

Razvoj i validacija metode tečne hromatografije za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u doziranim oblicima

**Danijela Damnjanović, Vladimir Dobričić*,
Olivera Čudina, Sote Vladimirov**

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za Farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, Beograd

Autor za korespondenciju:vladimir.dobricic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

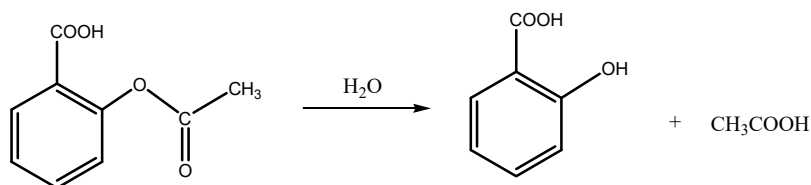
Acetilsalicilna kiselina pripada grupi nesteroidnih antiinflamatornih lekova koji ispoljavaju antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko delovanje. Cilj ovog rada je bio razvoj i validacija HPLC metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu acetilsalicilne kiseline i njenog degradacionog proizvoda, salicilne kiseline, u doziranim oblicima. Optimalno razdvajanje ispitivanih analita postignuto je na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical (4,6x150 mm, veličina čestica 5 µm) na temperaturi od 35°C. Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Protok je bio 1,0 mL/min, a talasna dužina detekcije 240 nm. Metoda je validirana i ispitani su sledeći parametri validacije: selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinu. Dobijene vrednosti su u skladu sa definisanim kriterijumima za validaciju metode. Predložena HPLC metoda je primenjena za kvalitativnu i kvantitativnu analizu acetilsalicilne i salicilne kiseline u šest različitih komercijalnih preparata. Svi rezultati ispitivanja su u dozvoljenim granicama specifikacija proizvođača. Predložena HPLC metoda pod datim eksperimentalnim uslovima predstavlja brz, jednostavan, tačan i selektivan postupak za istovremeno određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u doziranim oblicima.

Ključne reči: acetilsalicilna kiselina, salicilna kiselina, tečna hromatografija, validacija metode

Uvod

Acetilsalicilna kiselina spada u grupu nesteroidnih antiinflamatornih lekova koji ispoljavaju antiinflamatorno, analgetičko i antipiretičko dejstvo. Analgetički efekat je posledica blokade stvaranja impulsa bola na periferiji, kao i centralnog dejstva na nivou hipotalamusa. Antipiretički efekat nastaje dejstvom aspirina na centar za termoregulaciju u hipotalamusu što dovodi do periferne vazodilatacije, povećanog protoka krvi kroz kožu, znojenja i pada telesne temperature. Antiinflamatorno dejstvo aspirina je posledica inhibicije COX-1 (eng. *cyclooxygenase-1*) i COX-2 (eng. *cyclooxygenase-2*) enzima koji učestvuju u biosintezi prostaglandina i tromboksana. U malim dozama aspirin pokazuje antiagregacijsko dejstvo i veću selektivnost prema COX-1 koji je prisutan u trombocitima (1).

Kao aromatični estar, acetilsalicilna kiselina je nestabilna i lako podleže hidrolizi, pri čemu nastaju salicilna i sirćetna kiselina (Slika 1).



Slika 1. Hidroliza acetilsalicilne kiseline.
Figure 1. Hydrolysis of acetylsalicylic acid.

Zavisnost hidrolize acetilsalicilne kiseline od pH sredine ukazuje na specifičnu baznu i kiselu hidrolizu. Najveća stabilnost se javlja pri pH 2,5(2). Stabilnost acetilsalicilne kiseline u farmaceutskim formulacijama se povećava smanjenjem kontakta acetilsalicilne kiseline sa vodom, baznim supstancama i nukleofilima. Utvrđeno je i da stearati u čvrstim formulacijama direktno utiču na brzinu razgradnje acetilsalicilne kiseline. Pored uobičajenih proizvoda hidrolize, utvrđeno je i prisustvo salicilsalicilne i salicilacetilsalicilne kiseline (2,3).

Razvijene su i publikovane brojne metode za analizu acetilsalicilne kiseline i njenih srodnih supstanci. Najčešće korišćena instrumentalna metoda je tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC– eng. *High Performance Liquid Chromatography*). Ova metoda je primenjena za analizu acetilsalicilne kiseline u različitim farmaceutskim formulacijama (4,5), biološkom materijalu (6-8) i hrani (9). Za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline u humanoj plazmi korišćene su LC/MS-MS (eng. *liquid chromatography tandem-mass spectrometry*) metode, nakon

precipitacije proteina acetonitrilom i tečno-tečne ekstrakcije (10-12), a za određivanje ovih analita u urinu životinja korišćena je UHPLC (eng. *ultra high performance liquid chromatography*) metoda nakon čvrsto-tečne ekstrakcije (13). Pored različitih modifikacija metode tečne hromatografije, korišćene su hromatografija na tankom sloju (14), GC/MS-MS (eng. *gas chromatography tandem-mass spectrometry*, (15)) UV-spektrofotometrija (16), derivativna spektrofotometrija (17) i elektrohemijske metode (18-20).

Cilj ovog rada je da se razvije i validira HPLC metoda za određivanje sadržaja acetilsalicilne i salicilne kiseline u šest doziranih oblika koji su prisutni na našem tržištu.

EKSPERIMENTALNI DEO

Rastvarači, reagensi, standardne supstance i dozirani oblici

Za pripremu mobilne faze korišćeni su sledeći rastvarači i reagensi: acetonitril HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Nemačka), fosforna kiselina 85% (Riedel-de Haen, Švajcarska) i voda HPLC čistoće. Za razvoj i validaciju metode korišćeni su radni standardi acetilsalicilne kiseline (Actavis, Srbija) i salicilne kiseline (Lachema, Češka). Ispitivani farmaceutski oblici su:

1. Anbol[®], tablete, 300 mg (Galenika, Srbija)
Placebo: Aluminijum-hidroksid (u obliku sušenog aluminijum-hidroksid gela), magnezijum-hidroksid, povidon K-30, krosopovidon, magnezijum-stearat.
2. Andol[®]C, šumeće tablete 500 mg/250 mg, acetilsalicilna kiselina/askorbinska kiselina (Pliva Hrvatska d.o.o, Hrvatska)
Placebo: Limunska kiselina bezvodna, natrijum-hidrogenkarbonat, natrijum-karbonat bezvodni, natrijum-dihidrogencitrat, natrijum-citrat, povidon K-30, manitol, dokusat-natrijum, simetikon, natrijum-ciklamat, saharin-natrijum, aroma limuna KS 145.
3. Aspirin[®] 500, tablete, 500 mg (Bayer Bitterfeld GmbH, Nemačka)
Placebo: Celuloza u prahu, kukuruzni skrob.
4. Aspirin[®] Complex, granule za oralnu suspenziju 30 mg/500 mg pseudoefedrin/acetilsalicilna kiselina (Bayer Bitterfeld GmbH, Nemačka)
Placebo: saharoza, hipromeloza, sukraloza, aroma vanile, aroma pepermint mentol eukaliptus.
5. Midol[®], gastrozistentne tablete, 100 mg (Hemofarm A.D, Srbija)

Placebo: Celuloza prašak, skrob preželatinizovani, silicijum-dioksid koloidni bezvodni, stearinska kiselina, trietilcitrin, talk, simetikon emulzija, metakrilna kiselina-etilakrilat kopolimer (1:1) disperzija 30% koja sadrži Polisorbat 80 i natrijum-laurilsulfat.

6. Cardiopirin[®], 100 mg, gastrozistentne tablete (G.L.Pharma GmbH, Austrija)
Jezgro tablete: laktoza monohidrat, celuloza mikrokristalna, silicijum-dioksid koloidni bezvodni, skrob krompirov.

Film (obloga) tablete: talk, triacetin, metakrilna kiselina-etilakrilat kopolimer (1:1) disperzija 30%.

Za validaciju metode korišćen je preparat Anbol[®], 300 mg, tablete.

Hromatografski uslovi

HPLC analiza je rađena na hromatografskom sistemu HP 1100 (Hewlett-Packard, SAD) koji je opremljen binarnom pumpom, manuelnim injektorom i UV/VIS detektorom. Srednja preciznost je rađena na hromatografskom sistemu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Nemačka) opremljenim kvaternom pumpom, autosemplerom i DAD (eng. *Diode Array Detector*). Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 4,6x150 mm, veličina čestica 5 μm. Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Protok je bio 1,0 mL/min, talasna dužina detekcije 240 nm, a temperatura kolone 35°C.

Priprema rastvora za razvoj i optimizaciju HPLC metode.

Priprema rastvarača: Rastvarač za pripremu radnih rastvora je smeša acetonitrila, vode HPLC čistoće i 85% fosforne kiseline u odnosu 80:20:0,5 (V/V/V).

Priprema osnovnog rastvora standarda acetilsalicilne kiseline: Odmeri se tačno 25,6 mg acetilsalicilne kiseline i kvantitativno prenese u odmerni sud od 10 mL. Supstanca se rastvori u rastvaraču uz mešanje u ultrazvučnom kupatilu, a zatim sud dopuni do oznake. Ovako pripremljen osnovni rastvor se čuva u frižideru na temperaturi od 2°C do 8°C. Koncentracija dobijenog rastvora je 2,56 mg/mL.

Priprema osnovnog standarda salicilne kiseline: Odmeri se tačno 11 mg salicilne kiseline i kvantitativno prenese u odmerni sud od 10 mL. Supstanca se rastvori u rastvaraču uz mešanje u ultrazvučnom kupatilu, a zatim sud dopuni do oznake. Ovako pripremljen osnovni rastvor se čuva u frižideru na temperaturi od 2°C do 8°C. Koncentracija dobijenog rastvora je 0,11 mg/mL.

Priprema radnog rastvora standardnih supstanci za razvoj i optimizaciju metode: U odmerni sud od 5 mL otpipetira se 750 μ L osnovnog rastvora standarda acetilsalicilne kiseline i 550 μ L osnovnog rastvora standarda salicilne kiseline i dopuni do oznake rastvaračem. Na ovaj način dobija se rastvor koncentracije 0,38 mg/mL za acetilsalicilnu kiselinu, odnosno 0,012 mg/mL za salicilnu kiselinu.

Priprema rastvora uzorka placebo. Odmeri se 200 mg uzorka placebo i prenese u odmerni sud od 50 mL, doda oko 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Rastvor se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 μ m. Otpipetira se 667 μ L filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake.

Priprema rastvora placebo opterećenog standardima. Odmeri se 200 mg uzorka placebo i prenese u odmerni sud od 50 mL. Doda se odgovarajuća zapremina radnog rastvora standardnih supstanci i oko 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Rastvor se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 μ m. Otpipetira se 667 μ L filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake.

Priprema rastvora uzorka Anbol[®], 300 mg, tableta. Izmeri se masa Anbol[®], 300 mg, tableta i izračuna prosečna masa. U tarioniku sa pistilom se sprae tablete, odmeri masa koja odgovara prosečnoj masi tablete i kvantitativno prenese u odmerni sud od 50 mL. Doda se 2/3 rastvarača i rastvara u ultrazvučnom kupatilu 15 min. Posle hlađenja do sobne temperature, sud se dopuni rastvaračem do oznake. Dobijena suspenzija se profiltrira kroz najlonski filter veličine pora 0,45 μ m. Otpipetira se 667 μ L filtrata u odmerni sud od 10 mL i dopuni rastvaračem do oznake. Na isti način pripremaju se i rastvori uzoraka ostalih preparata koji su korišćeni u ovom ispitivanju.

Validacija metode

Predložena HPLC metoda je validirana prema ICH (eng. *International Conference on Harmonisation*) smernicama (21) i kriterijumima za prihvatanje rezultata za selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost i robusnost.

Selektivnost. Selektivnost metode ispitana je injektovanjem tri rastvora pod optimalnim hromatografskim uslovima: radnog rastvora standardnih supstanci (smeša acetilsalicilne i salicilne kiseline), rastvora placebo Anbol[®] tableta i rastvora placebo Anbol[®] tableta opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline. Selektivnost se procenjuje poređenjem odgovora potencijalno interferirajućih supstanci na retencionim vremenima koja odgovaraju acetilsalicilnoj i salicilnoj kiselini.

Linearnost. Za konstrukciju kalibracionih krivih, pet rastvora acetilsalicilne kiseline i salicilne kiseline pripremljeno je razblaživanjem odgovarajućih standardnih rastvora rastvaračem. Linearnost za acetilsalicilnu kiselinu je ispitana u opsegu

0,025-0,4 mg/mL, a za salicilnu kiselinu u opsegu 0,0025-0,015 mg/mL. Svaka tačka na kalibracionoj krivoj predstavlja srednju vrednost tri nezavisna merenja.

Preciznost. Preciznost metode ispitana je na tri nivoa - preciznost uređaja, ponovljivost i srednja preciznost. Za ispitivanje preciznosti uređaja napravljen je jedan uzorak u ispitivanoj koncentraciji (100%) i injektovan 10 puta. Za ispitivanje ponovljivosti pripremljeno je 6 uzoraka i svaki je injektovan po jednom. Na isti način je ispitana i srednja preciznost, ali na drugom HPLC uređaju, drugog dana i od strane drugog analitičara. Sadržaji acetilsalicilne i salicilne kiseline određeni su metodom standarda i izračunate su relativne standardne devijacije (RSD).

Tačnost. Tačnost metode je ispitana opterećivanjem placebo acetilsalicilnom i salicilnom kiselinom u koncentracijama 75% (0,3 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,009 mg/mL za salicilnu kiselinu), 100% (0,4 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,012 mg/mL za salicilnu kiselinu) i 125% (0,5 mg/mL za acetilsalicilnu, odnosno 0,015 mg/mL za salicilnu kiselinu). Pod optimalnim hromatografskim uslovima analiti su injektovani za sve tri koncentracije u triplikatu i izračunate su *Recovery* vrednosti.

Robusnost. Robusnost metode je ispitana tako što su vršene male promene odabranih hromatografskih parametara (temperature kolone, udela komponenata mobilne faze i brzine protoka mobilne faze) i praćen je njihov uticaj na rezultate (površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline). Radni rastvor standardnih supstanci injektovan je pod optimalnim hromatografskim uslovima, nakon čega su menjani odabrani hromatografski parametri na sledeći način: temperatura kolone (32°C i 38°C), udeo komponenata mobilne faze A i B (66:34 i 64:36 V/V) i brzina protoka mobilne faze (1,05 mL/min i 0,95 mL/min).

REZULTATI I DISKUSIJA

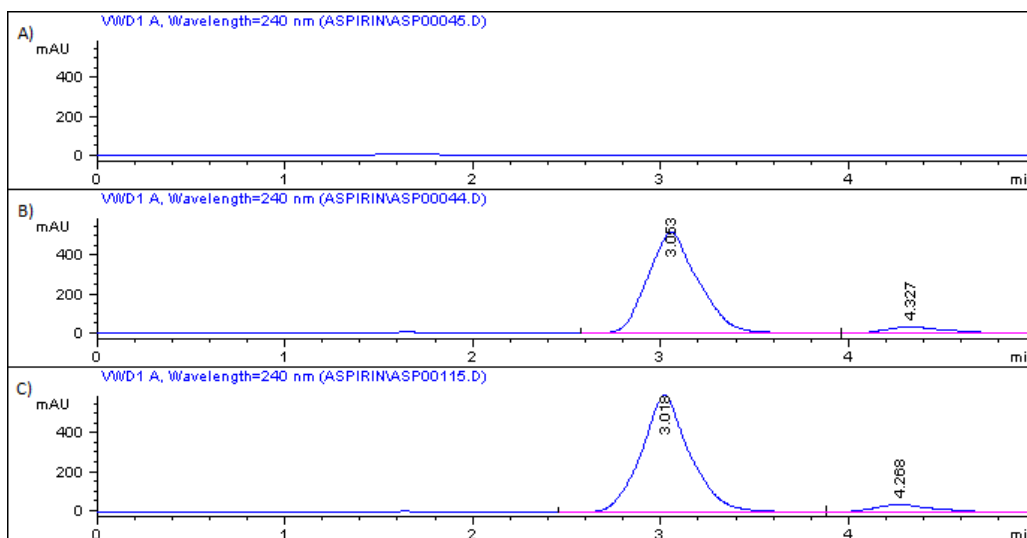
Razvoj i optimizacija hromatografske metode zahteva određivanje optimalnih hromatografskih uslova koji će omogućiti dobro razdvajanje ispitivanih supstanci i njihovo određivanje u prihvatljivom vremenu trajanja analize. Tokom razvoja predložene HPLC metode za određivanje acetilsalicilne i salicilne kiseline menjani su sledeći parametri: udeo komponenata mobilne faze, brzina protoka mobilne faze, talasna dužina detekcije i sastav rastvarača za ekstrakciju. U odnosu na početne hromatografske uslove (5), povećan je udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, tako da je odnos A i B 70:30 (V/V). Eluent A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B acetonitril. Za talasnu dužinu detekcije je izabrana 240 nm, jer na ovoj talasnoj dužini acetilsalicilna i salicilna kiselina dobro apsorbuju. Kao rastvarač za ekstrakciju korišćena je smeša mobilne faze A i B u odnosu 50:50 (V/V). Pod ovim hromatografskim uslovima retenciono vreme acetilsalicilne kiseline je 2,5 minuta, a salicilne kiseline 3,76 minuta. Askorbinska kiselina i pseudoefedrin koji su prisutni u nekim od ispitivanih kombinovanih preparata nisu ometali analizu, jer se retenciono

vreme askorbinske kiseline poklapa sa hromatografskim pikom mobilne faze, a pseudoefedrin se ne detektuje na toj talasnoj dužini. U sledećem koraku, protok je smanjen na 1,0 mL/min, a u mobilnoj fazi je povećan udeo organskog rastvarača, tako da je odnos A i B 65:35 (V/V). Kao rastvarač korišćene su mobilne faze A i B u odnosu 50:50 (V/V). Retenciono vreme salicilne kiseline je 3,03 minuta, a salicilne kiseline 4,3 minuta. Da bi se poboljšala simetrija pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline, menjan je sastav rastvarača. Pokazalo se da smeša A i B u odnosu 80:20 (V/V) ne daje dobru simetriju, kao ni smeša A i B u odnosu 20:80 (V/V). Kao optimalan rastvarač izabrana je smeša acetonitril-voda-85% fosforna kiselina u odnosu 80:20:0,5 (V/V/V). Vrednost pH eluenta A je oko 1,8. Kada se eluent A pomeša sa acetonitriplom, vrednost pH je veća od 2, što zadovoljava uslov specifikacije proizvođača kolone za opseg pH od 2 do 9.

Analizom uticaja promene parametara na faktor kapaciteta (k), širinu pika i simetriju pika, definisani su optimalni hromatografski uslovi za ispitivani sistem. Stacionarna faza je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical 4,6x150 mm, veličina čestica 5 μ m. Mobilnu fazu čine smeša A i B u odnosu 65:35 (V/V). Smeša A je voda HPLC čistoće i 85% fosforna kiselina u odnosu 80:0,5 (V/V), a B je acetonitril. Analiza se izvodi pri protoku 1,0 mL/min, na talasnoj dužini detekcije 240 nm i temperaturi od 35°C.

Predložena metoda je validirana prema smernicama ICH (21) i određeni su sledeći parametri validacije: selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinu.

Selektivnost HPLC metode potvrđena je injektovanjem radnog rastvora standardnih supstanci, placebo opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline, kao i rastvora placeba. Na retencionim vremenima koja odgovaraju acetilsalicilnoj i salicilnoj kiselini nisu se nalazile komponente koje interferiraju, pa se može zaključiti da je metoda selektivna. Na Slici 2 prikazani su hromatogrami dobijeni pri ispitivanju selektivnosti.



Slika 2. Hromatogrami dobijeni pri ispitivanju selektivnosti: A) hromatogram rastvora placebo Anbol® tableta; B) hromatogram radnog rastvora standardnih supstanci (acetilsalicilne i salicilne kiseline); C) hromatogram rastvora placebo Anbol® tableta opterećenog standardima acetilsalicilne i salicilne kiseline.

Figure 2. Chromatograms obtained in selectivity testing. A) chromatogram of Anbol® tablets; B) chromatogram of standard solution (acetylsalicylic and salicylic acid); C) chromatogram of Anbol® placebo solution spiked with acetylsalicylic and salicylic acid.

Da bi se metoda primenjivala u kvantitativnoj analizi, potrebno je odrediti **limit detekcije (LOD)** i **limit kvantifikacije (LOQ)** za salicilnu kiselinu kao nečistoću. Najmanja koncentracija pri kojoj se površina pika može detektovati predstavlja eksperimentalno dobijeni LOD. Najmanja koncentracija pri kojoj površina pika može da se integriše (RSD za šest ponavljanja $\leq 2\%$) predstavlja eksperimentalno dobijeni LOQ. Limiti detekcije i kvantifikacije za salicilnu kiselinu su određeni metodom kalibracione krive. LOD i LOQ iznose 0,0006 mg/mL, odnosno 0,0022 mg/mL (0,15%, odnosno 0,55% u odnosu na koncentraciju acetilsalicilne kiseline).

Za procenu **linearnosti** metode analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji koncentracije. Pokazano je da je odgovor detektora (površina signala) proporcionalan koncentraciji analita u ispitivanom intervalu. Kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata. Parametri linearnosti prikazani su u Tabeli I.

Tabela I Parametri linearnosti metode.**Table I** Linearity parameteres of the method.

	Acetilsalicilna kiselina	Salicilna kiselina
Opseg linearnosti (mg/mL)	0,025-0,400	0,0025-0,015
a^*	26412	71220
B	188,91	-12,961
R	0,9998	0,9991
P	0,0737	0,4158

* a – nagib; b – odsečak; r – koeficijent korelacije; p – statistička značajnost odsečka kalibracione krive

Regresiona analiza pokazala je da je metoda linearna u ispitivanom opsegu koncentracija, jer su vrednosti koeficijenata korelacije veće od 0,99 (za nečistoću) i 0,999 (za aktivnu supstancu). Vrednosti p takođe ispunjavaju zahteve za linearnost jer su veće od 0,05.

Preciznost metode ispitana je na tri nivoa – preciznost uređaja, ponovljivost i srednja preciznost. Sadržaji acetilsalicilne i salicilne kiseline određeni su metodom standarda i izračunate su relativne standardne devijacije (RSD). Zahtev za preciznost uređaja je $RSD < 1\%$, za ponovljivost $< 2\%$, a za srednju preciznost $< 3\%$ (22). Ponovljivost za nečistoće čiji je sadržaj $> 1\%$ je zadovoljena ako je $RSD < 5\%$. Dobijene RSD vrednosti potvrđuju preciznost metode i prikazane su u Tabeli II.

Tabela II Rezultati ispitivanja preciznosti metode.**Table II** Results of method precision testing.

Analit	Nivo	RSD (%)
Acetilsalicilna kiselina	Preciznost uređaja	0,61
	Ponovljivost	1,14
	Srednja preciznost	1,51
Salicilna kiselina	Preciznost uređaja	1,45
	Ponovljivost	3,88
	Srednja preciznost	2,16

Tačnost metode ispitivana je injektovanjem rastvora analita u triplikatu u koncentracijama 75%, 100% i 125% i određivanjem sadržaja analita metodom standarda. Izračunavanjem *Recovery* vrednosti potvrđena je tačnost metode u ispitivanom opsegu. Kao zahtev je postavljeno da je *Recovery* vrednost za aktivne supstance 98% - 102%, a za nečistoće čiji je sadržaj >1% iznosi 90% - 110% (22). Rezultati ispitivanja tačnosti metode prikazani su u Tabeli III.

Tabela III Rezultati ispitivanja tačnosti metode.

Table III Results of method accuracy testing.

Analit	Koncentracija (%)	Dodata koncentracija (mg/mL)	Izračunata koncentracija (mg/mL)	<i>Recovery</i> (%)	RSD (%)
Acetil-salicilna kiselina	75	0,307	0,305	99,52	3,68
	100	0,410	0,414	101,01	1,32
	125	0,487	0,485	99,56	0,80
Salicilna kiselina	75	0,0088	0,0087	98,55	4,02
	100	0,0121	0,0122	101,31	1,41
	125	0,0143	0,0145	101,19	1,04

Robusnost metode ispituje se tako što se vrše male izmene parametara (temperatura kolone, udeo komponenata mobilne faze i brzina protoka mobilne faze) i prati njihov uticaj na rezultat. Kao odgovori hromatografskog sistema prate se površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline. Rezultati ispitivanja robusnosti metode prikazani su u Tabeli IV.

Tabela IV Eksperimentalno dobijeni rezultati za procenu robusnosti metode.

Table IV Experimentally obtained results of method robustness analysis.

	Acetilsalicilna kiselina		Salicilna kiselina	
	Vrednost u odnosu na optimalne uslove (%)	Odstupanje od optimalnog (%)	Vrednost u odnosu na optimalne uslove (%)	Odstupanje od optimalnog (%)
Temperatura 32°C	100,49	+0,49	99,56	-0,44
Temperatura 38°C	101,97	+1,97	101,20	+1,20
Udeo komponenata MF* 66:34	102,12	+2,12	101,58	+1,58
Udeo komponenata MF* 64:36	100,56	+0,56	101,48	+0,56
Protok MF 1,05 mL/min	97,08	-2,92	97,84	-2,16
Protok MF 0,95 mL/min	102,57	+2,57	102,13	+2,13

*MF – mobilna faza

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da male promene izabranih parametara nemaju značajan uticaj na površine pikova acetilsalicilne i salicilne kiseline. Na taj način je potvrđena robusnost metode.

Predloženu metodu karakterišu slični ili nešto niži limiti kvantifikacije i detekcije za salicilnu kiselinu kao i slično vreme trajanja analize u odnosu na do sada publikovane HPLC metode sa UV detekcijom. Metodu prikazanu u ovom radu karakteriše odsustvo interferencija sa aktivnim supstancama koje mogu biti prisutne u ispitivanim formulacijama u kombinaciji sa acetilsalicilnom kiselinom (askorbinskom kiselinom i pseudoefedrinom).

Primena HPLC metode u analizi doziranih oblika

Za potvrdu primenljivosti predložene HPLC metode izvršena je kvantitativna analiza Anbol[®]300 mg tableta, Aspirin[®]500 mg tableta, Cardiopirin[®]75 mg gastrorezistentnih tableta, Midol[®]100 mg gastrorezistentnih tableta, Andol[®] C šumećih

tableta i Aspirin[®] complex granula za oralnu suspenziju. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli V.

Tabela V Rezultati ispitivanja doziranih oblika.

Table V Results of dosage forms analysis.

Uzorak	Sadržaj acetilsalicilne kiseline	Sadržaj salicilne kiseline
Anbol [®] 300 mg tablete	100,61% (301,83 mg/tbl)	< LOQ
Aspirin [®] 500 mg tablete	101,18% (505,91 mg/tbl)	< LOQ
Cardiopirin [®] 75 mg gastrorezistentne tablete	97,39% (73,04 mg/tbl)	0,89%
Midol [®] 100 mg gastrorezistentne tablete	97,21% (97,21 mg/tbl)	< LOQ
Andol [®] C šumeće tablete	103,89% (519,44 mg/tbl)	0,79%
Aspirin [®] complex granule	98,88% (494,4 mg/tbl)	< LOQ

Svi rezultati ispitivanja odgovaraju zahtevima specifikacija proizvođača.

Zaključak

Nova HPLC metoda je pogodna za istovremenu analizu acetilsalicilne kiseline i njenog proizvoda hidrolize, salicilne kiseline. Metoda omogućava selektivnu kvantifikaciju ova dva analita u toku 5 minuta, bez interferencije komponenata placeba i drugih aktivnih supstanci u ispitanim formulacijama. Parametri validacije (selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost i robusnost za oba analita, kao i LOD i LOQ za salicilnu kiselinu) potvrđuju da predložena HPLC metoda pod datim eksperimentalnim uslovima predstavlja precizan, tačan, selektivan i reproduktivan postupak za kvantitativnu analizu acetilsalicilne i salicilne kiseline i da se može rutinski primenjivati u laboratorijama za kontrolu kvaliteta.

Zahvalnica

Rad je deo Projekta br. 172041 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija, peto izdanje (prvo srpsko izdanje), Data status, Beograd, 2005.
2. Connors KA. Aspirin in Drug Stability, Principles, and Practices, 2nd ed, ed. Carsten JT, Marcel Dekker, New York, 1995, str. 221.
3. Williams RO, Liu J. Influence of formulation technique for hydroxypropylbeta-cyclodextrin on the stability of aspirin in HFA 134a. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999; 47: 145-52.
4. Neves de Aguiar JL, Leandro KC, Shirley de Mello PA, Albert ALM. Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2009; 45: 723-27.
5. Fogel J, Epstein P, Chen P. Simultaneous high-performance liquid chromatography assay of acetylsalicylic acid and salicylic acid in film-coated aspirin tablets. *J. Chromatogr.* 1984; 317: 507-11.
6. Belov VY, Kursakov SV, Sevastyanov VI, Antonov EN, Bogorodskii SÉ, Popov VK. Development of an HPLC-UV method for quantitative determination of acetylsalicylic acid and its main metabolite. *Pharm. Chem. J.* 2018; 52 (2): 151-55.
7. Hobl E-L, Jilma B, Ebner J, Schmid RW. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by isocratic high-pressure liquid chromatography with post-column hydrolysis and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2013; 27 (6): 695-98.
8. Pirola R, Bareggi SR, De Benedittis G. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B:* 1998; 705 (2): 309-15.
9. Venema DP, Hollman P, Janssen K, Katan M. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44 (7): 1762-67.
10. Sirok D, Pátfalusi M, Szeleczky G, Somorjai G, Greskovits D, Monostory K. Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma. *Microchem. J.* 2018; 136: 200-08.
11. Bae SK, Seo KA, Jung EJ, Kim H-S, Yeo C-W, Shon J-H, Park K-M, Liu K-H, Shin J-G. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix[®] in Korean healthy volunteers. *Biomed. Chromatogr.* 2008; 22: 590-95.
12. Xu X, Koetzner L, Boulet J, Maselli H, Beyenhof J, Grover G. Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23 (9): 973-79.
13. Castillo-García M, Aguilar-Caballos MP, Gómez-Hens A. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2015; 985: 85-90.

14. Dołowy M, Pyka-Pająk A. Development of new procedures for the detection and separation of salicylic acid and acetylsalicylic acid using thin-layer chromatography with densitometry. *J. Planar. Chromatogr.* 2017; 30 (5): 363-74.
15. Tsikas D, Tewes KS, Gutzki F-M, Schwedhelm E, Greipel J, Frölich JC. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric determination of acetylsalicylic acid in human plasma after oral administration of low-dose aspirin and guaimesal. *J. Chromatogr. B.* 1998; 709 (1): 79-88.
16. Dolores M, Morales-Hipólito EA, Garduño-Rosas JA, Villaseñor A, López-Arellano R. Development and validation of an alternate stability-indicating UV spectrophotometric analytical method for aspirin in tablets. *Indian J. Pharm. Sci.* 2016; 78 (6): 810-17.
17. Kokot Z, Burda K. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 18(4-5):871-75.
18. Maia Quintino MS, Corbo D, Bertotti M, Angnes L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta.* 2002; 58 (5): 943-49.
19. Paseková H, Sales MG, Montenegro MC, Araújo AN, Polášek M. Potentiometric determination of acetylsalicylic acid by sequential injection analysis (SIA) using a tubular salicylate-selective electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24 (5–6): 1027-36.
20. Torriero A, Luco J, Sereno L, Raba J. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta.* 2004; 62 (2): 247-54.
21. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, Geneva, Switzerland, 2009. (<http://www.ich.org>).
22. Crowther J. Validation of pharmaceutical test methods, in: Ahuja S, Scypinsky S. (Eds.), *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, San D. 2001; 415-43.

Development and validation of liquid chromatography method for determination of acetylsalicylic and salicylic acid in dosage forms

Danijela Damnjanović, Vladimir Dobričić*,
Olivera Čudina, Sote Vladimirov

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade

Summary

Acetylsalicylic acid belongs to nonsteroidal anti-inflammatory drugs with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. The aim of this work was development and validation of HPLC method for qualitative and quantitative analysis of acetylsalicylic acid and its major degradation product, salicylic acid, in dosage forms. The optimal separation was achieved using Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical column (4,6x150 mm, particle size 5 μm) thermostated at 35°C. Mobile phase consisted of eluents A and B in ratio 65:35 (V/V). As the eluent A, water of HPLC purity and 85% phosphoric acid in ratio 80:0.5 (V/V) were used, while acetonitrile was used as the eluent B. The flow rate was 1.0 mL/min and UV detection was performed at 240 nm. The method was validated in terms of selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness for both analytes, as well as limits of detection and quantification for salicylic acid. The obtained results meet the requirements of analytical procedures validation. The proposed HPLC method was applied in qualitative and quantitative analysis of acetylsalicylic and salicylic acids in six different forms of drugs. All obtained results meet the requirements of manufacturer specifications. The established HPLC method was found to be rapid, simple, accurate and selective for simultaneous determination of acetylsalicylic and salicylic acids in dosage forms.

Keywords: acetylsalicylic acid, salicylic acid, liquid chromatography,
validation of method
