

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Jan Němec

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Validace disoluční metody

Jan Němec

Bakalářská práce

2009

University of Pardubice  
Fakulty of Chemical Technology

Validation of dissolution method

Jan Němec

Bachelor thesis

2009

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan NĚMEC, DiS.**  
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**  
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**  
  
Název tématu: **Validace disoluční metody**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Popište disoluční metodiku pro stanovení účinných látek v tabletách.
- 2) Charakterizujte požadavky na validaci disoluční metody.
- 3) Na praktickém příkladu aplikujte validaci disoluční metody.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**


Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

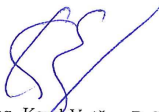
Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Hradci Králové 20.07.2009

Jan Němec

Rád bych poděkoval všem, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na vzniku této práce.

# SOUHRN

Tato práce je věnována problematice disolučních testů, které se používají jako lékopisné metody ve farmaceutickém průmyslu, pro zjištění rychlosti uvolňování účinné látky z pevných lékových forem za podmínek *in vitro*.

Experimentální část se zabývá disolucí tabletové lékové formy, která jako účinnou látku obsahuje azitromycin. Součástí práce je validace disoluční metody, která zahrnuje ověření linearity, přesnosti, správnosti a selektivity.

**Klíčová slova:** Disoluce  
Validace  
Azitromycin



# SUMMARY

This work is dealing with the questions of dissolution tests that are being used as pharmacopoeial methods within pharmaceutical industry for a detection of active substance releasing velocity from solid drug forms considering conditions “in vitro”.

An experimental part dwells on a tablet drug form dissolution with azitromycin as an active substance. A part of this work is a validation of dissolution method which comprehends verification of linearity, accuracy, correctness and selectiveness.

**Keywords:** Dissolution  
Validation  
Azitromycin

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
2.1 DISOLUCE .....	11
2.2 DISOLUČNÍ METODY .....	11
2.2.1 Pádelková metoda .....	11
2.2.2 Košíčková metoda.....	12
2.2.3 Metoda s průtočnou celou .....	13
2.3 DŮLEŽITÉ PARAMETRY DISOLUČNÍCH TESTŮ .....	14
2.4 KONTROLA DISOLUČNÍCH PŘÍSTROJŮ.....	14
2.5 LÉKOVÉ FORMY .....	15
2.6 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE (SVP).....	15
2.7 VALIDACE .....	16
2.8 PROVEDENÍ A LIMITY VALIDACE.....	16
2.9 AZITROMYCIN .....	18
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>21</b>
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	21
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	21
3.4 DISOLUCE .....	21
3.3 HPLC STANOVENÍ .....	22
3.5 LINEARITA .....	22
3.6 SPRÁVNOST .....	23
3.7 PŘESNOST .....	23
3.8 SELEKTIVITA .....	23
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>24</b>
4.1 LINEARITA .....	25
4.1 SPRÁVNOST .....	25
4.2 PŘESNOST .....	26
4.3 SELEKTIVITA .....	28
4.4 SHRNTÍ VÝSLEDKŮ .....	29
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>30</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ INFORMACÍ.....</b>	<b>31</b>

# 1. Úvod

Uvolňování léčiva z pevných perorálních lékových forem se zkouší in vitro disolučním testem. Požadavky na aparaturu, provádění a vyhodnocování výsledků disolučního testu jsou přesně uvedeny v českém, evropském i americkém lékopise. Každý lék musí splnit během disoluční zkoušky dané limity. Obecně lze léky ze skupiny pevných perorálních lékových forem vyskytujících se v současné době na farmaceutickém trhu rozdělit na lékové formy bez úpravy uvolňování léčiva a s modifikovaným uvolňováním léčiva. Rychlost disoluce je ovlivněna nejenom chemickými a fyzikálními vlastnostmi účinné látky, ale i použitými excipienty a výrobním procesem.

Obsah účinné látky ve vzorcích odebraných během disoluce se obvykle stanovuje spektrofotometricky nebo pomocí kapalinové chromatografie.

Validace je proces, při kterém se ověří použitelnost vyvinuté metody.

Předmětem této práce je validace pádelkové disoluční metody použité pro zjištění rychlosti uvolňování účinné látky azithromycinu z tablety s rychlým uvolňováním.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Disoluce

Uvolňování léčiva z tuhých perorálních lékových forem se zkouší *in vitro* disolučním testem. Požadavky na aparaturu, provádění a vyhodnocování výsledků disolučního testu jsou přesně uvedeny v českém, evropském i americkém lékopise a v dalších publikacích. Každý lék musí splnit během disoluční zkoušky dané limity. Rychlost disoluce je ovlivněna nejenom chemickými a fyzikálními vlastnostmi účinné látky, ale i použitými excipienty a výrobním procesem<sup>1</sup>.

### 2.2 Disoluční metody

Disoluční test lze provést několika metodami. Volba metody je nejvíce závislá na vlastnostech lékové formy. Pro disoluce pevných lékových forem se používají především tyto metody:

- pádelková metoda
- košíčková metoda
- metoda s průtokovou celou

#### 2.2.1 Pádelková metoda

**Přístroj pro pádelkovou metodu:** Zařízení se skládá z nádoby, která může být zakryta víkem ze skla nebo jiného vhodného inertního materiálu, motoru, hnací hřídele a lopatkového míchadla.

Nádoba je částečně ponořena ve vhodné vodní lázni přiměřené velikosti, nebo je vybavena vhodným zařízením k zahřívání, jako je vyhřívaný plášť. Vodní lázeň nebo vyhřívací zařízení umožňují udržovat teplotu uvnitř nádoby během zkoušky. Disoluční médium se udržuje ve stálém plynulém pohybu. Pro zajištění plynulého chodu míchací jednotky nesmí žádná část zařízení ani prostředí, v němž je přístroj umístěn, přispívat ke znatelnému pohybu, třesení nebo vibraci.

Jako míchací jednotka se používá pádlo tvořené hnací hřídelí s lopatkovým míchadlem. Hřídel musí být vystředěna a její rotace musí být plynulá a bez znatelného chvění, které by mohlo ovlivnit výsledky. Míchadlo je vyrobeno z kovu nebo vhodného inertního neohebného materiálu a tvoří s hnací hřídelí jeden celek. Může se použít i dvoudílné

provedení s výměnným míchadlem. Používá se zařízení pro regulaci rychlosti otáček, které umožňuje nastavení specifikované rychlosti otáčení hřídele. Nádoba je válcovitá s půlkulatým dnem o objemu jeden litr s obrubou nahoře. Pokud testovaná léková forma plave na hladině, může se použít malý volný kousek nereaktivního materiálu, jako je malá spirálka z drátu. Léková forma se pak uchytí do této spirálky. Mohou se použít i jiné ověřené prostředky k uchycení. Přístroj umožňující pozorování přípravku a míchací jednotky během zkoušky je vhodnější.

**Provedení testu:** Předepsané množství disoluční kapaliny se odměří do nádoby, sestaví se přístroj, disoluční kapalina se vytemperuje na  $(37 \pm 0,5^\circ\text{C})$ . Léková forma zkoušeného přípravku se vloží na dno nádoby před spuštěním přístroje. Přípravky, které plavou nebo se vznášejí v disoluční kapalině se přidrží vodorovně u dna za použití vhodné pomůcky, jako je spirálka z drátu nebo skla.

Nastaví se předepsané otáčky a přístroj se ihned uvede do chodu. Odběr vzorků probíhá tak že v předepsaném čase nebo v předepsaných časových intervalech nebo průběžně se odebere předepsané množství roztoku z nádoby ve středu mezi hladinou disoluční tekutiny a horní hranou lopatky míchadla, resp. košíčku, minimálně 10 mm od stěny nádoby. Je-li předepsán odběr opakovaný, odebraný objem roztoku v případě, kdy je použita metoda s míchadly nebo košíčky, se nahradí vždy stejným objemem disoluční kapaliny, případně se počítá s jejím úbytkem.

Odebraný roztok se zfiltruje přes inertní filtr o vhodné velikosti pórů, který neadsorbuje zkoušený vzorek z disoluční kapaliny a neobsahuje látky, které se extrahují disoluční kapalinou a interferují při použití předepsaného způsobu stanovení.

### 2.2.2 Košíčková metoda

**Přístroj pro košíčkovou metodu:** Používá se stejné zařízení jako u pádelkové metody (kapitola 2.2.1), jen hnací hřídel je na spodním konci zakončená válcovitým košíčkem. Košíček tvoří dvě části: horní příruba, která je na konci hnací hřídele. Pomocí tří pružných per nebo jiným vhodným způsobem se k horní přírubě připevňuje tubus košíčku, do kterého se umísťuje zkoušená léková forma. Upevnění tubusu musí být natolik pevné, aby během rotace nedocházelo k jeho vychýlení od středové osy nádoby. Tubus košíčku je tvořen sítkou válcovitého tvaru zasazenou nahoře i dole do úzkých kovových prstenců. Hřídel a košíček míchací jednotky jsou vyrobeny z nerezové oceli

**Provedení testu:** Postup je totožný s provedením testu u pádelkové metody (kapitola 2.2.1), rozdíl je pouze v umístění vzorku. Léková forma zkoušeného přípravku se vloží do suchého košíčku, který se upevní na hnací hřídel. Je třeba se pečlivě vyhnout vzduchovým bublinkám na povrchu zkoušeného přípravku.

### 2.2.3 Metoda s průtočnou celou

**Přístroj s průtokovou celou:** Zařízení se skládá ze zásobní nádoby na disoluční médium, pumpy na disoluční médium, průtokové cely a vodní lázně.

Vodní lázeň udržuje během celé zkoušky teplotu disolučního média. Pumpa vytlačuje disoluční médium přes průtokovou celu. Průtoková cela je z průhledného a inertního materiálu. Horní část cely obsahuje kovovou mřížku, která je hrubým filtrem, a po té filtrační jednotku pro filtry papírové, ze skleněných vláken nebo celulosy.

Existují dva základní typy průtokových cel:

1) Průtoková cela pro disoluce lipofilních lékových forem, jako jsou některé čípky a měkké želatinové tobolky. Dolní část obsahuje dvě sousedící komory, jedna je napojena na průtokové zařízení. Disoluční kapalina protéká přes komoru A a jejím vrchem přetéká do komory B, kde stéká do otvoru o malé světlosti, a odtud proudí opět vzhůru k filtračnímu zařízení. Ve střední části cely je dutina určená k hromadění lipofilních pomocných látek

2) Průtoková cela pro disoluce tablet a podobných lékových forem. Dolní kuželovitá část se plní malými skleněnými kuličkami. Ve špičce kužele cely je umístěna jedna větší skleněná kulička. Ta zabraňuje vstupu tekutiny do cely. Na ní je pak nasypána vrstva malých skleněných kuliček po okraj kuželovité části.

Cela je při měření vložena ve vodní lázni. K odstínění všech vibrací je pumpa od disoluční jednotky oddělena. Pumpa nesmí být umístěna výše než zásobní nádoby s disolučním médiem. Spojovací hadičky musí být pokud možno co nejkratší a inertní.

**Provedení testu:** Záleží na použité cele. Pokud se použije cela pro disoluce lipofilních lékových forem, tak se testovaný přípravek vkládá do komory A. V druhém případě se testovaná léková forma pokládá na malé skleněné kuličky. Nechá se tam volně ležet nebo se uchopí speciálním držákem tablet. Po té se připojí víko cely, v němž je umístěno filtrační zařízení. Za použití vhodného čerpadla s nastaveným přesným průtokem se disoluční médium o teplotě  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  nechá proudit přes dno do cely.

Vzorky odebírají při výstupu z cely nehledě na uzavřený nebo otevřený okruh<sup>2</sup>.

## 2.3 Důležité parametry disolučních testů

**1) otáčky míchadla:** Volí se takové, při kterých se bude léková forma dobře rozpadat. Provedou zkušební disoluce při různých otáčkách. Z grafického vyhodnocení a pozorování chování lékové formy v nádobě během testu se zvolí otáčky. Obvykle se zkouší 50, 75 a 100 otáček za minutu. U metody s průtočnou celou se zkouší různé průtoky disolučního média, většinou 8, 16, 32 mililitrů za minutu.

**2) Disoluční médium:** Používá se takové ve kterém je použita účinná látka dobře rozpustná. Rozpustnost účinné látky v médiu se zkouší v čtyřnásobné koncentraci než jaká bude v disoluční nádobě. Nejčastěji používaná disoluční média:

- 0,1 M kyselina chlorovodíková
- pufr pH = 1,2
- fosfátový pufr pH = 4,5
- acetátový pufr pH = 4,5
- fosfátový pufr pH = 6,8
- UHQ voda

Další používaná disoluční média:

- 2 % roztok laurylsíranu
- fosfátový pufr pH = 6,0
- žaludeční šťáva

Objem disolučního média v nádobě bývá obvykle jeden litr, ale podle potřeb disolučního testu může být i jiný. Spotřeba média při metodě s průtočnou celou je dána délkou disoluce a průtokem disolučního média. Veškerá disoluční média se vždy temperují na teplotu  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Kontrola disolučních přístrojů

Disoluční přístroje se jednou nebo vícekrát ročně kontrolují odborným technikem. U přístroje PHARMA TEST PTWS3 se kontroluje:

- házivost hřídele při 50 otáčkách
- házivost hřídele při 100 otáčkách
- házivost hřídele s pádlem při 50 otáčkách
- házivost hřídele s pádlem při 100 otáčkách

- centrování nádob
- kontrola rychlosti otáček
- kontrola teploty uvnitř naplněných nádob
- zemní a izolační odpor
- výkon pumpy

Přesná specifikace kontroly je uvedena v dokumentaci k disolučnímu přístroji<sup>3</sup>. Pokud by byli překročeny povolené limity, je nutné závadu odstranit. Nevyhovující přístroj není možné v režimu SVP použít.

## 2.5 Lékové formy

Léková forma je konkrétní podoba léčivého přípravku, tedy jeho fyzikální, chemická a tvarová charakteristika. Léková forma je daná potřebou podání (užití nebo použití) léku a koexistencí v ní potřebných léčiv a pomocných látek. Do tohoto pojmu se zahrnuje tvar, složení a fyzikální struktura<sup>4</sup>. Lékové formy rozlišujeme podle stavu na:

- pevné - tablety, kapsle
- kapalné - kapky, sirupy, injekce
- polotuhé - masti, gely

## 2.6 Správná výrobní praxe (SVP)

Představuje ve farmaceutické výrobě systém ochrany spotřebitele. Je to soubor opatření, který minimalizuje riziko, aby se dostal na trh lék nevyhovující kvality či nevhodný pro zamýšlené použití<sup>5,6</sup>.

Pro Českou republiku jsou závazné pokyny vydávané Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL)<sup>7</sup>. Jedná se o pokyn SÚKL VYR-32, který se řídí zásadami evropského předpisu EU- GMP Guide. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4, Good manufacturing practices.

- Základní oblasti SVP
  - řízení jakosti
  - pracovníci
  - prostory
  - zařízení
  - dokumentace
  - výroba



- kontrola jakosti
- Základní požadavky SVP
  - jasná definice výrobního postupu
  - provádění validací výrobních stupňů
  - názorné pracovní postupy a instrukce
  - školení pracovníků
  - dokumentační záznamy během výroby a kontroly
  - záznamy o distribuci výrobků
  - systém řešení reklamací a stahování výrobků z trhu

## 2.7 Validace

Validační činnosti znamenají dnes jeden ze základních principů farmaceutického jištění jakosti a představují též významnou položku nákladů na jakost u farmaceutických výrobců.

Validace je potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny<sup>8</sup>. Validace tedy dokládá s vysokým stupněm jistoty, že specifický proces je schopen trvale poskytovat výrobek splňující předem stanovené kvalitativní požadavky.

Validace disoluční metody se skládá ze čtyř zkoušek. Dvě zkoušky se týkají vlastní disoluce: přesnost a správnost. Další dvě zkoušky jsou analytického významu: linearita a selektivita.

- Linearita: schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky
- Správnost: míra shody s měřenou nebo vypočtenou hodnotou k jeho skutečné nebo specifikované hodnotě
- Přesnost: shoda mezi výsledky několika opakovaných měření
- Selektivita: schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek (placeba)

## 2.8 Provedení a limity validace

1) **Linearita:** Provede se v předpokládaném rozsahu koncentrací od 20 do 110% (deklarované účinné látky) v příslušném objemu předepsaného disolučního media. Vzorky se

vyhodnotí pomocí HPLC nebo spektrofotometrie. V případě opakovaných měření se do výpočtu kalibrace použijí průměrné hodnoty.

Linearitu prokazuje grafické zpracování závislosti koncentrace účinné látky na absorbanci či ploše píků. Přímkou, resp. míra linearity, je charakterizována příslušnou rovnicí a hodnotou spolehlivosti  $R$

$$R^2 \geq 0,98$$

**2) Správnost:** Testuje se modelovou disolucí na 3 hodnoty (60%, 80%, 100% účinné látky), nebo v případě přípravků s řízeným uvolňováním na střední hodnotu z daného intervalu (podmínky v příslušném sledovaném čase odběru). V každé ze šesti nádob je vytemperované disoluční médium s danou procentní koncentrací účinné látky. Modelová disoluce se odstartuje se současným vhozením tablety (tobolky) placebo do každé nádoby. V čase  $t$  (stanovený odběr podle znění testu) se z každé nádoby odebere třikrát vzorek a následně analyzuje (HPLC, spektrofotometrie) a softwarově vyhodnotí množství účinné látky. Ze získaných dat se pro každou nádobu vypočte výtěžnost (recovery). Získaná hodnota jednak charakterizuje odchylku výsledku dané metody od správné hodnoty v každé ze šesti nádob, za další pak minimální rozdíly mezi výtěžnostmi 1 – 6 potvrzují dobrou reprodukovatelnost výsledků od nádoby k nádobě. Resp. že rychlost uvolňování v každé z nich není zatížena nějakou systémovou chybou (například negativní ovlivnění příslušným míchadlem, místem odběru vzorků v nádobě a podobně)

**Požadované hodnoty sledovaných parametrů:**

**Výtěžnost (recovery)                    95 – 105%**

**RSD pro jednotlivou nádobu max. 3%**

**3) Přesnost:** Testuje se třikrát opakovanou disolucí jedné vybrané šarže daného přípravku s odběrem po  $t$  minutách (stanovený odběr v čase podle znění testu). Vybranou šarží se rozumí skutečnost, že se jedná o propuštěný přípravek, u kterého je požadovaná homogenita dána souborem výsledků všech provedených zkoušek. Parametr Přesnost je pak charakterizován směrodatnou odchylkou – ze tří stanovených hodnot uvolněného množství účinné látky pro každou nádobu.

Přesnost se ověřuje na dvou pracovištích nebo dvou disolučních kompletech téhož pracoviště a odchylka se vyjadřuje parametrem „Intermediate Precision“ IP (mezilehlá přesnost).

**Požadované hodnoty sledovaných parametrů:**

**RSD pro jednotlivou nádobu    max. 10%**

**IP    ≤ 6%**

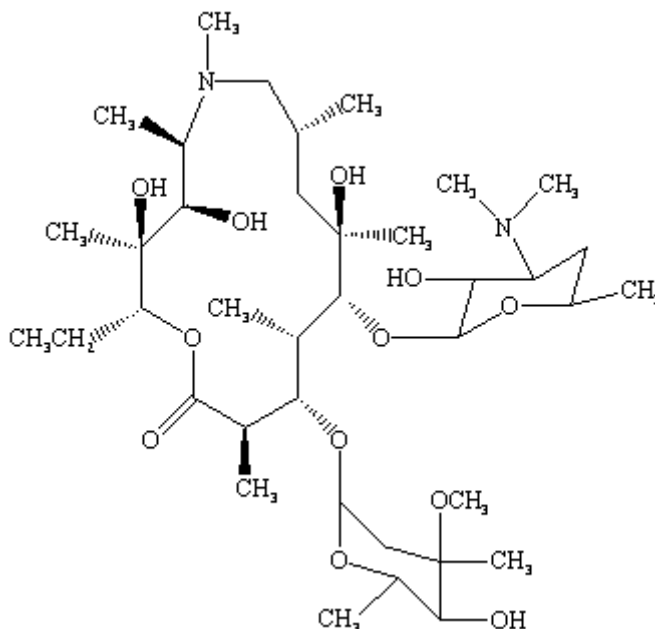
**4) Placebo:** Prove se a vyhodnotí disoluční test s placebem – za zvýšené rychlosti otáček míchadla (120ot./min) s odběrem po  $t$  minutách.

Interference placeba se vypočítá podle vzorce: 
$$I = \frac{100.C.A_p.V}{A_r.L}$$

- C            koncentrace referenčního roztoku, tj. libovolně zvolená koncentrace účinné látky v rozsahu ověřené linearity
- Ap            absorpance placeba
- Ar            absorpance referenčního roztoku
- V            objem disolučního media
- L            deklarované množství účinné látky

Pro  $I \leq 2\%$  lze použít UV-VIS spektrofotometrické hodnocení, pro  $I \geq 2\%$  je výhodnější použít HPLC metodu nebo při UV-VIS spektrofotometrickém hodnocení odečítat absorpaci placeba<sup>9</sup>.

## 2.9 Azitromycin



Obrázek č. 1 molekula azithromycinu

Azithromycin je krystalická látka o  $M_r = 749$ , bodu tání 113-115°C a specifické otáčivosti  $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ .<sup>10</sup> Léčiva obsahující jako účinnou látku azithromycin, patří do skupiny

makrolidových antibiotik. Mechanismus účinku azitromycinu spočívá v inhibici syntézy proteinů v bakteriích vazbou na ribosomální podjednotku 50S a v zamezení translokace peptidů. Azitromycin obvykle působí bakteriostaticky. Ve vysokých koncentracích však může být azitromycin vůči určitým mikroorganismům baktericidní. Azitromycin je účinný proti celé řadě gram pozitivních a gram negativních aerobních a anaerobních bakterií a bakteriálních patogenů, jako je komplex *Mycobacterium avium*, druhy *Mycoplasma*, *Borrelia burgdorferi*, druhy *Chlamydia* a druhy *Campylobacter*. Kromě toho je azitromycin účinný proti protozoálním mikroorganismům, jako je *Toxoplasma gondii*. Používá se k léčbě infekcí jako infekce dýchacích cest, zánět průdušek, zápal plic, zánět krčních mandlí, zánět hltanu, zánět vedlejších nosních dutin a zánět středního ucha, infekce kůže a měkkých tkání a léčba nekomplikovaných pohlavně přenosných chorob způsobených bakteriemi.

Kinetické studie prokázaly výrazně vyšší hladiny azitromycinu v tkáních než v plazmě, což ukazuje, že účinná látka se silně váže ve tkáních. V experimentálních studiích *in vitro* a *in vivo* bylo prokázáno, že azitromycin se hromadí ve fagocytech a jeho uvolňování je stimulováno aktivní fagocytózou. Podle studií na zvířatech se zdá, že tento proces přispívá k hromadění azitromycinu v tkáni.

Plazmatický poločas eliminace jasně odráží poločas vyloučení azitromycinu z tkání, který je 2-4 dny. Asi 12% nitrožilně podané dávky se vyloučí v nezměněné formě během 3 dnů; většina tohoto množství během prvních 24 hodin. Hlavní cestou vylučování azitromycinu je vylučování do žluči, především v nezměněné formě.

Léčiva obsahující azithromycin mají minimální nežádoucí účinky. V klinických studiích udávalo přibližně 13% pacientů výskyt nežádoucích účinků. Nejčastější byly nežádoucí účinky na gastrointestinální systém, které se vyskytovaly přibližně v 10% případů.

Ve studiích na zvířatech, kterým byly podávány vysoké dávky, vyvolávající koncentrace léku čtyřicetinásobně vyšší, než jaké se předpokládají v klinické praxi, způsoboval azitromycin reverzibilní fosfolipidózu, většinou bez zřejmých toxikologických následků. Neexistují důkazy, že by tento účinek měl význam pro normální používání azitromycinu u lidí.

Karcinogenní potenciál: Nebyly provedeny dlouhodobé studie na zvířatech, které by hodnotily karcinogenní potenciál.

Mutagenní potenciál: Ve standardních laboratorních testech: zkouška na myším lymfomu, zkouška na lidském lymfocytárním klastogenu a zkouška na myším kostním dřevěném klastogenu se u azitromycinu neprokázal žádný mutagenní potenciál.

Reprodukční toxicita: Ve studiích embryotoxicity na myších a potkanech nebyl pozorován teratogenní účinek. U potkanů vedl azitromycin v dávkách 100 a 200 mg/kg tělesné hmotnosti a den k mírné retardaci osifikace u plodu a ke zvýšení hmotnosti březí samice. V perinatálních a postnatálních studiích u potkanů byla pozorována mírná retardace po podání dávek azitromycinu 50 mg/kg/den a vyšších<sup>11</sup>.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité přístroje

- Disoluční komplet fy PHARMA TEST PTWS3 (Budapešť, Maďarsko)
- HPLC sestava (Spectra Systém, Waltham, USA)
- stolní počítač IBM kompatibilní
- zařízení ROWAPUR (Watrex, Praha, ČR)

#### 3.2 Použité chemikálie

- Substance azithromycin š. RTO5002 (101,3% účinné látky + 4,6% H<sub>2</sub>O)
- Placebo azithromycin š. 150306 (PRO.MED.CS Praha a.s., Praha, ČR)
- Sumamed 125mg tbl. š. 352036 (Pliva-Lachema a.s., Brno, ČR)
- hydroxid sodný p.a., (Lachema, Brno, ČR).
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a., (Lachema, Brno, ČR).
- UHQ voda (PRO.MED.CS Praha a.s., Praha, ČR)
- Acetonitril HPLC grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 3.4 Disoluce

Validovaná disoluční metoda pro Azithromycin 125mg tablety měla tyto parametry:

metoda:	pádelková
otáčky:	50 otáček/min
disoluční médium:	fosfátový pufr pH = 6,0
objem dis. média:	1000ml
teplota:	37,0 ± 0,5°C
odběrový interval:	2,5, 5, 10, 15, 20, 30min
objem vzorku:	5ml
filtrace:	filtry MILLEX <sup>®</sup> -HV (Millipore Durapore-PVDF, 0,45µm, 13mm) (Millipore, Billerica, USA)

Příprava disolučního média: 6,8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
28,2ml 0,2M NaOH  
doplnit do 1 litru UHQ vodou

### 3.3 HPLC stanovení

Veškeré vzorky byly měřeny na HPLC sestavě. Stanovení bylo prováděno isokratickou metodou a vyhodnocení metodou kalibrační křivky. Základ metody byl převzat z českého lékopisu<sup>12</sup>. Tato metoda byla upravena a měla tyto parametry:

nástřik vzorku:	25 $\mu$ l
kolona:	SUPELCOSIL LC-18, 250mm x 4,6mm velikost částic SF - 5 $\mu$ m
teplota:	laboratorní teplota 25°C
mobilní fáze:	roztok hydrogenfosforečnanu draselného + acetonitril + voda v poměru (10:35:55, v/v/v)
průtok mobilní fáze:	1ml/min
ředění vzorku	1:1 s mobilní fází
detekce:	UV/VIS detektor, 215nm

Retenční čas azithromycinu byl kolem šesté minuty.

### 3.5 Linearita

K ověření linearity bylo připraveno 8 kalibračních roztoků o známých koncentracích, které představovaly přibližně 12 – 480% deklarovaného množství účinné látky obsažené v tabletě viz tabulka č.1.

Tabulka č.1 přehled hodnot potřebných k testu linearity

kalibrační roztok č.	teoretické % účinné látky	teoretická koncentrace [mg/l]	skutečná navážka [mg] / objem [ml]	skutečná koncentrace [mg/l] dle % úč. l. a H <sub>2</sub> O v substanci
1	12	15	19,2 / 1000	18,5664
2	40	50	26,9 / 500	52,0246
3	80	100	14,4 / 100	139,248
4	160	200	20,3 / 100	196,301
5	240	300	15,6 / 50	301,704
6	320	400	20,9 / 50	404,206
7	400	500	26,6 / 50	514,444
8	480	600	30,4 / 50	578,936

### **3.6 Správnost**

Byl připraven zásobní roztok azithromycinu o koncentraci 1210,8 mg/50 ml v methanolu. Byla připravena disoluce podle metody pro azithromycin 125mg tablety. Z každé nádoby bylo odpipetováno 5 ml disolučního média a po té do každé nádoby napipetováno 5 ml zásobního roztoku a vložena tableta placebo. Poté byla provedena disoluce a po 30ti minutách byly z každé nádoby odebrány 3 vzorky, které byly předány k HPLC analýze. Referentní koncentrace byla 121,078 mg/l.

### **3.7 Přesnost**

Podle předpisu disoluční metody pro azithromycin 125 mg tablety byl třikrát proveden disoluční test se stejnou šarží tablet. Vzorky byly vždy předány k HPLC analýze.

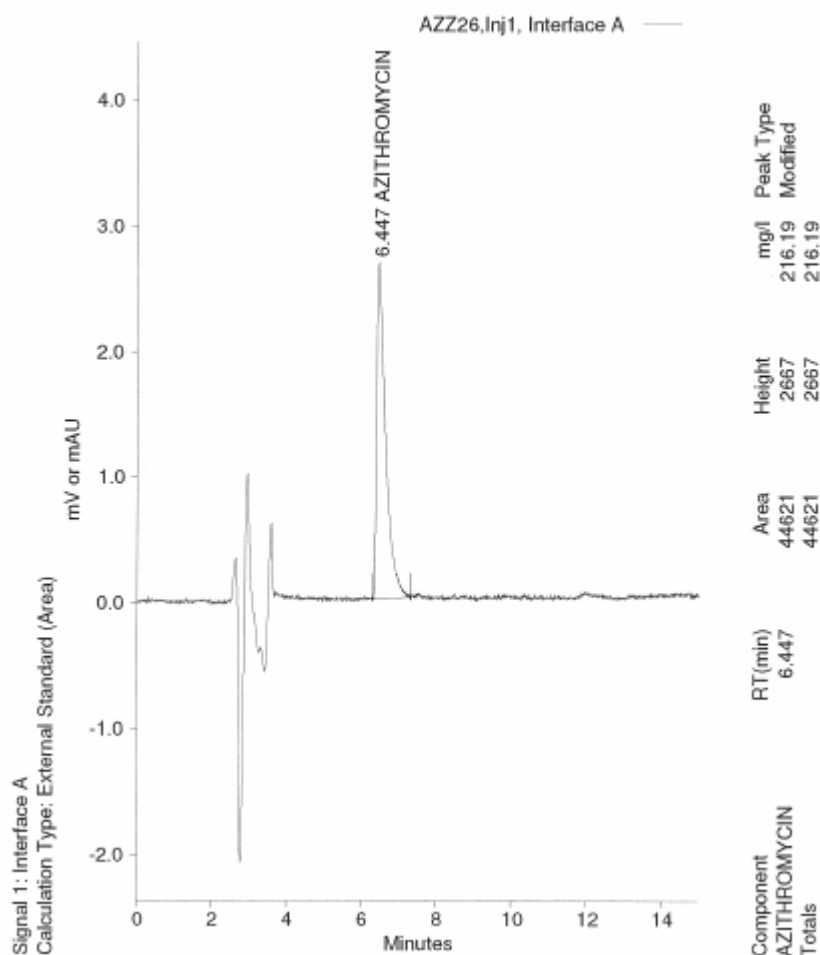
### **3.8 Selektivita**

Za podmínek disolučního testu pro azithromycin 125mg tablety byla provedena disoluce tablet placebo.



## 4. Výsledky a diskuze

Veškeré vzorky byly měřeny na HPLC sestavě. Pro ilustraci je zde uveden jeden chromatogram. Retenční čas azithromycinu se pohyboval kolem šesté až sedmé minuty.

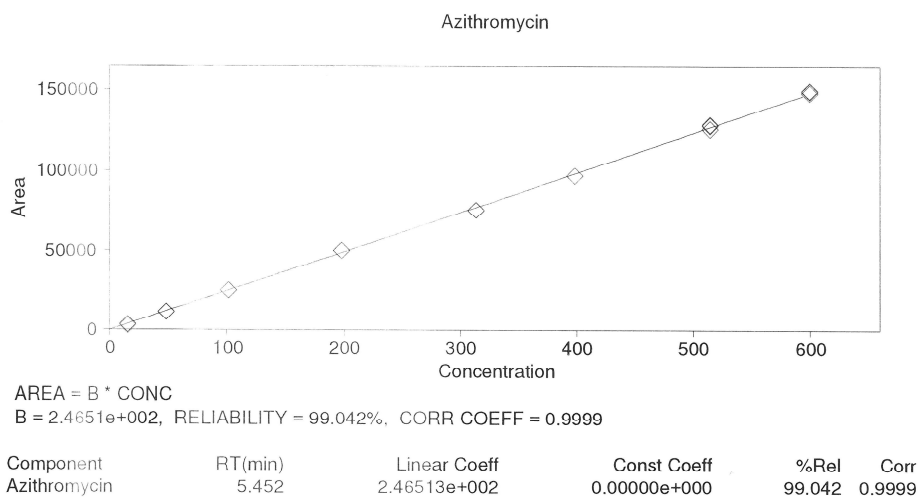


Obrázek č. 1 chromatogram azithromycinu

Kolona SUPELCOSIL LC-18, 250mm x 4,6mm velikost částic SF - 5 $\mu$ m, laboratorní teplota 25°C, mobilní fáze - roztok hydrogenfosforečnanu draselného + acetonitril + voda v poměru (10:35:55, v/v/v), průtok mobilní fáze 1ml/min, detekce UV 215nm.

## 4.1 Linearita

Naměřené hodnoty kalibračních roztoků byly graficky vyhodnoceny. Lineární závislost a potřebné hodnoty jsou na obrázku č.2.



Obrázek č. 2 závislost koncentrace Azithromycinu na ploše píků.

## 4.1 Správnost

Naměřené a vypočtené hodnoty testu správnosti jsou uvedeny v tabulkách.

Tabulka č. 2 vypočtené hodnoty testu správnosti

Disoluce	% referenční koncentrace (recovery) v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
Měření 1	97,532	100,456	101,827	102,570	101,843	104,957
Měření 2	96,954	99,167	100,035	102,554	100,109	100,588
Měření 3	99,308	97,623	97,747	101,282	103,107	100,068
<b>průměr</b>	97,931	99,082	99,869	102,135	101,686	101,871
<b>SD</b>	1,227	1,418	2,045	0,739	1,505	2,685
<b>RSD [%]</b>	1,253	1,432	2,048	0,724	1,480	2,636

Tabulka č. 3 průměrné hodnoty testu správnosti

Správnost [%]	
<b>Průměr</b>	100,429
<b>SD</b>	2,173
<b>RSD</b>	2,163

## 4.2 Přesnost

Naměřené a vypočtené hodnoty testu přesnosti jsou uvedeny v tabulkách. Jsou zde uvedeny veškeré odběrové intervaly.

Tabulka č. 4 vypočtené hodnoty pro odběrový interval: 2,5 min

Disoluce	% uvolněné účinné látky v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
<b>1</b>	24,027	15,821	16,479	14,484	31,438	21,193
<b>2</b>	25,944	33,586	16,271	19,790	21,966	14,033
<b>3</b>	19,160	16,771	28,226	18,036	12,790	16,920
<b>Průměr</b>	23,044	22,059	20,325	17,437	22,065	17,382
<b>SD</b>	3,497	9,994	6,843	2,703	9,324	3,602
<b>RSD (%)</b>	15,177	45,304	33,665	15,504	42,259	20,724

Tabulka č. 5 průměrné hodnoty pro odběrový interval: 2,5 min

Přesnost	
průměr	20,385
SD	6,056
RSD [%]	29,709

Tabulka č. 6 vypočtené hodnoty pro odběrový interval: 5 min

Disoluce	% uvolněné účinné látky v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
<b>1</b>	85,531	70,462	71,355	68,389	94,762	76,364
<b>2</b>	74,436	88,858	72,021	66,551	72,890	59,082
<b>3</b>	67,803	64,984	71,086	70,657	62,277	67,987
<b>průměr</b>	75,923	74,768	71,488	68,533	76,643	67,811
<b>SD</b>	8,957	12,506	0,481	2,057	16,564	8,642
<b>RSD (%)</b>	11,798	16,726	0,673	3,001	21,613	12,745

Tabulka č. 7 průměrné hodnoty pro odběrový interval: 5 min

Přesnost	
průměr	72,528
SD	9,070
RSD [%]	12,506

Tabulka č. 8 vypočtené hodnoty pro odběrový interval 10 min

Disoluce	% uvolněné účinné látky v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
1	86,249	77,171	86,564	77,214	79,527	86,968
2	78,870	90,640	88,062	92,582	84,396	74,329
3	86,774	85,446	88,804	84,320	96,552	87,649
průměr	83,965	84,419	87,810	84,705	86,825	82,982
SD	4,420	6,793	1,141	7,691	8,768	7,501
RSD (%)	5,264	8,047	1,299	9,080	10,099	9,040

Tabulka č. 9 průměrné hodnoty pro odběrový interval: 10 min

Přesnost	
průměr	85,118
SD	5,784
RSD [%]	6,795

Tabulka č. 10 vypočtené hodnoty pro odběrový interval 15 min

Disoluce	% uvolněné účinné látky v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
1	91,684	89,016	92,705	89,663	97,742	92,857
2	90,550	99,655	92,877	101,865	99,360	94,166
3	89,149	83,467	89,488	84,691	88,418	91,648
průměr	90,461	90,712	91,690	92,073	95,173	92,890
SD	1,270	8,226	1,909	8,837	5,906	1,259
RSD (%)	1,403	9,069	2,082	9,597	6,206	1,355

Tabulka č. 11 průměrné hodnoty pro odběrový interval: 15 min

Přesnost	
průměr	92,167
SD	4,967
RSD [%]	5,389

Tabulka č. 12 vypočtené hodnoty pro odběrový interval 30 min

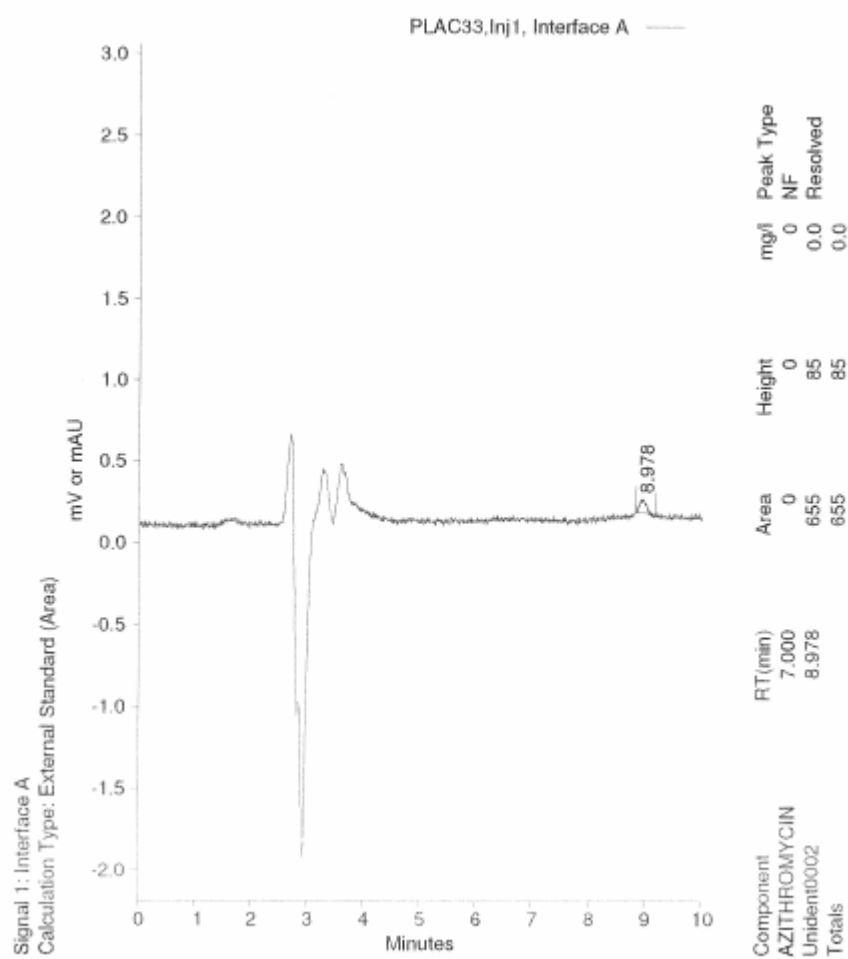
Disoluce	% uvolněné účinné látky v jednotlivých nádobách					
	1	2	3	4	5	6
1	93,628	97,938	93,481	94,108	99,709	97,467
2	97,849	99,843	97,361	102,225	99,595	95,153
3	98,220	94,913	100,574	95,793	96,579	100,382
průměr	96,566	97,565	97,138	97,375	98,628	97,668
SD	2,551	2,486	3,552	4,284	1,775	2,620
RSD [%]	2,642	2,548	3,656	4,399	1,800	2,683

Tabulka č. 13 průměrné hodnoty pro odběrový interval: 15 min

Přesnost [%]	
průměr	97,490
SD	2,593
RSD	2,660

### 4.3 Selektivita

Koncentrace vzorků placebo byla nulová. Pro ilustraci je na obrázku č. 3 zobrazen jeden chromatogram z testu selektivity.



Obrázek č. 3 chromatogram z testu selektivity

Kolona SUPELCOSIL LC-18, 250mm x 4,6mm velikost částic SF - 5 $\mu$ m, laboratorní teplota 25°C, mobilní fáze - roztok hydrogenfosforečnanu draselného + acetonitril + voda v poměru (10:35:55, v/v/v), průtok mobilní fáze 1ml/min, detekce UV 215nm.

## 4.4 Shrnutí výsledků

### Linearita

Měřená závislost je v celém rozsahu lineární. Hodnota  $R^2 = 0,98093$  tím splňuje uvedenou podmínku.

Linearita byla měřena v rozsahu 12 – 480% účinné látky (125 mg) Toto bylo provedeno záměrně, protože se počítá s použitím této linearitě k validaci metod pro Azithromycin 250 a 500 mg tablety.

### Správnost

Z hodnot uvedených v tabulkách vyplývá že obě podmínky jsou splněny. Výtěžnost u všech nádob je v rozmezí 95 – 105 %, stejně tak hodnoty RSD jsou pro každou nádobu vyhovující, nepřekračují 3 %.

### Přesnost

Podmínka je splněna pokud vyhovují hodnoty odběru v 30té minutě. Hodnota RSD pro jednotlivou nádobu max. 10%. Všechny nádoby podmínku splňují.

### Selektivita

Veškeré vzorky měli nulovou koncentraci. Metoda je tedy selektivní

## 5. Závěr

V této práci popsaná validace disoluční metody pro Azithromycin 125mg tablety, vznikala v době, kdy byly v platnosti trochu odlišné požadavky na validaci. V této době také firma začala ztrácet o projekt Azithromycin zájem. Nakonec byl projekt Azithromicin zastaven. Od konce minulého roku se validace řídí novými požadavky, které jsou popsány v této práci.

Pokud se projekt Azithromicin obnoví, bude nutné dodělat chybějící testy, aby byla validace kompletní. Veškeré zde uvedené výsledky, odpovídají novým požadavkům. Lze je případně v budoucnu využít.

## 6. Seznam použité literatury a zdrojů informací

---

<sup>1</sup> Doc. Ing. Petr Zámotný, Ph.D.: Zkouška disoluce pevných lékových forem

<sup>2</sup> Český lékopis ČL 2009, Praha, 2009

<sup>3</sup> Operating Instruction

<sup>4</sup> Milan Chalabala, Technologie Léků, Galén, 2001

<sup>5</sup> zákon č. 79/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů

<sup>6</sup> vyhláška č. 411/2004 Sb.

<sup>7</sup> Pokyn SÚKL VYR-32, Věstník SÚKL č.2/2006)

<sup>8</sup> ČSN EN ISO/IEC 17025:2001

<sup>9</sup> The United States Pharmacopeial Convection; Inc. , 2005

<sup>10</sup> The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, ed. Budavari S., Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, NJ

<sup>11</sup> AISPL ver. ČR 2009.2

<sup>12</sup> český lékopis ČL 2005, Praha, 2005