Amlodipine interferes with calcium channels and thus reduces the calcium influx into cells. This reduction leads to a vasodilatation effect and therefore to lower blood pressure [54]

Monographs employing the HPLC method for related substances are devoted to valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in Pharmacopoeias [7 - 11]. The triple combination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide has so far been analyzed only by assay methods [55]. The retention behavior of these drug substances in reversed phase HPLC methods depends on the pH of mobile phase. If a mobile phase with low pH value is used, the analytes elute in the order hydrochlorothiazide, amlodipine and valsartan [56 - 64]. If weak acidic or neutral conditions are used, the elution order of amlodipine and valsartan is reversed [65 - 68]. If neutral or basic buffer is used, valsartan is eluted first, followed by hydrochlorothiazide, and amlodipine leaves the column last [69, 70]. Only two stability-indicating assay methods have been published for this triple combination [57, 71]. However, no peak purity data and identification of degradation products were provided. Determination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide was also performed by spectrophotometric methods [62, 72 - 74]. No stability-indicating analytical method for quantitative purity testing and no UHPLC method, generally, were found in the literature for combination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide [55]. The USP describes only an HPLC column and no more details for the determination of organic impurities of this triple combination [9].

## 1.2 Preparation of monolithic thin layers

Preparation of monolithic thin layers is one of current directions of still continuously developing chemistry and technology of monolithic stationary phases [75]. Monolithic stationary phases are modern separation media with wide field of application. In contrast with spherical stationary phases, monolithic materials are formed by single piece of porous material, which completely full the mold.

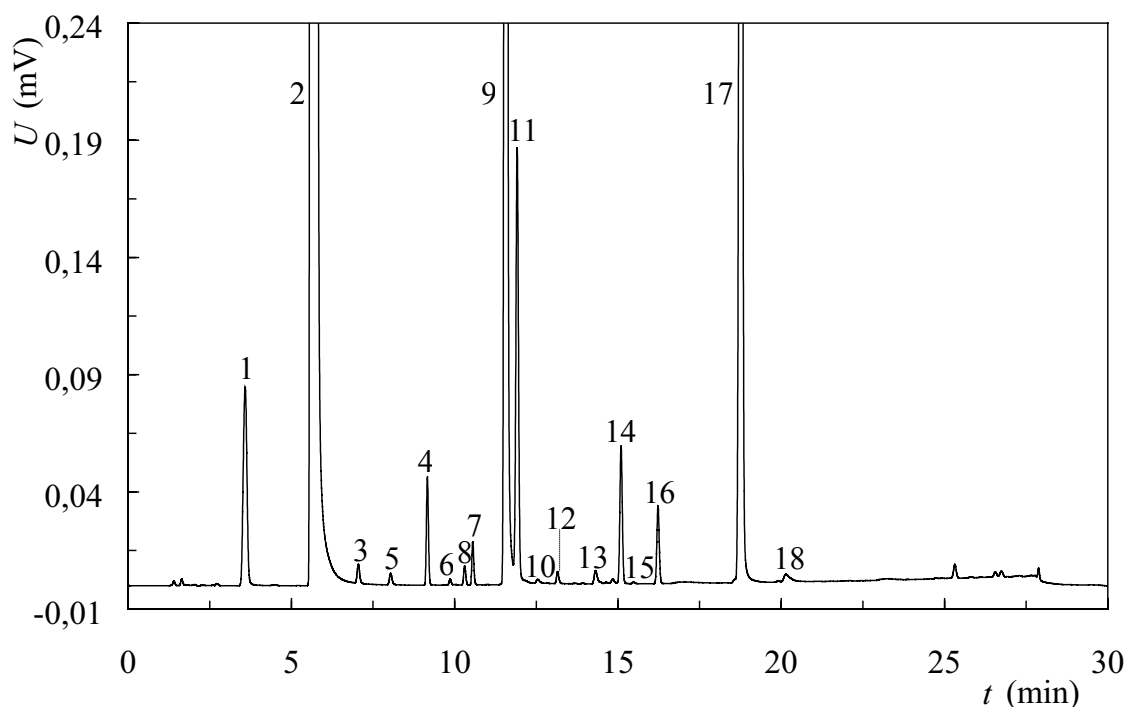
Preparation of monoliths for thin-layer chromatography (TLC) started in 2004 when Švec, Fréchet at al. presented MALDI sample plate modified with monoliths [76]. In contrast with classical matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid), monolithic phase performed lower background for ionization of small molecules and better stability of sampling plate compared with silica gel matrix [76]. In 2007 the procedure of preparation of monoliths between two glass plates separated by teflon gasket was published [77]. Polymerization was UV initiated. Composition of polymerization mixture (butyl-methacrylate 24 %, ethyleneglycol-dimethacrylate 16 %, decan-1-ol 40 % and cyclohexanol 20 %), was taken from preparation of capillary columns. However, the photography from scanning electron microscope revealed different morphology of surface of monolithic layer in comparison with the globular structure in the middle of layer. Compact and non-porous surface of monolith was formed on the side, which was in contact with non-silanized glass [77].

Smooth surface of the monolith was suitable for separation of dyes and macromolecules and their ionization by MALDI [77], but its contact angle with water was only 77 ° [78]. Required superhydrophobic characteristic was achieved when silanized glass was used as a cover plate. In this case monolith has rough and globular surface and its contact angle with water was 154 °. Although both glasses were silanized, monolithic stationary phase was preferably attached on the plate closer to UV lamp. Consequently, monolith was modified with hydrophilic monomers and used for two-dimensional chromatography of peptides using DESI ionization and MS detection [78]. Similar procedure was applied for preparation of monoliths based on glycidyl methacrylate [79] and styrene [80] used for connection of TLC-MS.

## 2. Results and discussion

### 2.1 Determination of impurities in Spasmopan®

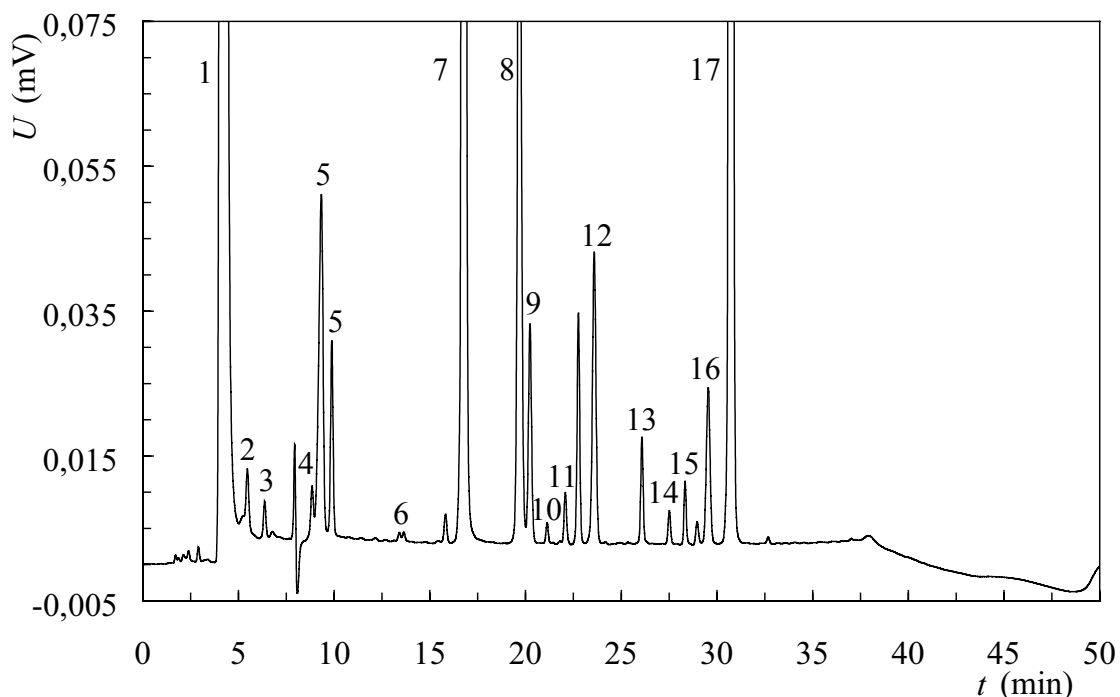
Although methods for related substances of paracetamol and codeine are based on ion-pair chromatography [8,9], the first attempt was made to develop a fast and novel method without an ion-pair reagent, which would avoid interferences caused by possible impurities from the ion-pair reagent. Two suppositories were dissolved in 50% acetonitrile (see below) and this sample was spiked with impurities F, J and K of paracetamol (according to Ph. Eur. [8]) and impurities of pitophenone KHBB, MeKHBB, X and PEE (see the list of abbreviations). Impurities of codeine phosphate hemihydrate A, C and E (according to Ph. Eur. [8]) were present naturally in the sample. This sample was used for development of the method. Separation of all the impurities and drugs was achieved using ACE 3 C<sub>18</sub>, 150 x 4,9 mm, 3 µm particle size column at 25 °C and gradient elution with phosphate buffer (10 mM, pH 7,0), acetonitrile and methanol. The chromatogram of this analysis and instrumental settings are shown in Figure 1. However, this method was found to be insufficiently robust to changes in the pH of the buffer ( $\pm 0.1$ ) and in the content of methanol during gradient programme ( $\pm 2$  %). Because of the number of impurities to be separated in 20 min, there were several critical pairs which were resolved only under specific conditions. In addition, the peak shape of the last impurity in the chromatogram (impurity PEE of pitophenone) was not satisfactory (USP tailing factor = 2.2). Other columns with similar dimensions (e.g. Gemini C<sub>18</sub>, YMC ODS-A, Zorbax ODS-A, Kinetex C<sub>18</sub>, Zorbax Eclipse C<sub>18</sub>) were also tested under these conditions and all of them yielded similar elution profiles to column ACE 3, but with lower selectivity. Zorbax Aqua C<sub>18</sub> column exhibited very different selectivity (especially for paracetamol impurities), but with even more unresolved pairs of peaks.



**Figure 1** Chromatogram of the sample solution of *Spasmopan*<sup>®</sup> spiked with impurities of paracetamol J (level 0,2%), F (level 0,3 %) and K (level 0,2%) and pitophenone impurities KHBB, X, MeKHBB and PEE at levels 0,2 %. Analysis was performed at HPLC system Waters Alliance 2695. Sample solvent: 50% acetonitrile. Separation column: ACE 3 C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm, 3 μm. Column temperature: 25 °C. Injection volume: 5 μL. Detection: UV, λ = 225 nm. Mobile phase: 10mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer of pH 7,0. Flow-rate: 0,8 mL/min. Gradient programme: [t(min)/acetonitrile(%)/methanol %] 0/5/5, 5/15/5, 25/85/0, 26/5/5, 35/5/5. Peak identification: 1 - impurity K, 2 - paracetamol, 3, 5, 8 - unknown impurities of paracetamol, 4 - impurity KHBB, 6 - impurity E, 7 - impurity X, 9 - codeine, 10 - impurity C, 11 - impurity F, 12 - fempiverinium, 13 - impurity A, 14 - impurity J, 15 - unknown impurity of codeine, 16 - impurity MeKHBB, 17 - pitophenone, 18 - impurity PEE. Unidentified peaks belong to sample solvent and mobile phase.

As development of the method without an ion-par reagent was not successful (see above), an ion-pair reversed phase HPLC method from our previous work [unpublished data] was tested. This method, which was suitable for combination of paracetamol and codeine used a Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 μm) column heated to 35 °C and gradient elution of sodium 1-octanesulfonate buffer at pH 2,5 with acetonitrile and methanol as follows [t(min)/acetonitrile(%)/methanol(%)] 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. However, the majority of the peaks from the spiked sample of *Spasmopan*<sup>®</sup> were not satisfactorily resolved under these conditions, as almost all the

impurities were eluted between 26 and 44 min. The column, its temperature and the buffer composition were kept constant, but the gradient programme was modified. Several critical pairs of compounds, i.e., impurity K and an unknown minor impurity of paracetamol; impurities of codeine C and A; and fempiverinium and an impurity of pitophenone X were monitored carefully to achieve sufficient resolution. Gradients, which started with 80% buffer, resulted in poor retention of impurity K, which co-eluted with the solvent peaks and other minority impurities of paracetamol. Similar to the non-ion-pair reversed phase method, retention of codeine and its impurities was very sensitive to the ratio of methanol and acetonitrile in the mobile phase (a higher volume of methanol led to longer retention). After testing several gradients, the final gradient programme without the presence of methanol, starting with the same content of buffer and with the faster first part of the gradient (compared to the original gradient) was developed. Under the final conditions, all the compounds were successfully resolved ( $R \geq 1,7$ ) for any pair of peaks and an excellent peak shape was also achieved for all the impurities ( $1,0 \leq \text{USP tailing factor} \leq 1,1$ ). The chromatogram of analysis of spiked sample obtained under final chromatographic conditions is shown in Figure 2.



**Figure 2** Chromatogram of analysis of sample solution of Spasmopan® spiked with impurities F, J and K of paracetamol and KHBB, X, MeKHBB and PEE of pitophenone at level 0,2 %. Sample solvent: 50% acetonitrile. Separation column: Symmetry C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm. Column temperature: 35 °C. Injection volume: 10 μL. Detection: UV, λ = 220 nm. Mobile phase: component A - buffer: sodium 1-octanesulfonate (1,33 g/L), pH 2,5 adjusted with 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; component B - acetonitrile; component C - methanol. Flow-rate: 1,0 mL/min. Gradient programme [t(min)/acetonitril(%)/methanol(%)]: 0/10/5, 15/15/5, 28/25/5, 38/35/5, 40/10/5, 50/10/5. Peak identification: 1 - paracetamol, 2, 3, 4 - unknown impurities of paracetamol, 5 - impurity K, 6 - impurity E, 7 - codeine, 8 - impurity F, 9 - impurity KHBB, 10 - impurity C, 11 - impurity A, 12 - impurity J, 13 - impurity X, 14 - impurity MeKHBB, 15 - fempiverinium, 16 - impurity PEE, 17 - pitophenone.

The peaks of impurity K of paracetamol and impurity E of codeine were distorted due to elution power of 50% acetonitrile. When compatible sample solvent was used the peaks were symmetric in retention times of second parts. Therefore, impurity K was resolved from unknown impurity of paracetamol. The peak eluting before this unknown impurity belonged to sample solvent and disappeared after addition of sodium 1-octanesulfonate solution into the sample solvent and after proper equilibration of the column. Unidentified peak eluting between codeine impurity A and paracetamol impurity J (peak numbers 11, 12, Fig. 2) was confirmed as degradation impurity of reference substance of paracetamol impurity F. This degradation product was not



present in freshly prepared spiked sample. The unknown impurity of codeine (peak number 15, Fig. 1) eluted standardly in this retention time. Selectivity of the method for impurity B of codeine (eluting before impurity E) was confirmed before validation due to unavailability of reference material. Other unidentified peaks belonged to sample solvent and mobile phase. Detection wavelengths were set (based on UV spectra) as follows: 220 nm for impurity K, 245 nm for paracetamol and its other impurities and 285 nm for codeine, pitophenone and their impurities.

The suppository is a complicated dosage form to analyze because it contains a large amount of non-polar placebo components which need to be removed to protect the column. However, suppositories melt at 37°C so that a heated ultrasonic bath was used to disintegrate them in water/organic modifier mixture and then the sample was cooled in a refrigerator to precipitate the placebo components (1 hour, 4 °C). Pure methanol, acetonitrile and isopropanol and their mixtures with water in ratios of 1:1 were tested as solvents. The mixture of acetonitrile and water provided the best accuracy for the drugs and the placebo components precipitated completely, unlike in the pure organic solvents. The ratio of water and acetonitrile in the sample solvent had to be changed to 8:2 due to the peak shape of impurities K and E. At this ratio, precipitation of the placebo components took at least 2,5 hours in the refrigerator.

Consequently, the procedure employing extraction of placebo into hexane was developed. Two suppositories were dissolved in 10 mL of 50% acetonitrile using ultrasonic bath at 37 °C. Then the sample was shaken with 20 mL of hexane and diluted with 15 mL water to achieve 20% content of acetonitrile in the sample solution. No quantitative difference was observed between these two removal methods. Water in the sample solvent was subsequently replaced by sodium 1-octanesulfonate buffer from the mobile phase (pH 2,5) to avoid incompatibilities between the mobile phase and sample solvent. However, at this pH, the amount of impurity K in the sample solution increased continuously due to hydrolysis of the paracetamol. On the other hand, at higher pH values (pH  $\geq$  3,5) the amount of impurity K in the sample solution decreased continuously due to its decomposition. The mixture of water and methanol (1:1) was the only solvent in which impurity K was stable. However, in this sample solvent, codeine

was found to be unstable, as the amount of impurity C in the sample solution increased rapidly (54% of peak area after 6 h). Finally, the sample solvent containing the buffer with pH 3.0 was chosen since the sample in this buffer was stable for up to 24 hours.

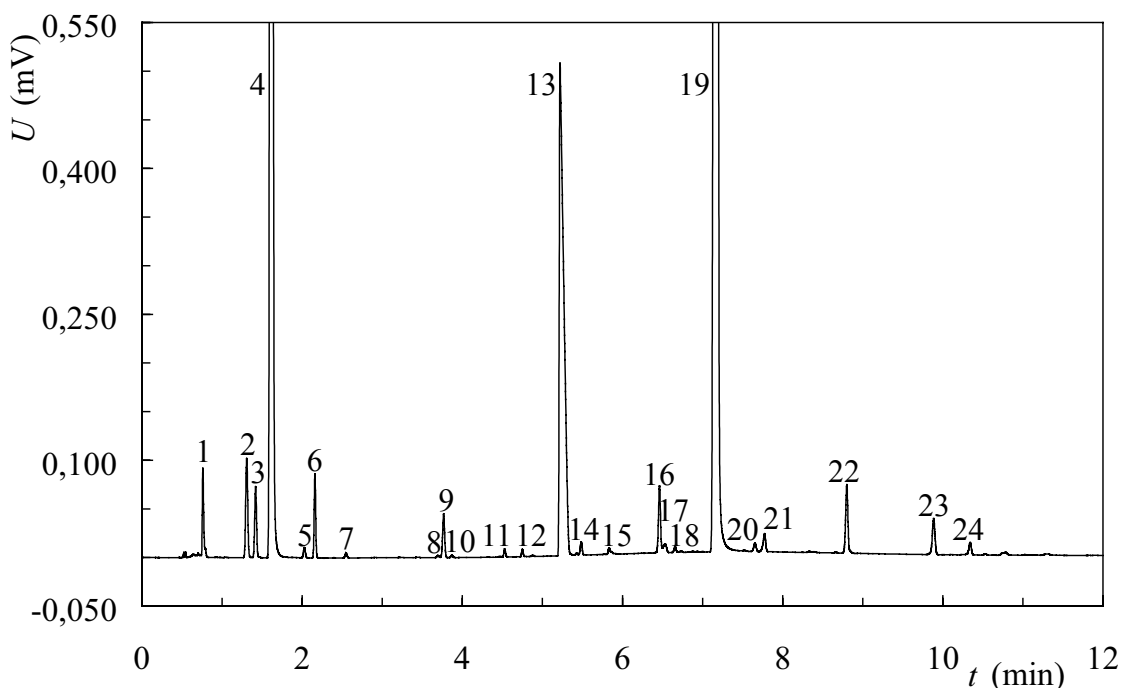
The batch of Spasmopan® four years after manufacturing (two years after its expiration date) was analyzed under final chromatography conditions. The content of impurity X increased by 0,3 % compared to its content in API, which was used for manufacturing and thus impurity X was confirmed as the main degradation product of pitophenone hydrochloride. Codeine phosphate hemihydrate and paracetamol were found to be stable in suppository dosage form, as no significant increase in their impurities was observed. The peak purity test was successfully met for all the principal peaks of the drugs in analysis of the expired batch and confirmed their spectral clearness. Therefore, the method was suitable for analysis of stability samples of Spasmopan®. The method was validated according to ICH guideline [81] in the range: 0,003 % - 0,017 % for paracetamol impurity K, 0,05 % - 0,17 % for other unknown impurities of paracetamol, 0,10 % - 1,51 % for codeine impurity A, 0,10 % - 0,65 % for codeine impurities B and E, 0,10 % - 0,40 % for codeine impurity C, 0,10 % - 0,30 % for other unknown impurities of codeine, 0,10 % - 0,65 % for pitophenone impurity X and 0,10 % - 0,30 % for other unknown impurities of pitophenone.

## **2.2 Determination of impurities in valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in combined tablets**

The reversed phase UPLC method with gradient elution of the mobile phase consisting of low pH phosphate buffer and acetonitrile was chosen as a default chromatographic system. Chromatographic methods for determination of this APIs were performed using buffers from the whole range of pH values. The best peak shapes were achieved at acidic pH. Homogenized tablets were dissolved in 60% methanol using ultrasonic bath and spiked with impurities A, B and C of hydrochlorothiazide (according to Ph. Eur. [8]), amlodipine impurities A, B, D, E, F and G (according to Ph. Eur. [8]) and valsartan impurities B, C (according to Ph. Eur. [8]), 07 and 09 (see the list of abbreviations). To achieve satisfactory retention of highly polar hydrochlorothiazide, the

gradient had to start with a low content of acetonitrile. The first promising separation was achieved on an Acquity UPLC BEH C<sub>8</sub> 100 x 2,1 mm, 1,7 µm column at 25 °C with a linear gradient of 95% of 0.01 M ammonium dihydrogen phosphate buffer pH 2,5 and 5% acetonitrile at the beginning to 35% of the buffer and 65% acetonitrile after 7 min (flow rate 0.4 mL/min) with injection volume of 1,0 µL. However, satisfactory sensitivity for amlodipine and its impurities was not achieved with this injection volume. Double injection volume led to distortion of the peaks of hydrochlorothiazide and its impurities B and A, which eluted at the beginning of the chromatogram. Satisfactory resolution of all the peaks was not also achieved. Amlodipine impurity B eluted on the tail of valsartan peak (peak numbers 19, 20, Fig. 3). This partial co-elution could be resolved by using different detection wavelengths for valsartan (225 nm) and amlodipine (360 nm). Minor unknown impurities of valsartan (content < 0,05 %) also co-eluted with amlodipine and with valsartan impurity C (peak numbers 13,14 and 16,17, Fig. 3).

The gradient programme starting with 10 or 15 % of acetonitrile resulted in better peak shapes for hydrochlorothiazide impurities, but they were still partly distorted even when 1 min of isocratic elution was added into the program. A higher content of acetonitrile at the start of the gradient program led to co-elution of hydrochlorothiazide impurities. Satisfactory separation of all the analytes was achieved by using separation column Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD (100 x 3,0 mm, 1,8 µm) heated to 30 °C and eluting analytes by slower gradient programme. Higher column volume enabled injection volume of 2,0 µL and thus required sensitivity of the method was achieved. Detection wavelengths were set (based on UV spectra) as follows: 220 nm for valsartan, its impurities and impurity D of amlodipine, 360 nm for amlodipine and its other impurities and 271 nm for hydrochlorothiazide and its impurities. Different wavelengths enhanced selectivity of the method especially for amlodipine impurities. Valsartan practically does not absorb UV light at 360 nm. Therefore, determination of amlodipine impurities was not interfered at all by minor valsartan impurities (content < 0,05 %), which amount was very variable in dependence on the batch of API. Chromatogram of spiked sample obtained under final chromatographic conditions is shown in Figure 3.



**Figure 3** Chromatogram of analysis of tablets combining amlodipine besylate (AMLO), valsartan (VALS) and hydrochlorothiazide (HCTZ) spiked with impurities A, B, C (HCTZ) at level 1,0 %, impurities A, B, D, E, F, G (AMLO) at level 0,2 %, respectively 0,5 % for impurity D and impurities B, C, 07 and 09 (VALS) at level 0,2 %, respectively 0,3 % for impurity C. Sample solvent: 1,6% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, acetonitrile, methanol in volume ratio of 4/3/3. Analysis was performed at chromatographic system Waters UPLC H-Class. Separation column: Zorbax Eclipse C<sub>8</sub> RRHD 100 x 3,0 mm, 1,8 μm. Column temperature: 30 °C. Detection: UV, 225 nm. Mobile phase: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5 and acetonitrile, gradient programme [t(min)/acetonitril(%)]: 0/15, 11/75, 12/75, 12,5/15 a 15/15. Flow-rate: 0,8 mL/min. Injection volume: 2,0 μL. Peak identification: 1 - besylate (AMLO), 2 - impurity B (HCTZ), 3 - impurity A (HCTZ), 4 - HCTZ, 5,7,8 - unknown impurities (HCTZ), 6 - impurity 09 (VALS), 9 - impurity C (HCTZ), 10, 14, 17, 18 - unknown impurities (VALS), 11 - impurity D (AMLO), 12 - impurity F (AMLO), 13 AMLO, 15 - impurity E (AMLO), 16 - impurity C (VALS), 19 - VALS, 20 - impurity B (AMLO), 21 - impurity G (AMLO), 22 - impurity 07 (VALS), 23 - impurity B (VALS), 24 - impurity A (AMLO). Unidentified peaks belong to sample solvent and mobile phase.

Originally 60% methanol was used as a solvent. It was found, however, that hydrochlorothiazide is quite unstable in this solvent, as the area corresponding to its impurity B increased rapidly (65% of area after 18 h at laboratory temperature). In addition, the recovery of hydrochlorothiazide impurity C in 60% methanol was only 49 % at concentration level 0,1 %. Degradation of hydrochlorothiazide to its impurity B

was stopped by using a 1.6% solution of ortho-phosphoric acid instead of water in 60% methanol. The recovery of impurity C improved up to 100 % when 80% methanol or 60% acetonitrile were used as solvents. However, the peaks of hydrochlorothiazide and its impurities were distorted when these sample solvents were used. Consequently, the combination of the two variants led to a final sample solvent consisting of a 1.6% solution of ortho-phosphoric acid, acetonitrile and methanol in a volume ratio of 4/3/3. Using this sample solvent, sample solution was found to be stable in for up to 48 h at 10 °C and recovery of hydrochlorothiazide impurity C was 100 % at concentration level 0,1 %.

Forced degradation study was performed to confirm the ability of the method for analyzing the stability samples. Homogenized tablets were stressed under following conditions: daylight (18 hours for dissolved tablets), higher temperature (65 °C, 18 hours), higher humidity (65 °C, 1 mL of H<sub>2</sub>O, 18 hours), acidic ( 50 °C, 3 mL of 0,5M HCl, 2 hours), alkaline (50 °C, 2 mL of 0,2M NaOH, 2 hours), oxidative (50 °C, 3 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 hours). All the degradation products were satisfactory separated ( $R \geq 1,2$ ) and the peak purity test was met for all the peaks of APIs. The main degradation products were confirmed (impurity B for hydrochlorothiazide, impurity D for amlodipine and impurity 09 for valsartan).

The method was validated according to ICH guideline [81] in the range: 0,05 % - 1,20 % for hydrochlorothiazide impurities A and B, 0,10 % - 1,24 % for hydrochlorothiazide impurity C, 0,05 % - 0,30 % for other unknown impurities of hydrochlorothiazide, 0,10 % - 0,66 % for amlodipine impurity D, 0,10 % - 0,30 % for other unknown impurities of amlodipine, 0,05 % - 0,41 % for valsartan impurity C and 0,05 % - 0,30 % for other unknown impurities of valsartan.

### **2.3 Preparation of monolithic thin layers**

Monolithic stationary phases were prepared on microscopic glass plate with dimension of 76 x 21 x 1 mm. The second part of the form was acrylate plexiglass Plexiglas XT ( 3 mm thick) cut on plates with dimensions of 76 x 21 mm. Teflon FEP films with thicknesses of 25, 50, 76 and 127  $\mu\text{m}$  cut on strips with dimensions

of 85 x 4 mm were put between glass and plexiglass plates. The form was held together with four office clips. Cover plate had to be plexiglass because using microscopic glass (silanized or non-silanized) led to adhesion of the monolith on the both parts of the form. After completed polymerization it would be unable to disassemble the form without destroying the monolith. In the first part of the preparation procedure the glass plate was silanized to enable covalent bonds between the monolith and glass. The plate was put into 1M NaOH for 3 hours at laboratory temperature. After that the glass plate was rinsed with water and put into 0,5M HCl for 30 minutes and rinsed with water again. The glass plate was dried at 120 °C for 2 hours and put into 20% solution of 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate in methanol for another two hours in dark at laboratory temperature. Silanized glass plate was rinsed with methanol and water and dried in dark at laboratory temperature for at least 16 hours. If the silanized glass plate was not rinsed with water thoroughly, residuals from silanization left on the plate. The impurities stopped flowing of polymerization mixture during the filling the form. In this case a lot of air gaps were present in filled form and prepared monolith was not homogenous. The form was filled vertically using automatic pipette. After that, the form was put (the glass part up) under the UV lamp (30 W, 254 nm). The distance between the form and lamp was 50 mm. Typical polymerization time was 25 minute, then the form was disassembled and monolithic layer was rinsed with methanol and hexane.

Polymerization mixtures were prepared into 5,0mL glass vials. All the components were weighed. Initiator DMPAP was dissolved in monomers (GMA, HEMA EDMA) in amount of 1 % with respect to monomers and then the components of porogenic mixture (cyclohexanol, propan-1-ol, decan-1-ol and butan-1,4-diol) were added. The mixture was sonicated for 10 minutes and purged with nitrogen for 15 minutes. The polymerization mixtures were stored at 4 °C. Compositions and characteristics of monolithic layers prepared in this work are shown in Table 1.

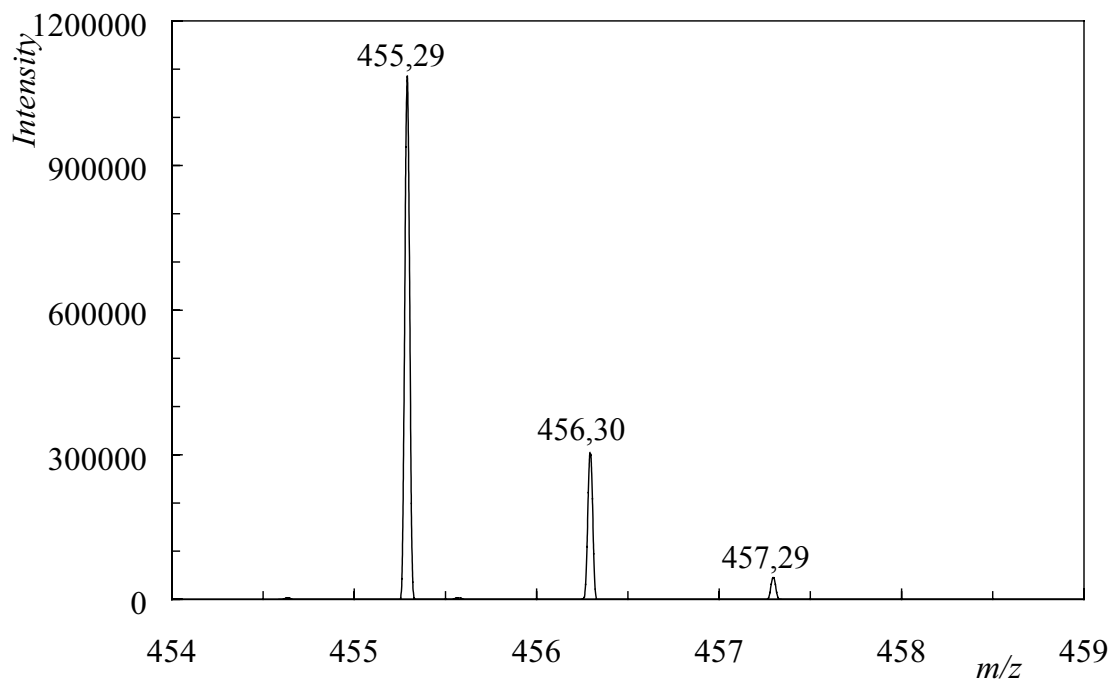
**Table 1** Composition of polymerization mixtures in % for preparation of monolithic thin-layers. Initiator: DMPAP in amount of 1 % with respect to monomers (GMA, HEMA, EDMA). Time for traveling of hexane through the layers in minutes and the mechanical stability of the layers.

Component	GMA	HEMA	EDMA	cyklohexanol	decan-1-ol	propan-1-ol	butan-1,4-diol	time of travel	mechanical
Mixture	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(min)	stability
S1	24	-	16	20	40	-	-	-	No
S2	24	-	16	-	-	40	20	-	No
S3	-	24	16	-	-	40	20	30	Yes
S4	-	24	16	20	40	-	-	2	No
S5	-	24	16	-	-	30	30	30	Yes
S6	-	24	16	-	-	20	40	30	Yes
S7	-	32	8	-	-	40	20	30	Yes
S8	-	16	24	-	-	40	20	30	Yes
S9	-	24	16	20	-	40	-	30	Yes
S10	-	24	16	-	40	-	20	2	No
S11	-	24	16	-	30	30	-	2	No
S12	-	24	16	-	20	40	-	15	No
S13	-	24	16	-	10	50	-	30	Yes
S14	-	24	16	30	-	-	30	25	No

According to data from Table 1, the monolithic thin layer which would be mechanically stable, and therefore suitable for ionization by DAPPI, while it would also provide good porosity for fast traveling of the mobile phase, was not prepared. Mechanical stability, smooth and shiny surface and probably poor porosity causing slow capillary action of hexane was determined by the presence of propan-1-ol in the porogenic mixture. On the contrary, mechanically unstable monolith, but suitable for chromatography (time of travel of hexane around 2 minutes) was prepared when decan-1-ol was used in the porogenic mixture. Porogenic mixtures combining propan-1-ol and decan-1-ol (mixtures S11 - S13) led to series of layers with increasing mechanical stability as content of propan-1-ol increased, but with decreasing amount of decan-1-ol the time necessary for traveling of hexane was increasing. Thickness of monolithic layer defined by thickness of teflon gasket had no influence on monolith characteristic such as mechanical stability and throughput for mobile phase. However, the form separated by gasket with thickness of 25  $\mu\text{m}$  was not possible to fill without air bubbles.

Monolithic layer (mixture S 3, Tab. 1) with thickness of 50  $\mu\text{m}$  was used to evaluate the possibility of ionization by DAPPI technique from monolithic stationary phases. This monolithic layer had good mechanical stability and thus the probability of damage of MS detector was minimized. Mass spectrum of verapamil obtained by ionization with DAPPI from monolithic thin layer is shown in Figure 4.





**Figure 4** Mass spectrum of 10mM verapamil ( $M_r = 454$ ). Injection volume: 1,0  $\mu\text{L}$ . Ionization DAPPI at positive mode from monolithic TLC plate S3 (see Tab 1). Mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Power on spray microchip: 4,5 W. Temperature of spray: 250  $^{\circ}\text{C}$  - 300  $^{\circ}\text{C}$  on the surface of plate. Spray: toluen 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  and nitrogen 180  $\text{mL}/\text{min}$ . Spray angle: 45  $^{\circ}$ . Temperature and voltage of capillary: 340  $^{\circ}\text{C}$ , 7,0 V. Tube lens voltage: 44,9 V.

The mass spectrum corresponding to molecule adduct  $[\text{verapamil}+\text{H}]^+$  was obtained by ionization with DAPPI technique. Approximately ten-times higher response was obtained by ionization from monolithic thin layer than commercial silica gel plate (Merck TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> MS-grade). Better efficiency of ionization was probably managed due to different thicknesses. Monolithic layer was significantly thinner than silica gel plate (50  $\mu\text{m}$  versus 195  $\mu\text{m}$ ) and thus bigger amount of verapamil was available for ionization. High temperature during ionization did not damage the monolithic layer and thus the layer was confirmed as suitable for DAPPI technique.

### 3. Conclusion

In the first part of this work the methods for determination of impurities in combined pharmaceutical dosage forms were developed and validated. The method for separation of impurities in paracetamol, codeine phosphate hemihydrate and pitophenone hydrochloride in presence of fempiverinium bromide was based on ion-pair reversed phase chromatography using HPLC technology. The procedure of sample preparation from suppository dosage form was developed to achieve satisfactory accuracy of impurities and stability of the sample solution. Separation of all impurities and APIs was achieved also in reversed phase chromatography mode. However, this method was found to be insufficiently robust to changes in pH of the buffer and in the content of methanol in mobile phase. The main degradation product of pitophenone was identified by the analysis of the batch of Spasmopan<sup>®</sup> four years after manufacturing. In addition due to this analysis, the method was confirmed as suitable for analysis of stability samples. Content of impurities in tablets combining amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide was determined by reversed-phase UHPLC method. The procedure of sample preparation was developed with respect to satisfactory accuracy of impurities, compatibility with chromatographic conditions and stability of the sample solution. The forced degradation study of the method was performed. The main degradation products of all three APIs were identified and the method was confirmed as suitable for analysis of stability samples

In the second part of this work methodology of preparation of monolithic thin-layer stationary phases was realized in laboratory environment of Department of Analytical Chemistry (Faculty of Science, Charles University in Prague). Homogenous monolithic layers attached on silanized glass plate were prepared after optimization of preparation steps. Prepared monolithic layers were based on methacrylate and polymerization was initiated with UV light. Mechanically stable layers with smooth shiny surface were not throughput for mobile phase. On the contrary, layers with good porosity were very fragile and unsuitable for ionization of molecules by DAPPI technique. Verapamil was successfully ionized by DAPPI from mechanically stable monolithic layer with higher efficiency then from commercial silica gel TLC plate.

## References

- [1] S. Ahuja, S. Scypinsky (Ed.): Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 415 – 443.
- [2] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015. Chapter 2.2.49.
- [3] ICH Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances, 2006.
- [4] ICH Q3C (R5) Guideline for Residual Solvents, 2011.
- [5] S. Görög; J. Pharm. Biomed. 48 (2008) 247 – 253.
- [6] ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products, 2006.
- [7] Český Lékopis 2009, Státní ústav pro kontrolu léčiv.
- [8] European Pharmacopoeia, 8.5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2015.
- [9] USP 37 Second supplement, The United States Pharmacopoeial Convention.
- [10] British Pharmacopoeia 2015, The British Pharmacopoeia Secretariat.
- [11] Japanese Pharmacopoeia 16, Ministri of Health, Labour and Welfare, Japan.
- [12] H. Lüllman, K. Mohr, A. Ziegler, D. Bieger: Color Atlas of Pharmacology, 2nd ed., Thieme, New York, 2000.
- [13] M. J. Neal: Medical Pharmacology at a Glance, 7th ed., Wiley, Hoboken, 2012.
- [14] S. K. Kulkarni, I. Ninan, A. Sighn; Indian J. Pharma. col. 30 (1998) 323 – 325, CAN 130:148241.
- [15] A. M. Larson, J. Polson, R. J. Fontana, T. J. Davern, E. Lalani, L. S. Hynan, J. S. Reisch, F. V. Schiødt, G. Ostapowicz, O. Shakil, W. M. Lee; Hepatology 42 (2005) 1364 – 1372.
- [16] X. Feng, Q. Zhang, P. Cong, Z. Zhu; Anal. Methods 5 (2013) 5286 – 5293.
- [17] L. M. Flower, R. B. Moore, J. R. Foster, E. A. Lock; Hum. Exp. Toxicol. 10 (1991) 451 – 459, CAN 116:209251.
- [18] T. Nemeth, P. Jankovics, J. Nemeth-Palotas, H. Kozegi-Szalai; J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 746 – 749.
- [19] E. McEvoy, S. Donegan, J. Power, K. Altria; Chromatographia 68 (2008) 49 – 56.

- [20] G. Milch, E. Szabo; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 1107 – 1113.
- [21] B. Dejaegher, M. S. Bloomfield, J. Smeyers-Verbeke, Y. V. Heyd; *Talanta* 75 (2008) 258 – 265.
- [22] J. Forshed, F. O. Andersson, S. P. Jacobsson; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 495 – 505.
- [23] S. L. Eldridge, V. K. Almeida, A. K. Korir, C. K. Larive; *Anal. Chem.* 79 (2007) 8446 – 8453.
- [24] E. A. Abdelaleem, N. S. Abdelwahab; *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 187 – 191.
- [25] D. A. Shash, J. P. Rana, S. L. Baldania, U. K. Chhalotiya, K. K. Bhatt; *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 27 (2014) 52 – 57.
- [26] I. U. Khan, M. Ashfaq, S. N. Razzaq, I. Mariam; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1437 – 1450.
- [27] M. S. Ali, S. Raffiuddin, M. Ghori, A. R. Kahtri; *J. AOAC Int.* 90 (2007) 82 – 93.
- [28] M. Kamberi, C. M. Riley, X. Ma, C. C. Huang; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 123 – 128.
- [29] O. Calinescu, I. A. Badea, L. Vladescu, V. Meltzer, E. Pincu; *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 335 – 342.
- [30] R. N. Rao, A. Narasaraju; *Anal. Sci.* 22 (2006) 287 – 292.
- [31] M. Crevar, B. Ivkovic, S. Vladimirov, V. Kuntic, Z. Vujic; *Acta Chim. Slov.* 55 (2008) 665 – 670.
- [32] E. Wyszeccka-Kaszuba, M. Warowna-Grzeskiewicz, Z. Fijalek; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1081 – 1086.
- [33] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart, A. M. McLaughl; *J. Chromatogr.* 354 (1986) 355–366.
- [34] W. R. Sisco, C. T. Rittenhouse, L. A. Everhart; *J. Chromatogr.* 348 (1985) 253 – 263.
- [35] R. Kommana, P. Basappa; *Chromatogr. Res. Int.* (2013), 4047277p.
- [36] K. Persson-Stubberud, O. Astrom; *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95 – 102.
- [37] Z. Budvari-Barany, G. Szasz, K. Gymessi-Forras; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3257 – 3268.

- [38] A. Kulikov, U. Artem, A. P. Biochenko, A. G. Verushkin; *Anal. Methods* 3 (2011) 2749 – 2757.
- [39] L. Krenn, B. Boros, R. Ohmacht, L. Jelinek; *Chromatographia* 51 (2000) S175 – S178.
- [40] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 687 – 693.
- [41] I. Bjoernsdottir, S. H. Hansen; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1083 – 1089.
- [42] I. Ojanpera, J. Vartivaara, A. Ruohonen, E. Vuori; *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1435 – 1446.
- [43] H. Schuetz, A. Pielmeyer, G. Weiler; *Aerzt. Lab.* 36 (1990) 113 – 123, CAN113:110560.
- [44] T. Daldrup, P. Michalke, W. Boehme; *Chromatogr. Newsl.* 10 (1982) 1 – 7, CAN98:84433.
- [45] T. Daldrup, F. Susanto, P. Michalke; *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 308 (1981) 413 – 427, CAN 96:29498.
- [46] B. Morelli; *Anal. Lett.* 31 (1998) 2431 – 2445.
- [47] B. Morelli; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 423 – 433.
- [48] T. Galaon, M. Radulescu, V. David, A. Medvedovici; *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 1360 – 1368.
- [49] D. Radulovic, L. Zivarovic, D. Zivanov-Stakic; *Acta Pol. Pharm.* 46 (1989) 506 – 509, CAN 113:158810.
- [50] D. Agbaba, O. Grozdanovic, L. Popovic, S. Vladimirov, D. Zivanov-Stakic; *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9 (1996) 116 – 119, CAN 125:96252.
- [51] D. Radulovic, Z. Blagojevic; *Arh. Farm.* 32 (1982) 3 – 7, CAN 97:98433.
- [52] A Global Brief on Hypertension, World Health Organization, Geneva, 2013.
- [53] Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 1462 – 1536.
- [54] G. A. McKay, R. M. Walters: *LectureNotes, Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 9th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2013.
- [55] J. Vojta, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 36 – 44.

- [56] R. A. Shaalan, T. S. Belal; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 215 – 230.
- [57] S. E. K. Tekkeli; *J. Anal. Methods Chem.* (2013), Article Number 179627.
- [58] D. Jothieswari, K. Anandakumar, S. D. Vijaya, B. Vijayakumar, D. Priya, R. B. Stephen; *J. Pharm. Biomed. Sci.* 5 (12) (2012).
- [59] B. N. Deepthi, D. N. Rao, M. P. Rao, S. R. Beeravalli, Y. R. Krishna, V. Rao, L. S. Koundilya; *Int. J. Univ. Pharm. Biosci.* 2 (2013) 174 – 185.
- [60] S. M. El-Gizawy, O. H. Abdelmageed, M. A. Omar, S. M. Deryea, A. M. Abdel-Megied; *Am. J. Anal. Chem.* 3 (2012) 422 – 430.
- [61] R. N. Sharma, S. S. Pancholi; *Acta Pharm. (Zagreb)* 62 (2012) 45 – 58.
- [62] K. R. Ulavapally, J. Sriramulu, V. R. Pyreddy, V. Bobbarala; *J. Pharm. Res.* 4 (2011) 894 – 896.
- [63] M. Sharma, C. Kothari, O. Sherikar, P. Mehta; *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 27 – 35.
- [64] C. Vishnuvardhan, P. Radhakrishnanand, S. G. Navalgund, K. R. Atcha, N. Satheshkumar; *Chromatographia* 77 (2014) 265 – 275.
- [65] S. E. Vignaduzzo, P. M. Castellano, T. S. Kaufman; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 2383 – 2395.
- [66] S. J. Varghese, T. K. Ravi; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 981 – 994.
- [67] W. M. Ebeid, E. F. Elkady, A. A. El-Zaher, R. I. El-Bagary, G. Patonay; *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 748 – 757.
- [68] R. S. Ch. Phani, K. R. S. Prasad, U. R. Mallu; *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 440 – 454.
- [69] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany; *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 4 (2013) 345 – 356.
- [70] M. Younus, T. K. Reddy, Y. R. Reddy, M. F. Arif; *J. Pharm. Res.* 3 (2010) 2647 – 2650.
- [71] A. Hemke, M. Bhure, V. Anjankar, K. Gupta; *Int. J. Pharm. Technol.* 5 (2013) 5383 – 5392.
- [72] M. B. Nikam, H. Dhamane, A. Aligave, M. S. Kondawar; *Int. J. Pharm. Technol.* 2 (2010) 642 – 650.

- [73] H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany; *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 215 – 223.
- [74] V. R. Galande, K. G. Baheti, S. Indraksha, M. H. Dehghan; *Indian J. Pharm. Sci.* 74 (2012) 18 – 23.
- [75] F. Svec, Y. Lv; *Anal. Chem.* 87 (2015) 250 – 273.
- [76] D. S. Peterson, Q. Luo, E. F. Hilder, F. Svec, J. M. J. Fréchet; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1504 – 1512.
- [77] R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Svec; *Anal. Chem* 79 (2007) 486 – 493.
- [78] Y. Han, P. Levkin, I. Abarientos, H. Liu, F. Svec, J. M. J. Fréchet; *Anal. Chem* 82 (2010) 2520 – 2528.
- [79] I. Urbanova, F. Svec; *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2345 – 2351.
- [80] Y. Lv, Z. Lin, T. Tan, F. Svec; *J. Chromatogr. A* 1316 (2013) 154 – 159.
- [81] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

## Curriculum vitae

### Personal information

---

Name and surname	Jiří Vojta
Place of birth	Prague
Contact	jiri.vojta@natur.cuni.cz

### Education

---

2011 - present	Ph.D. study, Charles University in Prague, Faculty of Science; Study program: Analytical Chemistry
2009 - 2011	MSc. study, Charles University in Prague, Faculty of Science; Study program: Clinical and toxicological analysis; Degree: MSc.
2006 - 2009	Bc.study, Charles University in Prague, Faculty of Science; Study program: Clinical and toxicological analysis; Degree: Bc.

### Work experiences

---

2015 - present	Ferring-Léčiva a.s. Position: QC analyst Responsibility: HPLC/UHPLC analysis of medicaments, analytical development.
2011 - 2015	Zentiva, k. s. Position: PhD Cont (part-time job) Responsibility: HPLC/UHPLC analysis of medicaments. Development and validation of methods. Forced degradation studies.
2010 - 2011	Zentiva, k.s Position: QC technician (part-time job) Responsibility: Preparation of samples and solution for HPLC/UHPLC analysis of medicaments.

### Others

---

Language	English (FCE, 2014)
Software	Empower: Basic and Advanced certified courses



## The list of publications, patents, lectures and posters

### Publications

1. M. Franc, **J. Vojta**, J. Sobotníková, P. Coufal, Z. Bosáková: Performance and lifetime of slurry packed capillary columns for high performance liquid chromatography, Chem. Papers 68 (2014) 22 – 28.
2. **J. Vojta**, A. Musilová-Svobodová, M. Franc, P. Coufal, Z. Bosáková: Preparation and Application of Monolithic Columns as Modern Separation Media, Chem. Listy 108 (2014) 127 – 134.
3. **J. Vojta**, P. Hanzlík, A. Jedlička, P. Coufal: Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 85 – 92.
4. **J. Vojta**, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková: A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, J. Pharm. Biomed. Anal. 109 (2015) 36 – 44.

### Patents

1. P. Coufal, A. Kubičková, V. Kubiček, M. Franc, **J. Vojta**, E. Tesařová, Z. Bosáková: Postkolonová derivatizace tuhým derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC, Patent 305127, Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika

### Lectures

1. **J. Vojta**: Vývoj a testování kapilárních kolon na bázi iontoměniče; Zentiva k.s., Praha, Česká republika, 11. 10. 2011.
2. **J. Vojta**: Monolitické kapilární kolony; Seminář katedry analytické chemie, Chemický ústav PřF UK, Praha, Česká republika, 18. 10. 2011.

3. **J. Vojta**, A. Musilová (Svobodová), P. Coufal: New capillary monolithic column for isocratic separation of small molecules; 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry", Praha, Česká republika, 25. 9. 2012.
4. **J.Vojta**: Monolithic material in separation science; Advances in separation method, Chemický ústav PŘF UK, Praha, Česká republika, 15. 4. 2013.

### Posters

1. A. Svobodová, **J. Vojta**, E. Tesařová, P. Coufal: Influence of Methacrylic Acid Addition on the Separation Performance of Polystyrene-based Monolith; 63. Zjazd Chemikov, Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9. 9. 2011.
2. **J. Vojta**, A. Svobodová, P. Coufal: Effect of Increasing Amount of Methacrylic Acid in Monolithic Columns for CLC and CEC Analysis of Small Molecules; 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Polsko, 9. – 13. 9. 2012.
3. **J. Vojta**, A. Kubičková, M. Franc, P. Coufal: On-Line Post-Column Derivatization of Amino Acids in Capillary Liquid Chromatography; HPLC 2013, 39th International Symposium of Chromatography and Related Techniques, Amsterdam, Nizozemsko, 16 – 20. 6. 2013.