

## Validarea metodei analitice (HPLC), utilizata pentru identificarea si dozarea ingredientului farmaceutic activ, Tylosin tartrat pentru uz veterinar si a produsului finit Tilodem 50, puldere hidrosolubila

### Analytical method (HPLC), validation used for identification and assay of the pharmaceutical active ingredient, Tylosin tartrate for veterinary use and its finite product Tilodem 50, hydrosoluble powder

Maria Neagu  
SC DELOS IMPEX '96 SRL

#### Rezumat

In cadrul SC DELOS IMPEX '96 SRL calitatea ingredientul farmaceutic activ (API) si al produsului finit Tilodem 50 – pulbere hidrosolubila, se face in conformitate cu Farmacopeia Europeana editia in vigoare.

Metoda de analiza folosita (HPLC) in acest scop este metoda compendială „Tylosin tartrate for veterinary use” din ediția curentă a *EurPh*. și reprezintă o variantă dezvoltata si validată „in house”.

Parametrii inclusi in metodologia de validare a metodei cromatografice sunt urmatorii : Selectivitatea, Liniaritatea. Domeniul de liniaritate, Limita de detectie, Limita de cuantificare, Precizia, Exactitatea, Robustetea, Stabilitatea solutiilor si Testarea sistemului cromatografic.

Conform Farmacopeei Europene, acest ingredient farmaceutic activ, este conform, din punct de vedere calitativ, daca contine Tylosin A – minim 80% si suma de Tylosin A, B, C, D – minim 95%.

Identificarea si dozarea fiecarui component in parte (Tylosin A, B, C, D) este posibila printr-o separare cromatografica – HPLC. Validarea acestei metode analitice este prezentata in continuare.

**Cuvinte cheie:** Tylosin tartrat a.u.v., validare (HPLC), identificare, dozare.

#### Abstract

In SC DELOS IMPEX '96 SRL the quality of the active pharmaceutical ingredient (API) for the finite product Tilodem 50 - hydrosoluble powder was accomplished in the respect of last European Pharmacopoeia.

The method for analysis used in this purpose was the compendial method „Tylosin tartrate for veterinary use” in *EurPh*. in vigour edition and represent a variant developed and validation „in house”.

The parameters which was included in the methodology validation for chromatographic method are the followings: Selectivity, Linearity, Linearity range, Detection and Quantification limits, Precision, Repeatability (intra day), Inter-Day Reproducibility, Accuracy, Robustness, Solutions' stability and System suitability.

According to the European Pharmacopoeia, the active pharmaceutical ingredient is consistent, in terms of quality, if it contains Tylosin A - minimum 80% and the amount of Tylosin A, B, C, D, at minimum 95%

Identification and determination of each component separately (Tylosin A, B, C, D) is possible by chromatographic separation - HPLC. Validation of analytical methods is presented below.

**Key words:** Tylosin tartrate a.u.v., validation (HPLC), identification, assay.

#### Introducere

SC DELOS IMPEX '96 produce si comercializeaza *Tilodem 50* pulbere hidrosolubila, care contine drept ingredient farmaceutic activ (API), Tylosin tartrat pentru uz veterinar. Acesta este un amestec continand in:

- Tylosin A- (4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-15-[[[(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-b-D-allopyranosyl)-oxy]methyl]-6-[[3,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-C-methyl-a-L-ribo-hexopyranosyl)-3-(dimethyl-amino)-b-D-glucopyranosyl]-oxy]-16-ethyl-4-hydroxy-5,9,13-trimethyl 7-(2-oxoethyl)oxacyclohexadeca11,13-diene-2,10-dione(tylosin A, tartrate  $M_r$  1982)
- Tylosin B (desmycosin, tartrate  $M_r$  1694)
- Tylosin C (macrocin, tartrate  $M_r$  1954)
- Tylosin D (relomycin, tartrate  $M_r$  1986)

Determinarea compozitiei Tylosinului fosfat este foarte importanta deoarece Tylosinul A trebuie sa reprezinte minim 80%, si suma de Tylosin A, B, C, D trebuie sa fie minim 95%, pentru ca substanta activa sa fie corespunzatoare din punct de vedere calitativ (conform Farmacopeiei Europene, editia in vigoare). Identificarea si dozarea celor patru componente ale Tylosinului fosfat este posibila, folosind o metoda HPLC (determinarea nu poate fi efectuata microbiologic).

Dozarea si identificarea, in acest caz, nu poate fi efectuata microbiologic.

Potentia acestui ingredient farmaceutic activ, se efectueaza microbiologic si nu poate fi mai mica de 800 UI/mg (raportat la substanta activa uscata).

In Figura 1 e prezentata cromatograma obtinuta in urma injectarii solutiei de identificare a picurilor de Tylosin A, B, C, D.

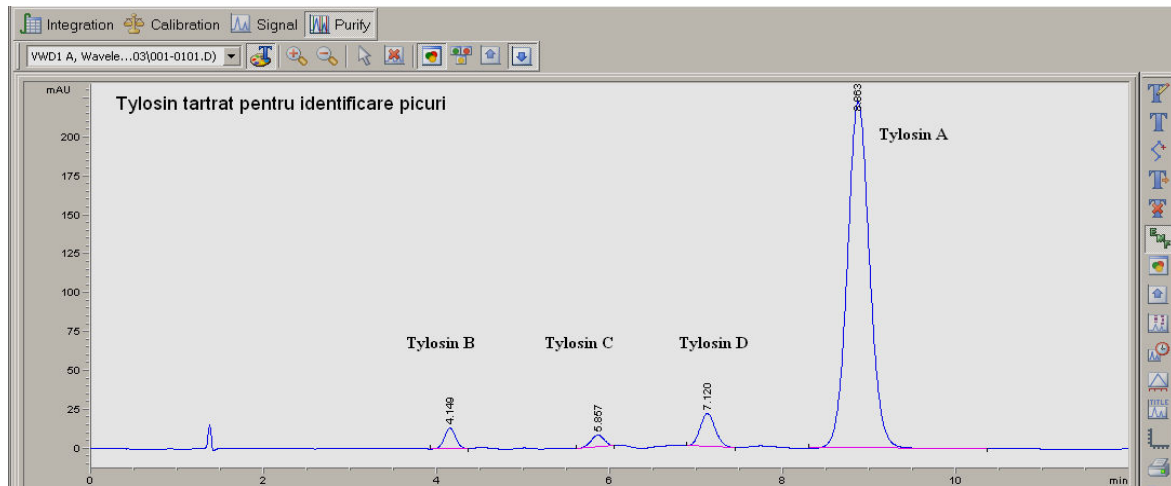


Figura 1. Cromatograma obtinuta in urma injectarii solutiei de identificare a picurilor de Tylosin A, B, C, D.

**MATERIALE ȘI METODE**

Aceasta metoda analitica este metoda compendială „Tylosin tartrate for veterinary use” din ediția curentă a European Pharmacopoeia și reprezintă o variantă dezvoltată și validată „in house”.

Metoda analitica, HPLC (cromatografie de lichide de inalta presiune), folosita in cadrul SC DELOS IMPEX '96 SRL, pentru identificarea si dozarea Tylosinului fosfat pentru uz veterinar (Tylosin A, Tylosin B, Tylosin C, Tylosin D) va fi prezentata in cele ce urmeaza. Parametrii inclusi in metodologia de validare a metodei cromatografice sunt:

1. **Selectivitatea.**
2. **Liniaritatea.**  
 Domeniul de liniaritate.  
 Limita de detectie.  
 Limita de cuantificare.
3. **Precizia.**
4. **Exactitatea.**
5. **Robustetea.**
6. **Stabilitatea solutiilor.**

**Testarea sistemului cromatografic**

**Parametrii operationali ai metodei cromatografice**

**Substanțe si materiale de referința**

- Tylosin tartrat pt. identificarea peak-ului CRS, lot 1 EurPh;
- Tylosin CRS, lot FOD333, EurPh;
- Tylosin D CRS, lot 2, EurPh.

**Reactivi, solvenți, soluții**

- Acetonitril gradient grade for liquid chromatography, Merck, lot I462630 847

- Perclorat de sodiu R, Merck, lot A 944064 951;
  - Hidroxid de sodiu, Merck, lot B0297669 847
  - Acid clorhidric fumans 37%, Merck, lot K39420317
  - Solutia apa oxigenata 3%;
  - Apa de uz cromatografic rezistivitate minima 18,2 MΩ, continut total în substante organice TOC max. 30ppb (apa ultra-purificata).
  - Solutia perclorat de sodiu, component al fazei mobile;
- Parametrii operationali ai metodei cromatografice sunt prezentati in Tabelul 1.

**Tabelul 1**

**Parametrii operationali ai metodei cromatografice**

<b>Coloană cromatografică:</b>	octadecylsilyl silica gel for chromatography R, 150mm L x 4,6mm i.d. x 5µm d.p.				
<b>Temperatura coloanei:</b>	35 °C				
<b>Volumul de injecție:</b>	20 µL				
<b>Eluție:</b>	Izocratic				
<b>Compoziția fazei mobile:</b>	Solvent A: Solutie perclorat de sodiu 200 g/L, ajustat la pH=2,5 cu HCL. Solvent B: Acetonitril R				
<b>Fază mobilă:</b>	<table border="1"> <tr> <td>% Solvent A</td> <td>% Solvent B</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </table>	% Solvent A	% Solvent B	60	40
% Solvent A	% Solvent B				
60	40				
<b>Debit:</b>	Raportul solventilor: 1 mL/min				
<b>Detectie</b>	UV				
<b>Lungime de undă:</b>	290				

**Echipamente**

**Sistem cromatografic (comun tuturor determinărilor)**

<b>Agilent 1200 modulele:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cabinet solvenți;</li> <li>• Pompa cuatenara de inalta presiune G 1354A cu degazor G 1379B, seria 1200;</li> <li>• Termostat pt. coloana G 1316A, seria 1200;</li> <li>• Detector spectrometric (VWD) G 1314B, seria 1200, sau similar;</li> <li>• Autosampler G 1329A;</li> <li>• Termostat autosampler G1330B, seria 1200;</li> </ul>
-------------------------------	--

## Descrierea metodei

Metoda propusa pentru validare are ca punct de plecare metoda compendială „Tylosin tartrate for veterinary use” din ediția curentă a *European Pharmacopoeia*.

Dozarea *tylosinului tartrat* se realizează prin metoda cromatografică propusă spre validare ai cărei parametri operaționali sunt prezentați în Tabelul 1.

Identificarea substanței active din produsul Tilodem 50 - *pulbere hidrosolubila* se bazează pe:

- Compararea timpului de retenție corespunzător picurilor de *tylosin tartrat* din cromatogramele rezultate în urma injectării Soluției test - *proba de dozare* cu timpul de retenție al picurilor de *tylosinului tartrat*, corespunzătoare *Soluției de referință (a)* - *Soluția de identificare a picurilor (CRS)*.

Concentrațiile probelor utilizate sunt prezentate în Tabelul 2

**Tabel 2**

Concentrațiile probelor utilizate pt. identificarea și dozarea Tylosinului din Tilodem 50 și din materia primă de Tylosin

Tipul determinării	Tipul probei	Concentrație probă (ppm)
Identificare substanță activă	Soluție identificare picuri - Soluție referință (a)	200
	Soluție etalon – Soluția de referință (b)	Tylosin tartrat 200 Tylosin D CRS 200
	Soluție probă – Soluția test	200
	Soluție etalon – Soluția de referință (b)	Tylosin tartrat 200 Tylosin D CRS 200
Dozarea substanței active	Soluție probă – Soluția test	200

Soluțiile folosite pentru identificarea substanței active sunt aceleași cu cele folosite la dozarea acesteia.

## Validarea metodei analitice

### Selectivitatea

**Scopul procedurii:** Se dorește să se demonstreze că metoda cromatografică propusă are capacitatea de a separa:

1) Substanța activă în raport cu impuritățile înrudite chimic;

2) Substanța activă și impuritățile înrudite chimic în raport cu excipienții eventual coextrași în cadrul procesului de preparare a probelor.

3) Substanța activă în raport cu impuritățile înrudite chimic rezultate prin degradarea acesteia.

Pentru a putea fi evaluată capacitatea metodei de a separa substanța activă în raport cu produșii de degradare ai acesteia au fost alese procese fizico-chimice care generează degradarea substanței active.

Procesele de degradare alese sunt: **stres oxidant, stres alcalin, stres acid, stres termic și iradierea cu lumină UV** la lungimea de undă de  $\lambda=253,7$  nm (Lampa UV-LBA e 30W, seria 7664-Biocomp).

## Prepararea probelor

### Soluția de referință (a):

Intr-un balon cotat de 10 ml, de clasa de precizie A, se aduc 2 mg de Tylosin fosfat pentru identificarea picurilor (continând Tylosin A, B, C, D), se dizolva și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția de referință (b):

Intr-un balon cotat de 10 ml, de clasa de precizie A, se aduc 2 mg de Tylosin CRS și 2 mg de Tylosin D CRS, se dizolva și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția test:

Intr-un balon cotat de 100 ml, de clasa de precizie A se cantareasc 80 mg de Tilodem 50 pulbere hidrosolubila, se dizolva și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția blanc:

Soluția conține amestecul reconstituit de excipienți (placebo) utilizați în formularea farmaceutică a produsului farmaceutic Tilodem 50 pulbere hidrosolubila.

20 mg Lactoza monohidrat se dizolva și se completează la 100 ml cu Solvent probe.

### Soluția de stres 1

5 ml din Soluția test, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția de stres 2

5 ml din Soluția test, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adaugă 1 ml NaOH 0,1 M și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția de stres 3

5 ml din Soluția test, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adaugă 1 ml NaOH 1 M și se completează la semn cu Solvent probe.

### Soluția de stres 4

5 ml din Soluția test, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adaugă 1 ml HCl 0,1 M și se completează la semn cu Solvent probe.

**Solutia de stres 5**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adauga 1 ml HCl 1 M si se completeaza la semn cu Solvent probe.

**Solutia de stres 6**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adauga 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% si se completeaza la semn cu Solvent probe.

**Solutia de stres 7**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se adauga 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% si se completeaza la semn cu Solvent probe.

**Solutia de stres 8**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se completeaza la semn cu Solvent probe.

Solutia este tinuta in etuva, la 40°C, 3 ore.

**Solutia de stres 9**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se completeaza la semn cu Solvent probe. Solutia este tinuta in etuva, la 40°C, 24 ore.

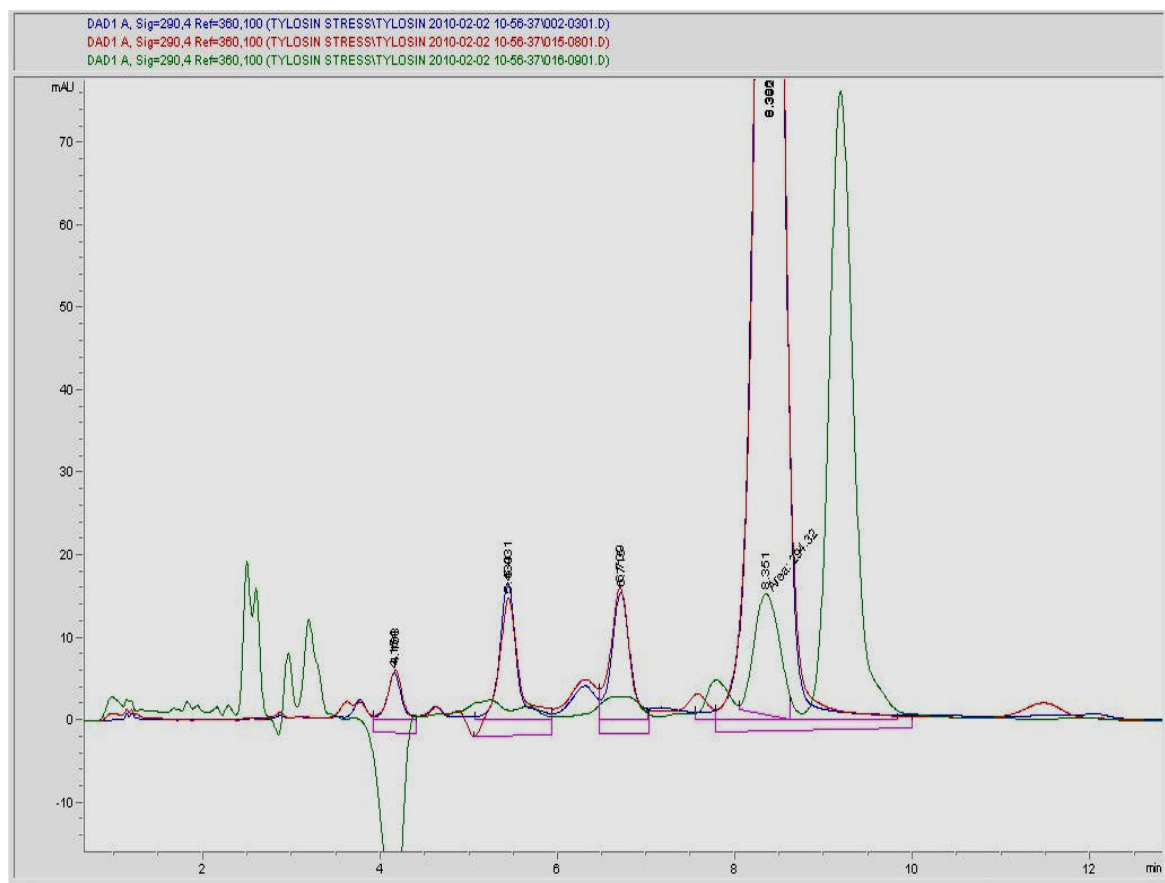
**Solutia de stres 10**

5 ml din **Solutia test**, se aduc într-un balon cotat, clasa de precizie A, de 10 ml, se completeaza la semn cu Solvent probe. Solutia obtinuta se supune iradierii cu lumina fluorescanta timp de 72 de ore.

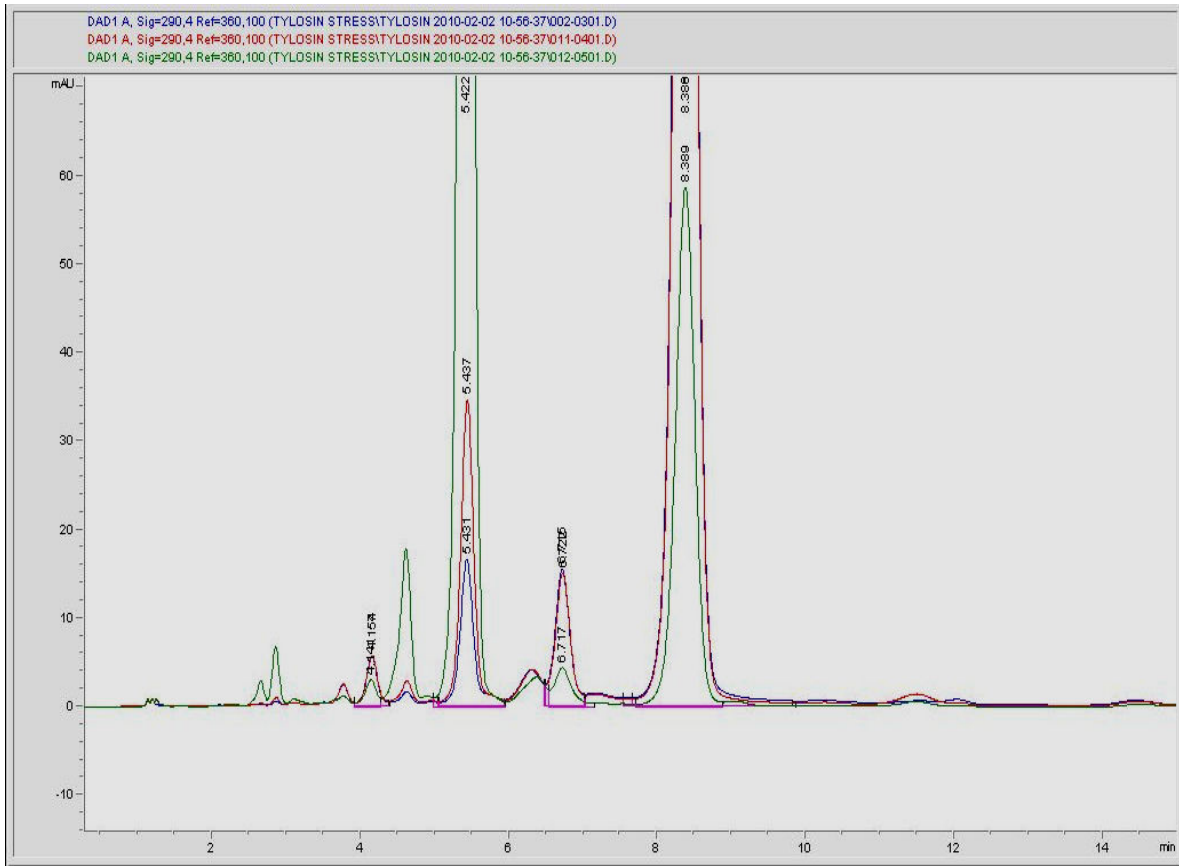
**Mod de lucru**

Se injecteaza in sistemul cromatografic toate cele zece **Solutii de stres**.

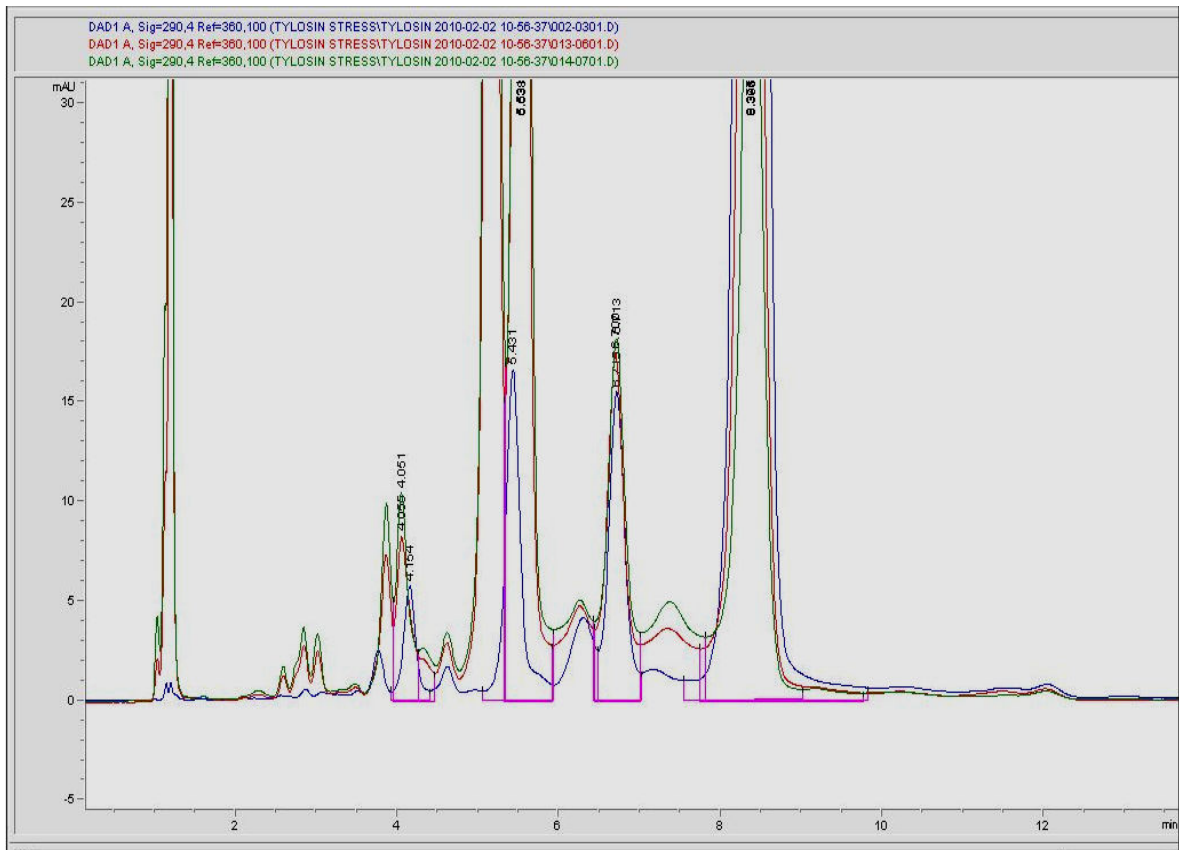
Suprapunerea cromatogramele obtinute in urma injectarii acestor solutii este prezentata in figurile 2, 3, 4, 5.



**Figura 2: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii Solutiei test si a Solutiei stres 2 si 3 (stres in mediu bazic).**



**Figura 3: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii Solutiei test si a Solutiei stres 4 si 5 (in mediu acid).**



**Figura 4: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii Solutiei test si a Solutiei stres 6 si 7 (in mediu oxidant).**

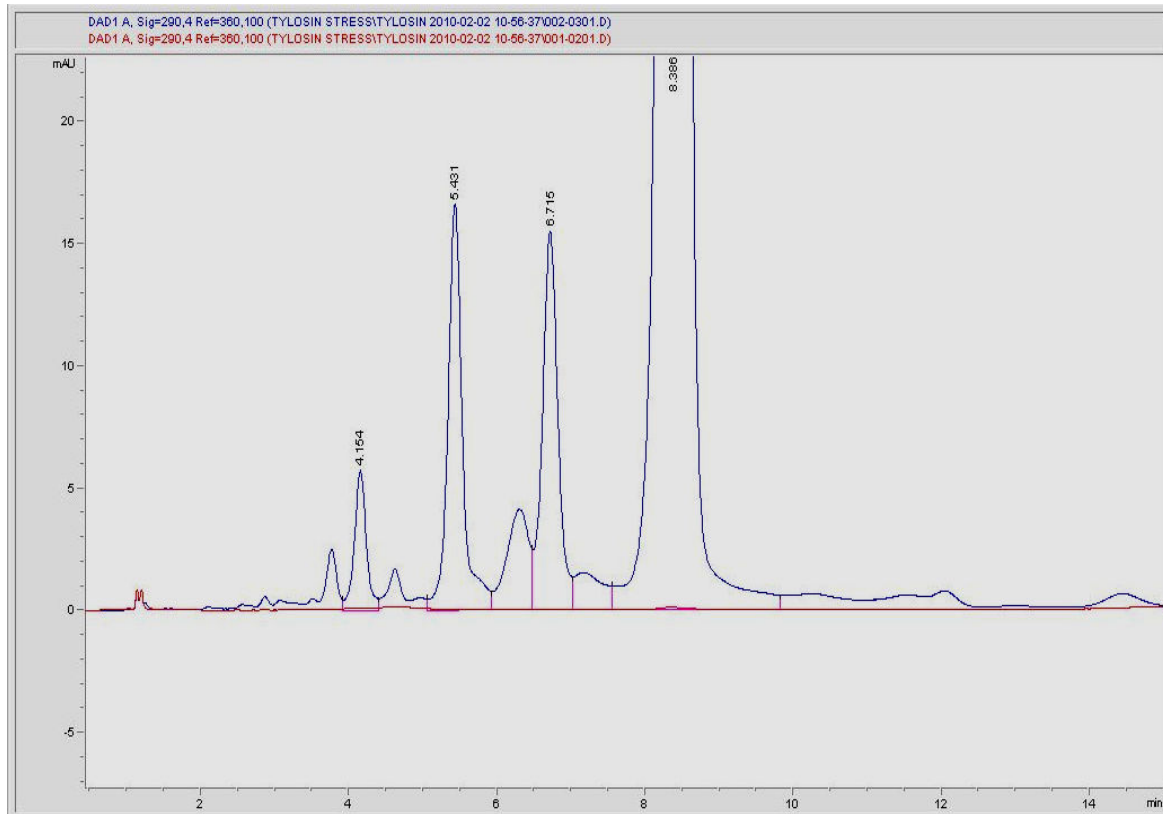


Figura 5: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii *Solutiei test* si a *Solutiei blanc (Placebo)*.

In Tabelul 3 este prezentata variatia ariilor picurilor de Tylosin (A, B, C, D), dupa ce solutiile continand produsul finit *TILODEM 50 pulbere hidrosolubila*, a fost supus unor conditii diverse de stres.

**Tabelul 3**

Variatia ariilor peak de tylosin A, B, C, D, din Tilodem 50

Conditie de stres	% Tylosin C	% Tylosin B	% Tylosin D	% Tylosin A
HCL 0,1 M	101,3	206,7	97,9	97,6
HCL 1 M	49,3	1670,9	31,0	0
NaOH 0,1 M	189,2	109,4	110,0	91,8
NaOH 1 M	0	0	34,8	35,3
1 mL H2O2 3%	188,6	569,5	100,8	41,8
2 mL H2O2 3%	185,6	727,5	99,9	21,2
Stress termic	83,0	88,0	82,9	82,4
Stress fotochimic	42,8	44,7	42,9	42,5

#### Criteria de admisibilitate:

Substanța activă trebuie sa fie separata în raport cu impuritățile înrudite chimic rezultate in procesul de fabricatie al acesteia, cu excipienții eventual coextrași în cadrul procesului de preparare a probelor, cu impuritățile înrudite chimic rezultate prin degradarea acesteia.

#### CONCLUZII

Metoda propusă este selectivă deoarece are capacitatea de a separa picurile

corespunzătoare Tylosinului (A, B, C, D) în raport cu picurile celorlalte impurități înrudite chimic. De asemenea, excipienții utilizați în formularea farmaceutică nu produc picuri cromatografice care să interfere cu picurile de Tylosin (A, B, C, D).

Produșii de degradare ai Tylosinului (A, B, C, D) în condiții de stres fizic sau chimic se separă, folosind metoda HPLC propusa, în raport cu picurile de Tylosin (A, B, C, D).

#### 3.2. Liniaritatea, domeniul de liniaritate, limitele de detecție și de cuantificare

Scopul procedurii: se dorește să se demonstreze că există o relație liniară între concentrațiile soluțiilor analitului de interes care se injectează în coloana cromatografică și ariile picurilor generate în cromatogramele corespunzătoare.

Se dorește să se determine domeniul de concentrații pentru care relația liniară amintită mai sus își păstrează valabilitatea.

Se urmărește determinarea concentrației minime de analit în soluțiile probă care permite determinarea cantitativă a acestora, cu un grad impus de certitudine (limită de cuantificare sau LOQ).

De asemenea se dorește determinarea acelei concentrații de analit care generează

un semnal distinct în raport cu zgomotul de fond, fără însă a permite dozarea exactă a acestuia (limita de detecție sau LOD).

**Prepararea probelor**

**Solutie stoc - 400 ppm:**

Intr-un balon cotate, clasa de precizie A, de 100 ml se aduc 80 mg de Tilodem 50 - pulbere hidrosolubila, se dizolva si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Solutie liniaritate 1 - 160 ppm:**

4 ml din Solutia stoc se aduc intr-un balon cotate, de 10 ml, de clasa de precizie A, si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Solutie liniaritate 2 - 180 ppm:**

4,5 ml din Solutia stoc se aduc intr-un balon cotate, de 10 ml, clasa de precizie A, si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Solutie liniaritate 3 - 200 ppm:**

5 ml din Solutia stoc se aduc intr-un balon cotate de 10 ml, de clasa de precizie A si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Solutie liniaritate 4 - 220 ppm:**

5,5 ml din Solutia stoc se aduc intr-un balon cotate de 10 ml, de clasa de precizie A, si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Solutie liniaritate 5 - 240 ppm:**

6 ml din Solutia stoc se aduc intr-un balon cotate de 10 ml, de clasa de precizie A, si se completeaza la semn cu Solvent de probe.

**Mod de lucru**

Se injecteaza de trei ori, fiecare din *Solutiile de liniaritate (1-5)* preparate mai sus in ordinea cresterii concentratiei.

In cromatogramele obtinute pentru fiecare solutie analizata, se integreaza picurile corespunzatoare Tylosinului A, B, C, D, se calculeaza valoarea medie a ariei picurilor, abaterea standard si abaterea relativa standard (%), folosind urmatoarele formule de calcul:

$$\bar{A}_p = \frac{\sum_{i=1}^n A_p^i}{n} \text{ - Media}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_p^i - \bar{A}_p)^2}{(n - 1)}} \text{ - Abaterea standard}$$

$$\text{RSD \%} = s \cdot 100 / \bar{A}_p \text{ - Abaterea relativa standard}$$

Se va trasa grafic dependenta nominala a solutiilor injectate (pe abscisa, exprimata in µg/mL sau ppm) si valoarea medie a ariilor peak-urilor integrate (pe ordonata, exprimata in mAU\*s).

Pentru analitul considerat, folosind relatiile de mai jos, se va calcula ecuatia dreptei de regresie liniara, coeficientul de corelatie al regresiei, intervalele normale de variatie pentru valorile pantei si ordonatei la origine, precum si limita de cuantificare, determinata pentru un nivel de certitudine de 95 % si n-2 grade de libertate (originea axelor de coordonate va fi considerata primul cuplu de valori al regresiei liniare). Se calculeaza urmatoorii parametrii statistici din datele de regresie liniara, folosind urmatoarele formule:

**Covarianta:**

$$S_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{n - 1}$$

**Abaterea standard pt. populatia valorilor lui x:**

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

**Abaterea standard pt. populatia valorilor lui y:**

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n - 1}}$$

**Coeficientul de corelatie:**

$$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{S_x \cdot S_y}$$

**Panta:**

$$B = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

**Ordonata la origine:**

$$A = \frac{\sum y}{n} - B \cdot \frac{\sum x}{n}$$

**Abaterea standard pentru intreaga populatie a valorilor:**

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum y^2 - A \sum y - B \sum xy}{n - 2}}$$

**Abaterea standard corespunzatoare pantei dreptei de regresie:**

$$S_b = \sqrt{\frac{n \cdot S_0^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}}$$

**Abaterea standard pentru ordonata la origine:**

$$S_a = \sqrt{\frac{S_0^2 \sum x^2}{n}}$$

**Intervalul de variatie pentru A:**

$$A \pm t \cdot S_a$$

**Intervalul de variatie pentru B:**

$$B \pm t \cdot S_b$$

**Limita de identificare:**

$$X_i = \frac{2t (S_a + \frac{\sum x}{n} \cdot S_b)}{b + t \cdot S_b}$$

**Unde:**

- x = valoarea corespunzatoare concentratiei analitului de interes µg/ml sau ppm);
- y = valoarea corespunzatoare ariei medii a picurilor analitului de interes, integrate in cromatogramele rezultate in urma a cate trei injectii succesive ale fiecarei Solutii de liniaritate (1-5).
- t = coeficientul "Student" (pentru un anumit nivel de certitudine P% si un numar v de grade de libertate), v = numarul gradelor de libertate (v = n-2), n = numarul de perechi de date experimentale (concentratie - arie medie).

**Conditii de admisibilitate**

Abaterea relativă standard permisă pentru ariile de pic în cazul injectării aceleiași soluții de trei ori este de cel mult 0,62% (conform European Pharmacopoeia).

Coeficientul de corelație  $r_{xy}$  ce caracterizează dreapta de regresie determinată trebuie să fie mai mare sau cel puțin egal cu 0,9990.

**REZULTATE SI CONCLUZII**

În Tabelul 4 sunt prezentate deviațiile relative standard calculate pentru ariile de Tylosin A, B, C, D, obținute pe trei injecții consecutive ale celor cinci Soluții de liniaritate (1-5), în ordinea de elutie.

Parametrii statistici, calculați pentru *Tylosin C* din *Soluțiile de liniaritate* (1-5) sunt prezentați în Tabelul 5.

Deviațiile relative standard calculate pentru ariile de Tylosin A, B, C, D din soluții de liniaritate 1-5. **Tabel 4**

Concentratia solutiei	Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
	90,99	93,80	204,20	3166,87
	91,25	93,70	204,47	3164,48
<b>160 ppm</b>	91,68	95,17	204,64	3165,36
Arie medie	91,31	94,22	204,44	3165,57
Deviatia standard	0,35	0,82	0,22	1,21
Deviatia relativa standard (%)	0,38	0,87	0,11	0,04
	103,09	108,40	233,14	3620,14
	103,31	108,52	233,71	3616,68
<b>180 ppm</b>	103,45	109,62	235,90	3653,90
Arie medie	103,28	108,85	234,25	3630,24
Deviatia standard	0,18	0,67	1,46	20,56
Deviatia relativa standard (%)	0,18	0,62	0,62	0,57
	111,61	118,39	252,09	3933,76
	111,85	118,72	252,52	3949,29
<b>200 ppm</b>	110,92	117,43	251,38	3908,90
Arie medie	111,46	118,18	252,00	3930,65
Deviatia standard	0,48	0,67	0,58	20,37
Deviatia relativa standard (%)	0,43	0,57	0,23	0,52
	123,83	132,84	280,10	4378,14
	124,28	133,20	281,38	4395,59
<b>220 ppm</b>	123,24	132,67	279,38	4361,58
Arie medie	123,78	132,90	280,29	4378,44
Deviatia standard	0,52	0,27	1,01	17,01
Deviatia relativa standard (%)	0,42	0,20	0,36	0,39
	133,27	143,47	300,89	4335,39
	133,76	143,56	303,87	4751,63
<b>240 ppm</b>	133,34	142,96	301,65	4736,55
Arie medie	133,46	143,33	302,14	4741,19
Deviatia standard	0,27	0,32	1,55	9,06
Deviatia relativa standard (%)	0,20	0,23	0,51	0,19

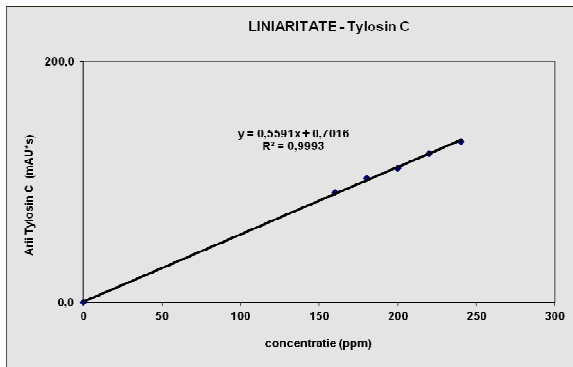
Parametrii statistici, calculati pentru *Tylosin C* din *Soluțiile de liniaritate* (1-5)

**Tabel 5**

<b>B</b>	0.559	panta	
<b>A</b>	0.7016	ordonata la origine	
<b>rx<sub>y</sub></b>	0.999625	coeficientul de corelatie	
<b>S<sub>xy</sub></b>	4174.47		
<b>S<sub>x</sub></b>	86.41		
<b>S<sub>y</sub></b>	48.33		
<b>So<sup>2</sup></b>	2.2	dispersia intregii populatii a valorilor y	
<b>So</b>	1.5	abaterea standard ptr.intreaga populatie a valorilor y	
<b>Sb<sup>2</sup></b>	0.0	dispersia pantei drepte de regresie	
<b>Sb</b>	0.0	abaterea standard corespunzatoare pantei drepte de regresie	
<b>tsb</b>	0.0	domeniul de variatie a lui B	
<b>Sa<sup>2</sup></b>	2.0	dispersia ordonatei la origine	
<b>Sa</b>	1.4115	abaterea standard ptr. Ord. La origine	
<b>tsa</b>	3.01	domeniul de variatie a lui A	
<b>Xi</b>	19.3650	limita de cuantificare	LOQ
	5.8095	limita de detectie	LOD

În Figura 6 este prezentată dependența concentrației de substanță activă din proba dintre aria peak-ului (mAU\*s) de *Tylosin C* și (ppm).

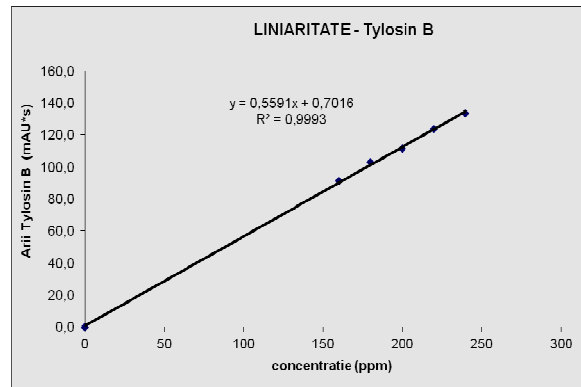




**Figura 6** Dependenta dintre aria peak-ului (mAU\*s) de Tylosin C si concentratia substantei active din proba (ppm)

Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin B din *Solutiile de liniaritate* (1-5) sunt prezentati in Tabelul 6.

In Figura 7 este prezentata dependenta dintre aria picului (mAU\*s) de Tylosin B si concentratia de substanta activa din proba (ppm).



**Figura 7** Dependenta dintre aria picului (mAU\*s) de Tylosin B si concentratia de substanta activa din proba (ppm)

Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin D din *Solutiile de liniaritate* (1-5) sunt prezentati in Tabelul 7.

**Tabelul 6**

**Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin B din Solutiile de liniaritate (1-5)**

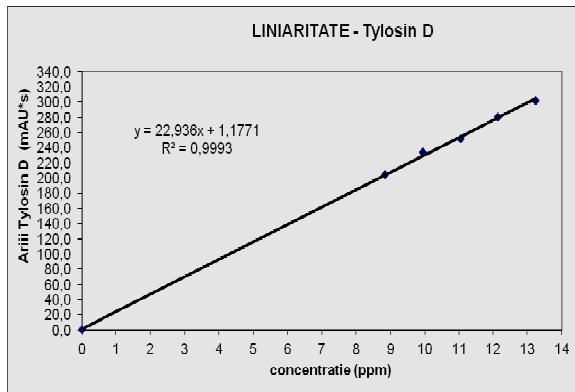
<b>B</b>	0.599	panta	
<b>A</b>	-0.2477	ordonata la origine	
<b>rx<sub>y</sub></b>	0.999725	coeficientul de corelatie	
<b>S<sub>xy</sub></b>	4472.28		
<b>S<sub>x</sub></b>	86.41		
<b>S<sub>y</sub></b>	51.77		
<b>So<sup>2</sup></b>	1.8	dispersia intregii populatii a valorilor y	
<b>So</b>	1.4	abaterea standard ptr.intreaga populatie a valorilor y	
<b>Sb<sup>2</sup></b>	0.0	dispersia pantei drepte de regresie	
<b>Sb</b>	0.0	abaterea standard corespunzatoare pantei drepte de regresie	
<b>tsb</b>	0.0	domeniul de variatie a lui B	
<b>Sa<sup>2</sup></b>	1.7	dispersia ordonatei la origine	
<b>Sa</b>	1.2948	abaterea standard ptr. Ord. La origine	
<b>t<sub>sa</sub></b>	2.76	domeniul de variatie a lui A	
<b>Xi</b>	16.7141	Limita de cuantificare	LOQ
	5.0142	Limita de detectie	LOD

**Tabelul 7**

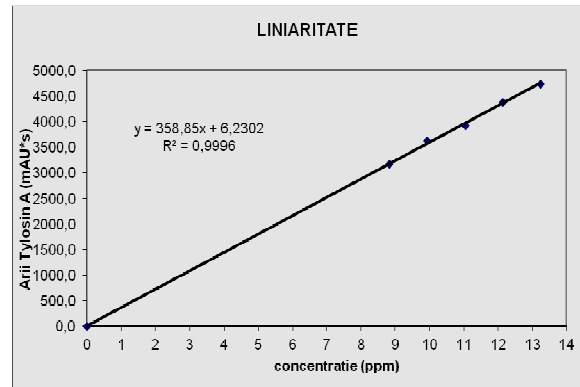
**Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin D din Solutiile de liniaritate (1-5)**

<b>B=</b>	1.266	panta	
<b>A=</b>	1.1771	ordonata la origine	
<b>rx<sub>y</sub></b>	0.999640	coeficientul de corelatie	
<b>S<sub>xy</sub></b>	9453.23		
<b>S<sub>x</sub></b>	86.41		
<b>S<sub>y</sub></b>	109.44		
<b>So<sup>2</sup></b>	10.8	dispersia intregii populatii a valorilor y	
<b>So</b>	3.3	abaterea standard ptr.intreaga populatie a valorilor y	
<b>Sb<sup>2</sup></b>	0.0	dispersia pantei drepte de regresie	
<b>Sb</b>	0.0	abaterea standard corespunzatoare pantei drepte de regresie	
<b>tsb</b>	0.0	domeniul de variatie a lui B	
<b>Sa<sup>2</sup></b>	9.8	dispersia ordonatei la origine	
<b>Sa</b>	3.1335	abaterea standard ptr. Ord. La origine	
<b>t<sub>sa</sub></b>	6.68	domeniul de variatie a lui A	
<b>Xi</b>	19.0045	limita de cuantificare	LOQ
	5.7014	limita de detectie	LOD

In Figura 8 este prezentata dependenta concentratia de substanta activa din proba (ppm) dintre aria peak-ului (mAU\*s) de Tylosin D si (ppm).



**Figura 8.** Dependenta dintre aria peak-ului (mAU\*s) de Tylosin D si concentratia de substanta activa din proba (ppm)



**Figura 9.** Dependenta dintre aria peak-ului (mAU\*s) de Tylosin A si concentratia de substanta activa din proba (ppm).

In Figura 9 este prezentata dependenta dintre aria peak-ului (mAU\*s) de Tylosin A si concentratia de substanta activa din proba.

Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin A din *Solutiile de liniaritate* (1-5) sunt prezentati in Tabelul 8:

**Tabelul 8**

**Parametrii statistici, calculati pentru Tylosin A din Solutiile de liniaritate (1-5)**

<b>B=</b>	19.809	panta	
<b>A=</b>	6.2302	ordonata la origine	
<b>rx<sub>y</sub></b>	0.999812	coeficientul de corelatie	
<b>Sxy</b>	147905.03		
<b>Sx</b>	86.41		
<b>Sy</b>	1711.99		
<b>So<sup>2</sup></b>	1379.6	dispersia intregii populatii a valorilor y	
<b>So</b>	37.1	abaterea standard ptr.intreaga populatie a valorilor y	
<b>Sb<sup>2</sup></b>	0.0	dispersia pantei drepte de regresie	
<b>Sb</b>	0.2	abaterea standard corespunzatoare pantei drepte de regresie	
<b>tsb</b>	0.4	domeniul de variatie a lui B	
<b>Sa<sup>2</sup></b>	1256.5	dispersia ordonatei la origine	
<b>Sa</b>	35.4467	abaterea standard ptr. Ord. La origine	
<b>t<sub>sa</sub></b>	75.57	domeniul de variatie a lui A	
<b>X<sub>i</sub></b>	13.9497	limita de cuantificare	LOQ
	4.1849	limita de detectie	LOD

### CONCLUZII

Asa cum rezulta din tabelele prezentate mai sus, deviatile (abaterele) relative standard pentru trei injectii consecutive ale fiecarei solutii de liniaritate in parte nu sunt mai mari de 0,62%.

Domeniul de concentratii in substanta activa, pe care s-a verificat liniaritatea, a fost intervalul 160 ppm – 240 ppm

Pe intervalul studiat metoda cromatografica propusa prezinta liniaritati intre ariile peak-urilor cromatografice si concentratia de analit din proba, caracterizate de coeficienti de corelare a datelor de 0,999.

Limitele de detectie (LOD) respectiv limitele de cuantificare (LOQ) rezultate din calculele statistice au fost prezentate mai sus.

Conform *European Pharmacopoeia*:

- limita de detectie (LOD) corespunde unui raport:  $S / N \geq 3$ ,
- conform ghidului ICH acesta este S/N

= 2 - 3 si

- pentru limita de cuantificare (LOQ), unui raport:  $S / N \geq 10$ .

### Precizia

**Scopul procedurii:** Se dorește să se demonstreze că aplicarea metodei, în mod repetat, asupra aceleiași probe, generează rezultate similare. Deoarece proba este supusă analizei în cadrul aceleiași sesiuni experimentale, procedura este cunoscută și sub denumirea de *Repetabilitate*.

Se dorește, de asemenea, să se demonstreze că aplicarea metodei, în mod repetat, la intervale de cel puțin o zi între două încercări succesive, asupra unor probe identice, genereaza rezultate similare.

Este în general indicată realizarea determinărilor de către analiști diferiți. Întreaga procedură se realizează în cadrul unor sesiuni experimentale diferite și este cunoscută și sub denumirea de *Reproductibilitate intermediară*.

### Prepararea probelor

#### Solutia test - 200 ppm tylosin tartrat

Intr-un balon cotate de 100 ml, clasa de precizie A, se aduc 40 mg de *Tilodem 50* – pulbere hidrosolubila, se dizolva si se completeaza la semn cu *Solvent probe*.

#### Modul de lucru

Se injectează de șase ori consecutiv *Solutia test*. În cromatogramele obținute, se integrează peak-urile corespunzătoare *Tylosinului*. Se calculează abaterea standard

și abaterea relativă standard (%) pentru aria fiecărui pic in parte.

#### Condiții de admisibilitate

Abaterea relativă standard calculată pentru ariile de pic obținute prin injectarea *Solutiei test* trebuie sa fie de maxim 2%.

#### Repetabilitatea

In tabelul 9 sunt prezentate ariile picurilor obținute prin injectarea *Solutiei test*, deviatia standard si deviatia relativa standard pentru cele șase injectii.

Tabelul 9

Ariile peak-urilor obținute prin injectarea *Solutiei test*, deviatia standard si deviatia relativa standard pentru cele șase injectii

Nr. injectie	Arie Tylosin C	Arie Tylosin B	Arie Tylosin D	Arie Tylosin A
1	112,94	119,46	253,15	3954,98
2	112,75	118,86	252,95	3944,74
3	113,11	118,52	251,86	3945,50
4	113,36	119,13	253,54	3946,76
5	113,32	119,65	253,31	3949,24
6	113,55	119,49	253,87	3955,56
Medie	113,17	119,19	253,11	3949,46
Deviatie standard	0,30	0,43	0,69	4,75
Deviatie relativa standard (%)	0,26	0,36	0,27	0,12

In Figura 10 este reprezentata variatia ariilor peak-urilor de *Tylosin C*, *Tylosin B*, *Tylosin D*, *Tylosin A*, pentru cele șase injectii de *Solutie test*.

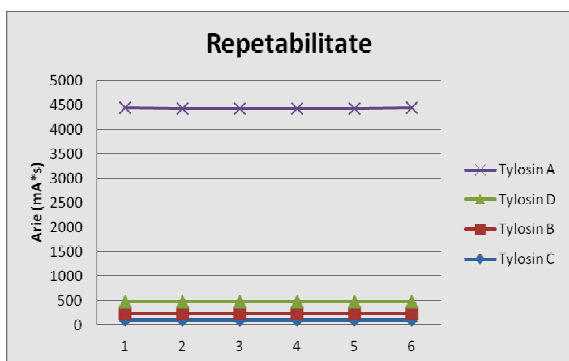


Figura 10. Variatia ariilor peak-urilor de *Tylosin C*, *Tylosin B*, *Tylosin D*, *Tylosin A*,

Din datele experimentale prezentate mai sus rezulta ca metoda este *Reproductibila*.

#### Reproductibilitate intermediară

În cadrul unei sesiuni experimentale se injectează de șase ori consecutiv, *Solutia test*. În cromatogramele obținute se integrează picurile corespunzătoare *Tylosinului*. Se calculează abaterea standard și abaterea relativă standard (%) pentru ariile fiecărui pic de Tylosin (A, B, C, D) din cromatogramele *Solutiei test*.

In Tabelul 10 sunt prezentate ariile picurilor obținute prin injectarea *Solutiei test*, deviatia (abaterea) standard si deviatia relativa standard pentru cele șase injectii.

Tabelul 10

Ariile picurilor obținute prin injectarea *Solutiei test*, deviatia (abaterea) standard si deviatia relativa standard pentru cele șase injectii.

Nr. injectie	Arie Tylosin C	Arie Tylosin B	Arie Tylosin D	Arie Tylosin A
1	121,6	110,4	298,1	3968,1
2	121,7	109,6	296,0	3970,1
3	121,8	110,4	295,7	3970,0
4	121,6	110,2	296,8	3968,2
5	121,5	109,0	298,4	3977,4
6	121,7	109,1	297,8	3973,7
Medie	121,7	109,8	297,1	3971,3
Deviatie standard	0,1	0,6	1,1	3,6
Deviatie relativa standard (%)	0,1	0,6	0,4	0,1

Figura 11 reprezintă variația ariilor picurilor de Tylosin (A, B, C, D) pentru cele șase injecții de *Solutie test*.

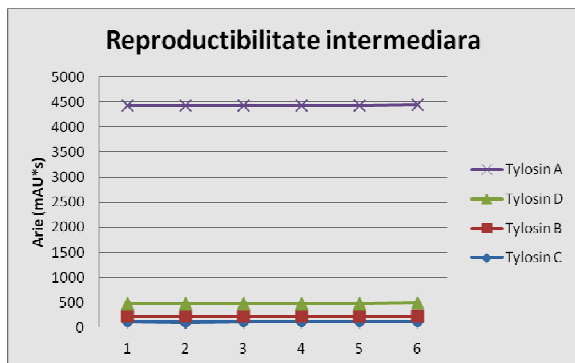


Figura 11 Variația ariilor picurilor de Tylosin (A, B, C, D) pentru cele șase injecții de *Solutie test*.

### Exactitatea

**Scopul procedurii:** se dorește să se demonstreze că prin folosirea ecuației de regresie pentru *Tylosin A*, *Tylosin B*, *Tylosin C*, *Tylosin D*, prezentată la punctul 3.2. **Liniaritate**, aplicată pe valori experimentale, având conținut cunoscut de *Tylosin* se pot regăsi valorile teoretice, adică se dorește să se demonstreze că metoda analitică în globalitatea sa (prepararea probelor și analiza cromatografică) generează rezultate cât mai apropiate de valorile considerate ca fiind adevărate.

Pentru a conferi mai multă consistență procedurii, exactitatea este apreciată pe un domeniu de concentrații care reproduce domeniul valoric utilizat în metoda analitică propusă; de asemenea, la evaluarea exactității se va lua în considerare și matricea de excipienți.

### Pregătirea probelor

#### *Solutie stoc - 400 ppm:*

Intr-un balon cotat de clasă de precizie A, de 100 ml se aduc 80 mg de *Tilodem 50* - pulbere hidrosolubilă, se dizolvă și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

#### *Solutie exactitate 1 - 160 ppm:*

4 ml din *Solutia stoc* se aduc într-un balon cotat de clasă de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

#### *Solutie exactitate 2 - 180 ppm:*

4,5 ml din *Solutia stoc* se aduc într-un balon cotat de clasă de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

#### *Solutie exactitate 3 - 200 ppm:*

5 ml din *Solutia stoc* se aduc într-un balon cotat de clasă de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

#### *Solutie exactitate 4 - 220 ppm:*

5,5 ml din *Solutia stoc* se aduc într-un balon cotat de clasă de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

#### *Solutie exactitate 5 - 240 ppm:*

6 ml din *Solutia stoc* se aduc într-un balon cotat de clasă de precizie A, de 10 ml și se completează la semn cu *Solvent de probe*.

### Mod de lucru

Se injectează de trei ori, fiecare din *soluțiile de exactitate (1-5)* preparate mai sus în ordinea creșterii concentrației.

În cromatogramele obținute pentru fiecare soluție analizată, se integrează picurile corespunzătoare *Tylosinului A, B, C, D*, se calculează valoarea medie, abaterea standard și abaterea relativă standard (%).

Se calculează randamentul de regasire R pentru fiecare soluție de exactitate utilizând relația:

$$R(\%) = C_{\text{exp}}/C_{\text{teor}} * 100$$

Se exprimă procentual raportul între cantitatea de analit  $C_{\text{exp}}$  determinată în baza relației precedente și valoarea nominală (teoretică).

Se va prezenta grafic relația dintre valorile experimentale ( $C_{\text{exp}}$ ) și valorile teoretice corespunzătoare analitului considerat.

### Condiții de admisibilitate

Randamentul de regasire pentru *Tylosin A*, *Tylosin B*, *Tylosin C*, *Tylosin D*, trebuie să varieze în intervalul 95,0-105,0% pe tot domeniul de concentrații investigate.

### REZULTATE ȘI CONCLUZII

În Tabelul 11 sunt prezentate randamentele de regasire pentru *Tylosin A*, *Tylosin B*, *Tylosin C*, *Tylosin D*, calculate în cazul celor patru *Soluții de exactitate*.

În Tabelul 12 sunt prezentate rezultatele pentru randamentul de regasire R în cazul celor patru soluții de exactitate injectate.

Tabelul 11

Randamentele de regasire pentru *Tylosin A*, *Tylosin B*, *Tylosin C*, *Tylosin D*, calculate in cazul celor patru *Solutii de exactitate*

Calculul randamentului de regasire pentru cele patru solutii de exactitate			
<b>160 ppm - valori teoretice - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
91,4	82,5	213,9	3015,2
<b>160 ppm valori experimentale - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
91,6	82,2	213,4	2985,2
<b>Randament de regasire - 160 ppm</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
99,9	100,3	100,3	101,0
<b>180 ppm - valori teoretice - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
102,1	91,8	239,0	3343,9
<b>180 ppm valori experimentale - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
103,0	92,5	240,1	3358,3
<b>Randament de regasire - 180 ppm</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
99,1	99,3	99,5	99,6
<b>220 ppm - valori teoretice - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
127,0	115,5	295,6	4122,2
<b>220 ppm valori experimentale - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
125,9	113,1	293,4	4104,6
<b>Randament de regasire - 220 ppm</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
100,9	102,1	100,7	100,4
<b>240 ppm - valori teoretice - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
139,4	129,1	326,2	4504,5
<b>240 ppm valori experimentale - arii</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
139,4	129,1	326,2	4504,5
<b>Randament de regasire - 240 ppm</b>			
Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
101,3	104,2	100,8	100,5

Tabelul 12

Rezultatele pentru randamentul de regasire R in cazul celor patru solutii de exactitate injectate.

Concentratia solutiei (ppm)	Randamentul de regasire (%)			
	Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
160	99,9	100,3	100,3	101,0
180	99,1	99,3	99,5	99,6
220	100,9	102,1	100,7	100,4
240	101,3	104,2	100,8	100,5

### 3.5. Robustetea

Scopul procedurii: se urmareste sa se demonstreze ca variatiile intr-un domeniu limitat a valorilor parametrilor operationali ai metodei nu afecteaza semnificativ rezultatele. Parametrii operationali investigati pentru metoda cromatografica propusa sunt urmatoarii:

A: Influenta lungimii coloanei cromatografice asupra separarii.

B: Modificarea raportului solventilor (a compozitiei fazei mobile).

C: Influenta temperaturii coloanei cromatografice.

D: Influenta debitului fazei mobile.

E: Influenta pH-ului componentei apoase a fazei mobile (Solventul A) asupra separarii.

### Pregatirea solutiilor

*Solutia de testare a sistemului cromatografic:*

Intr-un balon cotat de clasa de precizie A, de 10 mL, se aduc 2 mg de *Tylosin tartrat CRS* si 2 mg de *Tylosin D CRS*, se completeaza la semn cu *Solvent probe*.

### A: Influenta lungimii coloanei cromatografice

In aceasta etapa s-a urmarit evaluarea influentei lungimii coloanei cromatografice asupra separarii compusilor. Sau folosit urmatoarele coloane cromatografice:

**A1.** Kromasil 100 end - capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3,5  $\mu\text{m}$ ) cu dimensiunea de 150 mm

**A2.** Kromasil 100 end - capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3,5  $\mu\text{m}$ ) cu dimensiunea de 250 mm.

#### Modul de lucru

Se pregateste sistemul cromatografic, folosind coloana din varianta **A1**.

Coloana se echilibreaza pana la obtinerea unei linii de baza stabile, apoi se injecteaza 20  $\mu\text{l}$  de *Solutia de testare a sistemului cromatografic*.

Dupa inregistrarea cromatogramei se repeata operatiile si pentru varianta **A2**.

### REZULTATE SI CONCLUZII

Cromatogramele obtinute sunt prezentate in Figura 12.

Suprapunerea cromatogramelor obtinute in cazul folosirii coloanei cromatografice cu dimensiunea de 250 mm (varianta **A2**) in locul coloanei cromatografice cu dimensiunea de 150 mm (varianta **A1**).

Asa cum era de asteptat, folosirea unei coloane cu dimensiunea de 250 mm, Kromasil 100 end – capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3,5  $\mu\text{m}$ ) in locul celei indicate, de 150 mm, Kromasil 100 end – capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3,5  $\mu\text{m}$ ), modifica timpul de retentie al compusilor in sensul cresterii acestuia, modificand si rezolutia intre Tylosin D si Tylosin A, nesemnificativ insa, asa cum se poate observa din Tabelul 13

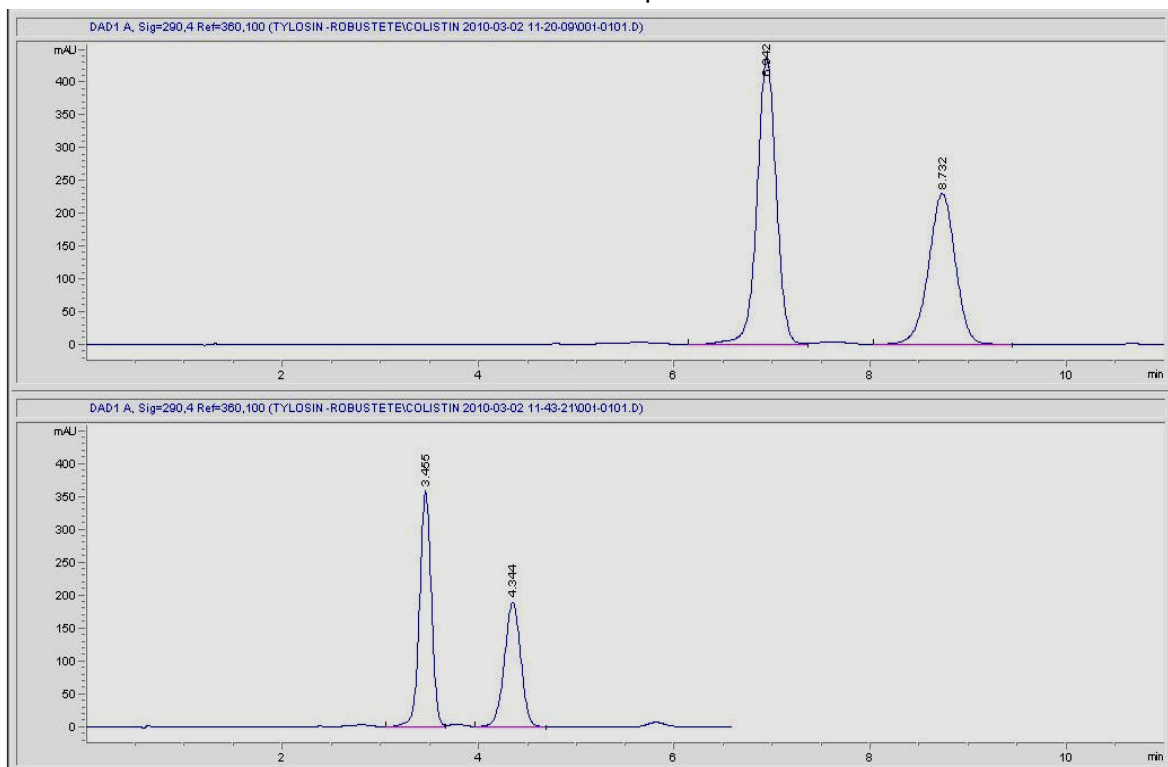


Figura 12. Suprapunerea cromatogramelor obtinute in cazul folosirii coloanei cromatografice cu dimensiunea de 250 mm (varianta A2) in locul coloanei cromatografice cu dimensiunea de 150 mm (varianta A1).

Tabelul 13

Timpuri de retentie al compusilor studiați în funcție de tipul coloanei

Coloana cromatografica	Timp retentie		Rezolutie
	Tylosin D	Tylosin A	
Kromasil – C18, (3,5 $\mu\text{m}$ ) cu dimensiunea de 150 mm	3,46	4,34	3,48
Kromasil – C18, (3,5 $\mu\text{m}$ ) cu dimensiunea de 250 mm	12,04	15,18	3,97

## B: Modificarea raportului solventilor fazei mobile.

### Mod de lucru

In acest caz modificarea metodei s-a facut prin scaderea concentratiei de *Solvent B* in compozitia fazei mobile, deci prin scaderea procentului de solvent organic si respectiv, in celalalt caz, prin cresterea acestuia. Se pregateste sistemul cromatografic, se echilibreaza pana la

obtinerea unei linii de baza stabile, apoi se injecteaza 20  $\mu$ l de *Solutie test*.

Cromatogramele prezentate in figura 13 reprezinta:

1. Cromatograma obtinuta folosind metoda propusa initial (40 : 60);
2. Cromatograma obtinuta dupa modificarea raportului solventilor (42 : 58);
3. Cromatograma obtinuta dupa modificarea raportului solventilor (39 : 61);

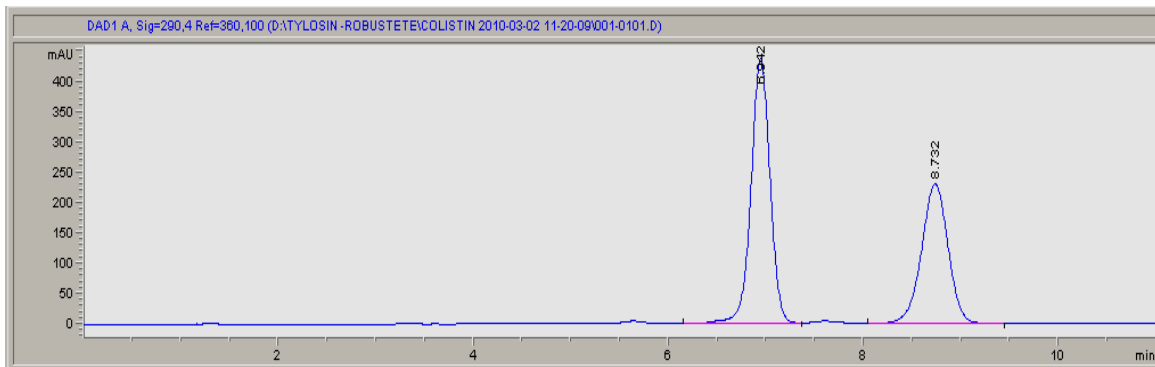


Figura 13.1. Cromatograma obtinuta folosind metoda propusa initial (40 : 60)

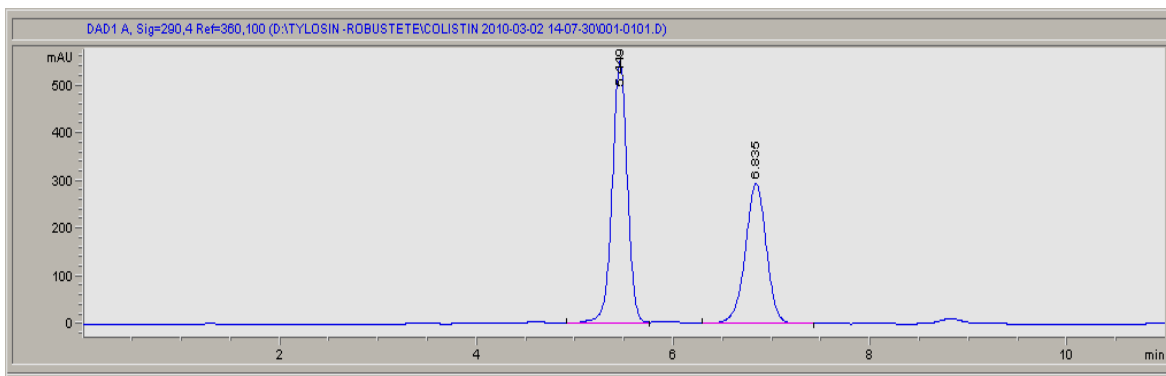


Figura 13.2. Cromatograma obtinuta dupa modificarea raportului solventilor (42 : 58)

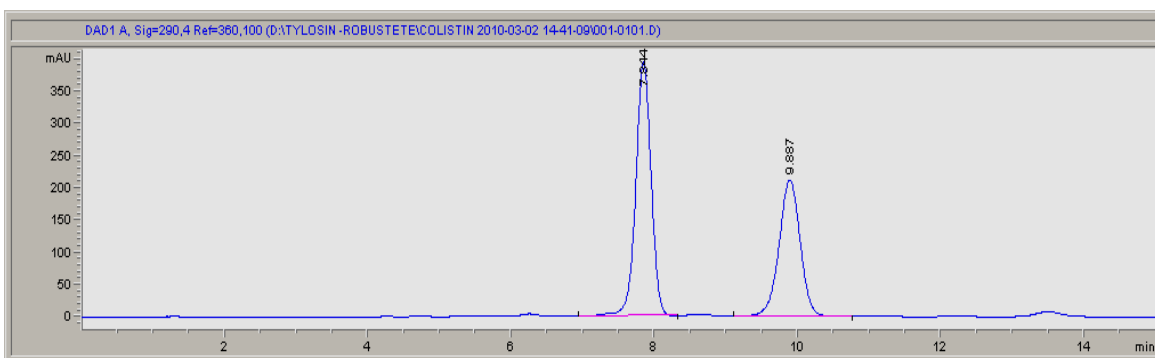


Figura 13.3. Cromatograma obtinuta dupa modificarea raportului solventilor (39 : 61);

## REZULTATE SI CONCLUZII

Modificarile aduse metodei cromatografice prezentate initial, au dus la o scadere a timpului de retentie al celor doi compusi (in ordinea de elutie: Tylosin D, Tylosin A), dar si la o scadere a rezolutiei

intre acestia, in cazul scaderii procentului de solvent apos din faza mobila, respectiv la cresterea timpului de retentie, dar si a rezolutiei, in cazul scaderii concentratiei de solvent organic din faza mobila, asa cum rezulta din Tabelul 14:

**Tabel 14**  
Timpii de retenție al compuşilor

Raport al solventilor	Timp retenție		Rezolutie
	Tylosin D	Tylosin A	
Solvent A : Solvent B (40:60)	6,94	8,73	4,32
Solvent A : Solvent B (42:58)	5,45	6,84	4,21
Solvent A : Solvent B (39:61)	7,84	9,89	4,53

### C: Influenta temperaturii coloanei cromatografice.

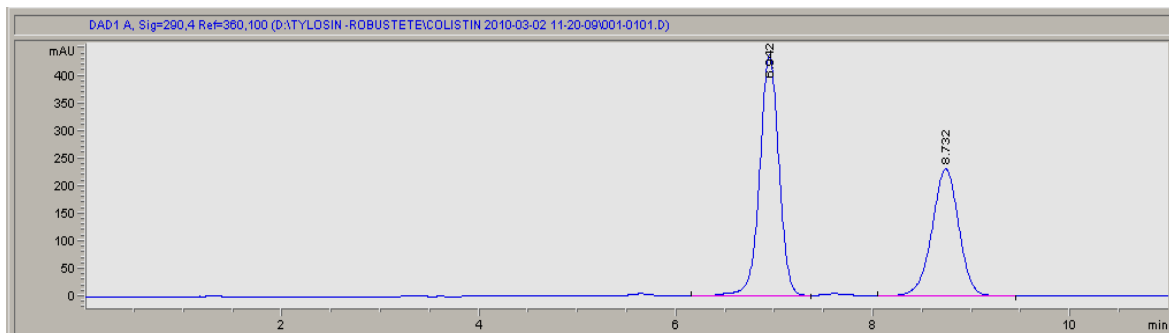
#### Mod de lucru

La metoda propusa initial, se modifica temperatura cu 5°C, toti ceilalti parametri ai metodei ramanand neschimbati.

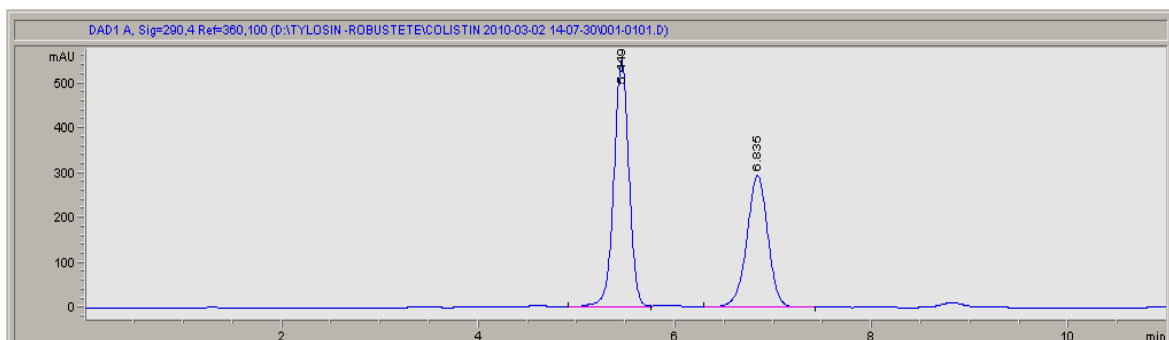
Temperatura coloanei cromatografice este in acest caz de 40°C.

Se pregateste sistemul cromatografic, se echilibreaza pana la obtinerea unei linii de baza stabile, apoi se injecteaza 20 µl de *Solutie de testare a sistemului cromatografic*.

Cromatogramele obtinute cu temperatura coloanei cromatografice de 35°C, respectiv la 40°C sunt prezentate in figura 14.



**Figura 14.1. Temperatura coloanei cromatografice 35°**



**Figura 14.2. Temperatura coloanei cromatografice 40°**

In Tabelul 15 este prezentata dependenta timpilor de retentie si modul in care se modifica rezolutia daca temperatura coloanei cromatografice este modificata cu 5°C (de la 35°C la 40°C).

**Tabelul 15**

Dependenta timpilor de retentie si modul in care se modifica rezolutia în funcție de temperatura

Temperatura coloanei cromatografice	Timp retenție		Rezolutie
	Tylosin D	Tylosin A	
35°C	6,9	8,7	4,3
40°C	5,5	6,8	4,2

### REZULTATE SI CONCLUZII

Asa cum era de asteptat timpul de retentie al celor doi compusi (*Tylosin A*, *Tylosin D*) se modifica, respectiv, scade

odata cu cresterea temperaturii, fara modificarea semnificativa ai celorlalti parametri ai separarii cromatografice.

### D: Influenta debitului fazei mobile

Modificarea metodei cromatografice prin schimbarea debitului fazei mobile, toti ceilalti parametri ramanand neschimbati, duce asa cum era de asteptat la modificarea timpilor de retentie al compusilor, fara a fi modificata semnificativ rezolutia.

Daca debitul fazei mobile creste cu 50% , timpul de retentie scade, asa cu era de asteptat cu aproximativ 50%, dupa cum se poate observa din cromatogramele de mai jos.



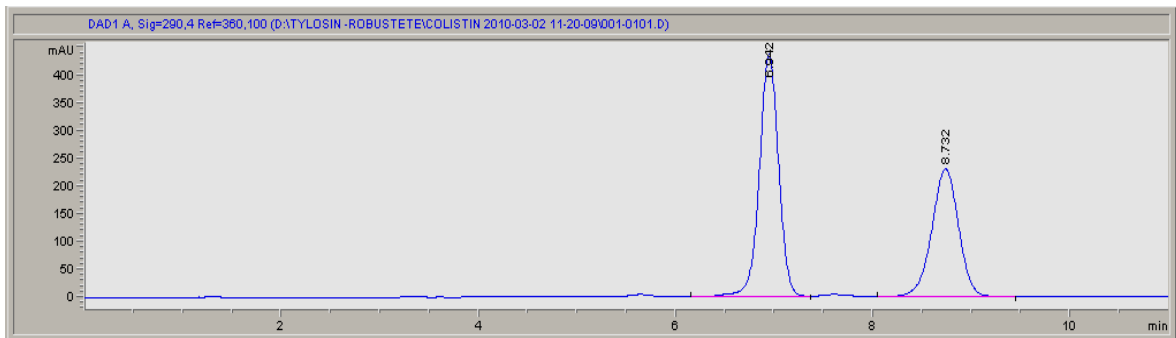


Figura 15. Cromatograma obtinuta fara ca debitul fazei mobile sa fie modificat

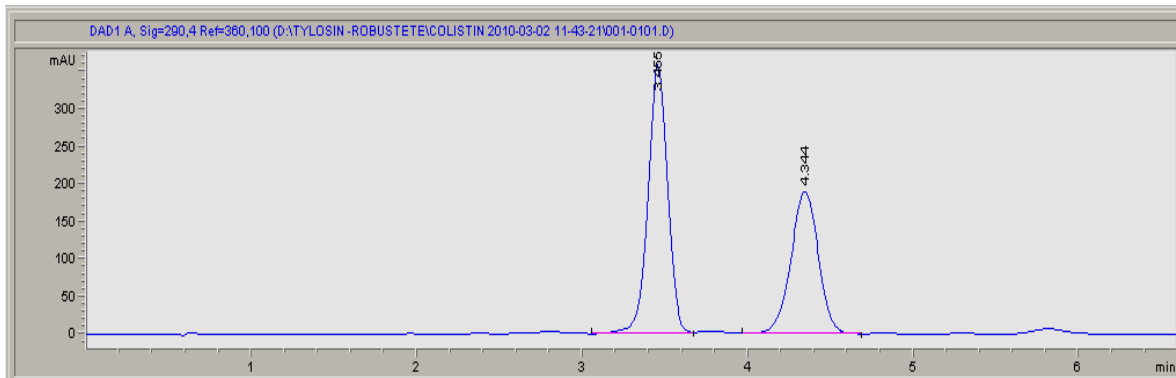


Figura 16. Cromatograma obtinuta dupa modificarea debitul fazei mobile

In Tabelul 16 este prezentata dependenta timpului de retentie de debitul fazei mobile si evolutia rezolutiei intre cele doua peak-uri cromatografice de *Tylosin D* si *Tylosin A*.

Tabelul 16

Dependenta timpului de retentie de debitul fazei mobile si evolutia rezolutiei intre cele doua picuri

Debit faza mobila (mL/min)	Timp retentie		Rezolutie
	Tylosin D	Tylosin A	
1	6,9	8,7	4,3
2	3,5	4,3	3,5

**Rezultate si concluzii**

Timpul de retentie al celor doi compusi (*Tylosin A*, *Tylosin D*) se modifica, cu modificarea, dar nesemnificativa, a rezolutiei cromatografice in cazul in care debitul fazei mobile este modificat.

**F: Influenta pH-ului componentei apoase (Solventului A) al fazei mobile**

Modificarea pH-ului componentei apoase a fazei mobile duce la o deplasare semnificativa a timpilor de retentie ai celor doi compusi dar si la o modificare a rezolutiei cromatografice.

Prin modificarea pH-ului componentei apoase a fazei mobile de la 2,5 la 3,5 s-au obtinut urmatoarele date experimentale.

Cromatogramele si raportul de integrare obtinut in urma modificarii pH-ului

componentei apoase sunt prezentate in continuare.

Cromatograma obtinuta in urma injectarii *Solutie de testare a sistemului cromatografic* in conditiile in care componentul apos al fazei mobile are pH 2,5 este prezentata in figura 17.

Cromatograma obtinuta in urma injectarii *Solutie de testare a sistemului cromatografic* in conditiile in care componentul apos al fazei mobile are pH 3,5 este prezentata in figura 18.

In Tabelul 17 este prezentata dependenta timpilor de retentie si a rezolutiei de pH-ul componentei apoase a fazei mobile (Solventul A).

Tabelul 17

Dependenta timpilor de retentie si a rezolutiei de pH-ul componentei apoase a fazei mobile

pH (Solvent A)	Timp retentie		Rezolutie
	Tylosin D	Tylosin A	
2,5	6,9	8,7	4,3
3,5	6,3	7,9	3,6

**Rezultate si concluzii**

Daca la metoda propusa initial se pastreaza toti parametrii neschimbati, mai putin pH-ul componentei apoase a fazei mobile (pH-ul solventului A), timpii de retentie ai celor doi compusi (*Tylosin A* si *Tylosin D*) se schimba, modificandu-se si rezolutia intre acestia, asa cum rezulta din tabelul nr.:17.

### 3.6. Stabilitatea solutiilor

**Scopul procedurii:** se urmareste viteza de degradare a substantei active din solutiile preparate, adica modul in care injectarea, dupa o anumita perioada de timp a acestora, poate influenta rezultatele analizelor.

Studiul stabilitatii solutiilor s-a facut prin injectarea *Solutiei de referinta (a)* (vezi selectivitate) la un interval de aproximativ luna.

Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabelul 18

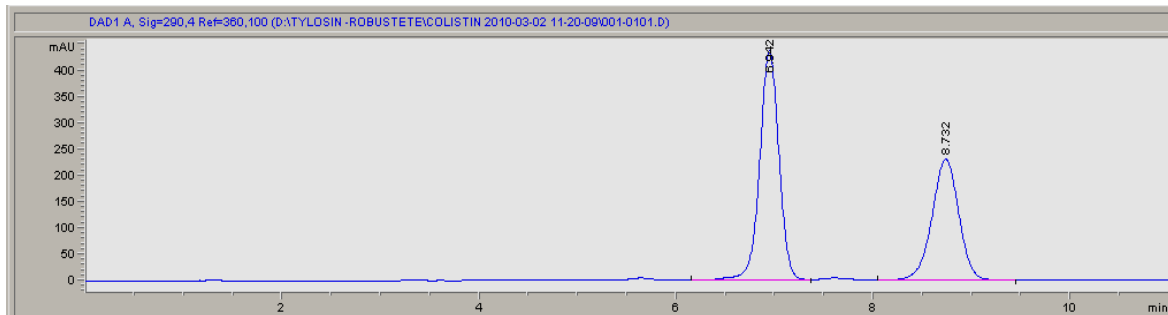


Figura 17. Cromatograma obtinuta in urma injectarii *Solutie de testare a sistemului cromatografic* in conditiile in care componentul apos al fazei mobile are pH 2,5

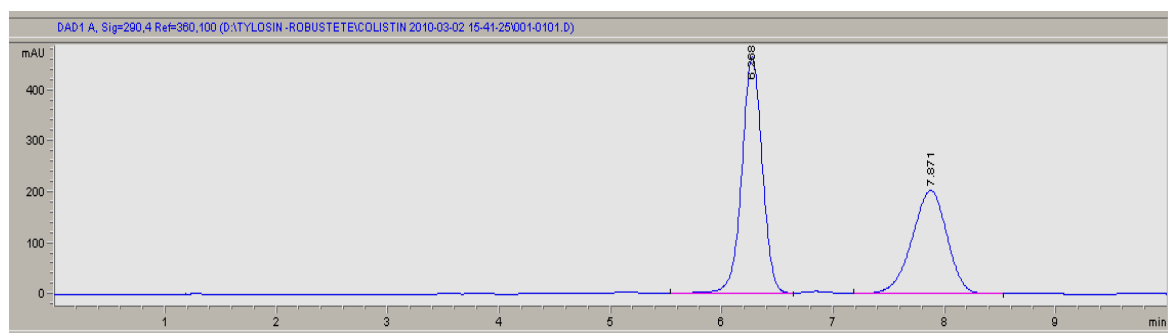


Figura 18 Cromatograma obtinuta in urma injectarii *Solutie de testare a sistemului cromatografic* in conditiile in care componentul apos al fazei mobile are pH 3,5

Tabelul 18

Viteza de degradare a substantei active din solutiile preparate

Solutie 240 ppm	Arie Tylosin C	Arie Tylosin B	Arie Tylosin D	Arie Tylosin A	Procent de regasire			
					Tylosin C	Tylosin B	Tylosin D	Tylosin A
To	139,7	128,4	323,8	4510,8				
1 luna	279,4	124,2	305,7	4497,4	200,0	96,7	94,4	99,7

### REZULTATE SI CONCLUZII

Din datele experimentale rezulta ca solutiile pastrate la +5°C in absenta luminii (la frigider) si *Tylosinul A, Tylosinul B si Tylosinul D* sunt stabile in solutie.

Chiar si dupa o luna ariile de *Tylosin A, Tylosin B si Tylosin D* sunt neschimbate.

Se observa insa o dublare a ariei de *Tylosin C*. Din practica, s-a constatat, ca standardele pot fi injectate si dupa cateva zile (3-4 zile), ariile acestora fiind modificate nesemnificativ si prin urmare rezultatele nefiind influentate (RSD < 2%).

### CONCLUZII FINALE

1. Metoda analitica propusa pentru identificarea si dozarea substantei active din produsul *Tilodem 50 pulbere*

*hidrosolubila*, indeplineste toate conditiile necesare si poate fi folosita in scopurile propuse.

2. S-a demonstrat ca aceasta metoda poate fi folosita si pentru produsul finit, deoarece metoda prezinta selectivitate fata de excipientii prezenti in *Tilodem 50 pulbere hidrosolubila*.

### BIBLIOGRAFIE

1. European Pharmacopoeia, Ed. 6.0;
2. ICH-Q2A - Text on Validation of Analytical Procedure
3. ICH-Q2B - Validation of Analytical Procedure: Methodology
4. CPMP / ICH /381 / ICH Q(R1)