



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Nina Ledinek

Optimizacija HPLC metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini

Magistrsko delo

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Optimizacija HPLC metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini

Magistrsko delo študijskega programa II. stopnje

Študent: Nina Ledinek

Študijski program: magistrski študijski program II. stopnje Kemijska tehnika

Predvideni strokovni naslov: magistrica inženirka kemijske tehnike

Mentor: red. prof. dr. Zoran Novak

Komentor: doc. dr. Matjaž Finšgar

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Številka: K2001599

Datum: 27.03.2017

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Statut UM–UPB 11, Uradni list RS, št. 44/2015) izdajam:

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

Nina Ledinek, študent-u/-ki študijskega programa 2. stopnje KEMIJSKA TEHNIKA, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Tema zaključnega dela je pretežno s področja Katedre za kemijsko tehnologijo.

Mentor-ica: red. prof. dr. Zoran Novak

Somentor-ica: doc. dr. Matjaž Finšgar

Naslov zaključnega dela:

OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA DOLOČANJE SORODNIH SUBSTANC PREDNISOLONA V UČINKOVINI

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:

OPTIMIZATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF RELATED SUBSTANCES OF PREDNISOLONE IN ACTIVE INGREDIENT

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 27.03.2018. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo zaključnega dela« in ga v treh izvodih oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentor-ja/-ice in morebitne/-ga somentor-ja/-ice o ustreznosti zaključnega dela.

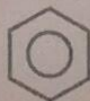
Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

Obvestiti:

- kandidat-a/-ko,
- mentor-ja/-ico,
- somentor-ja/-ico,
- odložiti v arhiv



DEKAN
red. prof. dr. Zdravko Kravanja



FAKULTETA ZA KEMIJU IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Kazalo

Kazalo.....	I
Izjava.....	III
Zahvala	IV
Povzetek.....	V
Abstract.....	VI
Seznam tabel.....	VII
Seznam slik.....	VIII
Uporabljeni simboli in kratice	XI
1 Uvod.....	1
1.1 Opredelitev problema.....	1
1.2 Namen, hipoteze in cilji	2
2 Teoretični del.....	3
2.1 Prednisolon kot aktivna farmacevtska učinkovina.....	3
2.2 Znane nečistote prednisolona.....	3
2.3 Evropska farmakopeja in HPLC - metode za določevanje sorodnih substanc.....	6
2.3.1 Aplikacija Ph.Eur. metod	7
2.4 Ustreznost kromatografskega sistema.....	9
2.4.1 Ponovljivost sistema.....	9
2.4.2 Razmerje signal/šum	10
2.4.3 Število teoretskih podov.....	10
2.4.4 Faktor simetrije	11
2.4.5 Ločljivost.....	11
2.4.6 Razmerje višin vrh/dolina	11
2.5 HPLC - sistem.....	13
2.5.1 Določitev volumna zakasnitve gradienta HPLC - instrumenta	14
2.5.2 HPLC - kolone	15
2.5.2.1 Gemini HPLC - kolone	15
2.5.2.2 Luna HPLC - kolone	16
2.5.2.3 Kinetex HPLC - kolone.....	16
2.5.2.4 Primerjava popolnoma poroznih delcev in Core-Shell delcev	17
2.6 Validacija Ph.Eur. HPLC - metod za določanje sorodnih substanc učinkovine	17
2.6.1 Specifičnost.....	18
2.6.2 Območje	18
2.6.3 Linearnost odziva	19
2.6.4 Točnost.....	19
2.6.5 Natančnost.....	19
2.6.5.1 Ponovljivost metode.....	19
2.6.6 Meja zaznavnosti.....	20
2.6.7 Meja določljivosti.....	20
2.6.8 Robustnost.....	20

3	Metode dela in materiali	21
3.1	Kemikalije in materiali	21
3.2	Instrumenti.....	21
3.2.1	HPLC - sistemi	21
3.2.2	Kromatografske kolone	22
4	Eksperimentalni del	23
4.1	Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc v učinkovini prednisolon	24
4.1.1	Priprava raztopin.....	24
4.1.2	Kromatografski pogoji.....	24
4.1.3	Identifikacija nečistot	25
4.1.4	Ustreznost sistema in zahteve (specifikacije)	25
4.2	Neveljavna (predhodna) Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini	26
4.2.1	Priprava raztopin.....	26
4.2.2	Kromatografski pogoji.....	26
4.2.3	Ustreznost sistema in zahteve (specifikacije)	26
4.3	Primerjava trenutno veljavne Ph.Eur. metode in neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode....	27
4.4	Optimizacija kromatografskih pogojev	28
5	Rezultati in diskusija.....	29
5.1	Rezultati aplikacije veljavne Ph.Eur. metode.....	30
5.1.1	Veljavna Ph.Eur. metoda na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m.....	30
5.1.2	Veljavna Ph.Eur. metoda na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m.....	31
5.2	Rezultati optimizacije Ph.Eur. HPLC - metode znotraj dovoljenih odstopanj	33
5.3	Razvoj nove metode	35
5.3.1	Rezultati neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode	35
5.3.2	Rezultati razvoja nove metode.....	38
5.3.2.1	1.izbrana nova metoda	40
5.3.2.2	2. izbrana nova metoda	47
5.3.2.3	Končna nova metoda	50
6	Zaključek	53
7	Literatura.....	55
8	Priloge.....	57
8.1	Priloga 1	57
9	Življenjepis	74

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal/a sam/a, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledal/a sem literaturo s področja magistrskega dela po naslednjih geslih:

Vir: Web of Knowledge (apps.webofknowledge.com)

Gesla:	Število referenc
impurities IN prednisolone IN HPLC	19
separation of corticosteroids IN HPLC	125
corticosteroids IN prednisolone IN HPLC	114
HPLC IN glucocorticoids IN prednisolone	70

Vir: Science direct (<http://www.sciencedirect.com/>)

Gesla:	Število referenc
"related substances" IN prednisolone IN HPLC	90
"separation of corticosteroids" IN HPLC	68
"separation of glucocorticoids" IN HPLC	12
"HPLC separation" IN glucocorticoids IN prednisolone	64

Vir: COBISS/OPAC (<http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid>, COBIB.SI)

Gesla:	Število referenc
HPLC IN določanje nečistot	3
Optimizacija HPLC metode	27

Skupno število pregledanih člankov: 25

Skupno število pregledanih knjig: 2

Maribor, januar, 2018

Nina Ledinek
podpis

Zahvala

Zahvljujem se predvsem mentorju, red. prof. dr. Zoranu Novaku in komentorju doc. dr. Matjažu Finšgarju za vso pomoč pri izdelavi magistrskega dela. Posebej se zahvaljujem dr. Amri Pervi Uzunalić za vso pomoč in usmerjanje med celotnim procesom izdelave magistrske naloge ter celotni Skupini za separacijske analize SSA za prijaznost in pomoč pri laboratorijskem delu.

Rada bi se zahvalila tudi svoji družini za vso podporo tekom vseh študijskih let.

Optimizacija HPLC metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini

Povzetek

Analiza vsebnosti sorodnih substanc je nujna v fazi razvoja in proizvodnje zdravila. Pri evropski farmakopejski (Ph.Eur.) HPLC - metodi za določanje sorodnih substanc prednisolona se v praksi pogosto pojavlja težava z doseganjem kriterija za ustreznost sistema. Težava se pojavlja pri slabi ločbi prednisolona in njegove sorodne substance hidrokortizona (nečistota A), ki sta si strukturno zelo podobna.

Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc prednisolona je bila razvita na kromatografski koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci, ki smo jo testirali kot izhodišče naše nadaljne optimizacije. V nadaljevanju magistrskega dela smo poskušali optimizirati Ph.Eur. metodo na kolonah s stacionarno fazo C18 drugega proizvajalca v okviru dovoljenih odstopanj od Ph.Eur., in nato poskušali razviti in predlagati novo metodo.

V magistrskem delu so doseženi vsi predhodno zastavljeni cilji. Prikazana je optimizirana metoda v okviru dovoljenih odstopanj od Ph.Eur., s katero smo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci dosegli kriterij za ustreznost sistema - razmerje vrh/dolina $H_p/H_v = 10,5$. Z optimizirano metodo dosežemo precej izboljššan rezultat v primerjavi z referenčnim kromatogramom Ph.Eur. metode na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci, kjer je doseženo razmerje $H_p/H_v = 7,0$. V magistrskem delu je predstavljena tudi nova razvita metoda s katero smo dosegli zelo dobro ločbo sorodnih substanc in ločitev prednisolona in nečistote A skoraj na bazni liniji ($H_p/H_v = 21,0$).

Ključne besede: prednisolon, sorodne substance, HPLC, Ph.Eur., optimizacija HPLC - metode, razvoj HPLC - metode

UDK: 543.544.17:543.544.5(043.2)

Optimization of HPLC - method for determination of related substances of prednisolone in active ingredient

Abstract

An analysis of related substances is necessary in the development and production phase of the drug. In practice, in the implementation of Ph.Eur. HPLC - method for the determination of related substances of prednisolone, we often encounter a problem with achieving a system suitability criteria. The problem occurs with the separation of the peaks prednisolone and its related substance hydrocortisone (impurity A), which are structurally very similar.

Ph.Eur. HPLC - method for the determination of related substances of prednisolone was developed on the chromatography column Venusil AQ C18, 150 mm x 4.6 mm, 3 μ m particles, which we tested as the starting point for our further optimization. In the continuation of the master's thesis we tried to optimize Ph.Eur. method on columns with the C18 stationary phase of the other manufacturers within the allowable adjustments to European pharmacopeia methods., and then tried to develop a new method.

All previously determined goals in the master's thesis have been achieved. In the master's thesis an optimized method (within the allowable adjustments to European pharmacopeia methods) on the column Gemini C18, 150 mm x 4.6 mm, 3 μ m particles is presented, which we used to reach the criteria for the system suitability, the ratio peak/valley – $H_p/H_v = 10,5$. With the optimized method, we achieve a significantly improved result compared to the reference chromatogram obtained with the Ph.Eur. method on the column Venusil AQ C18, 150 mm x 4.6 mm, 3 μ m particles, where the H_p/H_v ratio is 7,0. In the master's thesis, a new developed method is introduced to achieve a very good separation of related substances and the separation of prednisolone and impurity A, which is almost on the base line ($H_p/H_v = 21,0$).

Key words: prednisolone, related substances, HPLC, Ph.Eur., HPLC - method optimization, HPLC - method development

UDK: 543.544.17:543.544.5(043.2)

Seznam tabel

Tabela 2-1: Gradientna elucija pri izvedbi določitve volumna zakasnitve gradienta sistema.....	14
Tabela 3-1: Konfiguracija HPLC - sistemov.....	22
Tabela 3-2: Uporabljene kromatografske kolone.....	22
Tabela 4-1: Gradienta elucija metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini	25
Tabela 4-2: Primerjava veljavne in neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode.....	27
Tabela 4-3: Parametri, ki smo jih spreminjali pri optimizaciji/razvoju metode.....	28
Tabela 5-1: Gradientna elucija optimizirane metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini.	33
Tabela 5-2: Rezultati testov neveljavne Ph.Eur. metode na različnih kolonah (kromatogram RS (a)).	35
Tabela 5-3: Rezultati začetnih testov razvoja nove metode na različnih kolonah (kromatogram RSA).	39
Tabela 5-4: Rezultati testov razvoja nove metode na različnih kolonah (kromatogram RSA).	41
Tabela 5-5: Rezultati testov razvoja nove metode na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm (kromatogram RSA).	48
Tabela 8-1: Tri gradientne elucije uporabljene pri testih metod na 12 različnih HPLC - kolonah.	57
Tabela 8-2: Rezultati testov metod na različnih kolonah (kromatogram RSA).	58
Tabela 8-3: Rezultati testov na koloni Kinetex Phenyl Hexyl 2,6µm, 150 mm × 4,6 mm na sistemu HPLC 1000 (kromatogram RSA).	61
Tabela 8-4: Rezultati testov na koloni Kinetex Biphenyl 2,6µm, 150 mm × 4,6 mm na sistemu HPLC 1100 in Nexera XR1(kromatogram RSA).	62
Tabela 8-5: Rezultati testov na koloni Gemini C18 3µm, 150 mm × 4,6 mm (kromatogram RSA). ...	63

Seznam slik

Slika 1-1: Referenčni kromatogram Ph.Eur. metode sorodnih substanc prednisolona: raztopina prednisolona (vrh št. 2), ki vsebuje nečistoto B (vrh št. 1), nečistoto A (vrh št. 3) in nečistoto C (vrh št.4) ^[3]	1
Slika 2-1: Struktura hidrokortizona in prednisolona ^[7]	3
Slika 2-2: Strukturne formule specifičnih nečistot prednisolona ^[10]	4
Slika 2-3: Strukturne formule ostalih zaznanih nečistot prednisolona ^[10]	5
Slika 2-4: Slikovni prikaz pojmov za izračun razmerja signal/šum ^[4]	10
Slika 2-5: Slikovni prikaz pojmov za izračun faktorja simetrije ^[4]	11
Slika 2-6: Slikovni prikaz pojmov za izračun razmerja vrh/dolina ^[4]	12
Slika 2-7: Moduli HPLC - sistema ^[16]	13
Slika 2-8: Slikovni prikaz pojmov za izračun mrtvega volumna ^[4]	14
Slika 2-9: TWIN Technology pri proizvodnji polnil Gemini kolon (levo) in delci v koloni Gemini C18 (desno) ^[18]	15
Slika 2-10: Delci v koloni Luna (TMS – tetrametilsilan) ^[18]	16
Slika 2-11: Prikaz delcev stacionarnih faz različnih Kinetex kolon ^[19]	16
Slika 2-12: Primerjava Core-Shell delcev s poroznimi delci. Efekt vrtnične difuzije (razširjanje vrhov) (zgoraj-levo, spodaj-levo) in dolžino difuzijske poti molekul (zgoraj-desno, spodaj-desno) ^[20]	17
Slika 5-1: Diagram, ki prikazuje potek do rezultata optimizirane metode in nove metode.....	29
Slika 5-2: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemih HPLC 1200-2 (c = 0,5 mg/mL).....	30
Slika 5-3: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1(c = 0,5 mg/mL).....	31
Slika 5-4: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu HPLC 1200-2 (c = 0,5 mg/mL).....	32
Slika 5-5: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (c = 0,5 mg/mL).	32
Slika 5-6: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po optimizirani metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Agilent 1200-2 (c. = 0,5 mg/mL).	34
Slika 5-7: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po optimizirani metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (c = 0,5 mg/mL).	34

Slika 5-8: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR2.....	36
Slika 5-9: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR2 (<i>c</i> = 2,5 mg/mL). ..	36
Slika 5-10: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR1.	37
Slika 5-11: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR1(<i>c</i> = 2,5 mg/mL).....	37
Slika 5-12: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1.....	38
Slika 5-13: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 2,5 mg/mL). ..	38
Slika 5-14: Kromatogram izmerjen z metodo s katero je dosežena dobra ločitev kortikosteroidov ^[23]	40
Slika 5-15: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).....	43
Slika 5-16: Raztopina za občutljivost sistema RSC izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,00025 mg/mL).	43
Slika 5-17: Kromatogram raztopine standarda za identifikacijo vrhov RSB izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).....	44
Slika 5-18: Preslikava kromatogramov RSA in kromatogramov nečistote A, nečistote B in nečistote C izmerjenih s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1.....	44
Slika 5-19: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).....	45
Slika 5-20: Preslikava kromatogramov RSA in in kromatogramov kortizona in nečistote A izmerjenih s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1.	46
Slika 5-21: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).....	47
Slika 5-22: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).	47
Slika 5-23: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen z 2. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,5 mg/mL).....	49
Slika 5-24: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen z 2. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (<i>c</i> = 0,25 mg/mL).	50

Slika 5-25: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).	51
Slika 5-26: Raztopina za občutljivost sistema RSC izmerjena s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,00025$ mg/mL).....	51
Slika 5-27: Kromatogram raztopine standarda za identifikacijo vrhov RSB izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).	52
Slika 5-28: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).....	52
Slika 6-1: Diagram, ki prikazuje glavne prednosti in slabosti optimizirane Ph.Eur. metode in nove razvite metode.	53

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

A_s	faktor simetrije
c	koncentracija (mg/mL)
NTP	število teoretskih podov
p/v	razmerje višin vrh/dolina
R	ločljivost
$S_r(\%)$	relativni standardni odmik
S/N	razmerje signal/šum
T	temperatura (°C)
t_R	retenzijski čas (min)

Kratice

AcN	acetonitril
API	aktivna farmacevtska učinkovina (angl. "active pharmaceutical ingredient")
EDQM	angl. "European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare"
FDA	(angl. "U.S. Food and Drug Administration")
GMP	dobra proizvodna praksa (angl. "good manufacturing practise")
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Hp/Hv	razmerje višin vrh/dolina
H ₂ O	voda
LC/MS	tekočinska kromatografija/masna spektrometrija
MeOH	metanol
Ph.Eur.	Evropska farmakopeja
RV	raztopina vzorca
RSA	raztopina standarda za ustreznost sistema
RSB	raztopina standarda za identifikacijo vrhov
RSC	raztopina standarda za občutljivost sistema
THF	tetrahidrofur
QbD	(angl. "quality by design")

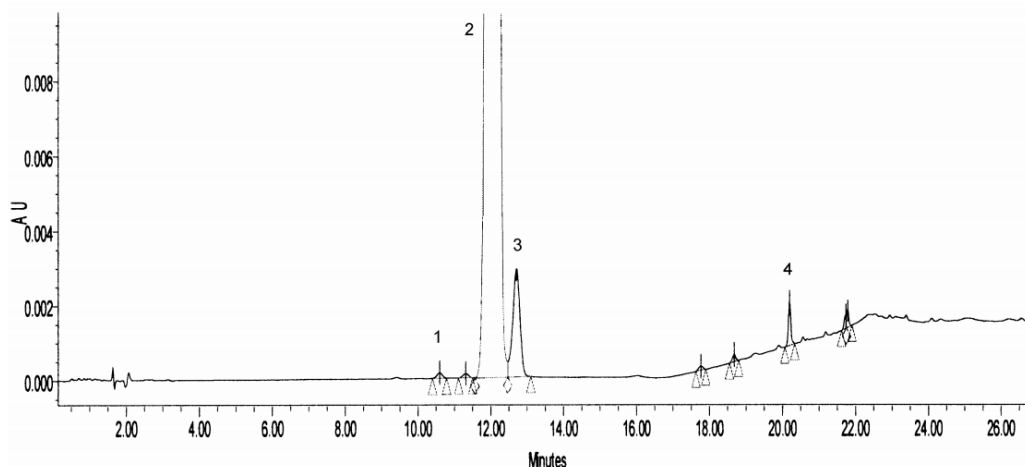
1 Uvod

Glukokortikoidi so dobro poznana skupina steroidnih hormonov, ki se v veliki meri uporabljajo zaradi svojih izredno dobrih protivnetnih lastnosti. Prednisolon je derivat kortizola in je pogosto predpisan sintetični glukokortikoid, ki ima veliko boljše glukokortikoidne lastnosti kot naravni glukokortikoidi^[1].

1.1 Opredelitev problema

Prednisolon se pogosto uporablja v farmacevtski industriji, ki strmi k temu, da izdela čim boljše, kakovostno in učinkovito zdravilo. V fazi razvoja in proizvodnje zdravila morajo zato biti izvedene vse potrebne analize, med drugim tudi analiza vsebnosti sorodnih substanc. Sorodne substance so zdravilni učinkovini strukturno sorodna snov. Predstavljajo nečistoto kot sestavino zdravila, ki ni kemično definirana učinkovina ali pomožna snov. Sorodne substance v učinkovini morajo biti strogo nadzorovane, zato je analiza vsebnosti sorodnih substanc pomembna metoda s katero se le-te določajo.

Veljavna evropska farmakopejska metoda (Ph.Eur.) tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za določanje sorodnih substanc prednisolona je bila razvita na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m delci. Kriterij za ustreznost kromatografskega sistema je razmerje višin vrh/dolina (H_p/H_v), med vrhovoma prednisolona in njegovo sorodno substanco hidrokortizon (nečistota A), ki mora biti večje od 3. Na spodaj prikazanem kromatogramu (slika 1-1), ki je bil izmerjen na omenjeni koloni Venusil (EDQM - "The Knowledge database") je dosežena ustreznost kromatografskega sistema ($H_p/H_v = 7$), vendar ločitev vrha prednisolona in nečistote A ni na bazni liniji^[2].



Slika 1-1: Referenčni kromatogram Ph.Eur. metode sorodnih substanc prednisolona: raztopina prednisolona (vrh št. 2), ki vsebuje nečistoto B (vrh št. 1), nečistoto A (vrh št. 3) in nečistoto C (vrh št.4)^[3].

Ločba je zelo odvisna od uporabljene kolone in HPLC - sistema. Do težav z zagotavljanjem ustreznosti kromatografskega sistema tako prihaja v primeru uporabe C18 kromatografskih kolon drugih proizvajalcev (drugačna selektivnost). Izbira kolone ter nastavitve (odzivni čas, referenčna valovna dolžina, angl. "bandwidth", "slit width", itd.) in tip detektorja, tip črpalke, volumen zakasnitve gradienta HPLC - sistema in drugi parametri lahko bistveno vplivajo na

ločbo teh dveh vrhov. V nekaterih primerih je lahko sistem neustrezen za uporabo Ph.Eur metode.

Proizvajalci aktivnih farmacevtskih učinkovin (angl. "*active pharmaceutical ingredient*" – API) imajo pri analizi sorodnih substanc prednisolona težave z doseganjem ustreznosti kromatografskega sistema. Proizvajalci se morajo držati predpisanih farmakopejskih metod za farmacevtske učinkovine, torej kadar je proizvod namenjen evropskemu trgu, morajo slediti metodam Evropske farmakopeje. Če ne dosežejo ustreznosti kromatografskega sistema, je pri verifikaciji metode potrebna optimizacija kromatografskih pogojev. Kromatografske pogoje lahko optimiziramo le v okviru dovoljenih odstopanj v skladu z evropsko farmakopejo^[4].

Veljavna Ph.Eur. metoda na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci je bila predstavljena v Evropski farmakopeji 7.2. Neveljavna (predhodna) metoda za določanje sorodnih substanc prednisolona je bila razvita na koloni Luna C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm delci. Kriterij za ustreznost sistema je bila ločljivost (angl. "*resolution*" - *R*), kjer je bilo potrebno doseči minimalno vrednost 2,2 med glavnim vrhom prednisolona in njegovo nečistoto A (hidrokortizon). S to metodo je bila dosežena boljša ločba vrhov na sami bazni liniji. Problematika te metode je bila mobilna faza, ki je vsebovala tetrahidrofuran (THF), ki lahko v primeru visoke koncentracije v HPLC - analizah povzroča težave. THF je težaven zaradi visoke hlapnosti, zaradi katere lahko prihaja do razlik v sestavi mobilne faze med izvajanjem analize. Paziti je potrebno tudi na odstotek THF v mobilni fazi in prisotnost zadostnega odstotka vodne faze, ker lahko THF poškoduje PEEK ferule (polieter eter keton) in plastične cevke na sistemu^[5]. V primeru uporabe THF v mobilni fazi nad pribl. 10 % vol. je potrebno uporabljati kovinske cevke in kovinske ferule na HPLC - sistemu. Pri dolgotrajni uporabi THF na HPLC - sistemu se lahko poškodujejo tesnila na sistemu, kar lahko povzroči težave pri drugih analizah. Zato uporaba THF v visokih % v mobilni fazi ni priporočljiva.

Če povzamemo, je slabost neveljavne Ph.Eur. metode uporaba THF v mobilni fazi v visokem deležu, slabost veljavne metode pa slaba ločba nečistote A od glavnega vrha.

1.2 Namen, hipoteze in cilji

Kot izhodišče obstoječe metode testiramo kolono Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci. Nato testiramo različne HPLC - kolone proizvajalca Phenomenex. Primarni namen je optimizirati Ph.Eur. metodo oziroma kromatografske pogoje z uporabo kromatografskih kolon s stacionarno fazo C18, v okviru dovoljenih odstopanj.

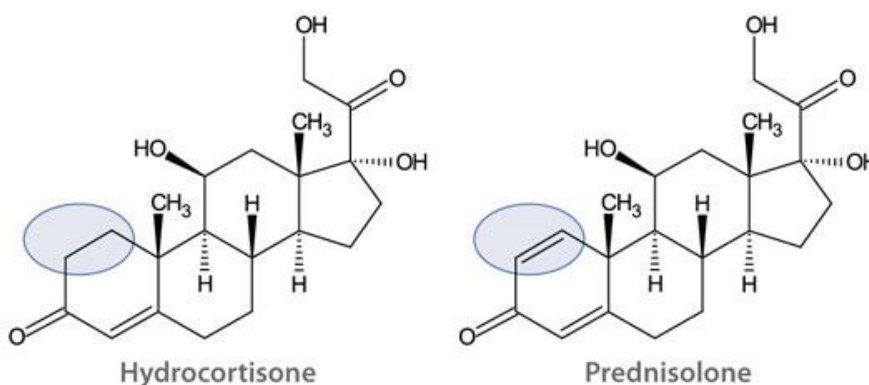
V primeru neuspešnosti optimizacije metode, se na najustreznejši koloni v primerjavi s kolono Venusil poskusi razviti nova metoda. Nato sledi testiranje kolon z drugimi stacionarnimi fazami in na ta način poskus razvoja nove metode.

V primeru optimizacije metode v okviru dovoljenih odstopanj od Ph.Eur, bi bila metoda uporabna za proizvajalce API-jev, saj v tem primeru ne bi bila potrebna dodatna validacija metode.

Cilj magistrskega dela je optimizirati Ph.Eur. metodo na koloni drugega proizvajalca v okviru dovoljenih odstopanj od Ph.Eur., s katero bi dosegli boljše rezultate ustreznosti kromatografskega sistema, kot na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm delci. V kolikor nam to ne uspe pa bi radi predlagali novo metodo.

2 Teoretični del

Glukokortikoidi so skupina hormonov, ki nastanejo naravno ali sintetično in so si med seboj strukturno zelo podobni. V to skupino spada tudi prednisolon in njena sorodna substanca oz. nečistota A, hidrokortizon. Analitiki se pogosto srečujejo z izzivom ločevanja spojin, ki imajo zelo podobne topnosti. Tudi v našem primeru imata prednisolon in hidrokortizon zelo podobni topnosti in strukturi, razlikujeta se le v eni dvojni vezi (slika 2-1)^[6].



Slika 2-1: Struktura hidrokortizona in prednisolona^[7].

2.1 Prednisolon kot aktivna farmacevtska učinkovina

Prednisolon je sintetični kortikosteroid s prevladujočo glukokortikoidno in nizko mineralkortikoidno aktivnostjo. Zaradi tega je koristen za zdravljenje širokega spektra vnetnih in avtoimunskih stanj.

Po priključku na receptorje na celični površini in vstopu v celico prednisolon vstopi v jedro, kjer se veže in aktivira specifične jedrske receptorje, kar ima za posledico spremenjeno izražanje genov in zaviranje produkcije vnetnega citokina. Ta tako tudi zmanjša število limfocitov, povzroča diferenciacijo celic in stimulira apoptozo v občutljivih populacijah tumorskih celic.

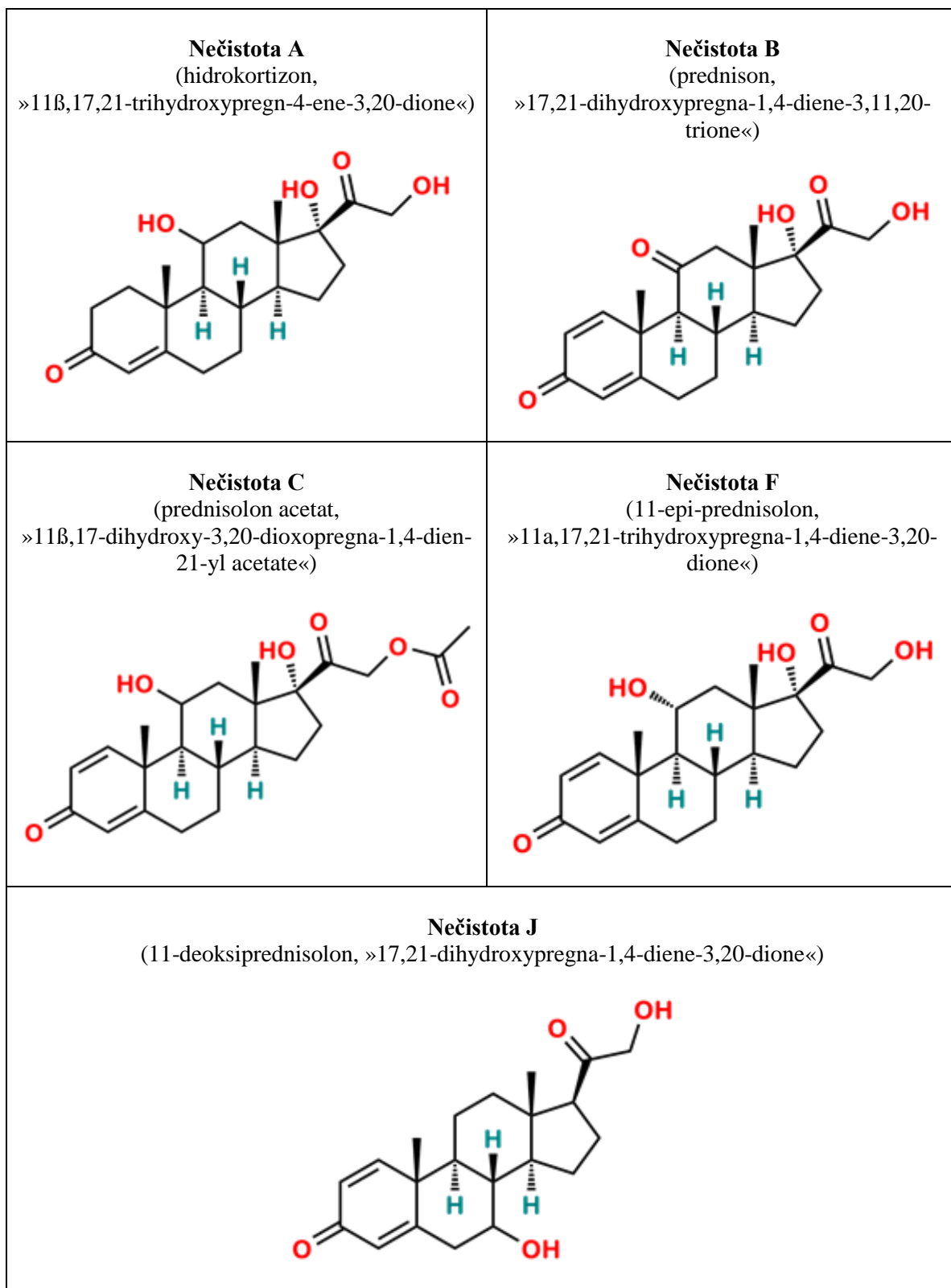
Uporablja se za zdravljenje primarne ali sekundarne adrenokortikalne insuficience, kot je prirojena hiperplazija nadledvične žleze, tiroditis. Prav tako se prednisolon uporablja pri zdravljenju artritisa, revmatoidnega artritisa, ankilozirajočega spondilitisa, burzitisa in epikondilitisa. Naveden je tudi pri zdravljenju levkemij, limfomov, trombocitopenije in avtoimunske hemolitične anemije. Poleg vsega naštetega se uporablja tudi pri zdravljenju celiakije, inzulinske rezistence, ulceroznega kolitisa in motenj jeter.

Prednisolon je na voljo le na recept. Generično zdravilo prednisolon proizvaja 17 podjetij. Poleg tega je bilo v letu 2017 naštetih že 60 znamk generičnega prednisolona. Obstaja v obliki tablet, kapsul, sirupa, kreme, gela, tekočine ali injekcije^[8].

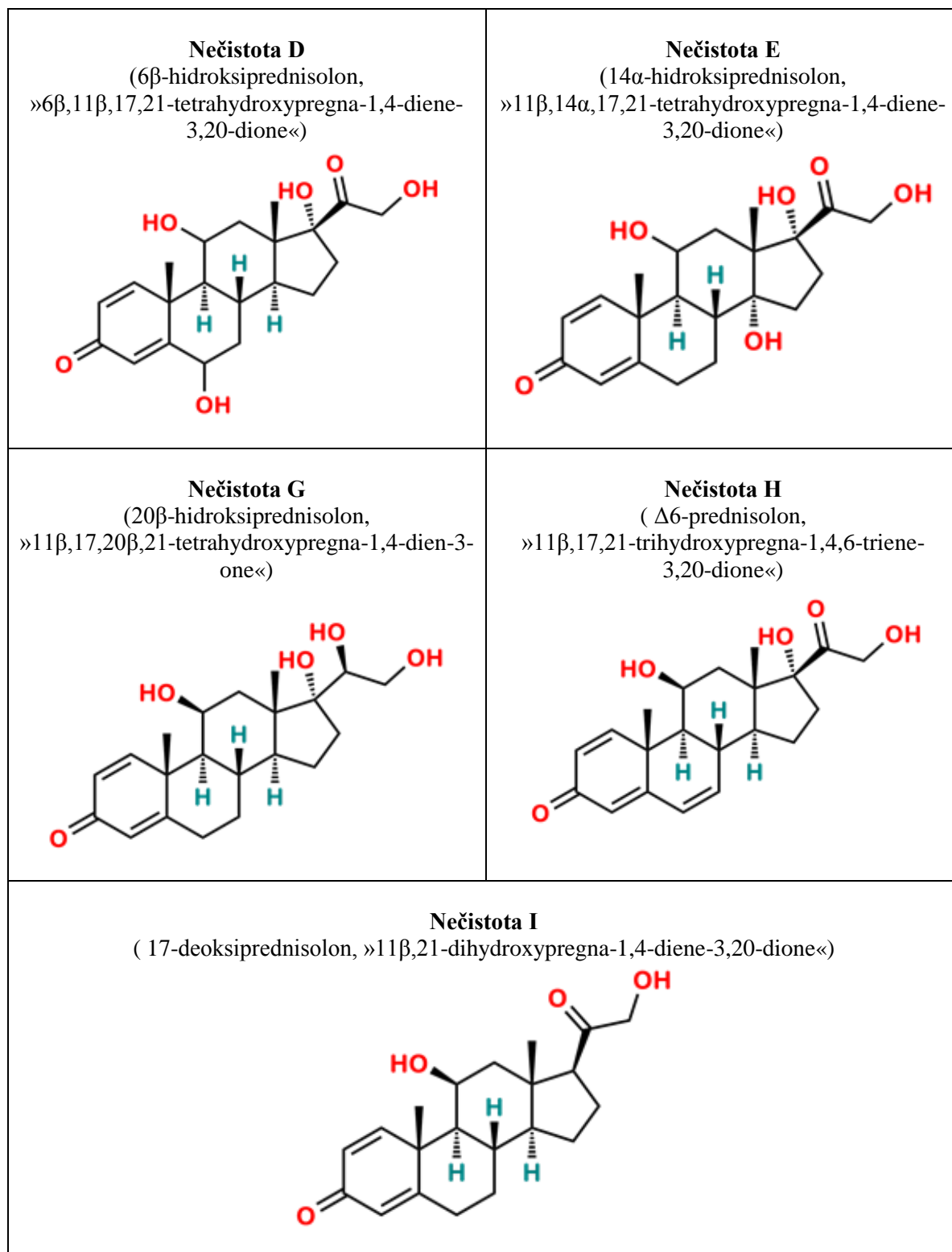
2.2 Znane nečistote prednisolona

V farmakopeji so navedene nečistote prednisolona. Navedene so specificirane nečistote in tudi ostale nečistote, ki jih lahko zaznamo v učinkovini^[9].

- **Specificirane nečistote:** A, B, C, F, J (slika 2-2).

Slika 2-2: Strukturne formule specificiranih nečistot prednisolona^[10].

- **Ostale zaznane nečistote:** D, E, G, H, I (slika 2-3). (Substance, ki so zaznane v katerem od testov v monografiji (v primeru če so prisotne na zadostni ravni). Njihove vsebnosti so omejene s splošnim kriterijem za druge/nеспециfirane nečistote in/ali v poglavju farmakopeje «Snovi za farmacevtsko uporabo».^[11])

Slika 2-3: Strukturne formule ostalih zaznanih nečistot prednisolona^[10].

2.3 Evropska farmakopeja in HPLC - metode za določevanje sorodnih substanc

Evropska farmakopeja (Ph.Eur.) je publikacija, ki predstavlja sistem predpisov za izdelavo zdravil, potrjevanje istovetnosti, ugotavljanje čistote in preizkušanje drugih parametrov kakovosti zdravil in snovi, iz katerih so zdravila izdelana. Evropsko farmakopejo določa Konvencija Sveta Evrope iz leta 1964. Izdaja jo Evropski direktorat za kakovost zdravil (»European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare – EDQM«)^[12].

Uradni objavljeni standardi zagotavljajo pravno in znanstveno podlago za nadzor kakovosti med razvojnimi, proizvodnimi in tržnimi procesi. Nanašajo se na kvalitativno in kvantitativno sestavo in teste, ki jih je potrebno izvesti na zdravilih, surovinah, ki se uporabljajo pri proizvodnji zdravil ter vmesnih proizvodih sinteze. Vsi proizvajalci zdravil in/ali snovi za farmacevtsko uporabo morajo zato uporabljati te standarde kvalitete, da lahko svoje izdelke tržijo v državah podpisnicah Konvencije. Namen Evropske farmakopeje je spodbujati javno zdravje z zagotavljanjem priznanih skupnih standardov za kakovost zdravil in njihovih sestavin. Takšni standardi morajo biti primerni za zagotovitev varne uporabe zdravil pri bolnikih. Poleg tega ti standardi olajšajo prosti pretok zdravil v Evropi in zunaj nje^[13].

Monografije in druga besedila Evropske farmakopeje so oblikovana tako, da ustrezajo potrebam oz. zahtevam:

- -regulativnih organov,
- -zahtevam s področja kontrole kakovosti zdravil in njihovih sestavin,
- proizvajalcem zdravil in njihovih posameznih koponent.

Evropska farmakopeja se pogosto uporablja na mednarodni ravni. S tem, ko globalizacija in širjenje v mednarodni trg naraščata, narašča potreba po razvoju globalnih standardov kakovosti za zdravila, zato Komisija tesno sodeluje z vsemi uporabniki farmakopeje po vsem svetu^[13].

Evropska farmakopeja ni prevedena v slovenščino, imamo pa svoj nacionalni dodatek, ki se imenuje Formularium Slovenicum (FS) in ga pripravlja Komisija za Evropsko farmakopejo. Prva izdaja FS je izšla leta 1998. Formularium Slovenicum uveljavlja enotno slovensko farmacevtsko izrazoslovje, ki je obvezno za farmacevte in zdravnike. Vsa zdravila, ki so v prometu v Sloveniji, morajo biti v skladu s predpisi Evropske farmakopeje in Formulariuma Slovenicuma^[12].

Monografije Evropske farmakopeje o snoveh za farmacevtsko uporabo so namenjene zagotavljanju sprejemljive kakovosti za uporabnike. Vloga farmakopeje pri varovanju javnega zdravja zahteva, da monografije zagotovijo ustrezen nadzor nečistot. Zahteve glede nečistot so navedene v specifičnih monografijah in v splošni monografiji snovi za farmacevtsko uporabo. Posamezne monografije in splošna monografija se dopolnjujejo. Specifične monografije predpisujejo merila sprejemljivosti za nečistote, medtem ko splošna monografija obravnava potrebo po kvalifikaciji, identifikaciji in poročanju o kakršnih koli organskih nečistotah, ki se pojavljajo v aktivnih snoveh.

Kakovost, v zvezi z nečistotami, nadzira niz testov znotraj monografije. Monografije o organskih kemikalijah običajno vsebujejo test z naslovom Sorodne substance, ki pokriva ustrezne organske nečistote. Ta test je lahko dopolnjen s specifičnimi testi kadar splošni test ne obvladuje katere nečistote, ali kadar obstajajo posebni razlogi (npr. varnostni) za zahtevo

specifičnega testa. Kadar monografija nima poglavja Sorodne substance ali drugih enakovrednih testov, temveč samo specifične teste, mora uporabnik kljub temu zagotoviti, da obstaja ustrezen nadzor nad organskimi nečistotami. Tiste, ki se pojavijo nad identifikacijskim pragom, je treba identificirati ter kvalificirati tiste, ki presegajo kvalifikacijsko mejo^[14].

Poglavje v monografiji vključuje nečistote (kemijska struktura in ime), ki so običajno organske, in je za njih znano, da so zaznane v testih predpisanih v monografiji. Temelji na informacijah, ki so bile na voljo v času izdelave ali revizije monografije. V poglavju so navedene specifične nečistote in ponekod tudi druge zaznane nečistote. Specificirane nečistote imajo kriterij sprejemljivosti, ki ni večji od tistega, ki ga odobrijo pristojni organi. Druge zaznane nečistote so potencialne nečistote z definirano strukturo, vendar niso znane kot nečistote, ki se normalno pojavljajo nad identifikacijskim pragom snovi, ki se uporabljajo v zdravilih, ki so jih odobrili pristojni organi pogodbenic Konvencije. Kadar je v aktivni snovi ugotovljena nečistota, ki ni specificirana, je uporabnik substance odgovoren za preverjanje, ali jo je potrebno identificirati ali kvalificirati, odvisno od vsebnosti, narave, največjega dnevnega odmerka in ustrezne identifikacije/kvalifikacije v skladu s splošno monografijo o snoveh za farmacevtsko uporabo^[14].

2.3.1 Aplikacija Ph.Eur. metod

Pri vsaki Ph.Eur. kromatografski analizi metodi so vključeni preizkusi ustreznosti kromatografskega sistema, s katerimi preverimo ali je dosežena zahtevana občutljivost in selektivnost metode. Kljub temu so v nekaterih primerih potrebne nekatere prilagoditve kromatografskih parametrov. Ker je pri metodi zahtevana samo vrsta stacionarne faze oz. je napisana splošna stacionarna faza, na trgu pa obstaja takšna raznolikost stacionarnih faz (več kot 500 različnih C18 stacionarnih faz) in s tem razlike v kromatografskem vedenju, se lahko zgodi, da ne dosežemo predpisanih zahtev ustreznosti sistema. Pri metodah kromatografije z reverzno fazo prilagoditev kromatografskih parametrov ne vodi vedno do zadovoljive kromatografije. V tem primeru je morda potrebno zamenjati kolono z drugo enakega tipa, s katero dosežemo želeno kromatografsko vedenje. Pomagamo si lahko z bazo podatkov na spletni strani EDQM ("The Knowledge database"), kjer so navadno navedeni podatki o koloni ali kolonah, ki so bile uporabljene med izdelavo monografije.

Farmakopeja nam v primeru nedosežene ustreznosti sistema pri metodah tekočinske kromatografije dovoljuje manjša predpisana odstopanja. V našem primeru Ph.Eur. metode za določanje sorodnih substanc prednisolona bomo delali z gradientno elucijo.

• Dovoljena odstopanja (gradientna elucija)

1.) Razmerje komponent v mobilni fazi in gradient

Manjše prilagoditve komponent v mobilni fazi in v gradientu so dovoljene, če dosežemo zahteve za ustreznost sistema, če glavni vrh eluira v $\pm 15\%$ predpisanega retenzijskega časa (v sekundah) in če končna elucijska moč mobilne faze ni šibkejša.

2.) Volumen zakasnitve gradienta

Časovne točke gradienta se lahko prilagodijo, da se kompenzirajo razlike v volumnu zakasnitve gradienta med sistemom, ki je bil uporabljen za razvoj metode in sistemom uporabljenim za analizo. Prilagojene časovne točke pri trenutnem pretoku se lahko izračunajo po naslednji enačbi (2.1):

$$t_c = t - \left(\frac{D-D_0}{F} \right) \quad (2.1)$$

kjer je:

- t_c prilagojena časovna točka gradienta (min)
 t časovna točka gradienta (min)
 D volumen zakasnitve gradienta sistema (mL)
 D_0 volumen zakasnitve gradienta sistema uporabljenega za razvoj metode (mL)
 F pretok (mL/min).

3.) pH mobilna faze

Prilagajanja niso dovoljena.

4.) Koncentracija soli v pufri

Prilagajanja niso dovoljena.

5.) Stacionarna faza

Sprememba identitete substituenta ni dovoljena (npr. ni dovoljena zamenjava C18 s C8 ali C4, itd.).

6.) Velikost delcev

Prilagajanja niso dovoljena.

7.) Dolžina kolone

Dolžino kolone lahko prilagodimo za $\pm 70\%$ (npr. dolžino kolone dimenzije 150 mm \times 4,6 mm lahko prilagodimo v dolžini od 45 mm – 255 mm).

8.) Notranji premer kolon

Notranji premer kolone lahko prilagodimo za $\pm 25\%$ (npr. notranji premer kolone dimenzije 150 mm \times 4,6 mm lahko prilagodimo od 3,45 mm – 5,75 mm).

9.) Pretok

Prilagajanja so dovoljena, kadar se spremenijo dimenzije kolone. V tem primeru prilagodimo pretok z uporabo enačbe (2.2).

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{(l_2 \cdot d_2^2)}{(l_1 \cdot d_1^2)} \quad (2.2)$$

kjer je:

- F_2 prilagojen pretok (mL/min)
 F_1 pretok (mL/min)
 l_2 prilagojena dolžina kolone (mm)
 l_1 dolžina kolone (mm)
 d_2 prilagojen notranji premer kolone (mm)
 d_1 notranji premer kolone (mm)

10.) Temperatura kolone

Temperaturo kolone lahko prilagodimo za $\pm 5\%$.

11.) Valovna dolžina detektorja

Odmiki niso dovoljeni.

12.) Volumen injiciranja

Volumen injiciranja se lahko znižuje dokler dosežemo predpisano natančnost in mejo zaznavnosti^[4].

2.4 Ustreznost kromatografskega sistema

Različni sestavni deli uporabljene kromatografske opreme morajo biti ustrezno kvalificirani in sposobni doseči učinkovitost, ki je potrebna za izvedbo testa oz. analize. Preizkus ustreznosti sistema je sestavni del vsake HPLC - metode in se uporablja za zagotovitev ustreznega delovanja kromatografskega sistema.

Parametri, ki se uporabljajo pri ocenjevanju ustreznosti kolone so učinkovitost (število teoretskih podov), kapacitivni faktor, ločljivost, relativni kapacitivni faktor in faktor simetrije.

Dejavniki, ki lahko vplivajo na kromatografijo vključujejo:

- sestavo, ionsko moč, temperaturo in pH mobilne faze;
- pretok, dimenzije kolone, temperaturo kolone in tlak;
- karakteristike stacionarne faze, vključno s tipom kromatografske faze (delcev ali monolitov), velikost delcev ali makropor, poroznost, specifično površino;
- reverzno fazo in druge površinske modifikacije stacionarnih faz, obseg kemične modifikacije (kar je izraženo z angl. "*end-capping*", ali angl. "*carbon loading*", itd.)^[4].

Po navodilih Evropske farmakopeje morajo biti izpolnjene naslednje zahteve in vse dodatne zahteve navedene v posamezni monografiji, če ni drugače predpisano:

- pri testu določanja vsebnosti sorodnih substanc ali vsebnosti, je za vrh dobljen z referenčno raztopino, ki se uporablja za kvantifikacijo, potrebno doseči faktor simetrije od 0,8 - 1,5, razen če je drugače predpisano;
- pri analizi vsebnosti sorodnih substanc, je meja določljivosti (ki ustreza razmerju signal/šum 10) enaka ali manjša od meje navajanja.

Skladnost s kriteriji ustreznosti sistema je potrebna skozi celoten kromatografski postopek. Glede na različne dejavnike, kot so pogostost uporabe postopka in izkušnje s kromatografskim sistemom, izberemo ustrezno shemo za spremljanje ustreznosti^[4]. Le ta je del predpisanega analiznega postopka.

Za preverjanje ustreznosti kromatografskega sistema se v praksi v farmacevtski industriji uporabljajo predvsem parametri opisani v nadaljevanju. Določajo se s pomočjo programske opreme, ki je nameščena za nadzor HPLC - instrumenta in evaluacijo izmerjenih kromatogramov.

2.4.1 Ponovljivost sistema

Ponovljivost sistema oz. odziva (angl. "*system repeatability*") je izražena kot izračunan relativni standardni odmik (s_r , (%)) zaporedne serije meritev najmanj 3 injiciranj referenčne raztopine. Izračuna se po naslednji enačbi:

$$s_r(\%) = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

kjer je:

y_i posamezne vrednosti, izražene kot ploščina vrha;

\bar{y} srednja vrednost posameznih vrednosti;

n število posameznih vrednosti.

2.4.2 Razmerje signal/šum

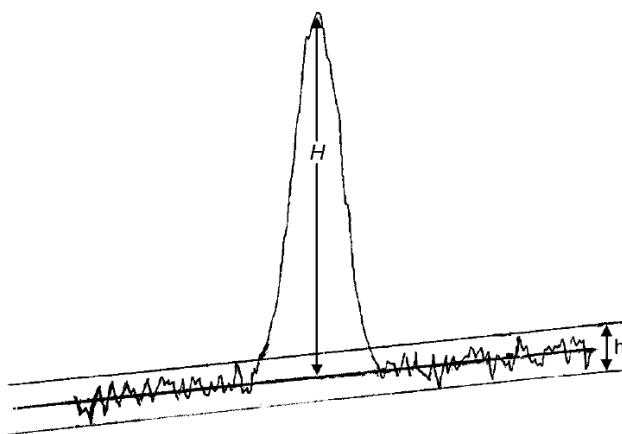
Kratkotrajni šum vpliva na natančnost kvantifikacije, zato je razmerje signal/šum (angl. "signal-to-noise ratio") nujno potrebno preveriti pred začetkom analize, da zagotovimo ustreznost sistema. Razmerje signal/šum se izračuna z enačbo:

$$S/N = \frac{2 \cdot H}{h} \quad (2.4)$$

kjer je:

H višina vrha, ki ustreza komponenti na kromatogramu dobljenim s predpisano referenčno raztopino, merjena od maksimuma vrha do ekstrapolirane osnovne vrednosti signala, opazovanega na razdalji, ki je enaka vsaj 5-kratni širini pri polovični višini vrha (slika 2-12);

h razpon šuma na kromatogramu, dobljenim s slepim injiciranjem ali aplikacijo, opazovan na razdalji, ki je najmanj 5-kratna širina pri polovični višini vrha na kromatogramu dobljenim s predpisano referenčno raztopino (slika 2-4)^[4].



Slika 2-4: Slikovni prikaz pojmov za izračun razmerja signal/šum^[4].

2.4.3 Število teoretskih podov

Učinkovitost kolone se lahko izračuna kot število teoretskih (angl. "plate number"). Izračuna se z uporabo naslednje enačbe (2.5), kjer sta vrednosti t_R in w_h izraženi v istih enotah:

$$NTP = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (2.5)$$

kjer je:

t_R retenzijski čas vrha, ki ustreza komponenti;

$w_{h/2}$ širina vrha na polovici višine^[4].

Število teoretskih podov se spreminja tako s komponento, kot s kolono, temperaturo kolone, mobilno fazo in retenzijskim časom.

2.4.4 Faktor simetrije

Faktor simetrije vrha (angl. "*symmetry factor*") se izračuna po naslednji enačbi:

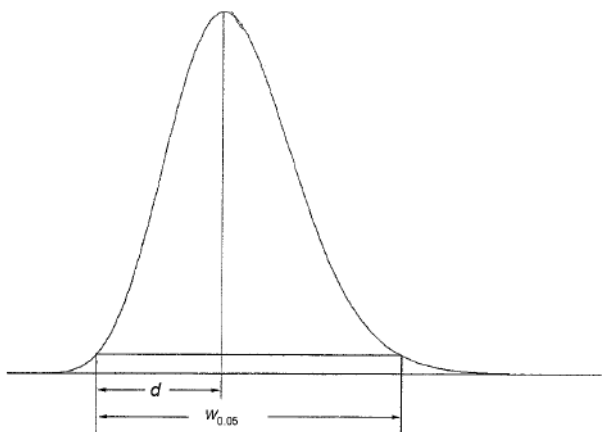
$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \cdot d} \quad (2.6)$$

kjer je:

$w_{0,05}$ širina vrha pri eni dvajsetini višine vrha (slika 2-5);

d razdalja med navpičnico iz maksimumom vrha in roba vrha pri eni dvajsetini višine vrha (slika 2-5).

Ko je faktor simetrije večji od 1,0, temu rečemo "*tailing*", ko pa je manjši od 1,0 to imenujemo "*fronting*"^[4].



Slika 2-5: Slikovni prikaz pojmov za izračun faktorja simetrije^[4].

2.4.5 Ločljivost

Ločljivost (angl. "*resolution*") med vrhovoma dveh komponent se izračuna po enačbi:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (2.7)$$

kjer je:

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1}, t_{R2} retenzijski čas vrhov;

w_{h1}, w_{h2} širini vrhov pri polovici višine^[4].

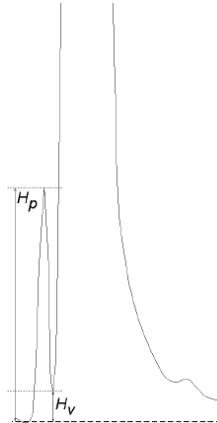
2.4.6 Razmerje višin vrh/dolina

Kadar se ne doseže ločitev na bazni liniji, se lahko razmerje vrh/dolina (angl. "*peak-to-valley ratio*") uporabi kot kriterij ustreznosti sistema pri testu sorodnih substanc.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (2.8)$$

kjer je:

- H_p višina nad ekstrapolirano bazno linijo manjšega vrha (slika 2-6);
 H_v višina nad ekstrapolirano bazno linijo pri najnižji točki vrha, kjer se ločujeta manjši in glavni vrh (slika 2-6)^[4].



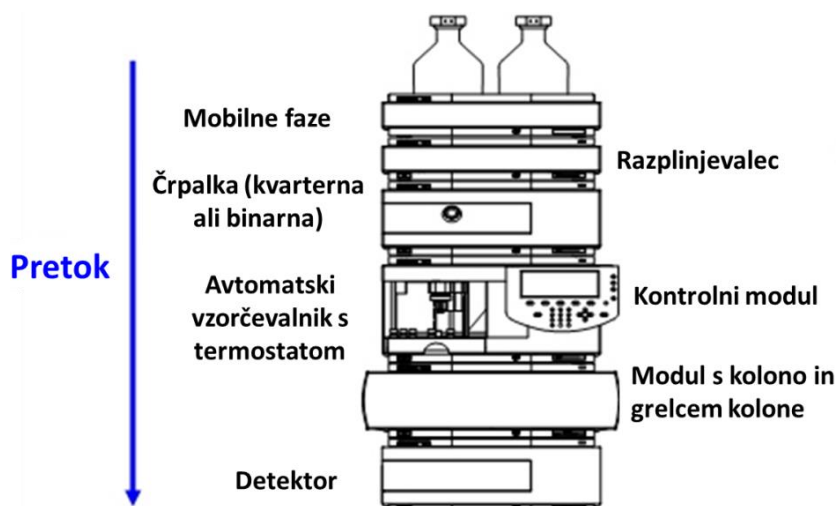
Slika 2-6: Slikovni prikaz pojmov za izračun razmerja vrh/dolina^[4].

2.5 HPLC - sistem

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je ena najbolj razširjenih analitskih tehnik v industriji. Uporablja se za ločevanje in analiziranje spojin z izmenjavanjem komponent med stacionarno in mobilno fazo. Tehnika se uporablja v številnih dejavnostih, kot so analiza živil, zdravil in agrokemikalij. Komponente so najprej raztopljene v topilu in nato vodene skozi kolono pri visokem tlaku. Mešanica se razporedi v njene komponente znotraj kolone in ločljivost je odvisna od interakcije med raztopljenimi komponentami in stacionarno fazo kolone in mobilno fazo. Interakcije lahko manipuliramo z različnimi izbirami tako mobilnih, kot stacionarnih faz.

HPLC kromatografijo lahko razdelimo v dve veliki skupini, kromatografijo normalne faze in reverzno fazno kromatografijo. Pri normalni fazi se za zadrževanje polarnih analitov uporablja polarna stacionarna faza (običajno silikagel), medtem ko reverzno fazna kromatografija temelji na interakcijah med nepolarnimi komponentami in nepolarnimi funkcionalnimi skupinami, ki so vezane na silika fazo. Večina HPLC - aplikacij danes temelji na reverzno fazni kromatografiji^[15].

HPLC - sistem je sestavljen iz posameznih enot, ki so prikazane na sliki 2-7.



Slika 2-7: Moduli HPLC - sistema^[16].

Za analizo različnih organskih spojin so najpogosteje uporabljeni UV - detektorji. Poznamo fiksne mehanize valovne dolžine, kjer lahko merimo le pri eni valovni dolžini in pa variabilne mehanizme valovne dolžine, kjer merimo pri eni valovni dolžini, vendar lahko zaznavajo znotraj širokega razpona valovnih dolžin. Takšni detektorji nudijo najboljšo možno selektivnost za katero koli komponento, ki absorbira svetlobo tako, da uporabniku omogočajo kar se da ustrezno valovno dolžino detektiranja. Detektorji na niz diod simultano merijo spekter valovnih dolžin in uporabniku omogočajo natančne odčitke absorpcije pri nespremenjeni valovni dolžini, medtem ko analit prehaja skozi pretočno celico^[15].

V našem primeru smo uporabljali detektor na niz diod DAD (angl. "*diode array detector*") in detektor na niz fotodiod PDA (angl. "*photodiode array detector*").

2.5.1 Določitev volumna zakasnitve gradienta HPLC - instrumenta

Volumen zakasnitve gradienta (D) HPLC –instrumenta (angl. "dwell volume") je prostornina tekočine v sistemu med točko, kjer se eluenti srečajo (se ustvari gradient) in točko, kjer mobilna faza vstopi v kolono (začetek).

Ta volumen lahko določimo z naslednjim postopkom.

- Kolona: brez kolone (uporabimo le kapilarno cevko).
- Mobilna faza:
 - mobilna faza A: voda;
 - mobilna faza B: 0,1 % raztopina acetona (V/V).
- Gradientna elucija:

Tabela 2-1: Gradientna elucija pri izvedbi določitve volumna zakasnitve gradienta sistema.

t (min)	0	20	30
% A	100	0	0
% B	0	100	100

- Pretok: nastavimo tako, da se doseže zadosten tlak (npr. 2 mL/min).
- Detekcija: UV - spektrofotometrija pri 265 nm.

Določimo čas $t_{0,5}$ (v minutah) (slika 2-8), ko se odziv (absorbanca) zviša za 50 % (slika 2-16) in nato s pomočjo enačbe 2.9 izračunamo volumen zakasnitve gradienta sistema D :

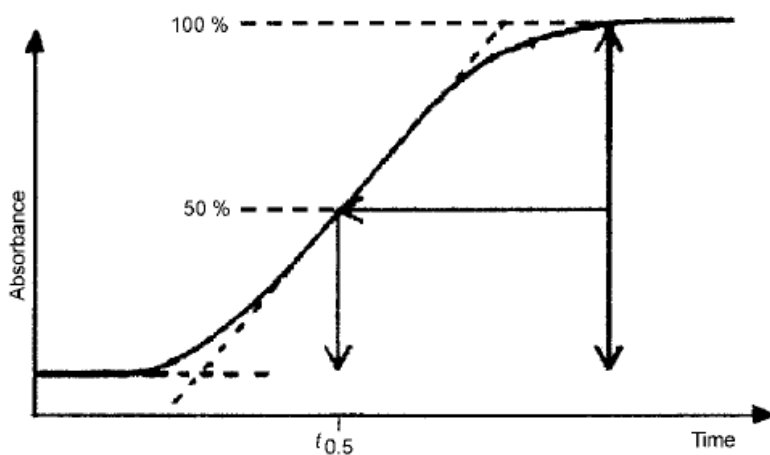
$$D = t_D \cdot F \quad (2.9)$$

kjer je:

$$t_D = t_{0,5} - 0,5 \cdot t_G \text{ (min);}$$

t_G predhodno definiran čas gradienta (= 20 min);

F pretok (mL/min)^[4].



Slika 2-8: Slikovni prikaz pojmov za izračun mrtvega volumna^[4].

2.5.2 HPLC - kolone

Pri kromatografiji z reverzno fazo je najpogostejša vezana faza C18 (oktadecilsilan, ODS). To je ena od mnogih vrst alkilnih ali ogljikovih verig, vezanih na površino delcev silike. Med druge priljubljene alkilsilanske faze spadata C8 in C4. Stacionarne faze kot so fenil, vključno s fenil-heksil in difenil, ter AQ, CN, in PFP, lahko ponudijo znatne razlike v selektivnosti in tako zagotovijo uspešno ločbo. Obstaja vedno več različnih stacionarnih faz s specifičnimi aplikacijami^[17].

Na splošno velja, da se večje molekule (npr. proteini) najboljše ločijo na kolonah z reverzno fazo s kratkimi verigami (C3, CN, diol), vezanimi na široke pore silikagela (100Å). Peptidi in majhne molekule se ločijo na kolonah z daljšo verigo (C8, C18). To je le splošno vodilo, ki pa v veliko primerih ne velja. Zato je na začetku priporočljivo izbrati fazo nekje na sredini hidrofobnega spektra (npr. C8), nato pa spremeniti v bolj hidrofobno ali bolj hidrofilno fazo, odvisno od začetnih rezultatov in topnosti vzorca^[17].

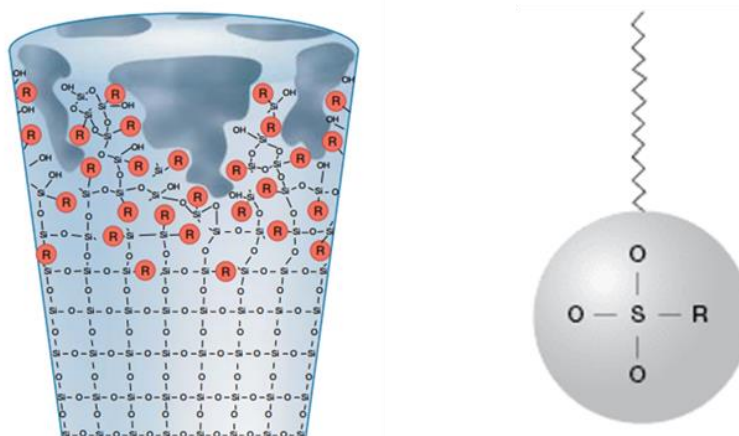
V nadaljevanju so opisane kolone Gemini, Luna in Kinetex, ki smo jih pri eksperimentalnem delu največ uporabljali.

2.5.2.1 Gemini HPLC - kolone

Gemini kolone so robustne kolone z reverzno fazo. V celoti izkoristijo visoke in nizke pH vrednosti za manipulacijo selektivnosti. Daljšo življensko dobo gre predpisati patentirani tehnologiji TWIN (Two-In-One) Tehnology (v primeru faze NX-C18 - Second-Generation TWIN-NX Tehnology). Gemini kolone imajo 3 različne stacionarne faze: C18, NX-C18 in C6-Phenyl. Pri razvoju metode bomo uporabljajo predvsem kolono C18^[18].

• TWIN (Two-In-One) Tehnology :

V zaključni fazi silika proizvodnje je na osnovno siliko pritrjena silika-organska plast, da se ustvari popolnoma nov kompozitni delec. Ker se notranja osnovna silica s tem proizvodnim procesom ne spremeni, delec ohrani svojo mehansko trdnost in togost ter odlično učinkovitost, medtem ko organska silika lupina ščiti delec pred kemičnimi napadi^[18] (slika 2-9).



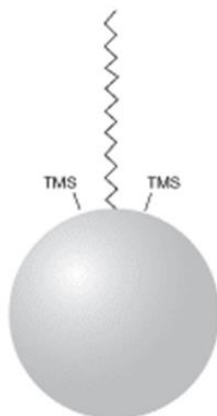
Slika 2-9: TWIN Tehnology pri proizvodnji polnil Gemini kolon (levo) in delci v koloni Gemini C18 (desno)^[18].

2.5.2.2 Luna HPLC - kolone

Luna kolone bazirajo na ultra čisti silika osnovi in ponujajo široko paleto selektivnosti. Danes je na vojo že 21 kolon z različnimi fazami. Imajo široko pH stabilnost za dolgo življenjsko dobo in fleksibilnost metod^[18].

V magistrskem delu je uporabljena kolona s stacionarno fazo **C18** in **C18(2)**:

Oktadecil silan ligandi so vezani na površino silike (slika 2-10), kar povzroči zelo hidrofobno fazo z veliko metilensko selektivnostjo. Nepolarni "endcapping" praktično odpravlja interakcije silanola^[18].



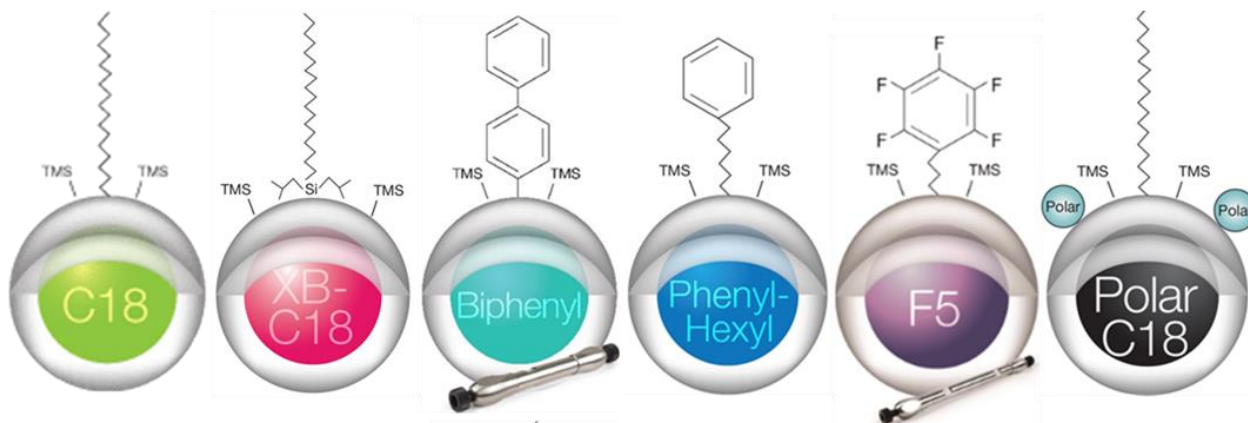
Slika 2-10: Delci v koloni Luna (TMS – tetrametilsilan)^[18].

Kolona C18(2) se od kolone C18 razlikuje v tem, da ima nekoliko nižji angl. "carbon load", kot originalna Luna C18.

2.5.2.3 Kinetex HPLC - kolone

Z uporabo sol-gel tehnologije, ki vključuje tehnologijo nano-strukturiranja, se na trdno silika jedro tvori vzdržljiva, homogena porozna lupina, da se ustvari angl. "core-shell" delec. Ta morfologija delcev ima za posledico ožje kromatografske vrhove v primerjavi s popolnoma poroznimi delci in na ta način zagotavlja izjemno visoko učinkovitost^[19].

Na sliki 2-11 so prikazani delci stacionarnih faz kromatografskih kolon, ki smo jih uporabili pri optimizacije metode.



Slika 2-11: Prikaz delcev stacionarnih faz različnih Kinetex kolon^[19].

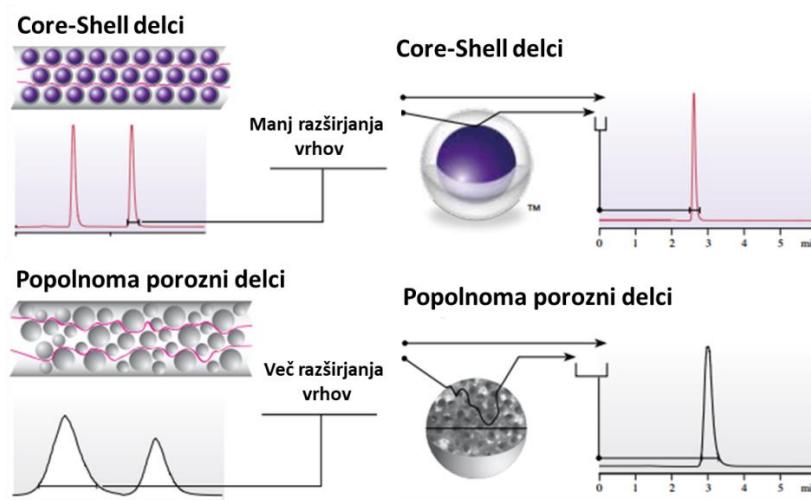
- C18: omogoča hidrofobno retenzijo in metilensko selektivnost;

- XB-C18: v tej fazi so zaščitne butilne stranske verige, ki omogočajo dobro obliko vrhov in večjo ločenost baznih spojin pri nevtralnih in kislih pogojih;
- Bifenil: 100% vodno stabilna bifenična kemija omogoča odlično reverzibilno fazno retenzijo in aromatično selektivnost;
- Fenil-heksil: omogoča boljšo retenzijo in ločevanje aromatskih ogljikovodikov;
- F5: visoko ponovljiva pentafluorofenilna faza, ki je izjemna za halogenirane, konjugirane, izomerske ali zelo polarne spojine;
- Polar C18: kombinirana C18 in polarna modificirana površina, ki zagotavljata polarno in nepolarno retenzijo poleg 100% vodne stabilnosti^[19].

2.5.2.4 Primerjava popolnoma poroznih delcev in Core-Shell delcev

Kinetex delci so zgrajeni s trdnim jedrom visoke gostote, ki spodbuja delce, da se usedejo v lego optimalne strukture. To zmanjša efekt vrtnične difuzije (angl. "Eddy Diffusion effects") (slika 2-12), saj je vmesni prostor med delci praktično homogen, kar ima za posledico visoko učinkovitost kolone. Pri kolonah z navadnimi poroznimi delci pa manj homogena struktura polnila kolone vodi do izgube učinkovitosti.

Tanka, porozna plast ali lupina pri Core-Shell delcih, zmanjša dolžino difuzijske poti in s tem zmanjša čas, ki je potreben za difuzijo molekul v in iz delcev^[20].



Slika 2-12: Primerjava Core-Shell delcev s popolnoma poroznimi delci. Efekt vrtnične difuzije (razširjanje vrhov) (zgoraj-levo, spodaj-levo)) in dolžino difuzijske poti molekul (zgoraj-desno, spodaj-desno)^[20].

2.6 Validacija Ph.Eur. HPLC - metod za določanje sorodnih substanc učinkovine

Cilj validacije analitskega postopka je dokazati, da je postopek primeren za predvideni namen. Metode v monografijah in splošnih poglavjih Evropske farmakopeje so validirane v skladu s sprejeto znanstveno prakso in trenutnimi priporočili o analitični validaciji. Če ni drugače navedeno v monografiji ali v splošnih poglavjih farmakopeje, validiranje analitskih metod ni potrebno. Validacija ni potrebna tudi v primeru, ko spreminjamo različne kromatografske parametre v okviru dovoljenih odstopanj. V primeru sprememb, ki niso v okviru dovoljenih odstopanj, pa je potrebna revalidacija metode.

V nadaljevanju so predstavljene smernice določene s strani ICH - "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (smernice "ICH guidelines Q2 (R1)"), ki so navedene v dokumentu "ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)". Smernice so določene na mednarodni konferenci o ustanovitvi tehničnih zahtev za registracijo farmacevtskih zahtev za človeško uporabo.

2.6.1 Specifičnost

Specifičnost (angl. "*specificity*") je sposobnost nedvoumnega ocenjevanja analita v prisotnosti drugih prisotnih komponent (nečistote, razpadni produkti, matriks, itd.).

Specifičnost ima naslednje značilnosti:

- identifikacija - za zagotovitev istovetnosti analita
- test čistosti - za zagotovitev, da vsi opravljeni analitski postopki omogočajo natančno navedbo vsebnosti nečistot analita, torej sorodnih substanc, težkih kovin, vsebnost rezidualnih topil, itd.
- vsebnost - za zagotovitev točnega rezultata, ki omogoča realno vsebnost analita v vzorcu.

Primerni identifikacijski testi morajo biti sposobni razlikovati med spojinami zelo sorodnih struktur, katere so velikokrat prisotne. Za kromatografske postopke se mora uporabiti reprezentivne kromatograme za dokazovanje specifičnosti in individualne komponente morajo biti ustrezno označene. Pri kritičnih separacijah lahko specifičnost kaže ločljivost dveh komponent, ki eluirata najbližje druga drugi.

- V primeru kadar:

- Nečistote so na voljo:

Pri testu nečistot, se lahko pravilna identifikacija potrdi z dodanjanjem standardov zdravilnim učinkovinom ali zdravilom s primernimi stopnjami nečistot in prikazom ločbe teh nečistot posamezno in/ali od drugih komponent v vzorcu.

- Nečistote niso na voljo:

Kadar standardi nečistot ali degradacijskih produktov niso na voljo, se lahko specifičnost dokaže s primerjavo rezultatov testov vzorcev, ki vsebujejo nečistote ali razgradne produkte, z drugimi dobro karakteriziranimi postopki, npr. farmakopejska metoda ali drug validirani analitski postopek (neodvisni postopek). To bi moralo vključevati tudi vzorce shranjene pod ustreznimi stresnimi pogoji (svetloba, toplota, vlaga, kislinska/bazna hidroliza in oksidacija). Pri testu nečistot moramo primerjati profile nečistot, saj je preverjanje čistosti vrhov lahko koristno za dokaz, da kromatografski vrh analita ni mogoče pripisati več kot eni komponenti^[21].

2.6.2 Območje

Območje analitskega postopka (angl. "*range*") je interval med zgornjo in spodnjo koncentracijo (količino) analita v vzorcu (vključno s temi koncentracijami), za katerega je bilo dokazano, da ima analitski postopek ustrezen nivo natančnosti, točnosti in linearnosti.

Območje običajno izhaja iz študij linearnosti in je odvisno od predvidene uporabe postopka.

Pri določanju nečistote, se moramo držati območja od stopnje navajanja do 120 % specifikacije. V primeru nečistot, ki so nevarne ali povzročajo toksične in nepričakovane farmakološke učinke, mora biti meja zaznavnosti/določljivosti sorazmerna z ravni, na kateri morajo biti nečistote nadzorovane^[21].

2.6.3 Linearnost odziva

Linearnost analitskega postopka (angl. "*linearity*") je sposobnost postopka (v določenem območju) pridobiti rezultate testa, ki so neposredno sorazmerni s koncentracijo (količino) analita v vzorcu.

Linearnost je potrebno ovrednotiti v celotnem območju analitskega postopka. Lahko se dokaže neposredno na zdravilni učinkovini (z redčenjem standardne osnovne raztopine) in/ali z ločenim tehtanjem sintetičnih zmesi komponent zdravil z uporabo predlaganega postopka. Linearnost ovrednotimo z grafičnim pregledom signalov, kot funkcijo koncentracije ali vsebnosti analita.

Če obstaja linearna povezava, je treba rezultate testov ovrednotiti z ustreznimi statističnimi metodami, na primer z izračunom regresijske premice z metodo najmanjših kvadratov. Podatki iz same regresijske premice so lahko koristni za zagotavljanje matematičnih ocen stopnje linearosti. Pridobiti je potrebno rezultate o korelacijskem koeficientu, odseku na y osi in naklonu regresijske premice. Pri določanju linearosti je priporočenih vsaj 5 koncentracij, vsi drugi pristopi morajo biti utemeljeni^[21].

2.6.4 Točnost

Točnost analiznega postopka (angl. "*accuracy*") izraža ujemanje med vrednostjo, ki je sprejeta bodisi kot konvencionalna resnična vrednost, bodisi kot referenčna vrednost, in ugotovljeno vrednostjo. Točnost je treba določiti v določenem območju analitskega postopka in jo oceniti na vzorcih (učinkovina/zdravilo), katerim dodamo znano količino nečistot. V primerih, ko je nemogoče pridobiti vzorce nekaterih nečistot in/ali razgradnih produktov, je lahko sprejemljivo primerjati rezultate pridobljene z neodvisnim postopkom. Jasno mora biti, kako se določijo posamezne ali skupne nečistote, npr. masa/masa ali odstotek ploščine vrha, v vseh primerih glede na glavni analit.

Točnost je potrebno oceniti na podlagi najmanj 9 določitev na najmanj 3 koncentracijah, ki pokrivajo specifično območje (3 koncentracije, 3 ponovitve vsake). Točnost se podaja kot izkoristek (%) preko vsebnosti znane količine dodanega analita v vzorcu ali kot razlika med srednjo vrednostjo in sprejeto točno vrednostjo skupaj z intervali zaupanja^[21].

2.6.5 Natančnost

Validacija testov za kvantitativno določanje nečistot vključuje tudi preiskavo natančnosti. Natančnost analitskega postopka (angl. "*precision*") izraža ujemanje med serijo meritev (stopnja razpršenosti), dobljenih z večkratno meritvijo istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Natančnost preverjamo na različne načine. V okviru validacije preverimo natančnost s ponovljivostjo metode, v določenih primerih je potrebno preveriti tudi vmesno natančnost in pri standardizaciji analitskega postopka medlaboratorijsko ponovljivost (npr. za vključitev postopkov v farmakopeje). Za vse tipe preverjanja natančnosti je potrebno izračunati standardni odmik in zadostiti kriteriju, ki je naveden pri metodi^[21].

2.6.5.1 Ponovljivost metode

Ponovljivost (angl. "*method repeatability*") določimo:

- najmanj 9 določitev, ki zajemajo določeno območje postopka (3 koncentracije / 3 ponovitve vsakega);
- ali
- najmanj 6 določitev pri 100 % delovne koncentracije (koncentracije raztopin vzorcev)^[21].

2.6.6 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti posameznega analitskega postopka (angl. "*detection limit*") je najmanjša količina analita v vzorcu, ki se lahko zazna.

Za določitev meje zaznavnosti je možnih več pristopov. Lahko jo določimo na podlagi vizualnega vrednotenja, na podlagi standardnega odmika in naklona umeritvene krivulje ali v večini primerov na podlagi razmerja signal/šum.

Določitev razmerja signal/šum se opravi s primerjanjem izmerjenih signalov vzorcev z znanimi niskimi koncentracijami analita s slepimi vzorci in določitvijo najmanjše koncentracije pri kateri je mogoče analit zanesljivo zaznati. Razmerje signal/šum med 3:1 ali 2:1 je splošno sprejemljivo za določitev meje zaznavnosti^[21].

2.6.7 Meja določljivosti

Meja določljivosti posameznega analitskega postopka (angl. "*quantitation limit*") je najmanjša količina analita v vzorcu, ki se lahko določi z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Je parameter kvantitativnih testov za nizke ravni spojin v vzorcih in je pomemben pri metodah za določanje nečistot in/ali produktov razkroja.

Za določitev meje določljivosti lahko uporabimo več pristopov. Mejo določljivosti v večini primerov določimo preko razmerja signal/šum. Pri primerjavi vzorcev z znanimi niskimi koncentracijami analita s slepimi vzorci določimo pri kateri je mogoče analit zanesljivo opredeliti. Tipično razmerje signal/šum za določitev meje navajanja je 10:1.

Mejo je potrebno nato validirati z analizo zadostnega števila vzorcev, za katere je znano, da so blizu mejni vrednosti ali pripravljene na mejni vrednosti^[21].

2.6.8 Robustnost

Robustnost analitskega postopka (angl. "*robustness*") je merilo zmožnosti postopka, da majhne spremembe parametrov metode nanj ne vplivajo in da zagotavlja zanesljivost med običajno uporabo.

Če so meritve dovzetne za spremembe analitskih pogojev, jih je potrebno ustrezno nadzorovati ali v postopek vključiti opombo o previdnosti. Posledica ocenjevanja robustnosti je določite vrste parametrov ustreznosti sistema (npr. ločljivost), da se zagotovi, da se validacija analitskega postopka ohranja skozi uporabo postopka.

Primeri tipičnih sprememb v postopkih tekočinske kromatografije so vplivi:

- sprememb v pH vrednosti mobilne faze,
- spremembe v sestavi mobilne faze,
- različne kolone (različne serije in/ali proizvajalci),
- temperatura,
- pretok^[21].

3 Metode dela in materiali

3.1 Kemikalije in materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in standarde s kvaliteto, ki ustreza smernicam Ph.Eur.

- **Reagenti**

- Acetonitril, Fisher Scientific UK, HPLC Gradient Grade (v nadaljevanju AcN);
- Metanol, J.T.Baker, (Ultra) Gradient HPLC Grade (v nadaljevanju MeOH);
- Tetrahidrofur, Sigma-Aldrich, for HPLC (v nadaljevanju THF);
- Ultračista voda (Elga sistem Flex2) (v nadaljevanju H₂O).

- **Standardi**

- Prednisolone for system suitability, European Pharmacopoeia Reference Standard, Batch: 2.0, Id: 00SGL5;
- Prednisolone for peak identification, European Pharmacopoeia Reference Standard, Batch: 1.1, Id: 00EJK6;
- Hydrocortisone, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ (HPLC), Lot: SZBL4101V;
- Cortisone, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ (HPLC), Lot: BCBR1049V;
- Prednisone, Fluka, Lot: P500042;
- Prednisolone acetat, European Pharmacopoeia Reference Standard, Batch: 4.1, Id:001cKc.

- **Vzorec**

- Učinkovina prednisolon (proizvajalec farmacevtske učinkovine: Kitajska).

3.2 Instrumenti

- **Tehtnice**

- Analitska tehtnica XPE-205/M, METTLER TOLEDO, S/N: B422645289, min. natehta ≥ 19 mg, max. zatehta: 220 g;
- Analitska tehtnica AX26DR/A, METTLER TOLEDO, S/N: 1120501355, min. natehta = 5 mg.

- **Ultrazvočna kopel**

- WISE CLEAN, WUC-D10H, S/N: 00833101A001.

- **Sistem za pridobivanje ultračiste vode**

- PureLab Flex 2, S/N: FLB00003169.

3.2.1 HPLC - sistemi

Teste smo izvajali na HPLC - sistemih, ki so navedeni v tabeli 3-1.

Tabela 3-1: Konfiguracija HPLC - sistemov.

Ime	HPLC 1100 (Agilent)	HPLC 1200-1 (Agilent)	HPLC 1200-2 (Agilent)	Nexera XR1 (Shimadzu)	Nexera XR2 (Shimadzu)
Model	1100	1200	1200	Nexera XR1	Nexera XR2
Detektor	VWD G1314F	DAD G1315D	DAD G1315B	PDA SPD-M20A	PDA SPD-M20A
Razplinjevalec	GA1322A	G1322A	G1322A	DGU-20A	DGU-20A
Kvarterna črpalka	G1311A	G1311A	G1311A	LC-20AD	LC-20AD
Binarna črpalka	/	/	/	LC-20AD	LC-20AD
Grelec kolone	G1316A	61316A	61316A	CTO-20AC	CTO-20AC
Avtomatski vzorčevalnik	G1329A	G1367B	G1313A	SIL-20AC	SIL-20AC
Termostat avt. vzorčevalnika	G1330B	G1330B	/	SIL-20AC	SIL-20AC
Komunikacijski modul	/	/	/	CBM-20A	/
Eksperimentalno določen volumen zakasnitve gradienta (pogl. 2.5.1)	1,2 mL	1,0 mL	/	1,2 mL (»Low pressure gradient«) 0,8 mL (»Binary gradient«)	1,2 mL (»Low pressure gradient«) 0,8 mL (»Binary gradient«)

3.2.2 Kromatografske kolone

Vse kolone, ki smo jih tekom optimizacije metode testirali so zbrane v tabeli 3-2.

Tabela 3-2: Uporabljene kromatografske kolone.

Št.	Ime kolone/Stacionarna faza	Dimenzija (mm x mm)	Velikost delcev (µm)	Proizvajalec	S/N	B/N
1	Venusil AQ C18	150 × 4,6	3	Agela Technologies	Q9310515BXQ0052	
2	Gemini C18	150 × 4,6	3	Phenomenex	703687-5	5526-041
3	Kinetex Biphenyl	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	758902-6	5715-037
4	Kinetex C18	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	762233-8	5569-195
5	Kinetex Phenyl Hexyl	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	591269-2	5602-103
6	Kinetex XB-C18	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	587293-23	5603-122
7	Kinetex F5	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	756977-10	5723-010
8	Synergi Hydro RP	150 × 4,6	4	Phenomenex	666221-10	5375-061
9	Luna C18(2) 3µ	150 × 4,6	3	Phenomenex	664592-1	5292-50
10	Gemini NX C18	150 × 4,6	5	Phenomenex	623311-8	5561-64
11	Luna Omega Polar C18	150 × 4,6	3	Phenomenex	H17-041694	5761-0010
12	Kinetex Polar C18	150 × 4,6	2,6	Phenomenex	H17-055036	5763-0012
13	Luna C18(2)	250 × 4,6	5	Phenomenex	H16-333283	5291-0143
14	Luna C18	250 × 4,6	5	Phenomenex	H17-174358	5235-0093

4 Eksperimentalni del

Laboratorijsko delo sem opravljala v Laboratoriju za separacijske procese in produktno tehniko, v Skupini za separacijske analize (SSA) na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru.

Laboratorij je bil v času opravljanja laboratorijskega dela v postopku pridobitve GMP certifikata (GMP - dobra proizvodna praksa), zato je vso delo potekalo v skladu s smernicami dobre laboratorijske prakse.

GMP je tisti del zagotavljanja kakovosti, ki zagotavlja, da se izdelki dosledno proizvajajo in nadzorujejo v skladu s standardi kakovosti, ki ustrezajo njihovi predvideni uporabi in kot to zahteva dovoljenje za promet. GMP je namenjena predvsem zmanjšanju tveganj, povezanih s katero koli farmacevtsko proizvodnjo.

V GMP okolju je potrebno zagotoviti:

- vsi proizvodni postopki so jasno opredeljeni in sistematično pregledani glede na izkušnje, in dokazano mora biti, da so sposobni dosledno proizvajati farmacevtske izdelke, ki imajo zahtevano kakovost, ki ustreza njihovim specifikacijam;
- opravljajo se kvalifikacije in validacije;
- zagotovljena so vsa potrebna sredstva, vključno z:
 - ustrezno kvalificiranim in usposobljenim osebjem;
 - primernimi prostori;
 - ustrezno opremo in storitvami;
 - ustreznimi materiali, zabojniki in etiketami;
 - potrjenimi postopki in navodili;
 - ustreznim skladiščenjem in transportom;
 - ustreznim osebjem, laboratoriji in opremo za medprocesne kontrole;
- navodila in postopki so napisani v jasnem in nedvoumnem jeziku;
- izvajalci so usposobljeni za pravilno izvajanje postopkov;
- med proizvodnjo se izdelajo zapisi (ročno in/ali preko instrumentov), ki kažejo, da so bili dejansko narejeni vsi koraki, ki jih zahtevajo opredeljeni postopki in navodila ter da sta količina in kakovost izdelka po pričakovanjih; vsa pomembna odstopanja so v celoti zabeležena in raziskana;
- v razumljivi in dostopni obliki se hranijo evidence, ki zajemajo proizvodnjo in distribucijo, kar omogoča sledljivost celotne zgodovine serije;
- pravilno skladiščenje in distribucija izdelkov, ki čim bolj zmanjša tveganje za njihovo kakovost;
- na voljo je sistem odpoklica celotne serije izdelkov iz prodaje ali dobave;
- preučujejo se pritožbe glede trženih proizvodov, vzroki za kakovostne napake in sprejeti so ustrezni ukrepi v zvezi s pomanjkljivimi izdelki, da se prepreči ponovitev^[22].

4.1 Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc v učinkovini prednisolon

V tem podglavju je predstavljena trenutno veljavna Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc v učinkovini prednisolon.

4.1.1 Priprava raztopin

Topilo: voda:acetonitril = 60:40 (V/V)

Vzorec: aktivna farmacevtska učinkovina prednisolon

- Raztopina vzorca (a) (RV):

V 20,0 mL merilni bučki raztopimo 10,0 mg vzorca v topilu in dopolnimo s topilom do oznake volumna.

- Raztopina vzorca (b):

V 20,0 mL merilni bučki raztopimo 25,0 mg vzorca v topilu in dopolnimo s topilom do oznake volumna. Odpipetiramo 1,0 mL raztopine v 10,0 mL merilno bučko in dopolnimo s topilom do oznake volumna.

- Raztopina standarda (a) (RSA):

V 10,0 mL merilni bučki raztopimo 5,0 mg standarda prednisolon za ustreznost sistema CRS (vsebuje nečistote A, B in C) v topilu in dopolnimo s topilom do oznake volumna.

- Raztopina standarda (b) (RSB):

V 10,0 mL merilni bučki raztopimo 5,0 mg standarda prednisolon za identifikacijo vrhov CRS (vsebuje nečistoti F in J) v topilu in dopolnimo s topilom do oznake volumna.

- Raztopina standarda (c) (RSC):

V 100,0 mL merilni bučki odpipetiramo 1,0 mL raztopine vzorca (a) in dopolnimo s topilom do oznake volumna. Odpipetiramo 1,0 mL raztopine v 10,0 mL merilno bučko ter dopolnimo s topilom do oznake volumna.

- Raztopina standarda (d):

V 10,0 mL merilni bučki raztopimo 25,0 mg standarda prednisolona CRS v topilu in dopolnimo s topilom do oznake volumna. Odpipetiramo 1,0 mL raztopine in dopolnimo s topilom do oznake volumna^[9].

4.1.2 Kromatografski pogoji

- Kolona:

Dimenzije: 150 mm × 4,6 mm

Stacionarna faza: »end-capped« oktadecilsilil silica gel, 3 µm delci

Temperatura kolone: 40 °C

- Mobilna faza:

- mobilna faza A: voda

- mobilna faza B: acetonitril:metanol = 50:50 (V/V)

- Pretok: 1 mL/min

- Detekcija: UV spektrofotometrija pri 254 nm

- Injiciranje: 10 µL raztopine vzorca (a) in raztopine standarda (a), (b) in (c)

- Gradienta elucija:

Tabela 4-1: Gradienta elucija metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini

<i>t</i> (min)	0	14	20	21	25	30
% A	60	60	20	20	60	60
% B	40	40	80	80	40	40

Metodo izvajamo zaščiteno pred svetlobo. V ta namen uporabljamo temno steklovino^[9].

4.1.3 Identifikacija nečistot

- Uporabimo kromatogram, ki ga prejmemo skupaj s standardom za ustreznost sistema CRS in kromatogram, ki ga posnamemo z raztopino standarda (a) za identifikacijo vrhov nečistote A, B in C;

- Uporabimo kromatogram, ki ga prejmemo skupaj s standardom za identifikacijo vrhov CRS in kromatogram, ki ga posnamemo z raztopino standarda (b) za identifikacijo vrhov nečistot F in J.

Relativni retenzijski čas (Rt_R) glede na prednisolon (t_R prednisolona – približno 14 min)^[9]:

- nečistota F = približno 0,7;
- nečistota B = približno 0,9;
- nečistota A = približno 1,05;
- nečistota J = približno 1,5;
- nečistota C = približno 1,7.

4.1.4 Ustreznost sistema in zahteve (specifikacije)

- Ustreznost sistema: raztopina standarda (a):

- Razmerje višin vrh / dolina (Hp/Hp): minimalno 3 (nečistota A/prednisolon).

- Zahteve za vsebnosti nečistot:

- nečistota A: ne več kot 10-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (1,0 %),

- nečistota F: ne več kot 5-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (0,5 %),

- nečistota B, C, J: za vsako nečistoto, ne več kot 3-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (0,3 %),

- neznane nečistote: za vsako nečistoto, ne več kot površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (0,1 %),

- skupno: za vsako nečistoto, ne več kot 15-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (1,5 %),

- meja navajanja: 0,5-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (c) (0,05 %)^[9].

Meja določljivosti metode je torej na 0,05 % delovne koncentracije (0,5 mg prednisolona/mL) prednisolona v raztopini vzorca, torej na 0,00025 mg prednisolona/mL.

4.2 Neveljavna (predhodna) Ph.Eur. HPLC - metoda za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini

Pred trenutno veljavno metodo za določanje vsebnosti sorodnih substanc prednisolona v Evropski farmakopeji 7.2 je bila veljavna naslednja metoda.

4.2.1 Priprava raztopin

- Raztopina vzorca (RV):

V 10,0 mL merilni bučki raztopimo 25,0 mg vzorca v 2,0 mL tetrahidrofurana in dopolnimo z vodo do oznake volumna.

- Raztopina standarda (a) (RS(a)):

V 100,0 mL merilni bučki raztopimo 2,0 mg standarda prednisolona CRS in 2,0 mg standarda hidrokortizona CRS (nečistota A) v mobilni fazi in dopolnimo do 100,0 mL z mobilno fazo.

- Raztopina standarda (b):

Odpipetiramo 1,0 mL raztopine vzorca in dopolnimo do 100,0 mL z mobilno fazo^[11].

4.2.2 Kromatografski pogoji

- Kolona:

Dimenzije: 250 mm × 4,6 mm

Stacionarna faza: »base-deactivated end-capped« oktadecilsilil silica gel, 5 µm delci

Temperatura kolone: 45 °C

- Mobilna faza:

V 1000 mL merilni bučki, zmešamo 220 mL tetrahidrofurana z 700 mL vode in pustimo, da se uravnoteži; dopolnimo do 1000 mL z vodo in ponovno premešamo.

- Pretok: 1 mL/min

- Detekcija: UV spektrofotometrija pri 254 nm

- Uravnoteženje: z mobilno fazo okoli 30 min

- Injiciranje: 20 µL; injiciramo topilo kot slepo raztopino

- Čas kromatografiranja: 4,5-kratni retenzijski čas prednisolona

- Retenzijski čas: prednisolon – približno 14 min; nečistota A – približno 15,5 min^[11].

4.2.3 Ustreznost sistema in zahteve (specifikacije)

- Ustreznost sistema: raztopina standarda (a):

- ločljivost: minimalno 2,2 med vrhovoma prednisolona in nečistote A; če je potrebno prilagodimo koncentracijo tetrahidrofurana v mobilni fazi.

- Zahteve:

- vse nečistote: za vsako nečistoto, ne več kot površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (b) (1 %) in ne več kot en vrh s površino večjo od 0,5-kratne površine glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (b) (0,5 %),

- skupno: ne več kot dvakratna površina glavnega vrha pridobljenega na kromatogramu raztopine standarda (b) (2 %),

- meja navajanja: 0,05-kratna površina glavnega vrha na kromatogramu pridobljenem z raztopino standarda (b) (0,05 %) ^[11].

Meja določljivosti metode je torej na 0,05 % delovne koncentracije (2,5 mg prednisolona/mL) prednisolona v raztopini vzorca, torej na 0,00125 mg prednisolona/mL.

4.3 Primerjava trenutno veljavne Ph.Eur. metode in neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode

Za lažjo predstavbo je v spodnji tabeli 4-2 primerjava veljavne in neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode za določanje sorodnih substanc prednisolona, ter prednosti in slabosti ene in druge.

Tabela 4-2: Primerjava veljavne in neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode.

Parameter	Veljavna Ph.Eur. metoda	Neveljavna Ph.Eur. metoda
Kolona	150 mm × 4,6 mm, stacionarna faza: »end -capped« oktadecilsilil silica gel, 3 µm (metoda razvita na Venusil AQ C18 3µm)	250 mm × 4,6 mm, stacionarna faza: »base -deactivated end- capped« oktadecilsilil silica gel, 5 µm (metoda razvita na Luna C18 5 µm)
T kolone	40 °C	45 °C
Mobilka	A: H ₂ O B: AcN:MeOH = 50:50	22 % THF
Elucija	Gradientna	Izokratska
Pretok	1 mL / min	1 mL / min
Injiciranje	10 µL	20 µL
Čas krom.	30 min	4,5 × t _R prednisolona (prbl. 60 min)
Topilo	H ₂ O: AcN = 60:40	Mobilna faza
Priprava RV	10,0 mg vzorca / 20,0 mL	25,0 mg vzorca + 2 mL THF / 10,0 mL (dopolniš z vodo)
Delovna koncen..	0,5 mg prednisolona/mL	2,5 mg prednisolona/mL
Raztopina standarda	<u>RSA:</u> 5 mg prednisolona za ustreznost sistema CRS / 10,0 mL <u>RSB:</u> 5 mg prednisolona za identifikacijo vrhov CRS / 10,0 mL	<u>RS (a):</u> 2 mg prednisolona CRS+ 2 mg hidrokortizona CRS (nečistota A) / 100 mL
Identifikacija nečistot	Rt _R glede na t _R predn. (prib. 14 min): F = pribl. 0,7; B = pribl. 0,9; A = pribl. 1,05; J = pribl. 1,5; C = pribl. 1,7. A, B in C identificiramo z RSA; F in J identificiramo z RSB.	t _R predn.: pribl. 14 min; nečistota A: pribl. 15,5 min.
Ustr. sistema	Razmerje višin vrh / dolina: min. 3	ločljivost: minimalno 2,2

Parameter	Veljavna Ph.Eur. metoda	Neveljavna Ph.Eur. metoda
Specifikacije	- A: 1,0 %; F: 0,5 %; B, C, J: 0,3 % - neznane nečistote: 0,1 % - skupno: 1,5 % - meja navajanja: 0,05 %	- vse nečistote: 0,5 % - skupno: 2 % - meja navajanja: 0,05 %
Prednosti	- krajši čas kromatografiranja - naveden postopek identifikacije vseh znanih nečistot	- izokratska elucija - ločba vrha prednisolona in nečistote A na bazni liniji
Slabosti	- gradientna elucija - ločba vrha prednisolona in nečistote A ni na bazni liniji (kriterij Hp/Hv > 3 je včasih težko dosegljiv)	- daljši čas kromatografiranja - mobilna faza (THF) - ni podanega postopka za identifikacijo vseh znanih nečistot

4.4 Optimizacija kromatografskih pogojev

V okviru optimizacije metode smo spreminjali različne parametre metode. Metodo smo optimizirali znotraj dovoljenih odstopanj in tudi izven dovoljenih odstopanj predpisanih kromatografskih pogojev v Ph. Eur. monografiji. Parametri, ki smo jih spreminjali so navedeni v tabeli 4-3.

Tabela 4-3: Parametri, ki smo jih spreminjali pri optimizaciji/razvoju metode.

Vpliv na ločbo prednisolon / nečistota A	
Znotraj dovoljenih odstopanj, optimizacija/razvoj metode	Kolona
	Dimenzija kolone
	Sestava mobilne faze
	Gradient
Izven dovoljenih odstopanj, nova metoda	Sestava mobilne faze
	Stacionarna faza
	Velikost delcev

Glede na dovoljena odstopanja od Ph.Eur. (poglavje 2.3.1) lahko v našem primeru Ph.Eur. metode sorodne substance prednisolona v učinkovini v okviru dovoljenih odstopanj spreminjamo oz. prilagajamo:

- sestavo mobilne faze in gradient, v kolikor glavni vrh eluira med 12,2 min – 15,8 min (Rt prednisolona po Ph.Eur. prbl. 14 min),
- dolžino kolone od 45 mm – 255 mm,
- notranji premer kolone od 3,44 mm – 5,75 mm,
- v primeru spremembe dimenzij kolone lahko korigiramo pretok,
- temperaturo kolone od 38 °C – 42 °C,
- znižamo lahko volumen injiciranja v kolikor dosežemo natančnost in mejo detekcije.

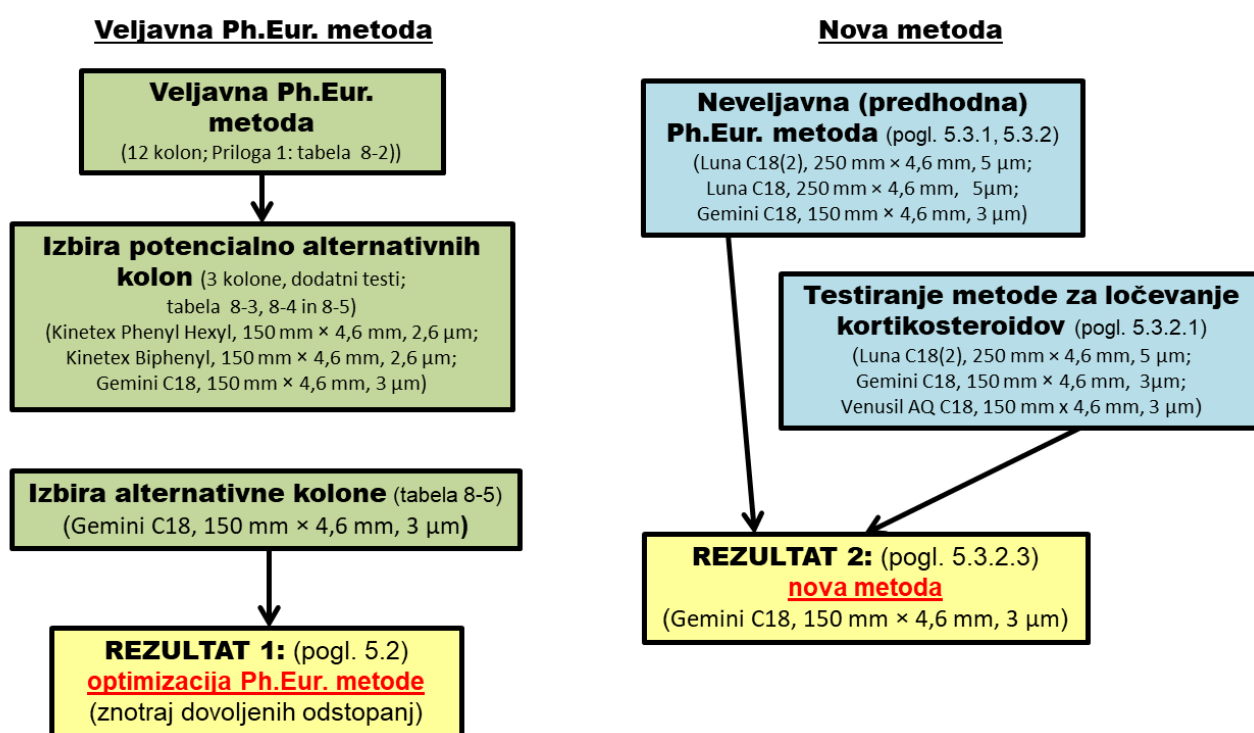
Kromatografski pogoji končnih metod so navedeni pri rezultatih.

5 Rezultati in diskusija

Vsa začetna preliminarna testiranja smo naredili na sistemih HPLC 1100 in HPLC 1200. Za izhodišče smo uporabili Ph.Eur. metodo na koloni Venusil AQ C18, 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm na kateri je bila veljavna Ph.Eur. metoda razvita. Rezultati dobljeni na tej koloni so nam predstavljali izhodišče. Nato smo stestirali Ph.Eur. metodo na različnih kolonah in poskusili s spreminjanjem različnih parametrov (razmerje mobilnih faz, pretok, temperatura) v okviru Ph.Eur. dovoljenih odstopanj in izven izboljšati rezultat.

V začetnih testiranjih smo parameter za oceno ustreznosti sistema, razmerje Hp/Hv, izračunavali ročno (uporaba programske opreme Agilent Chemstation). V nadaljevanju smo uporabljali programsko opremo Shimadzu LabSolutions CS, ki nam je omogočal izračun Hp/Hv.

Slika 5-1 prikazuje pot do optimizirane metode znotraj dovoljenih odstopanj in pot do nove metode.



Slika 5-1: Diagram, ki prikazuje potek do rezultata optimizirane metode in nove metode.

- V okviru optimizacije Ph.Eur. metode:

Ph.Eur. predpisani gradient smo testirali na 12 različnih kolonah (Priloga 1: tabela 8-1 in 8-2). Nato smo na določenih kolonah testirali še 2 rahli modifikaciji gradienta (Priloga 1: tabela 8-1 in 8-2).

Sledili so testi različnih gradientnih elucij na izbranih 3 potencialno ustreznih HPLC - kolonah (Priloga 1: tabela 8-3, 8-4 in 8-5).

Kot najboljša alternativa koloni Venusil AQ C18, 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm, se je izkazala kolona Gemini C18, 150 \times 4,6 mm, 3 μ m delci. Nadaljno optimizacijo metode smo zato izvajali na tej koloni (Priloga 1: tabela 8-5).

Z optimiziranimi kromatografskimi pogoji Ph.Eur. metode znotraj dovoljenih odstopanj od Ph.Eur. smo dosegli najvišjo razmerje $H_p/H_v = 10,5$. Kromatografski pogoji optimizirane metode, rezultati in kromatogrami so predstavljeni v poglavju 5.2.

- V okviru razvoja nove metode:

V izhodišču razvoja nove metode smo testirali neveljavno (predhodno) Ph.Eur. metodo na predpisanih kolonah (poglavje 5.3.1) ter nato še na koloni, ki se je v okviru optimizacije Ph.Eur. metode izkazala za najboljšo (Gemini C18, $150 \times 4,6$ mm, $3\mu\text{m}$) (poglavje 5.3.1).

Nato smo testirali prilagojene kromatografske pogoje predstavljene v članku na temo ločevanja kortikosteroidov (poglavje 5.3.2.1) na 3 kolonah. Tudi pri tej metodi smo najboljše rezultate dosegli na koloni Gemini C18, $150 \times 4,6$ mm, $3\mu\text{m}$.

Na podlagi teh rezultatov in rezultatov neveljavne Ph.Eur. metode, smo razvoj metode nadaljevali na koloni Gemini C18, $150 \times 4,6$ mm, $3\mu\text{m}$. Najboljši rezultat smo dosegli z metodo predstavljeno v poglavju 5.3.2.3, s katero dosežemo razmerje $H_p/H_v = 21,0$.

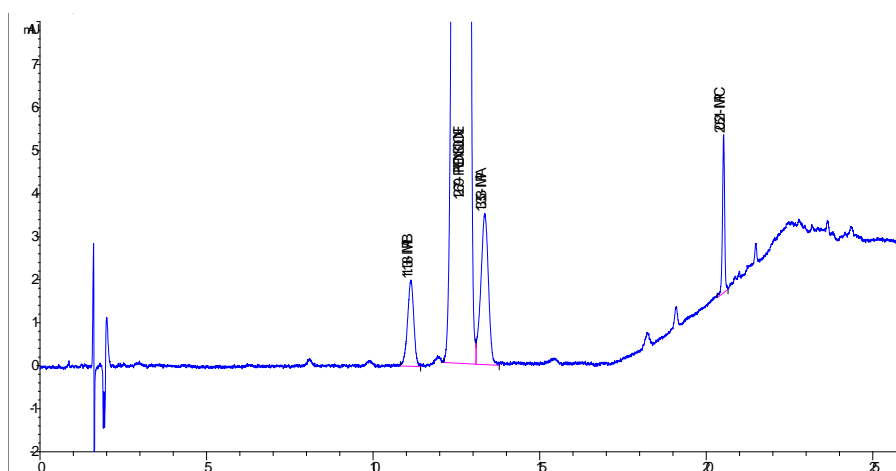
5.1 Rezultati aplikacije veljavne Ph.Eur. metode

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati aplikacije veljavne Ph.Eur. metode na koloni Venusil AQ C18, $3\mu\text{m}$, 150 mm \times $4,6$ mm na kateri je bila metoda razvita (poglavje 5.1.1). V poglavju 5.1.2 je predstavljena aplikacija Ph.Eur. metode na koloni Gemini C18, $150 \times 4,6$ mm, $3\mu\text{m}$.

Nazadnje je v poglavju 5.2.3. predstavljena končna optimizirana metoda in rezultati aplikacije metode na koloni Gemini C18, $150 \times 4,6$ mm, $3\mu\text{m}$.

5.1.1 Veljavna Ph.Eur. metoda na koloni Venusil AQ C18, 150 mm \times $4,6$ mm, $3\mu\text{m}$

Ker je bila metoda sorodne substance prednisolona razvita na tej koloni, smo za izhodišče v okviru preliminarnih testiranj na sistemu HPLC 1200-2 izmerili kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA in preverili razmerje H_p/H_v nečistote A ter prednisolona (slika 5-2).

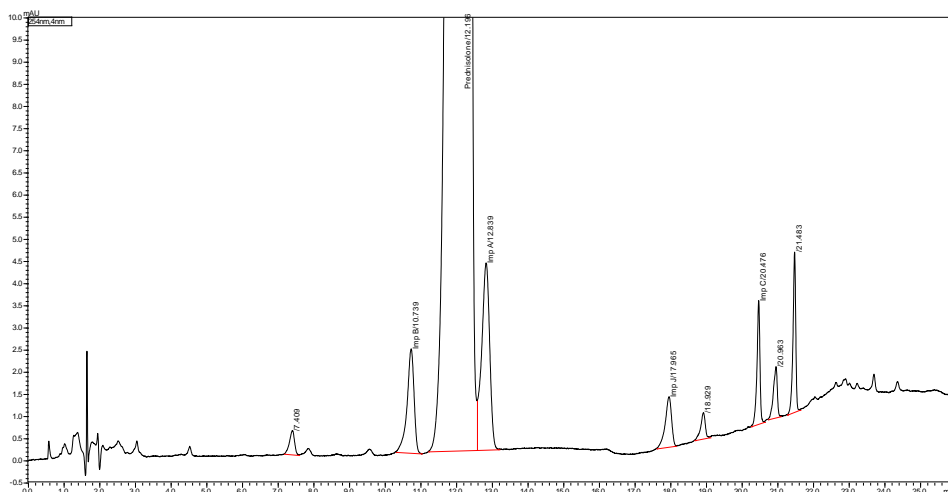


Slika 5-2: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Venusil AQ C18, 150 mm \times $4,6$ mm, $3\mu\text{m}$ na sistemh HPLC 1200-2 ($c = 0,5$ mg/mL).

Iz kromatograma smo izračunali razmerje $H_p/H_v = 6,9$. Potrebno je omeniti, da smo razmerje izračunavali ročno, z izmerjenimi dolžinami H_p in H_v iz povečanih

kromatogramov. Kromatogram primerjamo s kromatogramom na EDQM spletni strani, ki prikazuje kromatogram razvite metode (slika 1-1). Kromatogram se sklada z referenčnim kromatogramom.

Metodo smo ponovili še na instrumentu Nexera XR1, kjer lahko razmerje Hp/Hv pridobimo iz računalniškega programa, s čimer se izognemo napaki pri ročnem preračunavanju razmerja (slika 5-3).

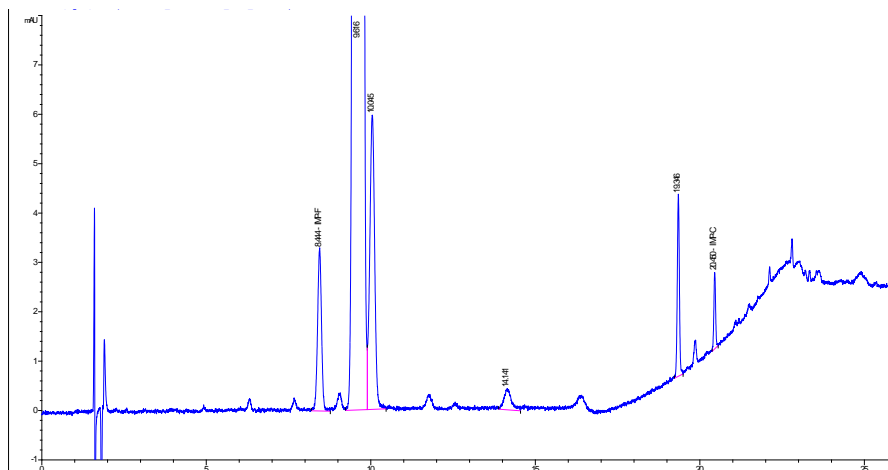


Slika 5-3: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

Rezultat Hp/Hv znaša 3,8, kar je slabše kot pri predhodnem kromatogramu. Pri tem je potrebno omeniti, da zaradi omejene količine standarda, raztopina standarda RSA ni bila sveže pripravljena pred injiciranjem temveč hranjena v temni viali. Zato lahko na kromatogramu na sliki 5-3 opazimo več nečistot kot na sliki 5-2.

5.1.2 Veljavna Ph.Eur. metoda na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m

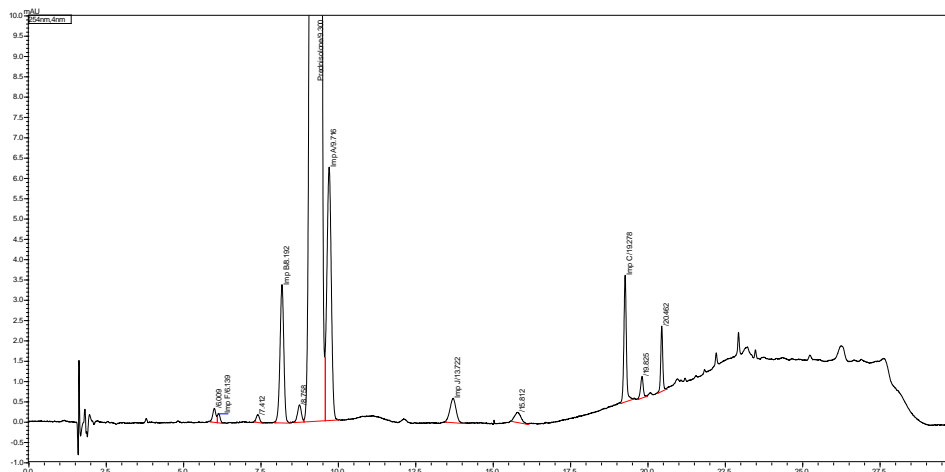
Kolona Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m se je v okviru preliminarnih testiranj izkazala za najboljšo alternativo koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m. Na tej koloni s Ph.Eur. metodo dosežemo zahtevane kriterije ustreznosti sistema. Vrhovi na kromatogramih izmerjenih na tej koloni so ožji in odzivi višji (slika 5-4).



Slika 5-4: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu HPLC 1200-2 ($c = 0,5$ mg/mL).

Na kromatogramu na sliki 5-4 smo izračunali razmerje $H_p/H_v = 4,8$ s čimer je sicer dosežena ustreznost sistema (> 3), vendar je rezultat slabši kot v primeru kolone Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na instrumentu HPLC 1200-2. Je pa na kromatogramu izmerjenem na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm viden neznan vrh, ki eluira med nečistoto B in prednisolonom (na pribl. t_R 9 minut), ki pa ga na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm ne vidimo, oziroma je zelo slabo ločen.

Metodo smo ponovili še na instrumentu Nexera XR1, kjer smo razmerje H_p/H_v pridobili iz računalniškega programa (slika 5-5).



Slika 5-5: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

Rezultat H_p/H_v znaša 4,0, kar je boljše kot na koloni Venusil AQ C18, 150 mm x 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1. Vrhovi so ostri in ustrezno ločeni pri čemer lahko ocenimo nižjo mejo zaznavnosti in posledično zaznavanje večjega števila nečistot.

5.2 Rezultati optimizacije Ph.Eur. HPLC - metode znotraj dovoljenih odstopanj

Naš cilj je izboljšati ločbo vrhov, zato smo poskusili metodo optimizirati. Pri optimizaciji Ph.Eur. metode smo spreminjali različne parametre, temperaturo kolone, pretok, gradient ter predvsem sestave mobilnih faz (tabela s predstavljenimi testi je v Prilogi 1, tabela 8-5). Na ta način smo dobili optimizirano metodo s katero smo znatno izboljšali rezultat ustreznosti sistema.

Priprava raztopin in ostali kromatografski pogoji ostanejo enaki Ph.Eur. metodi, spremenjen je gradient in sestava mobilne faze.

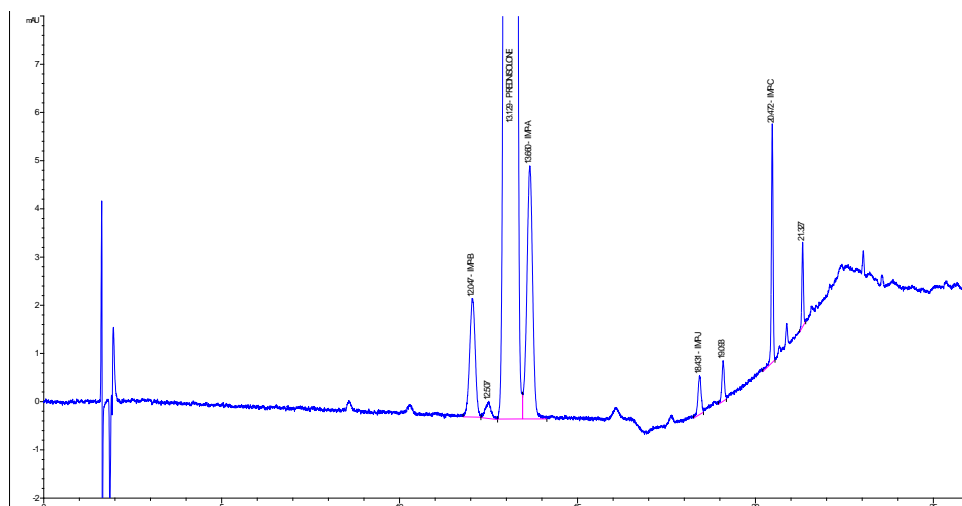
- Mobilna faza:
 - mobilna faza A: voda
 - mobilna faza B: acetonitril : metanol = 50:50 (V/V)
 - mobilna faza C: acetonitril : metanol = 80:20 (V/V)
- Gradients elucija:

Tabela 5-1: Gradientna elucija optimizirane metode za določanje sorodnih substanc prednisolona v učinkovini.

t (min)	0	10	14	20	25	26	30
% A	64	70	70	20	20	64	64
% B	36	0	0	80	80	36	36
% C	0	30	30	0	0	0	0

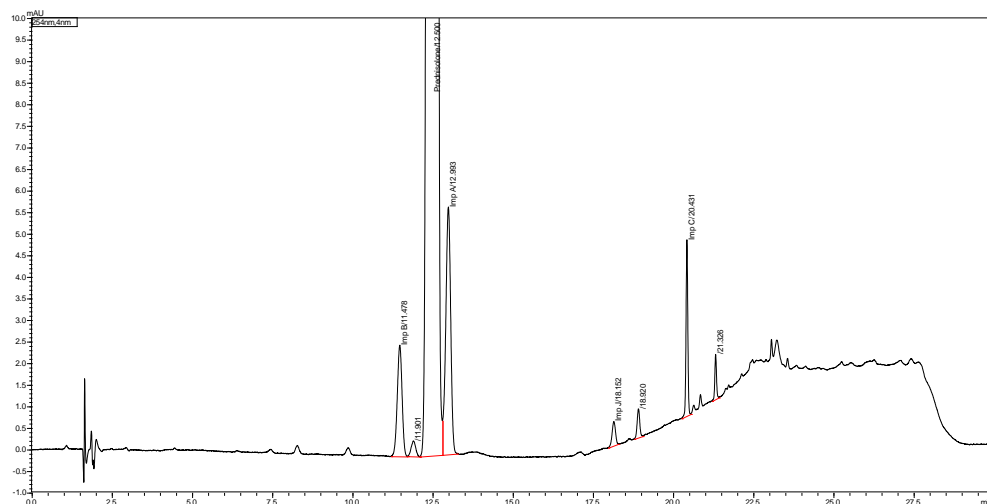
Z optimizirano metodo smo na sistemu Agilent 1200-2 dobili kromatogram z veliko boljšo ločbo vrhov nečistote A in prednisolona (Slika 5-6). Rezultat H_p/H_v znaša 10,5 (računan ročno).

S to metodo dosežemo dobro ločbo, vendar ima metoda pomanjkljivost. Pomanjkljivost metode je uporaba 3 kanalov, torej potrebujemo 3 mobilne faze in kvarterno črpalko (4 kanali). Na sliki 5-6 je kromatogram raztopine standarda RSA. Potrebno je omeniti, da je bil ta kromatogram izmerjen z metodo, kjer mobilnih faz nismo predhodno zmešali v razmerja AcN:MeOH = 1:1 (mobilna faza B), in AcN:MeOH = 80:20 (mobilna faza C). V kanalu B je bil acetonitril in v kanalu C metanol, mobilne faze pa smo mešali na črpalki, ker je bilo to precej lažje zaradi testiranja različnih gradientov in sestav mobilnih faz. Zaradi tega je tudi opazen padec bazne linije na t_R približno 17 minut.



Slika 5-6: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po optimizirani metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Agilent 1200-2 ($c = 0,5$ mg/mL).

Metodo smo ponovili na sistemu Nexera XR1. V tem primeru smo se natančno držali metode in smo mobilne faze predhodno zmešali v prava razmerja (mobilna faza B: AcN:MeOH = 1:1, mobilna faza C: AcN:MeOH = 80:20). V tem primeru smo dosegli $H_p/H_v = 7,3$ (Slika 5-7).



Slika 5-7: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen po optimizirani metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

5.3 Razvoj nove metode

V izhodišču razvoja nove metode smo izhajali iz neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode, kjer je bila glede na podan kriterij ustreznosti sistema, ločba prednisolona in nečistote A precej boljše kot v trenutno veljavni metodi. Metodo smo preizkusili na treh različnih kolonah. Rezultati so predstavljeni v poglavju 5.3.1.

Pri razvoju nove metode smo poskušali doseči boljše rezultate z različnimi mešanicami in koncentracijo tetrahidrofurana (THF) v mobilni fazi. Poskusili smo metode z različnimi mobilnimi fazami, pri katerih smo spreminjali razmerje metanola, acetonitrila, vode in tetrahidrofurana. Rezultati so prikazani v poglavju 5.3.2.

5.3.1 Rezultati neveljavne (predhodne) Ph.Eur. metode

Pred trenutno veljavno Ph.Eur. metodo je bila v farmakopeji predstavljena precej drugačna metoda. Metoda je bila razvita na daljši koloni (Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm) z večjimi delci in z drugačno sestavo mobilne faze, ki je vsebovala tetrahidrofur. Poleg tega je bila metoda izokratska, kar je pri metodah tekočinske kromatografije velika prednost, saj imamo le eno mobilno fazo (metoda je opisana v poglavju 4.2).

Pri tej metodi je priprava raztopine standarda drugačna in prav tako kriteriji za ustreznost sistema. Kriterij za ustreznost sistema v tem primeru je ločljivost (R).

V tabeli 5-2 so povzeti rezultati aplikacije neveljavne Ph.Eur. metode na 3 kolonah.

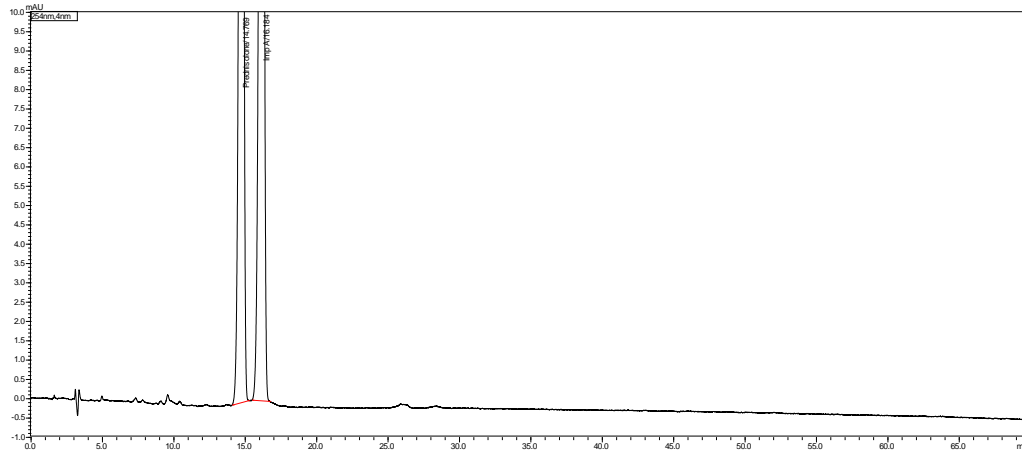
Tabela 5-2: Rezultati testov neveljavne Ph.Eur. metode na različnih kolonah (kromatogram RS (a)).

Neveljavna (predhodna) Ph.Eur metoda (krom. pogoji – poglavje 4.2)					
Kolona	Sistem	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	R (predn/neč A)	Opombe
Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μm	Nexera XR2	14,769	16,164	2,836	/
Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm	Nexera XR1	15,968	17,488	2,862	/
Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm	Nexera XR1	8,675	9,494	3,339	Najboljša ločljivost

- **Uporaba neveljavne Ph.Eur. metode na kolonah Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μm in na Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm**

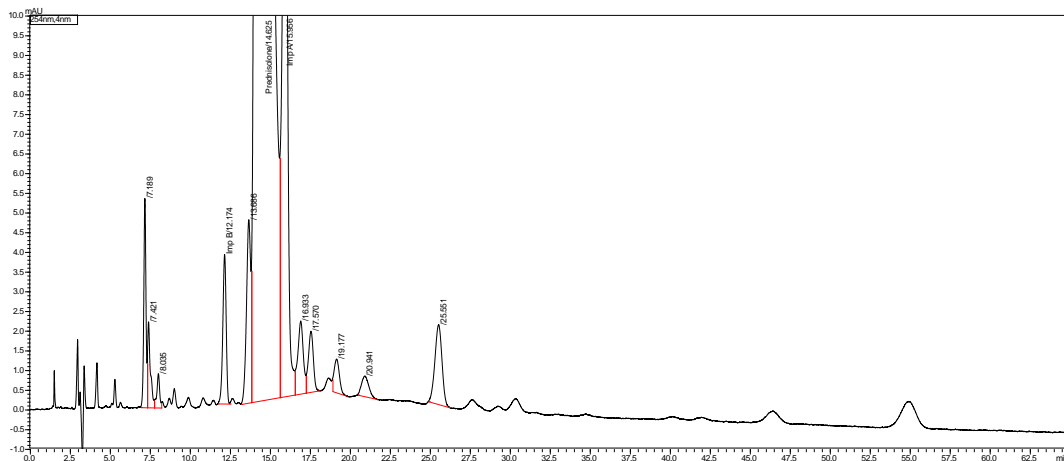
Ph.Eur. metodo smo izmerili na koloni Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μm in na Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm, na kateri je bila neveljavna Ph.Eur. metoda razvita.

Na kromatogramu raztopine standarda RS (a) (Slika 5-8) je prikazana ločba vrhov prednisolona in nečistote A, ki ustreza kriteriju za ustreznost sistema ($\geq 2,2$) in znaša $R = 2,836$.



Slika 5-8: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18(2), 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m na sistemu Nexera XR2.

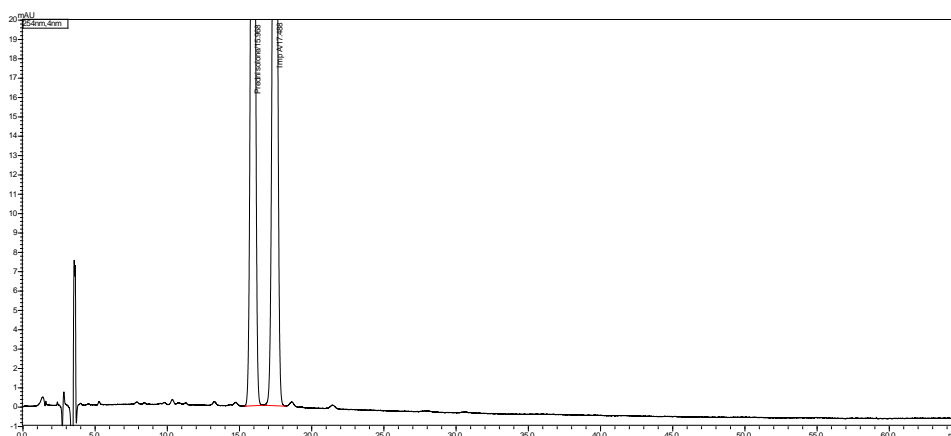
Na sliki 5-9 je prikazan kromatogram raztopine vzorca učinkovine.



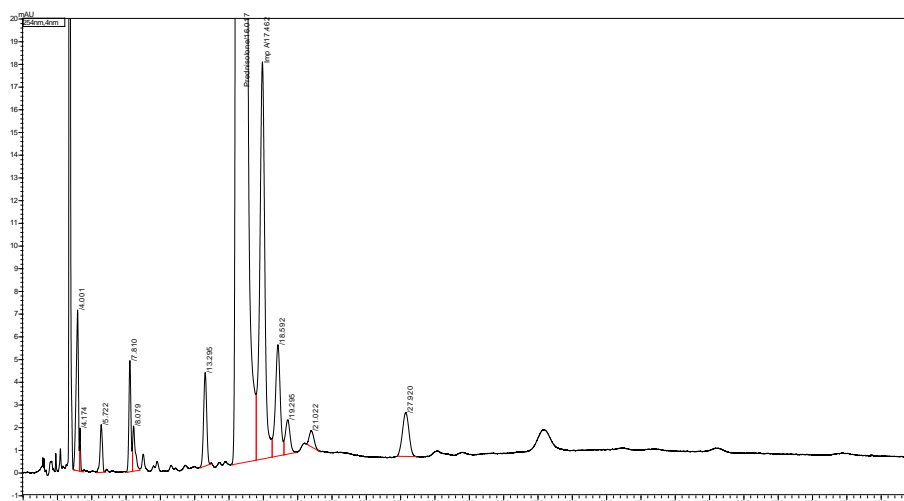
Slika 5-9: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18(2), 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m na sistemu Nexera XR2 ($c = 2,5$ mg/mL).

Nato smo na sistemu Nexera XR1 predhodno Ph.Eur. metodo izmerili še na koloni Luna C18, 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m, na kateri je bila ta metoda razvita.

Na sliki 5-10 je kromatogram raztopine standarda RS (a), na katerem je dosežena ločljivost 2,862, slika 5-11 pa prikazuje kromatogram raztopine vzorca.



Slika 5-10: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR1.



Slika 5-11: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 2,5$ mg/mL).

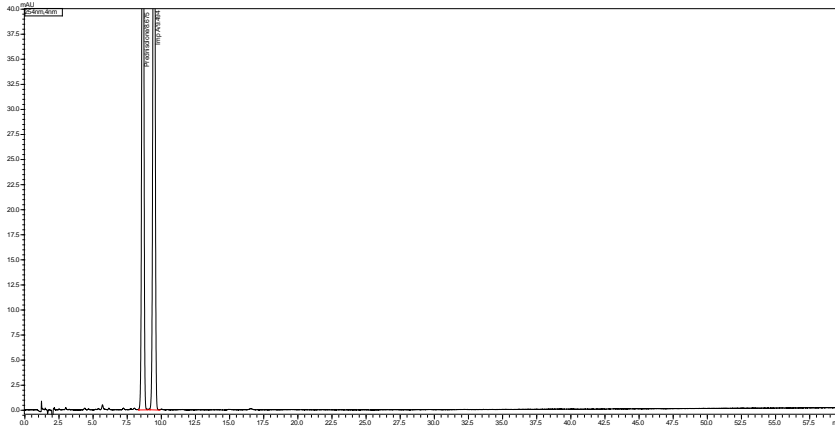
Pomembno je poudariti, da pri neveljavni Ph.Eur. metodi ni bilo podanih relativnih retenzijskih časov nečistot, da bi lahko identificirali vse nečistote na kromatogramu (podana le R_{tR} prednisolona in nečistote A).

Opazna je razlika v selektivnosti kolon C18 in C18 (2), kar je vidno na slikah 5-9 in 5-11.

- **Uporaba neveljavne Ph.Eur. metode na koloni Gemini C18, 150 × 4,6mm, 3µm**

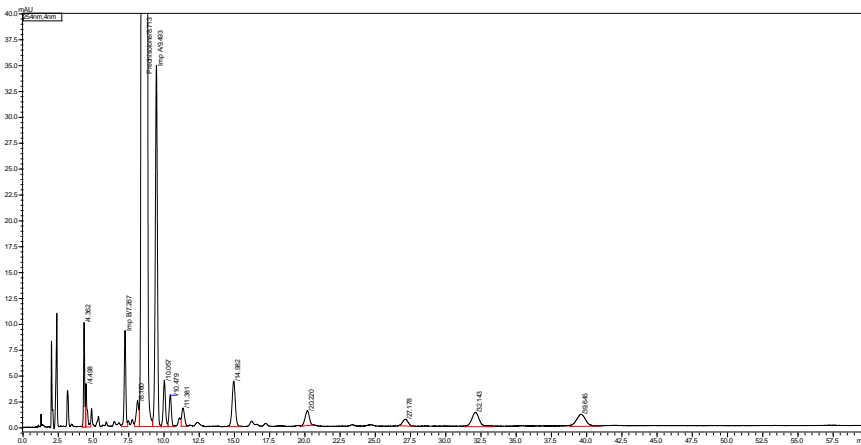
Ker se je kolona Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm v predhodnih testiranjih izkazala za najboljšo alternativo koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm, smo neveljavno Ph.Eur. metodo testirali še na tej koloni. Preverili smo, ali so rezultati na tej koloni uspešnejši, kot na predpisani daljši koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5µm.

Na sliki 5-12 je prikazan kromatogram raztopine standarda RS (a), na katerem je dosežena ločljivost 3,339, kar je precej boljše od rezultata na kolonah Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μm in Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm, kjer smo dosegli vrednosti 2,836 in 2,862.



Slika 5-12: Kromatogram raztopine standarda RS (a) pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm na sistemu Nexera XR1.

Slika 5-13 prikazuje kromatogram raztopine vzorca. Komponente so v primerjavi s kromatogramoma izmerjenima na kolonah Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μm in koloni Luna C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm (slika 5-9 in slika 5-11) boljše ločene in vidnih je več vrhov, ki jih na prejšnjih kromatogramih nismo videli. Meja zaznavnosti metode je bistveno nižja.



Slika 5-13: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen po neveljavni (predhodni) Ph.Eur. metodi na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm na sistemu Nexera XR1 ($c = 2,5$ mg/mL).

5.3.2 Rezultati razvoja nove metode

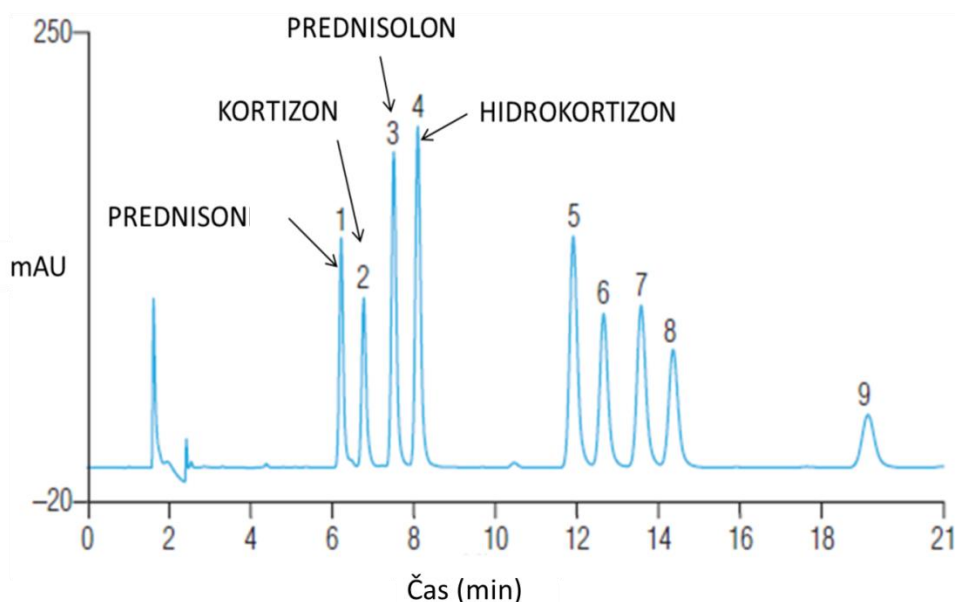
Glede na to, da je neveljavna Ph.Eur. metoda vsebovala THF smo v nadaljevanju testirali metode, kjer smo v mobilno fazo (mešanica H₂O:AcN:MeOH) dodajali nizke vrednosti THF-a. Rezultati testov so prikazani v tabeli 5-3.

Tabela 5-3: Rezultati začetnih testov razvoja nove metode na različnih kolonah (kromatogram RSA).

Šifra testa	kolona	Mobilna faza	Krom. pogoji	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Predisolon/neč A)
Test1-Gemini (XR1)	Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μ m	H ₂ O:AcN:MeOH:THF 40:30:30:0,5	<u>Inj.</u> 10 μ L <u>Pretok:</u> 1ml/min	3,022	2,796	3,804	koelucija
Test2-Gemini (XR1)		H ₂ O:AcN:MeOH:THF 60:20:20:0,5	<u>Čas krom.:</u> 45min <u>T_{kolone:}</u> 40°C	8,855	9,247	7,725	Hp/Hv = 4,0
Test3-Gemini (XR1)		H ₂ O:AcN:MeOH:THF 65:17,5:17,5:1	<u>T_{vyzorcev:}</u> 25°C	12,467	12,975	10,591	Hp/Hv = 3,2
Test1-Luna C18(2) (XR1)	Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5 μ m	H ₂ O:AcN:MeOH:THF 40:30:30:0,5	<u>Inj.</u> 10 μ L <u>Pretok:</u> 1ml/min	4,921	5,462	4,559	Hp/Hv = 3,2
Test2-Luna C18(2) (XR1)		H ₂ O:AcN:MeOH:THF 60:20:20:0,5	<u>Čas krom.:</u> 45min <u>T_{kolone:}</u> 40°C	14,896	15,511	13,052	Hp/Hv = 1,4
Test4-Luna C18(2) (XR1)		25 % THF	<u>T_{vyzorcev:}</u> 25°C <u>Inj.</u> 20 μ L <u>Pretok:</u> 1ml/min	10,369	11,416	9,144	Ločeni na bazni liniji (med njima slabo ločen neznani vrh)

5.3.2.1 1.izbrana nova metoda

Pri pregledu različnih člankov na temo separacije kortikosteroidov, smo našli članek pri katerem so dosegli zelo dobro ločitev med kortikosteroidi z zelo podobno strukturo (slika 5-14). V mobilni fazi so uporabili mešanico tetrahydrofurana, vode in metanola^[23].



Slika 5-14: Kromatogram izmerjen z metodo s katero je dosežena dobra ločitev kortikosteroidov^[23].

Ta kromatogram je izmerjen na koloni Acclaim 120 C18, 3 μ m, dimenzije 4,6 \times 150 mm z izokratsko metodo z naslednjimi parametri^[23]:

- pretok: 1,0 mL/min,
- mobilna faza: MeOH:THF:H₂O=8:19:73 (V/V/V),
- temperatura kolone: 50°C,
- volumen injiciranja: 30 μ L,
- detekcija: UV, 254 nm.

Na podlagi tega članka smo prilagodili volumen injiciranja in nato prilagodili tudi pretok ter čas kromatografiranja. Metodo smo testirali na koloni Luna C18(2), 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m in na koloni Gemini C18, 150 mm \times 4,6 mm, 3 μ m, s katero smo dosegli zelo dobre rezultate. Test smo ponovili tudi na koloni Venusil AQ C18, 150 mm \times 4,6 mm, 3 μ m, ki pa se ni izkazala za boljšo izbiro kot kolona Gemini.

Rezultati testov so prikazani v tabeli 5-9.

Tabela 5-4: Rezultati testov razvoja nove metode na različnih kolonah (kromatogram RSA).

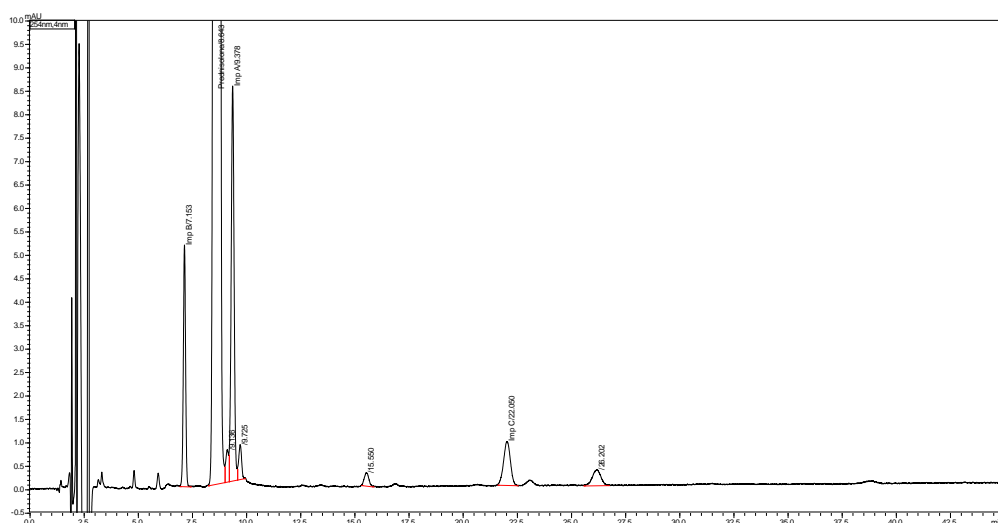
Šifra testa	kolona	Mobilna faza	Krom. pogoji	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Predisolon/neč. A)	Opombe
Test5- Luna C18(2) (XR1)	Luna C18(2), 250 mm × 4,6 mm, 5µm	MeOH:THF H ₂ O 8:19:73	<u>Inj.</u> 25 µL <u>Pretok:</u> 1,5ml/min <u>Čas krom.:</u> 30min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcevi}:</u> 25°C	7,783	8,453	6,426	Hp/Hv = 2,5	Metoda iz članka na temo separacije kortikosteroidov
Test6- Luna C18(2) (XR1)			<u>Inj.</u> 25 µL <u>Pretok:</u> 1,0mL/min <u>Čas krom.:</u> 30min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcevi}:</u> 25°C	11,402	12,391	9,455	Hp/Hv = 3,2	Znižanje pretoka iz 1,5 mL/min na 1,0 mL/min
Test7- Gemini (XR1)	Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm		<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 1,0mL/min <u>Čas krom.:</u> 30min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcevi}:</u> 25°C	6,867	7,439	5,685	Ločeno na bazni liniji (med prednisolonom in neč. A neznani vrh-slabo ločen)	Znižanje volumna injiciranja
Test8- Gemini (XR1)			<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 40min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcevi}:</u> 25°C	8,643	9,378	7,153	Ločeno na bazni liniji (neznani vrh med prednisolonom in neč. A bolje ločen)	Znižanje pretoka iz 1,0 mL/min na 0,8 mL/min; 1. izbrana nova metoda (poglavje 5.4)

Šifra testa	kolona	Mobilna faza	Krom. pogoji	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Predisolon/neč. A)	Opombe
Test8-Venusil (XR1)	Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3μm		<u>Inj.</u> 10 μL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 40min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>$T_{vzorcev}$:</u> 25°C	10,735	11,766	8,836	Ločeno na bazni liniji (med prednisolonom in neč. A neznani vrh-slabo ločen)	1 .izbrana nova metoda
Test9-Gemini (XR1)	Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3μm		<u>Inj.</u> 10 μL <u>Pretok:</u> 0,5mL/min <u>Čas krom.:</u> 45min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>$T_{vzorcev}$:</u> 25°C	13,405	14,544	11,149	Ločeno na bazni liniji (neznani vrh med prednisolonom in neč. A bolje ločen; vendar je metoda precej podaljšana)	Znižanje pretoka iz 1,0mL/min na 0,5mL/min

S to mobilno fazo in kromatografskimi pogoji smo dosegli zelo dobre rezultate. Izmed vseh testov v tabeli 5-4 smo najboljše rezultate dosegli pri metodi Test8-Gemini (1.izbrana nova metoda).

V nadaljevanju so prikazani rezultati oziroma kromatogrami izmerjenimi s to metodo.

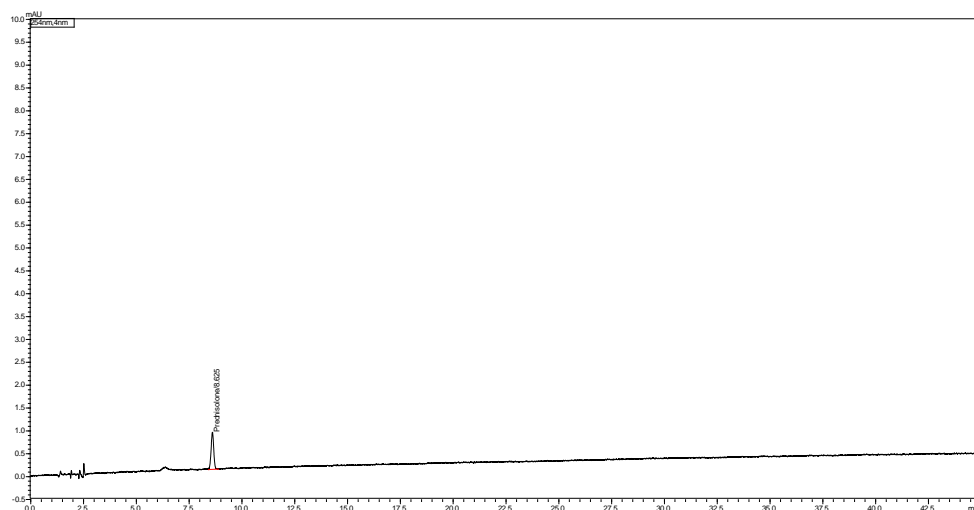
Na sliki 5-15 je prikazan kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA.



Slika 5-15: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

S to metodo nam je komponenti prednisolon in nečistoto A uspelo popolnoma ločiti. Ločeni sta celo do te mere, da je med njima viden tudi dodaten neznan vrh, ki ga s prejšnjimi metodami nismo videli. Vrhovi na začetku kromatograma so prisotni zaradi razlike med mobilno fazo in topilom s katerim je pripravljena raztopina standarda (AcN:H₂O = 40:60).

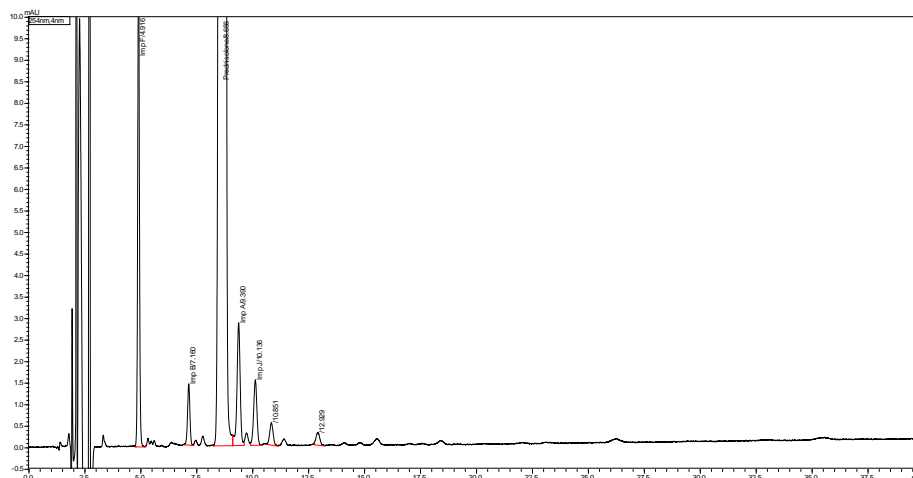
Izmerili smo tudi kromatogram raztopine za občutljivost sistema RSC (slika 5-16). Raztopina RSC predstavlja raztopino 0,05 % delovne koncentracije. Da potrdimo ustreznost sistema, moramo doseči razmerje signal/šum $S/N \geq 10$. Dosegli smo rezultat $S/N = 43$, torej je sistem ustrezen. Glede na to, da je naša delovna koncentracija 0,5 mg/mL in dosežen rezultat $S/N = 43$, lahko sklepamo, da bi zadoščala koncentracija 0,3 mg/mL.



Slika 5-16: Raztopina za občutljivost sistema RSC izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,00025$ mg/mL).

Da bi lahko identificirali vrhove na kromatogramu raztopine standarda RSA oz., da smo lahko potrdili identifikacijo, smo pripravili raztopine standardov znanih nečistot A, B, C in raztopino standarda za identifikacijo vrhov RSB, ki vsebuje nečistoti F in J.

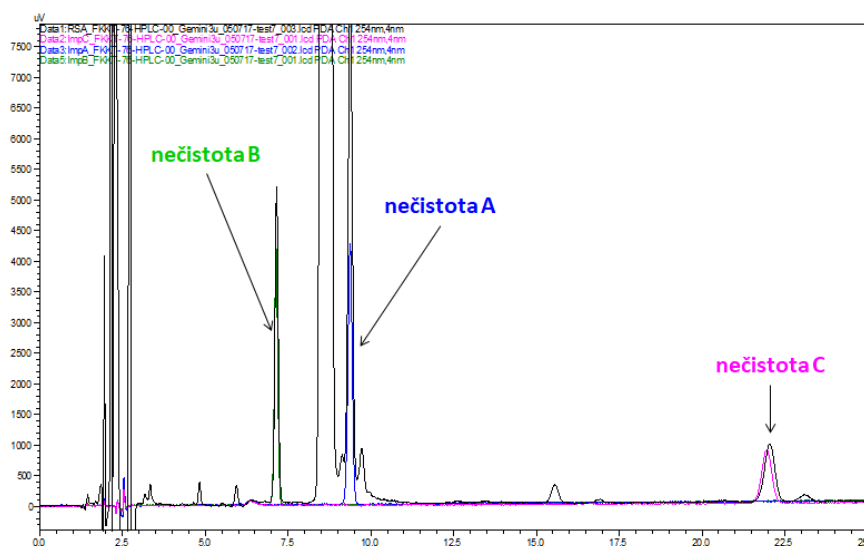
Na sliki 5-17 je kromatogram raztopine za identifikacijo vrhov RSB. Na ta način smo določili čas elucije vrha nečistote F in J. Raztopina RSB je pripravljena s topilom AcN:H₂O = 40:60, zato so na začetku kromatograma vidni vrhovi, ki pripadajo topilu.



Slika 5-17: Kromatogram raztopine standarda za identifikacijo vrhov RSB izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

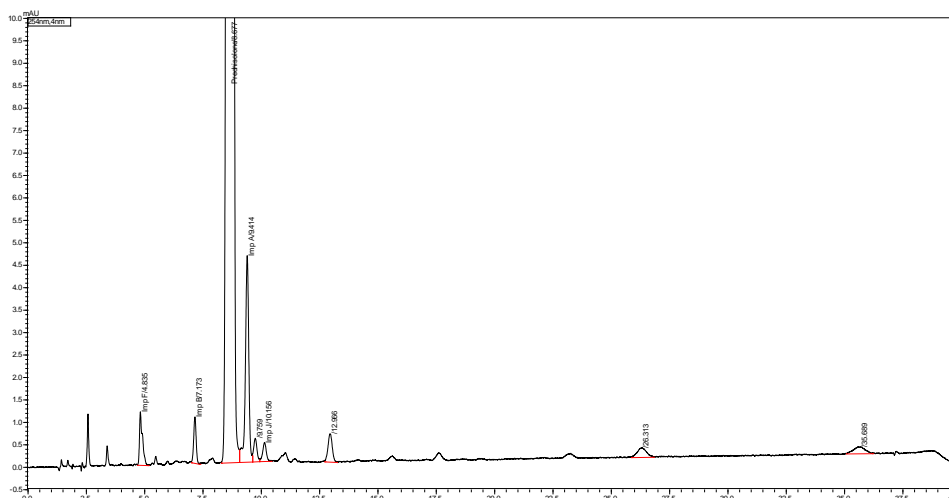
Nato smo izmerili kromatograme drugih znanih nečistot. Za pripravo raztopin smo za topilo uporabili mobilno fazo. Raztopine so pripravljene v ustreznih koncentracijah tako, da so odzivi podobni odzivom na kromatogramu raztopine RSA.

Na sliki 5-18 je prikazana preslikava kromatogramov RSA in kromatogramov nečistote A, nečistote B in nečistote C. Na preslikavi je dobro vidno prekrivanje vrhov in na ta način lahko potrdimo identifikacijo vrhov oz. retenzijske čase elucije znanih nečistot.



Slika 5-18: Preslikava kromatogramov RSA in kromatogramov nečistote A, nečistote B in nečistote C izmerjenih s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1.

Nato smo izmerili še kromatogram raztopine vzorca učinkovine prednisolona, ki ga prikazuje slika 5-19.



Slika 5-19: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

Kot že omenjeno, smo s to metodo dosegli ločitev prednisolona in nečistote A do te mere, da poleg njiju eluirata dva dodatna neznana vrhova, in sicer eden med njima in eden za nečistoto A (slika 5-15). Glede na predstavljen kromatogram v članku na katerem smo osnovali to metodo (slika 5-14) smo sklepali, da bi vrh med prednisolonom in nečistoto A lahko pripadal kortizonu.

Neznani vrh med prednisolonom in nečistoto A smo identificirali s pomočjo LC/MS analize (Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Dr. Petra Kotnik, univ. dipl. inž. kem. teh).

Analizirali smo raztopino vzorca učinkovine prednisolon. Rezultati LC/MS analize so pokazali, da so v vzorcu naslednje komponente, ki si sledijo:

- 6 α -hidroksi-prednison,
- 17 α ,21-dihidroksi-pregan-1,4,6-trien-3,11,20-trion,
- 6 α ,11 β ,17 α ,20 β ,21-pentahidroksipregnan-1,4-dien-3-on,
- Nečistota E,
- Nečistota D,
- Nečistota F,
- Nečistota H,
- Nečistota B,
- Prednisolon,
- 20 α -hidroksi prednison,
- Kortizon,
- Nečistota A,
- Nečistota G,
- Nečistota J,
- Nečistota I,
- 6 β ,11 α ,17 α ,20 β ,21-pentahidroksi-5theta-pregn-1-en-3-on,
- Nečistota C.

Pri tem skupaj eluirajo:

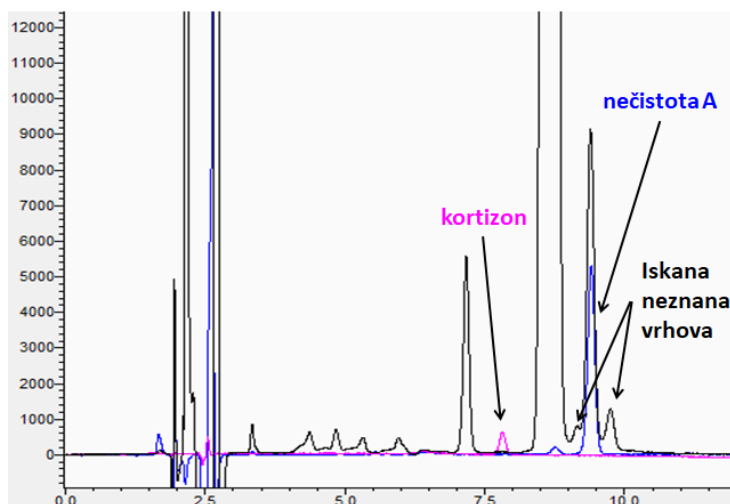
- Nečistoti E in D (enaki fragmenti),
- Nečistoti F in H (enaki fragmenti),
- Prednisolon, 20 α -hidroksi prednison in kortizon (različni fragmenti),
- Nečistoti A in G (enaki fragmenti),
- Nečistoti J in I (enaki fragmenti).

Ker prednisolon, 20 α -hidroksi prednison in kortizon eluirajo skupaj (imajo različne tranzicije), lahko z normirano skalo določimo približno vsebnost posamezne komponente: prednisolon - 100%, 20 α -hidroksi prednison - 16%, kortizon - 6%.

Tako neznani vrh, ki ga želimo identificirati pripada 20 α -hidroksi prednisonu ali kortizonu.

Za potrditev identifikacije vrha med prednisolonom in nečistoto A smo pridobili standard kortizona in ga injicirali z enakimi kromatografskimi pogoji kot RSA ter preverili retenzijski čas elucije. Injicirali smo tudi raztopino standarda RSA, ter raztopino hidrokortizona (nečistota A).

Na sliki 5-20 je vidna preslikava kromatogramov **RSA** in kromatogramov **kortizona** in **nečistote A**.



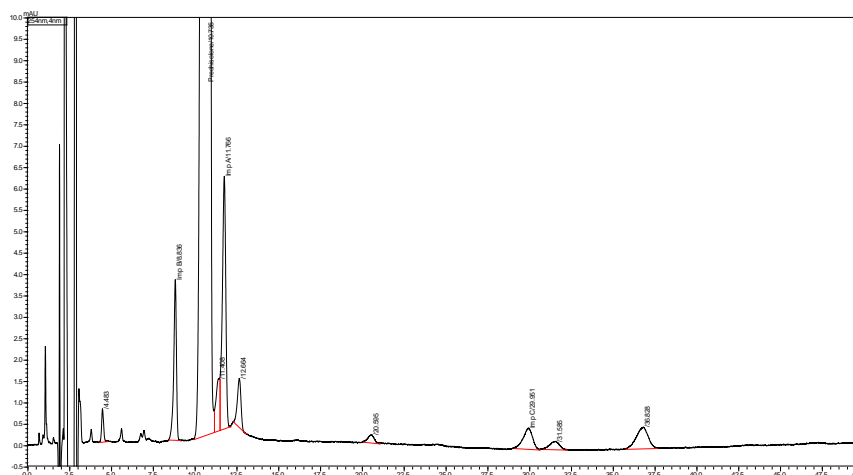
Slika 5-20: Preslikava kromatogramov RSA in in kromatogramov **kortizona** in **nečistote A** izmerjenih s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm \times 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1.

Ugotovili smo, da noben od neznanih vrhov ne pripada kortizonu, torej lahko naša domnevanja ovržemo. Treba je tudi poudariti, da je delovna koncentracija raztopine RSA na kromatogramu 0,5 mg/mL, meja navajanja pa 0,05 %, zato bi v primeru znižanja koncentracije na 0,3 mg/mL bila najverjetneje elucija teh dveh vrhov zanemarljiva (čeprav je točno vsebnost le-te na podlagi kromatograma na sliki 5-19 težko oceniti).

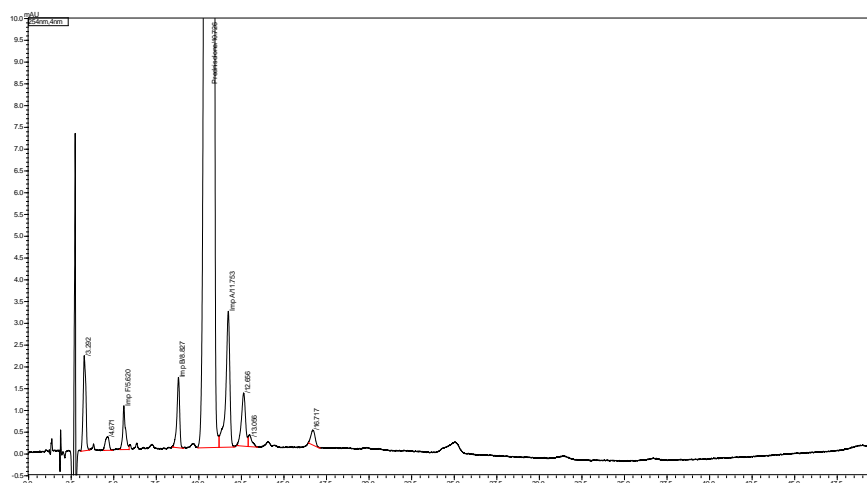
Na podlagi potrditve, da neznani vrh med prednisolonom in nečistoto A ne pripada kortizonu, lahko v skladu z rezultati LC/MS analize trdimo, da vrh pripada 20 α -hidroksi prednisonu.

S tem potrdimo tudi vrstni red elucije vrhov na kromatogramu iz članka na temo separacije kortikosteroidov (slika 5-14), torej po vrsti eluirajo nečistota B (prednison), kortizon, prednisolon in nečistota A (hidrokortizon).

Za primerjavo smo metodo testirali tudi na koloni **Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm**. Na sliki 5-21 je prikazan kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA, na sliki 5-22 pa kromatogram raztopine vzorca.



Slika 5-21: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$).



Slika 5-22: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s 1. izbrano novo metodo na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$).

Pri primerjavi kromatogramov ugotovimo, da s 1. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3µm dosežemo boljše rezultate, kot na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm. Prednisolon in nečistota A sta na koloni Gemini boljše ločena in vrhovi so ožji in višji.

5.3.2.2 2. izbrana nova metoda

Razvoj nove metode je nato potekal v smeri zmanjšanja koncentracije tetrahidrofurana v mobilni fazi. Ustrezno glede na rezultate smo v mobilni fazi prilagajali tudi odstotek vode in metanola. Rezultati so prikazani v tabeli 5-5.

Tabela 5-5: Rezultati testov razvoja nove metode na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm (kromatogram RSA).

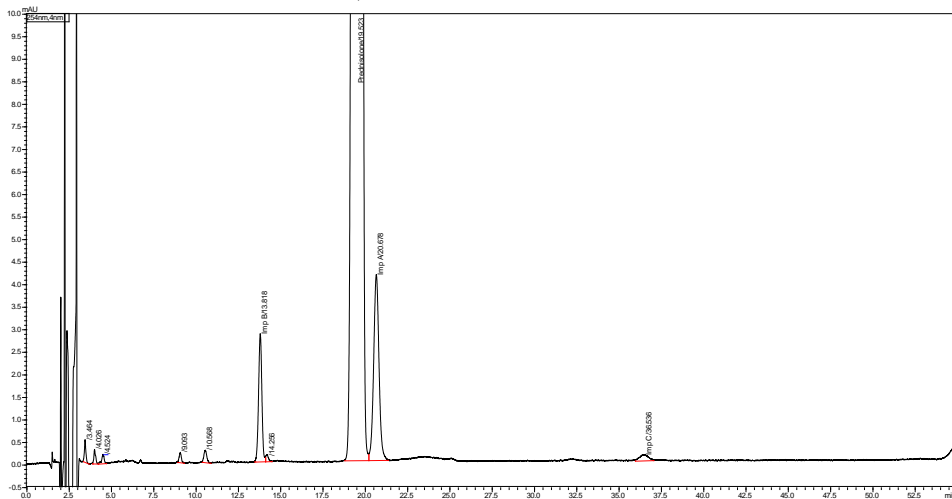
Šifra testa	kolona	Mobilna faza	Krom. pogoji	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Prednisolon/neč. A)	Opombe
Test10-Gemini (XR1)	Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm	MeOH:THF H ₂ O 15:10:75	<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 60min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcev}:</u> 25°C	19,523	20,678	13,818	Hp/Hv = 30,4	2. izbrana nova metoda
Test11-Gemini (XR1)		MeOH:THF H ₂ O 20:10:70	<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 45min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcev}:</u> 25°C	14,341	15,087	10,345	Hp/Hv = 21,0	končna nova metoda (poglavje 5.3.2.3)
Test12-Gemini (XR1)		MeOH:THF H ₂ O 25:5:70	<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 50min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcev}:</u> 25°C	24,915	25,819	16,961	Hp/Hv = 1,6	
Test13-Gemini (XR1)		MeOH:THF H ₂ O 10:15:75	<u>Inj.</u> 10 µL <u>Pretok:</u> 0,8mL/min <u>Čas krom.:</u> 45min <u>T_{kolone}:</u> 50°C <u>T_{vzorcev}:</u> 25°C	12,144	13,075	9,418	Hp/Hv = ?	

Pri 1.izbrani novi metodi je mobilna faza vsebovala 19 % (THF). V literaturi so omenjene možne težave pri uporabi THF-a, ki lahko pri višjih koncentracijah pri dolgih analizah privede do poškodb sistema ali kolone, vendar nikjer ni zavedenega točnega odstotka, katera vrednost predstavlja »višjo koncentracijo«^[24]. Ker se THF-a zaradi potencialne problematičnosti raje izogibamo, smo v nadaljevanju poskusili znižati odstotek THF-a. Za čim boljše ločbo vrhov je bilo potrebno ustrezno prilagoditi tudi odstotek vode in metanola. Odstotek THF-a smo znižali skoraj za polovico in tudi na ta način dosegli zelo dobro separacijo prednisolona in nečistote A.

Parametri 2. izbrane nove metode:

- izokratska metoda,
- čas kromatografiranja: 60 min,
- pretok: 0,8mL/min,
- mobilna faza: MeOH:THF:H₂O=15:10:75 (V/V/V),
- temperatura kolone: 50 °C,
- volumen injiciranja: 10 µL,
- detekcija: UV, 254 nm.

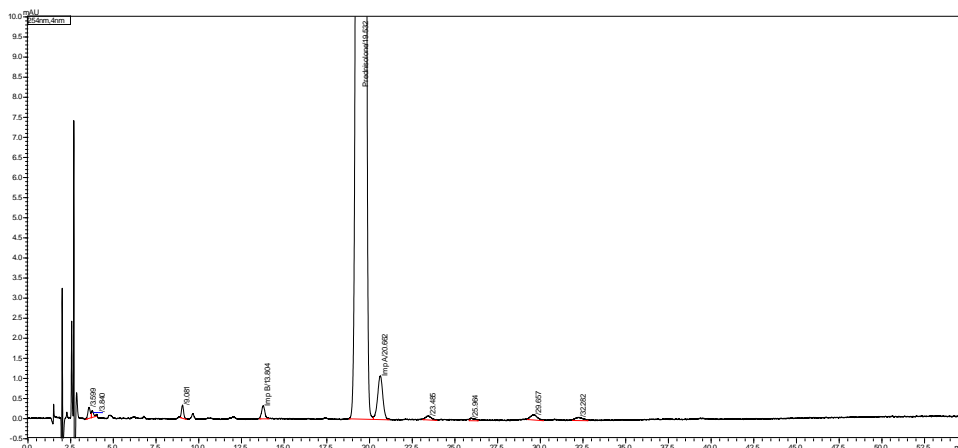
Testiranja smo izvajali na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1. Na sliki 5-23 je kromatogram raztopine standarda RSA za ustreznost sistema. S to metodo sta prednisolon in nečistota A ločeni skoraj na bazni liniji. Razmerje Hp/Hv znaša 30,4.



Slika 5-23: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA pridobljen z 2. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3µm na sistemu Nexera XR1 (c = 0,5 mg/mL).

Na začetku kromatograma so vidni vrhovi, ki pripadajo topilu, saj je bila raztopina standarda za ustreznost sistema pripravljena s topilom AcN:H₂O = 40:60, naša sestava mobilne faze pa je precej drugačna.

Izmerili smo še raztopino vzorca učinkovine z nižjo koncentracijo $c = 0,25 \text{ mg/mL}$ (slika 5 - 24). Pri pripravi raztopine vzorca, kot topilo uporabimo mešanico v razmerju $\text{MeOH:THF:H}_2\text{O} = 8:19:73$.



Slika 5-24: Kromatogram raztopine vzorca pridobljen z 2. izbrano novo metodo na koloni Gemini C18, $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,25 \text{ mg/mL}$).

Na kromatogramu raztopine vzorca z nižjo koncentracijo sta komponenti prednisolona in nečistote A ločeni na bazni liniji. Vrhovi na začetku kromatograma pripadajo topilu ($\text{MeOH:THF:H}_2\text{O} = 8:19:73$).

S to metodo dobimo odlične rezultate, vendar je problem dolžina kromatografiranja, ki znaša okoli 60 min. Dolge metode so v primeru analiz večih vzorcev zelo dolgotrajne, poraba reagentov visoka in tudi obraba delov kromatografskega sistema višja.

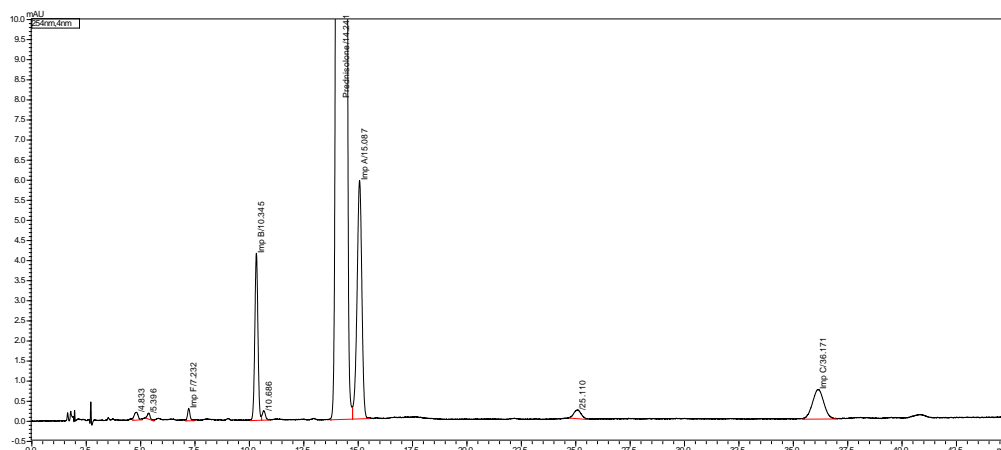
5.3.2.3 Končna nova metoda

Zaradi dolgega časa kromatografiranja pri 2. izbrani novi metodi smo metodo razvijali dalje v smeri zmanjšanja vodne faze v mobilni fazi. Odstotek tetrahidrifurana v mobilni fazi smo obdržali na 10 %, ker pri nižjih koncentracijah nismo dobili dobrih rezultatov. Zato smo povišali odstotek metanola in znižali odstotek vode.

Parametri končne nove metode:

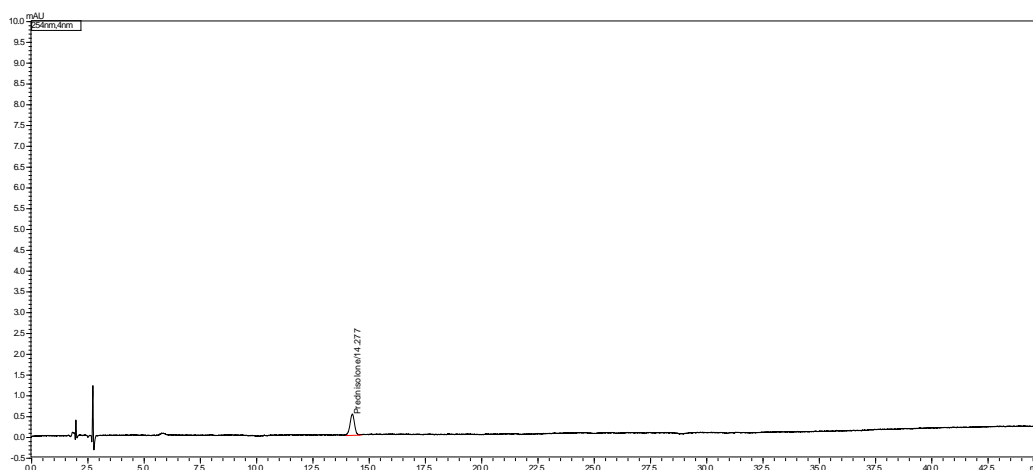
- izokratska metoda,
- čas kromatografiranja: 45 min,
- pretok: $0,8 \text{ mL/min}$,
- mobilna faza: $\text{MeOH:THF:H}_2\text{O} = 20:10:70 \text{ (V/V/V)}$,
- temperatura kolone: $50 \text{ }^\circ\text{C}$,
- volumen injiciranja: $10 \mu\text{L}$,
- detekcija: UV, 254 nm .

Metodo smo izmerili na koloni Gemini C18, $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ na sistemu Nexera XR1. Na sliki 5-25 je kromatogram raztopine standarda RSA za ustreznost sistema. S to metodo smo dosegli razmerje $\text{Hp/Hv} = 21,0$.



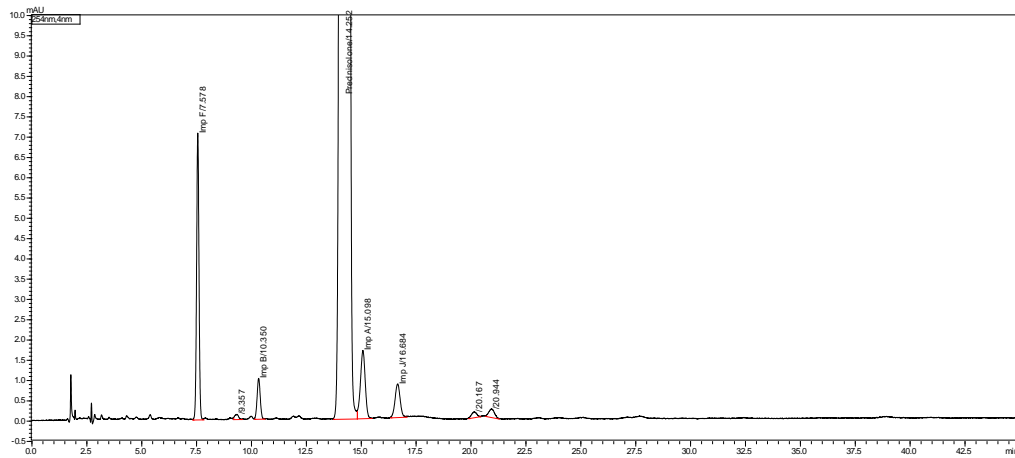
Slika 5-25: Kromatogram raztopine standarda za ustreznost sistema RSA izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

Izmerili smo tudi kromatogram raztopine za občutljivost sistema RSC (slika 5-26). Raztopina RSC predstavlja raztopino 0,05 % delovne koncentracije. Da potrdimo ustreznost sistema preverimo razmerje signal/šum, ki znaša 37.



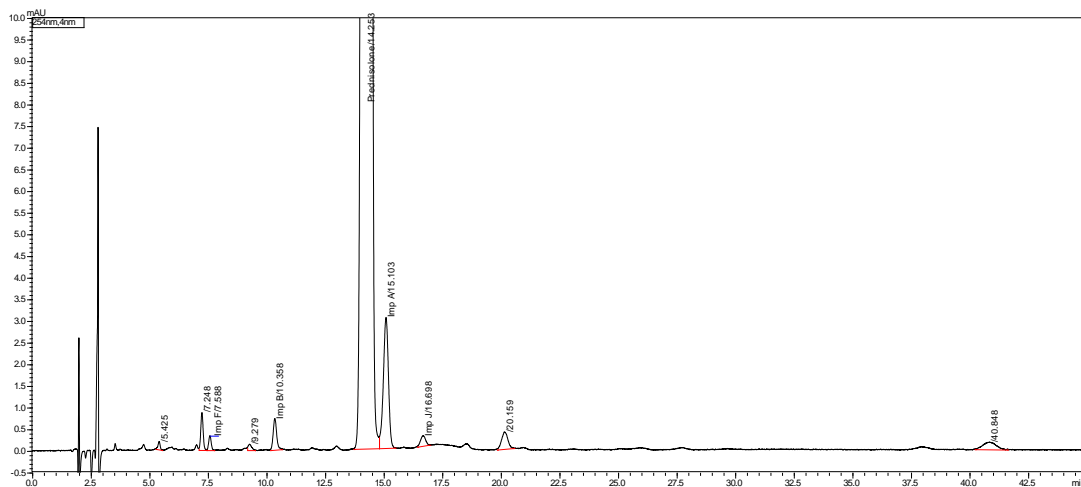
Slika 5-26: Raztopina za občutljivost sistema RSC izmerjena s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,00025$ mg/mL).

Na sliki 5-27 je kromatogram raztopine za identifikacijo vrhov RSB. Tako smo določili čas elucije vrha nečistote F in J.



Slika 5-27: Kromatogram raztopine standarda za identifikacijo vrhov RSB izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

Nato smo izmerili še kromatogram raztopine vzorca učinkovine prednisolon, ki ga prikazuje slika 5-28.



Slika 5-28: Kromatogram raztopine vzorca izmerjen s končno novo metodo na koloni Gemini C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m na sistemu Nexera XR1 ($c = 0,5$ mg/mL).

S to metodo smo v primerjavi z 2.izbrano novo metodo skrajšali čas kromatografiranja za 15 min (iz 60 min na 45 min). Kljub nižjemu deležu vode v mobilni fazi še vedno dosežemo zelo dobro ločbo vrhov (kromatogram RSA, Hp/Hv = 21,0).

6 Zaključek

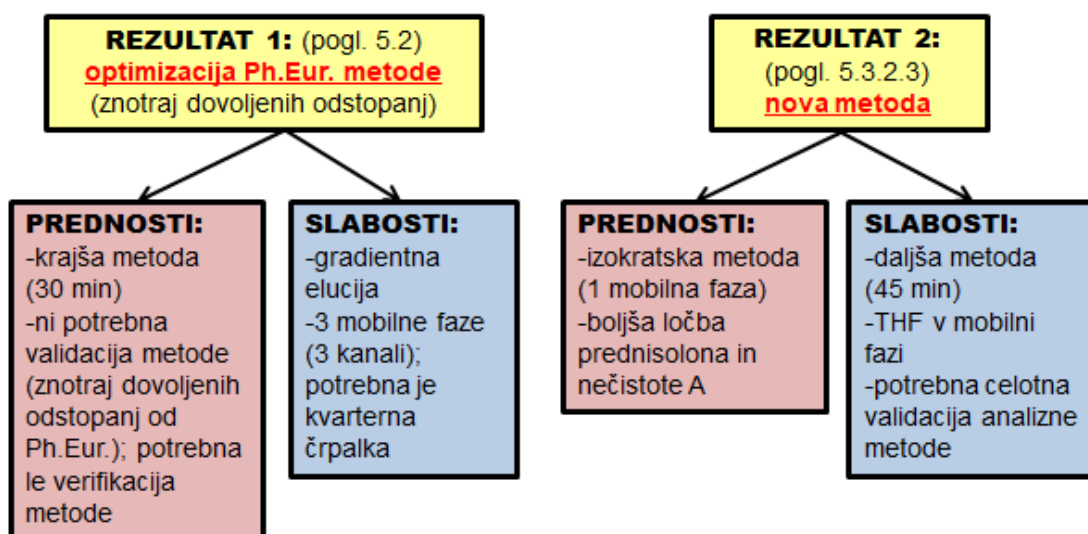
Zadane cilje pred začetkom magistrske naloge smo tekom eksperimentalnega dela uspeli doseči. Glavni cilj magistrske naloge je bila optimizacija Ph.Eur. metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za določanje sorodnih substanc prednisolona v okviru dovoljenih odstopanj od Ph.Eur., v primeru neuspešnosti pa razviti novo metodo.

Optimizacija Ph.Eur. metode, znotraj dovoljenih odstopanj od Ph.Eur., nam je uspela na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm. S to metodo smo dosegli razmerje vrh/dolina $H_p/H_v = 10,5$ (kriterij za ustreznost sistema je $H_p/H_v \geq 3$), kar je precej izboljššan rezultat od $H_p/H_v = 7,0$, ki so ga dosegli s Ph.Eur. metodo na referenčnem kromatogramu (spletna stran EDQM) na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm.

Med drugim smo potrdili predpostavko, da se lahko rezultati precej razlikujejo od sistema do sistema, saj smo na koloni Venusil AQ C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm s Ph.Eur. metodo na sistemu HPLC 1200-2 dosegli razmerje vrh/dolina $H_p/H_v = 6,9$ (ročni izračun) in na sistemu Nexera XR1 razmerje $H_p/H_v = 3,8$ (izračun v rač. programu). Na obeh sistemih smo izmerili Ph.Eur. metodo še na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm, kjer smo na sistemu HPLC 1200-2 izračunali razmerje $H_p/H_v = 4,8$, na sistemu Nexera XR1 pa dosegli razmerje $H_p/H_v = 4,0$. Pri primerjavi kromatogramov opazimo na koloni Gemini C18, 150 mm × 4,6 mm, 3 μm ostrejšše vrhove in s tem nižjo mejo zaznavnosti metode in več zaznanih nečistot.

Čeprav smo uspeli optimizirati Ph.Eur. metodo, smo se v nadaljevanju lotili še razvoja nove metode v želji po doseženi še boljši ločbi vrhov sorodnih substanc. S testiranjem različnih metod z mobilnimi fazami z različnimi razmerji reagentov (voda, acetonitril, metanol, tetrahidrofuran), smo razvili novo metodo (mobilna faza: MeOH:THF:H₂O = 20:10:70), s katero dosežemo razmerje $H_p/H_v = 21,0$. S to metodo sta prednisolon in nečistota A ločena skoraj na bazni liniji.

Obe metodi, tako optimizirana Ph.Eur. metoda, kot nova metoda, imata tako prednosti kot slabosti. Te so povzete na sliki 6-1.



Slika 6-1: Diagram, ki prikazuje glavne prednosti in slabosti optimizirane Ph.Eur. metode in nove razvite metode.

Največja slabost optimizirane Ph.Eur. metode je predvsem ta, da za gradientno elucijo potrebujemo 3 kanale in s tem 3 mobilne faze, česar vsi HPLC - sistemi ne omogočajo. Največja prednost te metode je v tem, da ni potrebna validacija metode, ker smo metodo optimizirali znotraj dovoljenih odstopanj od Ph.Eur. Metoda je torej dobra izbira za laboratorije, ki se morajo držati Ph.Eur. metod (med drugim tudi proizvajalci aktivnih farmacevtskih učinkovin) in ne dosežejo kriterija ustreznosti kromatografskega sistema s Ph.Eur. metodo. V tem primeru je potrebna le verifikacija metode, ki vključuje selektivnost, ponovljivost sistema, ponovljivost metode, določitev meje določljivosti, meje zaznavnosti, stabilnost raztopin standardov, stabilnost raztopin vzorcev in linearnost.

Pri novi metodi je največja pomanjkljivost, da je potrebna validacija metode. Zato jo priporočamo predvsem laboratorijem in vsem tistim, ki niso zavezani k uporabi Ph.Eur. metod, saj smo s to metodo dosegli ločbo prednisolona in nečistote A skoraj na bazni liniji. Velika prednost metode je tudi izokratska elucija in s tem 1 mobilna faza. Slabost metode je sicer uporaba tetrahidrofurana v mobilni fazi, vendar v tako nizkih koncentracijah (10%) naj ta ne bi povzročal težav (odvisno od HPLC - sistema in dolgotrajnosti uporabe metode).

V okviru zadanih ciljev in zadanega obsega magistrske naloge smo dosegli dobre rezultate. Razvito metodo je v prihodnosti mogoče nadgraditi in dopolniti. Priporočeno bi bilo izvesti celotno validacijo metode, da se dokaže ustreznost. Naš predlog pred tem je tudi skrajšanje metode. Metodo bi lahko skrajšali z dodanim gradientnim korakom po eluciji glavnega vrha z večjim deležem organske faze (npr. acetonitril).

V prihodnosti v primeru nalog in izzivov, podobnih našemu magistrskemu delu priporočamo uporabo računalniških programov za optimizacijo/razvoj HPLC - metod (QbD – »Quality by design« oz. načrtovanje eksperimentov). S temi računalniškimi programi bi zelo skrajšali našo pot do rezultatov, predvsem pa drastično znižali število izvedenih eksperimentov. Pri optimizaciji Ph.Eur. metode smo naredili preko 120 eksperimentov, da smo prišli do končne optimizirane metode. Če bi uporabili katerega od računalniških programov, pa bi za končno metodo najverjetneje potrebovali precej manj eksperimentov. Uporabo QbD za razvoj in validacijo HPLC - metod priporoča tudi FDA (»U.S. Food and Drug Administration«). Nekateri od programov, ki so trenutno najbolj aktualni za optimizacijo/razvoj HPLC - metod so Drylab^[25], Chromsword^[26] in Method Scouting^[27].

7 Literatura

- [1] Navdeep Bal, Anu Kumar, Dayanthi Nugegoda. Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Journal of Hazardous Materials*. 339, 281-291, 2017.
- [2] EDQM Knowledge Database. Detailed view of Prednisolonum. https://extranet.edqm.eu/4DLink1/4DCGI/Web_View/mono/353 (dostop: 2.9.2017).
- [3] European pharmacopoeia 7.0, Prednisolone 07/2011:0353. <https://extranet.edqm.eu/4DLink1/pdfs/chromatos/0353.pdf> (dostop: 2.9.2017).
- [4] The European pharmacopoeia 8.0. 2.2.46. Chromatographic separation techniques, Liquid chromatography.
- [5] LC/GC North America solutions for separation scientist. LC Troubleshooting. A two year compilation: 2006.2007.
- [6] <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/Analytical/ascentis-express-f5-columns/hydrocortisone-and-prednisolone.jpg> (dostop: 2.9.2017).
- [7] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/brochures/ascentis-express-f5-columns.html> (dostop: 15.12.2017).
- [8] Drugs.com. Prednisolone. August 01, 2017. <https://www.drugs.com/mtm/prednisolone.html> (dostop: 3.9.2017).
- [9] European pharmacopoeia 7.0, Prednisolone 07/2011:0353.
- [10] SYNZEAL. Prednisolone. <https://www.synzeal.com/prednisolone-3> (dostop: 5.10.2017)
- [11] European pharmacopoeia 7.0, Prednisolone 01/2008:0353, corrected 6.0.
- [12] JAZMP. Evropska farmakopeja. <http://www.jazmp.si/farmakopeja/evropska-farmakopeja/> (dostop: 7.10.2017)
- [13] EDQM. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-background-50.html> (dostop: 05.01.2018).
- [14] European pharmacopoeia 8.0, 5.10. Control of impurities in substances for pharmaceutical use.
- [15] Dr Sarma Krishna pathy ,YLN Murthy,Sunithasarma,Atchuutha ramaiah. BASIC SKILLS TRAINING GUIDE – HPLC method development and validation – an overview. 2013.
- [16] Agilent Technologies. Stack configurations. http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/system/stackConfigurations.html (dostop: 10.11.2017).
- [17] Agilent Technologies. The LC Handbook. Guide to LC Columns and Method Development. Agilent Technologies Inc. USA, April 30, 2015.
- [18] Phenomenex. Chromatography Product Guide 15/16. Phenomenex, Inc., 2015.
- [19] Phenomenex. Kinetex. <https://www.phenomenex.com/kinetex/index> (dostop: 16.10.2017).
- [20] Phenomenex. The Ultimate Guide to HPLC/UHPLC Reversed Phase Selectivity Phenomenex, Inc, 2013.

- [21] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- [22] World Health Organization. Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. Good manufacturing practices and inspection. Volume 2, 2nd updated edition. World Health Organization, 2007.
- [23] Dionex. UHPLC Separation of Nine Corticosteroids in Under Four Minutes, Thermo Scientific. Dionex corporation. 2016.
- [24] Agilent Technologies. Use of tetrahydrofuran (THF) with LC/MC.
- [25] Quality by Design Software for HPLC Method Development in the Design Space for the New Decade with Drylab. http://www.polygen.com.pl/imagesdb_drylab2010-130822-0.pdf (dostop: 20.12.2017).
- [26] Chromsword. Solutions for automated HPLC method development. <http://www.chromsword.com/> (dostop: 20.12.2017).
- [27] Nexera Method Scouting System. https://www.shimadzu.com/an/hplc/method_scouting-1.html (dostop: 20.12.2017).

8 Priloge

8.1 Priloga 1

V spodnjih tabelah so zbrani podatki in rezultati opravljenih testov v okviru optimizacije metode. Rezultati v tabelah, prikazanih v Prilogi 1, se nanašajo na poglavje 5.1. V tabeli 8-2 so prikazani testi, katerih gradient je prikazan v tabeli 8-1.

Tabela 8-1: Tri gradientne elucije uporabljene pri testih metod na 12 različnih HPLC - kolonah.

Šifra metode: PhEur (predpisani krom. pogoji)						
<i>t</i> (min)	0	14	20	25	26	30
%A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
%B (AcN:MeOH=1:1)	40	40	80	80	40	40
Šifra metode: PhEur-1						
<i>t</i> (min)	0	14	20	25	26	30
%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
%B (AcN:MeOH=1:1)	35	35	80	80	35	35
Šifra metode: PhEur-2						
<i>t</i> (min)	0	14	20	25	26	30
%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
%B (AcN:MeOH=1:1)	30	30	80	80	30	30

Tabela 8-2: Rezultati testov metod na različnih kolonah (kromatogram RSA).

Šifra testa	Sistem	Kolona	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe
PhEur	HPLC 1100	Venusil AQ C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	12,943	13,638	11,356	5,8	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2		12,679	13,353	11,138	6,9	≥ 3 ; ustreza	/
PhEur	Nexera XR1		12,196	12,839	10,739	3,8 (izračun LabSolutions)	≥ 3 ; ustreza	/
PhEur	HPLC 1100	Gemini C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	9,627	10,060	8,459	3,8	≥ 3 ; Rt prednis. izven Ph.Eur.	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2		9,602	10,024	8,445	5,1	≥ 3 ; Rt prednis. izven Ph.Eur.	3 kanali (A:H ₂ O, B:AcN, C:MeOH)
PhEur	HPLC 1200-2		9,616	10,045	8,444	4,8	≥ 3 ; Rt prednis. izven Ph.Eur.	/
PhEur	Nexera XR1		9,300	9,716	8,192	4,0 (izračun LabSolutions)	≥ 3 ; Rt prednis. izven Ph.Eur.	/
PhEur-1	HPLC 1100		15,559	16,206	13,524	3,3	≥ 3 ; ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1100		19,423	19,541	18,968	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-1		5,697	5,962	6,498	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1200-1	Kinetex Biphenyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	8,800	9,226	10,274	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1200-1		15,132	/	17,459	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2		5,656	5,880	5,078	2,4	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL

Šifra testa	Sistem	Kolona	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe
PhEur-1	HPLC 1200-2	Kinetex C18 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	8,923	9,262	7,911	2,4	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1200-2		15,604	16,122	13,698	1,4	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1100	Kinetex Phenyl Hexyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	5,199	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1100		7,919	8,194	/	1,2	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1100		13,400	13,861	/	1,6	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-1	Kinetex XB-C18 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	6,816	/	6,096	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1200-1		10,871	/	9,640	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1200-1		17,844	/	16,940	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2	Kinetex F5 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	4,441	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1200-2		6,614	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1200-2		10,206	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2	Synergi Hydro RP 4 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	9,355	/	8,486	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1200-2		15,164	/	13,645	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL

Šifra testa	Sistem	Kolona	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe
PhEur-2	HPLC 1200-2		19,135	/	18,801	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1200-2	Luna C18(2) 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	9,817	10,204	8,660	1,1 (koelucija)	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1200-2		16,040	16,610	14,027	1,1 (koelucija)	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1200-2		19,433	/	19,028	Koelucija	Ne ustreza	Višja $c \approx 0,6$ mg/mL
PhEur	HPLC 1100		7,136	/	6,426	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL
PhEur-1	HPLC 1100	Gemini NX C18 5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	11,304	/	10,082	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL
PhEur-2	HPLC 1100		18,024	/	17,254	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL
PhEur	Nexera XR1		Luna Omega Polar C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm	10,332	/	9,272	Koelucija	Ne ustreza
PhEur	Nexera XR1	Kinetex Polar C18 2,6 μ m 150 mm \times 4,6 mm	6,524	/	5,909	Koelucija	Ne ustreza	/
PhEur-1	Nexera XR1		10,252	/	9,233	Koelucija	Ne ustreza	/

Med testiranimi kolonami smo izbrali tri kolone:

-Kinetex Phenyl Hexyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm,

-Kinetex Biphenyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm in

-Gemini C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm,

na katerih smo nadaljevali še z dodatnimi testi. Gemini kolono smo izbrali, ker smo le na tej koloni dosegli ustreznost sistema. Drugi dve koloni pa smo izbrali na podlagi potencialno primerne stacionarne faze za ločbo naših sorodnih substanc.

Testi in rezultati so predstavljeni v spodnjih tabelah tabela 8-3, tabela 8-4, tabela 8-5.

Tabela 8-3: Rezultati testov na koloni Kinetex Phenyl Hexyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm na sistemu HPLC 1000 (kromatogram RSA).

Šifra testa:	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-3	8,044	8,319	/	1,6	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN:MeOH= 40:60)	35	35	80	80	35	35
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-4	17,624	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN:MeOH= 40:60)	30	30	80	80	30	30
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-5	11,762	12,118	/.	1,1 (koelucija)	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	66	66	20	20	66	66
							%B (AcN:MeOH= 40:60)	34	34	80	80	34	34
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-6	20,035	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (MeOH)	35	35	80	80	35	35
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-7	14,113	14,517	/	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN:MeOH= 30:70)	35	35	80	80	35	35
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-8	14,083	14,493	/	1,1 (koelucija)	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN:MeOH= 30:70)	35	35	80	80	35	35
							t(min)	0	16	20	25	26	30
Phenyl-Hexil-PhEur-9	18,134	/	/	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN:MeOH= 40:60)	30	30	80	80	30	30
							t(min)	0	20	25	30	31	35
Phenyl-Hexil-PhEur-10	25,155	/	25,050	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (MeOH)	35	35	80	80	35	35
							t(min)	0	20	25	30	31	35
Phenyl-Hexil-PhEur-11	18,084	/	17,798	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	%A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							%B (MeOH)	40	40	80	80	40	40
							t(min)	0	20	25	30	31	35

Tabela 8-4: Rezultati testov na koloni Kinetex Biphenyl 2,6 μ m, 150 mm \times 4,6 mm na sistemu HPLC 1100 in Nexera XR1(kromatogram RSA).

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
							t(min)	0	14	20	25	26	30
Biphenyl-PhEur-3 (1100)	4,169	/	4,653	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	55	55	20	20	55	55
							%B (AcN:MeOH=1:1)	45	45	80	80	45	45
Biphenyl-PhEur-4 (1100)	4,468	/	4,957	Koelucija	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	58	58	20	20	58	58
							%B (AcN:MeOH=1:1)	42	42	80	80	42	42
Biphenyl-PhEur-5 (1100)	7,703	8,033	8,940	Koelucija (predn/neč A)	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							%B (AcN:MeOH=40:60)	40	40	80	80	40	40
Biphenyl-PhEur-6 (XR1)	7,762	/	9,108	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN)	17,5	17,5	40	40	17,5	17,5
							%C (MeOH)	17,5	17,5	40	40	17,5	17,5
Biphenyl-PhEur-7 (XR1)	6,071	/	7,027	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN)	21	21	48	48	21	21
							%C (MeOH)	14	14	32	32	14	14
Biphenyl-PhEur-8 (XR1)	9,773	/	11,647	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	18	18	48	48	18	18
							%C (MeOH)	12	12	32	32	12	12
Biphenyl-PhEur-9 (XR1)	6,506	/	7,551	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							%B (AcN)	16	16	32	32	16	16
							%C (MeOH)	24	24	48	48	24	24
Biphenyl-PhEur-10 (XR1)	10,236	/	12,194	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN)	14	14	32	32	14	14
							%C (MeOH)	21	21	48	48	21	21

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/Neč A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
Biphenyl-PhEur-11 (XR1)	17,481	/	18,506	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	12	12	32	32	12	12
							%C (MeOH)	18	18	48	48	18	18
Biphenyl-PhEur-12 (XR1)	13,047	/	15,718	Koelucija	Ne ustreza	/	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	40	40	15	15

Ker se je od vseh preizkušenih kolon, kolona Gemini C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm izkazala za najuspešnejšo in edino s katero smo poleg kolone Venusil AQ C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm dosegli ustreznost sistema, smo v nadaljevanju poskusili optimizirati metodo na tej koloni (tabela 8-5).

Tabela 8-5: Rezultati testov na koloni Gemini C18 3 μ m, 150 mm \times 4,6 mm (kromatogram RSA).

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
PhEur (1100)	9,609	10,030	8,441	2,8	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							%B (AcN:MeOH=1:1)	40	40	80	80	40	40
Gemini-PhEur-3 (1100)	11,512	12,006	10,066	3,2	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	62	62	20	20	62	62
							%B (AcN:MeOH=1:1)	38	38	80	80	38	38
PhEur-1 (1100)	15,777	16,415	13,695	2,6	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN:MeOH=1:1)	35	35	80	80	35	35
Gemini-PhEur-4 (1100)	12,856	13,398	11,211	2,9	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	63	63	20	20	63	63
							%B (AcN:MeOH=1:1)	37	37	80	80	37	37
Gemini-PhEur-5 (1100)	15,818	16,453	13,735	2,3	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	17	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN:MeOH=1:1)	35	35	80	80	35	35

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
Gemini-PhEur-6 (1100)	9,691	10,178	8,794	4,8	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	63	63	20	20	63	63
							% B (AcN:MeOH=60:40)	37	37	80	80	37	37
Gemini-PhEur-7 (1100)	11,707	12,285	10,574	4,6	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							% B (AcN:MeOH=60:40)	35	35	80	80	35	35
Gemini-PhEur-8 (1100)	16,625	17,108	13,937	1,3	Neustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	63	63	20	20	63	63
							% B (AcN:MeOH=40:60)	37	37	80	80	37	37
Gemini-PhEur-9 (1100)	12,585	13,026	10,611	1,5	Neustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							% B (AcN:MeOH=40:60)	40	40	80	80	40	40
Gemini-PhEur-10 (1100)	10,698	11,231	9,679	3,4	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	64	64	20	20	64	64
							% B (AcN:MeOH=60:40)	36	36	80	80	36	36
Gemini-PhEur-11 (1100)	10,331	10,822	9,394	3,3	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min) (T=35°C)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	63	63	20	20	63	63
							% B (AcN:MeOH=60:40)	37	37	80	80	37	37
Gemini-PhEur-12 (1100)	7,552	7,933	6,898	4,6	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							% B (AcN:MeOH=60:40)	40	40	80	80	40	40
Gemini-PhEur-13 (1100)	7,942	9,327	7,265	4,5	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min) (T=35°C)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							% B (AcN:MeOH=60:40)	40	40	80	80	40	40
Gemini-PhEur-14 (1100)	22,964	23,593	19,681	3,2	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	20	25	30	31	35
							% A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							% B (AcN:MeOH=1:1)	30	30	80	80	30	30

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija						
Gemini-PhEur-15 (1100)	7,714	8,056	6,825	3,1	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	57	57	20	20	57	57
							% B (AcN:MeOH=1:1)	43	43	80	80	43	43
Gemini-PhEur-16 (1100)	8,974	9,369	7,898	3,7	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	59	59	20	20	59	59
							% B (AcN:MeOH=1:1)	41	41	80	80	41	41
Gemini-PhEur-17 (1100)	6,658	6,952	5,918	2,7	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	55	55	20	20	55	55
							% B (AcN:MeOH=1:1)	45	45	80	80	45	45
Gemini-PhEur-18 (1100)	5,911	6,239	5,604	6,1	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	60	60	20	20	60	60
							% B (AcN:MeOH=70:30)	40	40	80	80	40	40
Gemini-PhEur-19 (1100)	6,381	6,704	6,074	7,3	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							% B (AcN:MeOH=70:30)	35	35	80	80	35	35
Gemini-PhEur-19 (1200-1)	8,587	9,071	8,059	8,1	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	65	65	20	20	65	65
							% B (AcN:MeOH=70:30)	35	35	80	80	35	35
Gemini-PhEur-20 (1200-1)	14,626	15,408	13,533	8,4	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							% B (AcN:MeOH=70:30)	30	30	80	80	30	30
Gemini-PhEur-21 (1200-1)	14,645	15,432	13,562	8,5	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	16	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							% B (AcN:MeOH=70:30)	30	30	80	80	30	30
Gemini-PhEur-22 (1200-1)	10,921	11,584	10,464	10,3	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	16	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	70	70	20	20	70	70
							% B (AcN:MeOH=80:20)	30	30	80	80	30	30

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
							t(min)	0	16	20	25	26	30		
Gemini-PhEur-23 (1200-1)	19,756	19,932	19,510	3,4	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% A (H ₂ O)	75	75	20	20	75	75		
Gemini-PhEur-24 (1200-1)	16,198	17,135	15,340	10	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% B (AcN:MeOH= 80:20)	25	25	80	80	25	25		
Gemini-PhEur-25 (1200-1)	14,116	14,946	13,417	11,8	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	17	20	25	26	30		
Gemini-PhEur-26 (1200-1)	11,799	12,456	10,981	9,4	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur. (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% A (H ₂ O)	72	72	20	20	72	72		
Gemini-PhEur-27 (1200-1)	24,442	24,588	24,137	2	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% B (AcN:MeOH= 70:30)	28	28	80	80	28	28		
Gemini-PhEur-28 (1200-1)	19,290	20,275	17,722	8,5	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	21	25	30	31	35		
Gemini-PhEur-29 (1200-1)	18,707	19,687	17,235	8,5	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% A (H ₂ O)	72	72	20	20	72	72		
Gemini-PhEur-30 (1200-1)	12,238	13,341	10,507	3,8	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	% B (AcN)	19,6	19,6	56	56	19,6	19,6		
							% C (MeOH)	8,4	8,4	24	24	8,4	8,4		
							AcN:MeOH=70:30								
							t(min)	0	21	25	30	31	35		
							% A (H ₂ O)	72	72	20	20	72	72		
							% B (AcN)	19,6	19,6	56	56	19,6	19,6		
							% C (MeOH)	8,4	8,4	24	24	8,4	8,4		
							AcN:MeOH=40:60		AcN:MeOH=70:30				AcN:MeOH=40:60		
							t(min)	0	9,5	10	21	25	30	31	35
							% A (H ₂ O)	60	60	72	72	20	20	60	60
							% B (AcN)	16	16	19,6	19,6	56	56	16	16
							% C (MeOH)	24	24	8,4	8,4	24	24	24	24

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
							AcN:MeOH=40:60		AcN:MeOH=70:30				AcN:MeOH=40:60		
Gemini-PhEur-31 (1200-1)	13,280	14,016	10,254	2,2	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	8	9	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	72	72	20	20	60	60
							%B (AcN)	16	16	19,6	19,6	56	56	16	16
							%C (MeOH)	24	24	8,4	8,4	24	24	24	24
Gemini-PhEur-32 (1200-1)	12,783	13,511	10,279	2,0	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	9	9,5	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	72	72	20	20	72	72
							%B (AcN)	16	16	19,6	19,6	56	56	16	16
							%C (MeOH)	24	24	8,4	8,4	24	24	24	24
Gemini-PhEur-33 (1200-1)	15,089	15,547	13,596	4,0	≥ 3; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	10	11	17	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65
							%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5
							%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5
Gemini-PhEur-34 (1200-1)	14,352	14,843	13,209	4,9	≥ 3; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	8	9	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65
							%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5
							%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5
Gemini-PhEur-35 (1200-1)	13,689	14,210	12,690	5,7	≥ 3; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	6	7	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65
							%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5
							%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5
Gemini-PhEur-36 (1200-1)	13,317	13,859	12,402	7,2	≥ 3; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65
							%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5
							%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija																																													
Gemini-PhEur-36 (1200-2)	13,516	14,063	12,570	11,5	≥ 3 ; ustreza (viden zamik bazne linije pri t_R prbl. 7,5 – 9,5 min)	/	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">AcN:MeOH=1:1</th> <th colspan="2">AcN:MeOH 80:20</th> <th colspan="4">AcN:MeOH=1:1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>15</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>65</td> <td>65</td> <td>70</td> <td>70</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>65</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN)</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> <td>24</td> <td>24</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> </tr> <tr> <td>%C (MeOH)</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> <td>6</td> <td>6</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> </tr> </tbody> </table>		AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1				t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65	%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5	%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5
	AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1																																															
t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30																																												
%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65																																												
%B (AcN)	17,5	17,5	24	24	40	40	17,5	17,5																																												
%C (MeOH)	17,5	17,5	6	6	40	40	17,5	17,5																																												
Gemini-PhEur-37 (1200-1)	11,512	12,076	10,644	7,3	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">AcN:MeOH=60:40</th> <th colspan="2">AcN:MeOH 80:20</th> <th colspan="4">AcN:MeOH=60:40</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>14</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>65</td> <td>65</td> <td>70</td> <td>70</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>65</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN)</td> <td>21</td> <td>21</td> <td>24</td> <td>24</td> <td>48</td> <td>48</td> <td>21</td> <td>21</td> </tr> <tr> <td>%C (MeOH)</td> <td>14</td> <td>14</td> <td>6</td> <td>6</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>14</td> <td>14</td> </tr> </tbody> </table>		AcN:MeOH=60:40		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=60:40				t(min)	0	5	6	14	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65	%B (AcN)	21	21	24	24	48	48	21	21	%C (MeOH)	14	14	6	6	32	32	14	14
	AcN:MeOH=60:40		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=60:40																																															
t(min)	0	5	6	14	20	25	26	30																																												
%A (H ₂ O)	65	65	70	70	20	20	65	65																																												
%B (AcN)	21	21	24	24	48	48	21	21																																												
%C (MeOH)	14	14	6	6	32	32	14	14																																												
Gemini-PhEur-38 (1200-1)	7,299	7,632	6,485	3,6	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>14</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>57</td> <td>57</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>57</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN:MeOH=1:1)</td> <td>43</td> <td>43</td> <td>80</td> <td>80</td> <td>43</td> <td>43</td> </tr> </tbody> </table>	t(min)	0	14	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	57	57	20	20	57	57	%B (AcN:MeOH=1:1)	43	43	80	80	43	43																								
t(min)	0	14	20	25	26	30																																														
%A (H ₂ O)	57	57	20	20	57	57																																														
%B (AcN:MeOH=1:1)	43	43	80	80	43	43																																														
Gemini-PhEur-39 (1200-1)	8,649	9,042	7,623	3,7	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>14</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>59</td> <td>59</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>59</td> <td>59</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN:MeOH=1:1)</td> <td>41</td> <td>41</td> <td>80</td> <td>80</td> <td>41</td> <td>41</td> </tr> </tbody> </table>	t(min)	0	14	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	59	59	20	20	59	59	%B (AcN:MeOH=1:1)	41	41	80	80	41	41																								
t(min)	0	14	20	25	26	30																																														
%A (H ₂ O)	59	59	20	20	59	59																																														
%B (AcN:MeOH=1:1)	41	41	80	80	41	41																																														
Gemini-PhEur-40 (1200-1)	7,569	7,772	7,261	3,2	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">AcN:MeOH=1:1</th> <th colspan="2">AcN:MeOH 80:20</th> <th colspan="4">AcN:MeOH=1:1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>3,5</td> <td>14</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>60</td> <td>60</td> <td>60</td> <td>60</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>60</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN)</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>20</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>%C (MeOH)</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>8</td> <td>8</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>20</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>		AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1				t(min)	0	3	3,5	14	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	60	60	60	60	20	20	60	60	%B (AcN)	20	20	32	32	40	40	20	20	%C (MeOH)	20	20	8	8	40	40	20	20
	AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1																																															
t(min)	0	3	3,5	14	20	25	26	30																																												
%A (H ₂ O)	60	60	60	60	20	20	60	60																																												
%B (AcN)	20	20	32	32	40	40	20	20																																												
%C (MeOH)	20	20	8	8	40	40	20	20																																												
Gemini-PhEur-41 (1200-1)	11,120	11,436	10,636	5,3	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">AcN:MeOH=1:1</th> <th colspan="2">AcN:MeOH 80:20</th> <th colspan="4">AcN:MeOH=1:1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>t(min)</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>15</td> <td>20</td> <td>25</td> <td>26</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>%A (H₂O)</td> <td>65</td> <td>65</td> <td>65</td> <td>65</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>65</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>%B (AcN)</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> <td>28</td> <td>28</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> </tr> <tr> <td>%C (MeOH)</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> <td>7</td> <td>7</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>17,5</td> <td>17,5</td> </tr> </tbody> </table>		AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1				t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30	%A (H ₂ O)	65	65	65	65	20	20	65	65	%B (AcN)	17,5	17,5	28	28	40	40	17,5	17,5	%C (MeOH)	17,5	17,5	7	7	40	40	17,5	17,5
	AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1																																															
t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30																																												
%A (H ₂ O)	65	65	65	65	20	20	65	65																																												
%B (AcN)	17,5	17,5	28	28	40	40	17,5	17,5																																												
%C (MeOH)	17,5	17,5	7	7	40	40	17,5	17,5																																												

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
							AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
Gemini-PhEur-42 (1200-1)	15,294	15,868	14,590	8,3	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	17	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	24	24	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	6	6	40	40	15	15
Gemini-PhEur-43 (1200-1)	10,116	10,438	9,655	5,7	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN)	21	21	28	28	48	48	21	21
							%C (MeOH)	14	14	7	7	32	32	14	14
Gemini-PhEur-44 (1200-1)	11,111	11,603	9,406	2,4	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	9	9,5	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	60	65	20	20	60	60
							%B (AcN)	16	16	24	24	32	32	16	16
							%C (MeOH)	24	24	16	16	48	48	24	24
Gemini-PhEur-45 (1200-1)	18,148	18,686	17,332	6,4	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	8	8,5	21	25	30	31	35
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	12	12	24	24	32	32	12	12
							%C (MeOH)	18	18	6	6	48	48	18	18
Gemini-PhEur-46 (1200-1)	19,118	19,635	18,262	5,8	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	9,5	10	21	25	30	31	35
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	12	12	24	24	32	32	12	12
							%C (MeOH)	18	18	6	6	48	48	18	18
Gemini-PhEur-47 (1200-1)	13,231	13,518	12,659	3,9	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	7	8	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	65	65	65	65	20	20	65	65
							%B (AcN)	14	14	28	28	32	32	14	14
							%C (MeOH)	21	21	7	7	48	48	21	21

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
							AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1				
Gemini-PhEur-48 (1200-1)	17,060	17,616	16,303	7,5	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	7	8	18	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	24	24	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	6	6	40	40	15	15
Gemini-PhEur-49 (1200-1)	17,760	18,304	16,969	7,1	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	8	9	20	25	30	31	35
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	24	24	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	6	6	40	40	15	15
Gemini-PhEur-50 (1200-1)	18,493	19,022	17,671	6,6	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	9	10	21	25	30	31	35
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	24	24	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	6	6	40	40	15	15
Gemini-PhEur-51 (1200-1)	19,178	19,692	18,331	6,1	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	10	11	21	25	30	31	35
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	15	15	24	24	40	40	15	15
							%C (MeOH)	15	15	6	6	40	40	15	15
Gemini-PhEur-52 (1200-1)	14,310	14,310	13,624	9,1	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	16	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	70	70	70	70	20	20	70	70
							%B (AcN)	18	18	24	24	48	48	18	18
							%C (MeOH)	12	12	6	6	32	32	12	12
Gemini-PhEur-53 (1200-1)	11,302	11,615	9,493	2,3	Ne ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	8	8,5	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	60	60	60	60	20	20	60	60
							%B (AcN)	16	16	24	24	32	32	16	16
							%C (MeOH)	24	24	16	16	48	48	24	24

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
							AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
Gemini-PhEur-54 (1200-1)	11,651	12,161	10,560	5,5	≥ 3 ; t_R prednis. izven Ph.Eur.	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	62	62	70	70	20	20	62	62
							%B (AcN)	19	19	24	24	40	40	19	19
							%C (MeOH)	19	19	6	6	40	40	19	19
Gemini-PhEur-55 (1200-1)	13,602	14,138	12,736	7	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	12	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	66	66	70	70	20	20	66	66
							%B (AcN)	17	17	24	24	40	40	17	17
							%C (MeOH)	17	17	6	6	40	40	17	17
Gemini-PhEur-56 (1200-1)	14,309	14,856	13,241	6,6	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0		12	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	66		70	70	20	20	66	66
							%B (AcN)	17		24	24	40	40	17	17
							%C (MeOH)	17		6	6	40	40	17	17
Gemini-PhEur-57 (1200-1)	12,839	13,408	12,092	8,0	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0		6	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	66		70	70	20	20	66	66
							%B (AcN)	17		24	24	40	40	17	17
							%C (MeOH)	17		6	6	40	40	17	17
Gemini-PhEur-58 (1200-1)	14,898	15,489	13,602	5,7	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0		16		20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	66		70		20	20	66	66
							%B (AcN)	17		24		40	40	17	17
							%C (MeOH)	17		6		40	40	17	17
Gemini-PhEur-59 (1200-1)	12,660	13,182	11,688	6,1	≥ 3 ; ustreza	Nižja $c \approx 0,4$ mg/mL	t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64	64	70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18	18	24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18	18	6	6	40	40	18	18

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija								
Gemini-PhEur-59 (1200-2)	12,972	13,510	11,963	11,4	≥ 3 ; ustreza (viden zamik bazne linije pri t_R prbl. 7,5 – 9,5 min)	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0	5	6	15	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64	64	70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18	18	24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18	18	6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-60 (1200-2)	12,900	13,447	11,925	13	≥ 3 ; ustreza	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0	3	6	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64	64	70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18	18	24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18	18	6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-61 (1200-2)	12,410	12,985	11,591	14,7	≥ 3 ; ustreza (koelucija B in neznane neč.)	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0		6	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64		70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18		24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18		6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-62 (1200-2)	12,568	13,130	11,702	14,4	≥ 3 ; ustreza (slaba ločba B in neznane neč.)	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0		7	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64		70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18		24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18		6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-63 (1200-2)	12,729	13,284	11,821	12,8	≥ 3 ; ustreza (slaba ločba B in neznane neč.)	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0		8	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64		70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18		24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18		6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-64 (1200-2)	12,988	13,530	12,028	12,3	≥ 3 ; ustreza (slaba ločba B in neznane neč.)	/	AcN:MeOH= 1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH= 1:1				
							t(min)	0		9	14	20	25	26	30
							%A (H ₂ O)	64		70	70	20	20	64	64
							%B (AcN)	18		24	24	40	40	18	18
							%C (MeOH)	18		6	6	40	40	18	18

Šifra testa	t_R prednisolon (min)	t_R neč. A (min)	t_R neč. B (min)	Hp/Hv (Pred/A)	Ocena ustreznosti	Opombe	Gradientna elucija							
							AcN:MeOH=1:1		AcN:MeOH 80:20		AcN:MeOH=1:1			
Gemini-PhEur-65 (1200-2)	13,129	13,660	12,047	10,5	≥ 3 ; ustreza	/	t(min)	0	10	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	64	70	70	20	20	64	64
							% B (AcN)	18	24	24	40	40	18	18
							% C (MeOH)	18	6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-65 (1100)	13,238	13,774	12,204	9,7	≥ 3 ; ustreza	/	t(min)	0	10	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	64	70	70	20	20	64	64
							% B (AcN)	18	24	24	40	40	18	18
							% C (MeOH)	18	6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-65 (Nexera XR1)	12,610	13,144	11,485	7,2	≥ 3 ; ustreza	Izračun Hp/Hv iz LabSolutions	t(min)	0	10	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	64	70	70	20	20	64	64
							% B (AcN)	18	24	24	40	40	18	18
							% C (MeOH)	18	6	6	40	40	18	18
Gemini-PhEur-66 (Nexera XR1)	12,500	12,993	11,478	7,2	≥ 3 ; ustreza	Izračun Hp/Hv iz LabSolutions	t(min)	0	10	14	20	25	26	30
							% A (H ₂ O)	64	70	70	20	20	64	64
							% B (AcN:MeOH=1:1)	36	0	0	80	80	36	36
							% C (AcN:MeOH=80:20)	0	30	30	0	0	0	0

9 Življenjepis

OSEBNI PODATKI **Nina Ledinek**

📍 Vuhred 1, 2365 Vuhred (Slovenija)

✉ ledinek.92.nina@gmail.com

Spol Ženski | Datum rojstva 15. 9. 1992 | Državljanstvo slovensko

DELOVNE IZKUŠNJE

1/6/2015–v teku **Laboratorijsko delo - delo preko študentskega servisa**

Laboratorij za separacijske procese in produktno tehniko, Skupina za separacijske analize (SSA), Univerza v Mariboru

Opravljanje dela analitika v laboratoriju:

- tekočinska kromatografija - HPLC analize (analize vsebnosti in istovetnosti, sorodne substance, itd.);
- validacija HPLC metod;
- optimizacija HPLC metod;
- različne fizikalno kemijske analize (določevanje gostote, vsebnosti vode, določevanje pH, stopnje obarvanosti in opalescence raztopin, itd.);
- laboratorij ima certifikat GMP (dobra proizvodna praksa) torej delo poteka v skladu s smericami dobre proizvodne prakse.

3/7/2017–4/8/2017 **Laboratorijsko delo - obvezno praktično usposabljanje**

Laboratorij za separacijske procese in produktno tehniko, Skupina za separacijske analize (SSA), Univerza v Mariboru

- Različne fizikalno kemijske analize (določevanje gostote, vsebnosti vode, določevanje pH, stopnje obarvanosti in opalescence raztopin, itd.);
- tekočinska kromatografija HPLC;
- delo v skladu s smericami dobre proizvodne prakse.

6/7/2015–14/8/2015 **Laboratorijsko delo - obvezno praktično usposabljanje**

Laboratorij za separacijske procese in produktno tehniko, Skupina za separacijske analize (SSA), Univerza v Mariboru

- Pomoč v laboratoriju;
- spoznavanje različnih fizikalno kemijskih analiz;
- seznanitev s tekočinsko kromatografijo HPLC;
- seznanitev s sistemom dela v skladu s smericami dobre proizvodne prakse.

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

1/10/2015–17/1/2018 **Magistrica inženirka kemijske tehnike**

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor (Slovenija)

- 21/11/2017 **Notranji presojevalec sistema vodenja kakovosti v laboratoriju**
SIQ - Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje, Ljubljana (Slovenija)
- 11/4/2017 **Seminar: Symbiosis of Core-Shell and Fully Porous Particles: Implementing Both for Better HPLC and UHPLC Results**
Kemomed d.o.o.
- 6/4/2017 **Seminar: Dobre prakse merjenja v laboratoriju**
METTLER TOLEDO d.o.o.
- 22/11/2016 **Izobraževanje: Reversed Phase HPLC Method-Development**
Kemomed d.o.o.
- 18/11/2015 **Seminar: Optimizacija Ph.Eur. HPLC metod**
Kemomed d.o.o.
- 1/10/2011–2/9/2015 **Diplomirana inženirka kemijske tehnologije (VS)**
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor (Slovenija)
- 2007–2011 **Gimnazijska maturantka**
Gimnazija Ravne na Koroškem, Ravne na Koroškem (Slovenija)

KOMPETENCE

Materni jezik slovenščina

Tuji jeziki	RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
	Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
angleščina	C1	C1	B2	B2	B2
	Imam certifikat o opravljenem tečaju angleškega akademskega pisanja na nivoju B2				
nemščina	A2	B1	A2	A2	B1
	opravljena splošna matura				

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik
[Skupni evropski jezikovni okvir](#)

Komunikacijske kompetence - Dobre komunikacijske spretnosti sem razvila v študijskem času, kjer sem sodelovala pri humanitarnih študentskih projektih izdelovanja eko kozmetike. Sposobnosti komunikacije v timu, izražanja ter sprejemanja različnih mnenj sem osvojila kot članica Študentskega sveta med študijem na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor.
- Veliko izkušenj z delom v skupinu sem dobila med delom v laboratoriju Skupine za separacijske analize SSA.

Organizacijske/vodstvene kompetence - Med delom v GMP laboratoriju sem se s sprejemanjem zelo različnih nalog in projektov naučila dobro organizirati in razdeliti delo.

Strokovne kompetence - Strokovna znanja na svojem področju letno izpopolnujem z udeležbo na različnih seminarjih in izobraževanjih.

Digitalne kompetence

SAMOVREDNOTENJE				
Obdelava informacij	Komunikacija	Ustvarjanje vsebin	Varnost	Reševanje problemov
Usposobljeni uporabnik	Usposobljeni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik

[Digitalne kompetence - Samooceniševalna lestvica](#)

Vozniško dovoljenje B