

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



DIPLOMOVÁ PRÁCE

HPLC hodnocení vybraných léčiv IX.

HPLC evaluation of selected pharmaceuticals IX.

Hradec Králové 2015

Šárka Šušková

Děkuji RNDr. Milanu Mokrému, CSc., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, poskytnuté materiály a neocenitelné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji za asistenci a pomoc při měření v laboratoři. Děkuji všem asistentům, pracovníkům a postgraduálním studentům na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv za příjemné pracovní prostředí.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použitých zdrojů a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 30. 7. 2015

Podpis:

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY

LÉČIV

Jméno: Šárka Šušková

Školitel: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Název práce: HPLC hodnocení vybraných léčiv IX.

Tato práce byla zaměřena na optimalizaci chromatografických podmínek u látek: perindoprilum erbuminum, indapamidum, amlodipinum besylatum, valsartanum a hydrochlorothiazidum s cílem vypracovat stejné podmínky pro jejich analýzu v různých lékových přípravcích.

Chromatografické podmínky byly optimalizovány nástřikem jednotlivých standardů a pomocí toho byly nalezeny takové podmínky, aby se složky separovaly. Poté co se každá z nich eluovala v jiném čase, byl nastříknut směsný vzorek.

Chromatografické chování těchto látek při různé hodnotě pH, různé koncentraci pufru a při změnách procentuálního zastoupení organické složky mobilní fáze bylo hodnoceno pomocí výpočtu hmotnostního distribučního poměru a grafickým vyjádřením jeho závislosti na dané změně.

V důsledku různé chemické povahy analyzovaných látek bylo vypracování chromatografických podmínek experimentálně náročné, i přesto se podařilo vyhledat chromatografické podmínky pro všechny látky stejné: chromatografická kolona Discovery®HS C18, mobilní fáze složená z methanolu jako organické složky a fosfátového pufru o koncentraci 0,01 M okyseleného na pH 3,5 v poměru 60:40 (v/v), při teplotě 40 °C a vlnové délce 215 nm.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND
DRUG ANALYSIS

Name: Šárka Šušková

Supervisor: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Title: HPLC evaluation of selected drugs IX.

This work was focused on optimizing the chromatographic conditions for substances: perindopril erbumine, indapamide, besylatum amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide to develop the same conditions as the analysis in a variety of dosage formulations.

The chromatographic conditions were optimized injection of individual standards and use of such conditions were found to be constituents separated. After each of which elutes at a different time, a composite sample was injected.

Chromatographic behavior thereof at different pH, different concentrations of buffer, and when changing the percentage of the organic component of the mobile phase was evaluated by calculating the weight distribution ratio and its graphic representation according to the change.

Due to the different chemical nature of the analytes was the development of experimentally-consuming chromatographic conditions, nevertheless we managed to search chromatographic conditions equal for all substances: Discovery®HS chromatographic column C18, the mobile phase consisting of methanol as the organic component and phosphate buffer 0,01 M acidified pH 3,5 to 60:40 (v / v) at 40 ° C and a wavelength of 215 nm.

OBSAH

1	ÚVOD	8
1.1	CÍL PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	HISTORIE	11
2.2	HPLC	12
2.2.1	Využití	12
2.3	ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	14
2.3.1	Dle mechanismu separace	14
2.3.2	Dle povahy mobilní fáze	15
2.3.3	Dle uspořádání stacionární fáze	15
2.4	ZÁKLADNÍ CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY	16
2.4.1	Retenční charakteristiky	16
2.4.2	Chromatografická data	18
2.4.3	Separační data	18
2.5	STACIONÁRNÍ FÁZE	20
2.6	MOBILNÍ FÁZE	21
2.7	VYSOKOÚČINNÝ KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF	22
2.7.1	Zásobníky mobilní fáze	23
2.7.2	Čerpadla mobilní fáze	24
2.7.3	Dávkovací zařízení	25
2.7.4	Detektory	26
2.7.5	Zařízení pro zpracování dat	27
2.8	VLASTNOSTI LL	28
2.8.1	Vlastnosti perindoprilu	28
2.8.2	Vlastnosti amlodipinu	30
2.8.3	Vlastnosti valsartanu	32
2.8.4	Vlastnosti hydrochlorothiazidu	35
2.8.5	Vlastnosti indapamidu	38
2.9	PRÁCE TÝKAJÍCÍ SE PROBLEMATIKY HPLC A LL	41
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	48
3.1.1	Použité Chemikálie	48
3.1.2	Použité přístroje	48
3.1.3	Chromatografický materiál – SF	49
3.2	VYPRACOVÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO HPLC LL	50
3.2.1	Výběr stacionární a mobilní fáze	50
3.2.2	Výběr vlnové délky pro UV detekci	51
3.3	PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE A ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	52
3.3.1	Příprava mobilní fáze	52
3.3.2	Příprava zásobních roztoků	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
4.1	VÝVOJ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO HPLC ANALÝZU AMLODIPINU, HYDROCHLOROTHIAZIDU, VALSARTANU, PERINDOPRILU A INDAPAMIDU	55
4.1.1	Stacionární fáze	55
4.1.2	Mobilní fáze	55
4.1.3	Detekce	55

4.2	STUDIUM CHROMATOGRAFICKEHO CHOVÁNÍ	66
4.2.1	<i>Hmotnostní distribuční poměr</i>	66
4.2.2	<i>pH</i>	68
5	ZÁVĚR	69
	SEZNAM ZKRATEK	71
6	CITOVANÁ LITERATURA	72

1 ÚVOD

Na začátku 20. století byla definována sloupcová kapalinová chromatografie, Column Liquid Chromatography, prací ruského botanika Michaila Tswetta. Ve své práci se zabýval odstraněním listových pigmentů, extrahovanými z rostlin pomocí rozpouštědla. Separace probíhala v koloně, skleněné trubici pomocí hydrostatického tlaku, za použití dvou specifických materiálů (uhlíčitanu vápenatého v práškové křídě a oxidu hlinitého). Díky gravitaci a různé rychlosti částic vzorku došlo k oddělení látek do barevných pruhů. Tswett toto označil jako chromatografii. (1)

Využití HPLC je velmi široké. HPLC je využívána ke kontrole léčiv, k analýze léčivých přípravků, ke kontrole čistoty léčiv, při identifikaci léčiv, stanovení obsahu léčiv, ke sledování stability léčiv a také k monitorování léčiv v biologickém materiálu.

1.1 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro separaci pěti léčivých látek. Jednalo se o látky různé chemické povahy používané v praxi v různých kombinacích pro jejich synergický účinek při léčbě arteriální hypertenze. Vypracované chromatografické podmínky by měly umožnit analýzu těchto látek v různých kombinovaných léčivých přípravcích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HISTORIE

Chromatografie je souhrnný termín pro laboratorní techniky pro separaci směsí. To znamená oddělení od směsi vzhledem k rozdílům v distribučním koeficientu složek vzorku mezi dvěma různými fázemi. Jedna z těchto fází je mobilní, zatímco druhá je stacionární.

Rusko-italský botanik Michail Tswett byl první, kdo začal používat termín chromatografie. Termín chromatografie je odvozený od dvou řeckých slov „chroma“, což znamená barva a „graphein“, což znamená psát. Použil jemně dělený kapalinový skleněný sloupec, kterým chtěl oddělit žluté, oranžové a zelené rostlinné pigmenty (xantofyly, karoteny, chlorofyly). V roce 1906, Tswett nejprve použil termín chromatografie ve svých dvou článcích o chlorofylu v německém botanickém časopise.

Willstater a Stoll se později pokusili zopakovat Tswettovy experimenty. Použili velmi agresivní adsorbent ničící chlorofyl a tak nepotvrdili experimenty Tswetta. Willstater a Stoll publikovali své výsledky a díky tomu Tswettova metoda chromatografie brzy upadla do zapomnění. Ve dvacátém století se objevili nové metody díky pracím vědců Edgara Lederera, A. J. Martina a R. L. Syngeho. Martin a Synge vyvinuli rozdělovací chromatografii. Martin byl zakladatelem moderní chromatografie, způsobu oddělování různých látek ve směsi. M. Tswett je obvykle uváděn jako vynálezce adsorpční chromatografie na začátku dvacátého století. Naproti tomu Martin vynalezl tři formy chromatografie: rozdělovací chromatografii, papírovou chromatografii, plynovou chromatografii, které byly rychle přijaty a jsou stále používány dodnes. Dokonce i ostatní dvě formy chromatografie, které vyplynuly z práce Martina, jsou v dnešní době nejčastěji používané. Jedná se o TLC a HPLC. Martinův vývoj chromatografie byl pozoruhodný úspěch a vysloužil si za ni Nobelovu cenu za chemii v roce 1952. 7. června roku 1941, Martin a Synge dokázali rozdělovací chromatografii obhájit na zasedání biochemické společnosti, které se konalo v Hampsteadu. Martin a Synge navrhli, že by

bylo možné použít za mobilní fázi místo kapaliny plyn. Martin se podílel na vývoji plynové chromatografie o deset let později. V polovině sedmdesátých let také navrhoval použití jemných částic a vysokých tlaků na zlepšení separace, která zůstává hlavním rysem HPLC.

V dalších letech docházelo k vylepšování technik a tím vznikla UHPLC . (2)

2.2 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography) se řadí mezi nejčastěji používanou separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Separace je založena na různém mechanismu závislém na náplni kolony Dnes se používají chemicky vázané fáze na bázi silikagelu (např. C18, C8) a eventuálně oxidu zirkoničitého. Stacionární fáze je náplň kolony, která je stálá a s časem se nemění a mobilní fáze je rozpouštědlo protékající kolonou. HPLC je vhodná pro dělení netěkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách.

Mezi hlavní přednosti patří rychlost analýzy, citlivost stanovení, minimální množství vzorku pro analýzu a možnost automatizace. Ve všech zmíněných parametrech HPLC konkuruje plynové chromatografii (GC), která se využívá oproti HPLC ke stanovení těkavých látek, avšak většina léčiv jsou netěkavé povahy, a proto HPLC se využívá ve větší míře než GC. (3) (4) (5)

2.2.1 Využití

HPLC se využívá pro lékopisnou kontrolu léčiv (ke stanovení obsahu, ke zkouškám totožnosti a zkouškám na čistotu) a dále se využívá k analýze přírodních léčiv v rostlinném materiálu, k monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách, k vývoji nových léčiv a analýze

peptidů, proteinů a polynukleotidů. HPLC slouží v oblasti životního prostředí například ke stanovení antibiotik v mase ryb. Jejich nadměrné použití v průmyslové akvakultuře vede k přítomnosti zbytkových antibiotik v rybách, které jsou určeny ke konzumaci. To má škodlivé účinky na lidské zdraví a životní prostředí. Bakterie, které jsou patogenní pro člověka, jsou kvůli tomu vůči antibiotikům odolnější. (3) (4) (5)

2.3 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Separace jednotlivých složek směsi je tedy ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou mobilní fáze. Eluce může být provedena buď mobilní fází o konstantním složení při použití izokratické eluce nebo mobilní fází o zvyšující se eluční síle při gradientové eluci (složení MF je během eluce programově měněno ve prospěch silnější eluční složky). Izokratická eluce je vhodná pokud mají látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Naopak gradientová eluce se uplatní, mají-li složky směsi výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich izokratická eluce by tak byla časově velmi náročná. (6)

2.3.1 Dle mechanismu separace

Hlavním cílem chromatografické separace je dosažení rozdělení analytů v přijatelném čase. Rozdělení analytů může být dokonalé nebo nedokonalé a je vhodné tento stupeň kvantitativně vyjádřit. Míru kvality separace dvou sousedních píků charakterizuje parametr rozlišení. (4)

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

Rozdělovací chromatografie

O separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).

Adsorpční chromatografie

O separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka-silikagel).

Iontově-výměnná chromatografie

O separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.

Gelová chromatografie

Složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi – gelu. Menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt).

Afinitní chromatografie

Stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah – afinitu. (7)

2.3.2 Dle povahy mobilní fáze

Kapalinová chromatografie

Jako mobilní fáze je kapalina.

Plynová chromatografie

Jako mobilní fáze je plyn.

2.3.3 Dle uspořádání stacionární fáze

Kolonová chromatografie

Stacionární fáze je umístěna v trubici – koloně.

Plošné techniky

Papírová chromatografie

Stacionární fáze je chromatografický papír vyrobený z celulózy. Dnes se již nepoužívá.

Tenkvrstvá chromatografie

Stacionární fáze je umístěna na skleněné desce, hliníkové fólii nebo plochém podkladu z jiného materiálu. (7)

2.4 ZÁKLADNÍ CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY

2.4.1 Retenční charakteristiky

2.4.1.1 retenční čas a retenční objem

$$V_R = t_R v$$

v němž značí:

t_R – retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce,

v – průtokovou rychlost MF

Základní kvalitativní charakteristikou je pro každou dělenou látku retenční (eluční) čas (t_R), což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku). Jednotkou retenčního času je 1 sekunda popřípadě 1 minuta. Druhou retenční charakteristikou je retenční (eluční) objem (V_R), což je objem mobilní fáze, který proteče kolonou za retenční čas. Jednotkou retenčního objemu je 1 ml.

Kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem nebo výška píku.

2.4.1.2 Distribuční koeficient

Eluční charakteristiky složky na určité koloně mohou být dány distribučním koeficientem (K_0), který se vypočítá:

$$\frac{t_R - t_0}{t_t - t_0} = K_0$$

v němž značí:

t_R - retenční čas nebo objem nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

t_0 - mrtvý čas nebo objem nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

t_r - retenční čas nebo objem nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího složce, které může volně pronikat do všech pórů stacionární fáze.

2.4.1.3 *Hmotnostní distribuční poměr*

Definován jako:

$$D_m = \frac{\text{množství rozpuštěné látky v SF}}{\text{množství rozpuštěné látky v MF}} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

V němž značí:

t_R – retenční čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

t_M – mrtvý čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

Hmotnostní distribuční poměr charakterizuje selektivitu a udává, jak moc se analyty na koloně zadržují a zpožďují.

2.4.1.4 *Retardační faktor*

neboli retenční faktor, je používán v planární chromatografii kde udává poměr vzdálenosti od startu ke středu skvrny a vzdálenosti, kterou od startu urazilo čelo MF.

2.4.2 Chromatografická data

2.4.2.1 Faktor symetrie

neboli faktor chvostování píku, značí úplnou (ideální) symetrii píku pokud se rovná 1,0.

2.4.2.2 Účinnost chromatografické kolony

Základním cílem metody HPLC je dosažení optimální rozdělení látek v co nejkratším čase. Pro hodnocení účinnosti separačního procesu je používán parametr účinnosti. Účinnost kolony charakterizuje míru rozšiřování elučních zón dělených na koloně a je tedy ukazatelem kvality chromatografické separace. Mírou účinnosti kolony je bezrozměrná veličina N , která je nazývána počet teoretických pater. Čím vyšší je počet teoretických pater N , tím méně je zóna analytu rozšířena během průchodu kolonou, a tím je tato kolona účinnější.

2.4.3 Separační data

2.4.3.1 Rozlišení

Rozlišení (R_S) mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, může být vypočteno ze vzorce:

$$\frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} = R_S, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

v němž značí:

t_{R1} a t_{R2} - retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

w_{h1} a w_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

2.4.3.2 Poměr výšky píku k sedlu

Jestliže není dosaženo oddělení dvou píků na základní linii, lze použít jako kritérium způsobilosti systému.

2.4.3.3 *Relativní retence*

t_{R2} - retenční čas sledovaného píku

t_{R1} - retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce)

t_M - mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce (8)

$$\frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = R$$

2.5 STACIONÁRNÍ FÁZE

Chromatografické kolony, jako součást chromatografu, zažívají nejvyšší pokrok. Stacionárních fází existuje velké množství. HPLC analýzy probíhají buď v normálním módu na silikagelu, který je silně polární. Tj. pokud se jedná o polární SF a nepolární MF. Dnes se již tolik nevyužívají. Druhou možností a dnes nejčastěji využívané jsou chemicky vázané fáze. Chemicky vázané fáze jsou zcela nepolární dlouhé uhlíkové řetězce (např. C18-oktadecyl, C8-oktyl, C6H6-fenyl) nebo různě polární kratší řetězce s funkční skupinou (např. OH-, CN-kyanopropyl, NH₂-aminopropyl). Skupiny chemicky vázané fáze (SiO₂) se mohou používat v oblasti pH 2-8 a do 60 °C. Pokud je pH nad 8 dochází k rozpouštění silikagelu, pokud je pH pod 2 dochází k rozštěpení řetězců. Oproti oxidu křemičitému lze také použít oxid zirkoničitý, který disponuje výhodami. Mezi ně řadíme separaci při pH 0-14 a možnost separace za vyšší teploty a tlaku. Pro analýzu opticky aktivních látek se používají chirální stacionární fáze. Podstatou chirální separace je interakce analytu a chirální stacionární fáze za využití nejméně tří simultánně působících reakcí (vodíkové vazby, komplexy, π - π interakce, dipól-dipólové interakce a sférické efekty). V současné době existují čtyři hlavní typy chirálních stacionárních fází. Jedná se o fázi proteinovou, cyklodextrinovou, polysacharidovou a Pirklovy stacionární fáze. Separace enantiomerů závisí na objemové frakci organického rozpouštědla, pH, teplotě a koncentraci a typu pufru. (9)

Dalším typem stacionárních fází jsou monolitické kolony. Monolitické kolony na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Klasické 3-5 μ m částicové kolony vykazují výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Monolitické kolony mají dva typy pórů. Velké póry zajišťují rychlý souvislý tok mobilní fáze skrz monolit a významně

zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, za to středně velké póry poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje provozování monolitů při značně vysokých rychlostech mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i pro separaci opticky aktivních látek. (10)

HPLC chromatografické kolony jsou obvykle vyrobeny z leštěné nerezové oceli, titanu nebo skla. Pro analytické účely jsou nejčastěji dlouhé 10-25 cm o vnitřním průměru 2-5 mm. Kolony jsou obvykle naplněny stacionární fází s velikostí částic 3-5 μm . Tvar částic může být sférický, nepravidelný, porézní a se specifickou povrchovou strukturou. (9) (11)

V ideálním případě by teplota během analýzy měla být konstantní. Většina separací se provádí při laboratorní teplotě, ale sloupce mohou být zahřívány na vyšší teploty pomocí termostatů s cílem dosáhnout lepší účinnosti. Teplota se zvyšuje s ohledem na typ stacionární fáze. Je možné pracovat i při vyšších teplotách (např. perindopril v ČL 2009 je uváděn při teplotě 60°C). (9) (11)

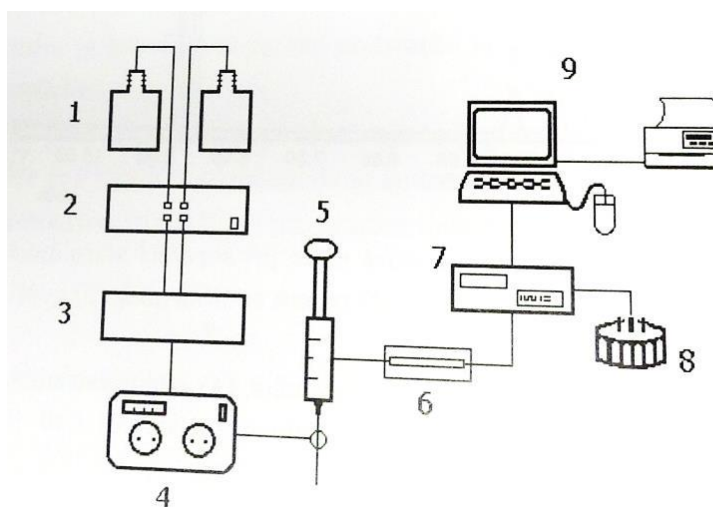
2.6 MOBILNÍ FÁZE

Volba mobilní fáze je založena na požadovaném retenčním chování a fyzikálně chemických vlastnostech analytu a typu detektoru. Pro normální fáze by měla být použita lipofilní rozpouštědla (např. hexan, heptan, cyklohexan) naopak u reverzních fází hydrofilní rozpouštědla (např. methanol, voda, acetonitril). Mobilní fáze by měla být filtrována přes vhodný filtr (např. nylonové filtry). Filtrovány jsou pufrů a poté i MF. Vícesložková mobilní fáze by měla být připravena z jednotlivých složek o požadovaném množství a následným promícháním. Organické rozpouštědlo (např. methanol, ACN) v MF nesmí při nastavené vlnové délce na detektoru pro separaci absorbovat. Úprava pH se provádí u samostatného pufru nebo v celé mobilní fázi. (9) (5)

2.7 VYSOKOÚČINNÝ KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF

Kapalinový chromatograf se skládá z:

- a. **zásobníků MF (1),**
- b. **degaseru (2),** který vychytává plyny v kapilárách (např. vakuově)
- c. **směšovače (3),** které homogenizují MF
- d. **vysokotlakého čerpadla MF (4),** které konstantní průtokovou rychlostí tlačí MF nastaveného složení přes kolonu do detektoru,
- e. **dávkovacího zařízení (5),** umožňující nadávkovat roztok vzorku na kolonu
- f. **chromatografické kolony (6),** kde dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny MF do detektoru
- g. **detektoru (7),** který indikuje průtok separované složky detekční celou a přenáší vhodně upravený signál do počítače
- h. **sběrač frakcí (8),** dnes již se nevyužívá
- i. **datové stanice (9),** PC, který ho zpracuje, umožní výstup na tiskárnu a také řídí chod celého chromatografu. Plnou čarou je znázorněn tok MF, přerušovanou čarou elektrický signál. (5) (6)



Obr. č. 1 Přehled HPLC (6)

Pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Mobilní fáze unáší jednotlivé složky vzorku chromatografickou kolonou, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu eluátu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. (5)

Při kvantitativním způsobu vyhodnocení se většinou používají metody z oblasti instrumentální analýzy (metoda vnějšího standardu, metoda standardního přídatku, metoda vnitřního standardu a metoda vnitřní normalizace). Způsob použité techniky závisí na konkrétních podmínkách metody.

Ke kvantitativní analýze se řadí plocha a výška píku. První metodou vyhodnocení je metoda vnějšího standardu, kde nastříkujeme na kolonu zvlášť vnější standard a zvlášť vzorek. Další metodou je metoda vnitřního standardu, kdy se do zkoušeného i porovnávacího roztoku přidává navíc ještě další látka- vnitřní standard a poté nastříkujeme na kolonu. U obou metod lze aplikovat metodu kalibrační křivky. Metoda normalizace udává procentuální zastoupení. Využíváme ji hlavně u stanovení čistoty. Mezi metody, které zvyšují přesnost kvantitativní analýzy, patří poměr signálu k šumu a opakovatelnost. Opakovatelnost se vyjádří relativní směrodatnou odchylkou.

2.7.1 Zásobníky mobilní fáze

Konstrukčním materiálem zásobníků bývá nejčastěji sklo, plasty (polyethylen, polypropylen, polytetrafluorethylen) nebo nerezová ocel. Vždy je potřeba zbavit mobilní fázi pohlcených plynů nejčastěji pomocí degaseru, také pomocí ultrazvuku nebo helia. Zásobníky mobilní fáze jsou zakryté víkem. K propojení chromatografických systémů se většinou používají kapiláry z oceli (při vstupu na kolonu v místě vysokého tlaku) a z plastů (teflonu, v místě výstupu z kolony kde poklesne tlak). (12)

2.7.2 Čerpadla mobilní fáze

HPLC čerpací systémy jsou potřebné k dodání odměřených množství mobilní fáze při konstantní průtokové rychlosti. Mobilní fáze by bez čerpadla neprotekla z důvodu velkého odporu stacionární fáze. Jsou k dispozici čerpací systémy, které poskytují rozpouštědlo z jednoho nebo více zásobníků. Kolísání tlaku by mělo být minimalizováno, například při průchodu stlačeného rozpouštědla přes pulzní tlumící zařízení. Hadice a přípojky musí být schopny odolat tlaku vyvinutému čerpacím systémem. (9)

Čerpadla jsou trojího typu a to plynová, velkoobjemová a dvojčinná.

U plynových je zdrojem energie stlačený plyn. Plyn je poté veden přímo nad hladinu kapaliny nebo je od ní oddělen pomocí pístu. Při kontaktu plynu s kapalinou se plyn částečně v kapalině rozpouští, proto je výhodnější oddělit plyn od kapaliny prostřednictvím pístu či membrány. Tato čerpadla jsou obvykle bezpulsní, velmi jednoduchá a levná.

Druhým typem jsou velkoobjemová čerpadla. Tlak na píst je zde vyvolán mechanicky použitím elektromotoru. Jejich pracovní objem je 100-500 ml. Hlavní výhodou je konstantní průtok, nepulsující tlak a vysoká stabilita základní linie detektoru. Mezi nevýhody se řadí to, že cena čerpadel je velmi vysoká z důvodu přesného opracování jednotlivých dílů. Také pomalé ustanovení stabilního průtoku (15-60 minut) se řadí mezi nevýhody. Tento typ čerpadla se musí po několika hodinách práce plnit MF a použítá

MF musí být odvzdušněna, což je také velice nákladné. Nejčastěji se používá pro práci s vysokými tlaky.

Posledním druhem jsou dvojčinná čerpadla. Jedná se o reciproční čerpadla s malým objemem činné části. Jejich charakteristickým znakem je pulsní tok MF. Čerpaná kapalina je vytlačována pístem nebo membránou. Hlava čerpadla je opatřena dvěma ventily- sacím a výtlačným.

Důležité je pro pumpy nastavení jejich průtoku. Měl by být přesný a reprodukovatelný se směrodatnou odchylkou nižší než 0,5 až 1 %. Pumpa musí být zkonstruována z materiálů, které nepodléhají korozi a musí být odolné agresivním mobilním fázím, jako jsou slabě kyselé a bazické roztoky, organická rozpouštědla a tlumivé roztoky. Nejčastěji používaným materiálem je nerezová ocel, titan nebo keramické materiály. (13) (14)

2.7.3 Dávkovací zařízení

Účinnost separace může významně ovlivnit zařízení pro dávkování vzorku. Při nedokonalém dávkování může docházet k významnému rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení, zejména při použití vysoce účinných kolon. U dávkovaných vzorků je potřeba dbát na to, aby byly dokonale rozpuštěny. Nejlepší je použít rozpouštědlo o stejném složení jako MF. Pokud jsou ve vzorku přítomny částice, musí být odfiltrovány. Pro dávkování se používají automatické dávkovače nebo dávkovací ventily. (14)

Roztok vzorku se obvykle zavádí do protékající mobilní fáze nebo v blízkosti hlavy kolony za použití vstřikovacího systému založeného na vstřikovacím ventilu, který může pracovat s vysokým tlakem. Takový systém vstřikování má pevnou smyčku nebo variabilní množství plynu, které je možno ovládat ručně nebo automatizovaně. Částečné plnění smyčky může vést ke zhoršení přesnosti objemu injekce. (9)

2.7.4 Detektory

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí na použitém detektoru. Mezi nejčastěji používané detektory patří: spektrofotometrické detektory, fluorimetrické detektory, hmotnostní detektory, elektrochemické detektory a refraktometrické detektory.

Nejčastěji používanými detektory při analýze HPLC jsou detektory spektrofotometrické díky značné citlivosti (10^{-9} - 10^{-10} g/ml) a možnosti užití při gradientové eluci. Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky během několika sekund složkami eluátu protékajícího celou detektorem v maximu píku hodnoceného léčiva. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast VIS. V praxi mezi nejužívanější patří UV-VIS detektory s proměnou vlnovou délkou,

Dalším typem detektoru jsou takové, které detekují léčiva fluoreskující buď samovolně nebo po provedené derivatizaci, jde o fluorimetrické detektory. Jsou tedy méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (10^{-9} - 10^{-12} g/ml) a selektivnější.

Elektrochemické detektory využijeme u hodnocení léčiv, které jsou elektrochemicky aktivní, tzn. dají se oxidovat nebo redukovat na elektrodě. Elektrochemická veličina, je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Jejich citlivost je na úrovni citlivosti fluorimetrického detektoru. (4) (5)

V hmotnostním spektrometru jsou molekuly léčiva ionizovány nárazy elektronů, termoionizací a elektroionizací. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje. Hmotnostní detektory jsou finančně velmi náročné, ale jsou vysoce selektivní a citlivé. (6) (15)

Posledním typem detektorů jsou refraktometrické detektory. Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahující analyzovanou látku. Díky velkým nevýhodám, ke kterým patří menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování a nemožnost využití při gradientové eluci, se používají ojediněle při analytickém hodnocení léčiv. (4) (5)

2.7.5 Zařízení pro zpracování dat

Pro zpracování záznamů z detektoru je možné použít přístroj, který umí data zpracovat do chromatografických píků a uložit. Pro tuto činnost se využívá počítač s tiskárnou. Mají velkou kapacitu pro sběr, zpracování a ukládání dat pro opětovné zpracování. (9) (5)

2.8 VLASTNOSTI LL

2.8.1 Vlastnosti perindoprilu

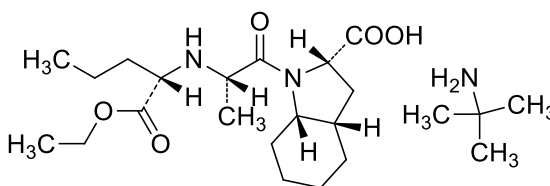
2.8.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti perindoprilu

Lékopisný název: Perindopril-erbumin, perindoprilum erbuminum

Sumární vzorec: C₂₃H₄₃N₃O₅

Chemický název: 2 -methylpropan-2-amin-(2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-(ethoxykarbonyl) butyl]amino }propanoyl]oktahydro-1H-indol-2-karboxylát.

Strukturní vzorec:



M_r 441,61

Perindopril-erbumin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96 %, dobře rozpustný nebo mírně rozpustný v dichlormethanu. Je polymorfní. (8)

2.8.1.2 *Farmakologické vlastnosti perindoprilu*

Charakteristika

Perindopril patří do skupiny inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu a je proléčivem perindoprilátu.

Farmakokinetika

Podává se hlavně perorální cestou, kde se vstřebává až 75 % dávky. Biotransformuje se játry na perindoprilát a neúčinné metabolity. Vylučuje se hlavně močí (43 % neúčinných metabolitů, 22 % ve formě perindoprilátu, méně než 10 % v nezměněné formě). Částečně se také vylučuje žlučí, asi z 25 %. Biologický poločas perindoprilu je asi 1 hodina, avšak biologický poločas perindoprilátu je až 10 hodin. Po jednorázovém i opakovaném podání účinek přetrvává déle než 24 hodin. (16) (17)

Dávkování a způsob podání

Perindopril se využívá k léčbě arteriální hypertenze, srdeční nedostatečnosti, snížení výskytu kardiovaskulárních příhod u pacientů s ICHS a jako profylaxe recidivy cévní mozkové příhody. Dávkování je individuální. Společným znakem dávkování perindoprilu většinou bývá podávání 1 x denně, nejprve zahajovací dávka, poté dvojnásobné navýšení a dlouhodobé užívání. (16)

Léky s látkou

Mezi monokomponentní přípravky patří APO-Perindo, Coverex, Perinalon, Perindopril Actavis, Prenessa, Prestarium, a jiné. Mezi kombinované přípravky patří Perinpa, Prenewel a Prestarium Combi. Tyto přípravky bývají kombinací perindoprilu erbumin a indapamidu v různých koncentracích. (16)

2.8.2 Vlastnosti amlodipinu

2.8.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti amlodipinu

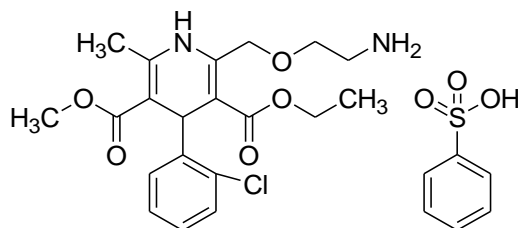
Lékopisný název: Amlodipin-besylát, Amlodipini besilas

Sumární název: C₂₆H₃₁ClN₂O₈S

Chemický název:

3-ethyl-5-methyl-(4RS)-2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorfenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát-benzensulfonát

Strukturní vzorec:



M_r 567,05

Amlodipin-besylát je bílý nebo téměř bílý prášek. Těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v ethanolu bezvodém, těžce rozpustný v propan-2-olu. (18)

2.8.2.2 *Farmakologické vlastnosti amlodipinu*

Charakteristika

Amlodipin je dihydropyridinový blokátor vápníkových kanálů 3. generace s vysokou vaskulární selektivitou.

Farmakokinetika

Po perorálním podání se vstřebává 60-65 % dávky a maximálních plazmatických hladin je dosaženo za 6-9 hodin. Amlodipin je biotransformován v játrech prostřednictvím oxidázy CYP_{3A4} na neúčinné metabolity. Vylučuje se převážně močí, částečně též žlučí. Jeho biologický poločas je velmi dlouhý (30-35 hod).

Dávkování a způsob podání

Amlodipin se využívá k léčbě stabilizované anginy pectoris, variantní anginy pectoris a k léčbě arteriální hypertenze. Obvykle se podává 5 mg 1 x denně, kdy je možné dávku zdvojnásobit. Léčivo amlodipin besilas je používán ve formě perorální.

Léky s látkou

Mezi léčivé přípravky obsahující pouze amlodipin patří například Agen, Zorem, Amlozek, a jiné. V kombinovaných přípravcích jej můžeme najít v přípravku Caduet a Prestance. (16) (17)

2.8.3 Vlastnosti valsartanu

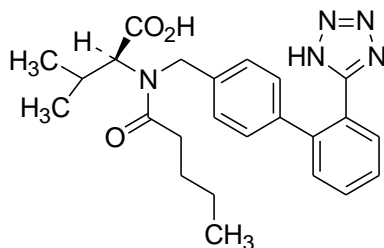
2.8.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti valsartanu

Lékopisný název: Valsartanum, Valsartan

Sumární název: C₂₄H₂₉N₅O₃

Chemický název: (2S)-3-Methyl-2-[pentanoyl [[2'-(1H-tetrazol-5-yl)bifeny-4-yl]methyl]amino]butanová kyselina

Strukturní vzorec:



M_r 435,5

Valsartan je bílý nebo skoro bílý, hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v bezvodém ethanolu a mírně rozpustný v dichlormethanu. (19)

2.8.3.2 *Farmakologické vlastnosti valsartanu*

Charakteristika

Valsartan je kompetitivní antagonist angiotenzinových receptorů AT₁, tj. na receptoru pro angiotenzin II. Je to analog k látce losartan, který byl zaveden v roce 1996. Rozdíl mezi ACEi a sartany je v ovlivnění bradykyninu. Sartany tuto dekompenzaci neovlivňují a proto také nevyvolávají kašel. Valsartan a všechny účinné látky této skupiny léčiv, používáme v terapii hypertenze nebo v terapii srdeční nedostatečnosti.

Farmakokinetika

Valsartan se po perorálním podání vstřebává z 10-35 % dávky. Minimálně se biotransformuje v játrech na neúčinné metabolity. Vylučuje se převážně v nezměněné formě žlučí (70 %), částečně též močí (30 %). Valsartan má biologický poločas 6-9 hodin a jeho účinek po jednorázovém podání trvá 8-12 hodin. Po opakovaném podání přetrvá až 24 hodin.

Dávkování a způsob podání

Dávkování je individuální dle onemocnění. Pro léčbu arteriální hypertenze podáváme obvykle 80 mg 1x denně. V případě zvýšení dávky je možné s odstupem nejméně dvou týdnů zvýšit na 160 mg 1x denně.

U léčby srdeční nedostatečnosti začínáme dávkou 40 mg 2 x denně a poté můžeme zvyšovat až na dvojnásobek.

Valsartan je možné použít, pokud chceme snížit výskyt kardiovaskulárních příhod u pacientů po překonaném infarktu myokardu s dysfunkcí levé komory srdeční nebo se srdeční nedostatečností. V tomto případě začínáme dávkou 20 mg 2 x denně a poté ji zvyšujeme na

dvojnásobnou dávku dávky předchozí. Jako udržovací dávka se považuje dávka 160 mg 2 x denně. Valsartan začínáme podávat nejdříve 12 hodin po prodělaném infarktu myokardu a nejdéle 10 dnů po něm.

Léky s látkou

Mezi léčivé přípravky pouze s účinnou látkou valsartan můžeme zařadit Diovan od firmy Novartis, Valsabela, Valsacor a Valsartan Actavis. Mezi léčivé přípravky kombinované řadíme Co-Diovan, Exforge a Teval plus H. V kombinovaných přípravcích se vyskytuje účinná látka valsartan s hydrochlorothiazidem nebo s amlodipinem v jedné tabletě. (16) (17)

2.8.4 Vlastnosti hydrochlorothiazidu

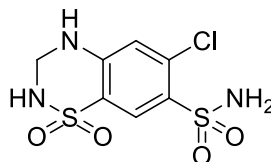
2.8.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti hydrochlorothiazidu

Lékopisný název: Hydrochlorothiazid, Hydrochlorothiazidum

Sumární název: C₇H₈ClN₃O₄S₂

Chemický název: 6-chlor-7-sulfamoyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid.

Strukturní vzorec:



M_r 297,73

Hydrochlorothiazid je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Velmi těžce rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v ethanolu 96 %. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. (20)

2.8.4.2 *Farmakologické vlastnosti hydrochlorothiazidu*

Charakteristika

Hydrochlorothiazid je thiazidové saluretikum. Obecně jsou saluretika méně účinná ale déle působící v porovnání s kličkovými diuretiky. Inhibují reabsorpci sodíku a chloridů v distálním tubulu ledvin.

Hlavní indikací saluretik je arteriální hypertenze. Používají se jak v monoterapii tak také v kombinační léčbě. (16)

Farmakokinetika

Hydrochlorothiazid po perorálním podání se vstřebává z 60-80 % dávky. Vylučuje se v nezměněné formě prakticky úplně do moči. Biologický poločas hydrochlorothiazidu, diuretika distálního tubulu, je 10-12 hodin. Po perorálním podání účinek nastupuje za 2 hodiny, maximálního účinku dosahuje za 3-6 hodin a účinek trvá 6-12 hodin po jednorázovém podání a až 24 hodin po opakovaném podání.

Dávkování a způsob podání

Dávkování je rozličné dle skupiny pacientů.

Pro dospělé s arteriální hypertenzí se doporučuje každý den 12,5 mg nejlépe ráno, nebo obden 25 mg nejlépe ráno. V kombinaci s ACEi nebo sartany je možné zvýšit dávku na 1 x 25 mg.

U osob starších 65 let, u diabetiků, se doporučuje nepřekračovat dávku 12,5 mg/den. U pacientů s edémy můžeme podat dávku 25 mg-100 mg denně v jedné nebo dvou dílčích dávkách. Za udržovací dávku je považováno 25 mg 1x denně.

Pro děti u edémů i arteriální hypertenze je doporučováno denní dávku 1-2 mg/na kg váhy, rozdělit do dvou dílčích dávek. Maximálně však můžeme podat 25 mg. (16) (17)

Léky s látkou

Mezi léčivé přípravky obsahující pouze hydrochlorothiazid patří Hydrochlorothiazid Zentiva. Nejčastěji se hydrochlorothiazid kombinuje s ACEi, sartany nebo beta-blokátory. Ke kombinovaným přípravkům zařadíme například Amprilan H (+ramipril), Enap H (+enalapril hydrogenomaleas), Inhibice plus (+cilazapril), Lodoz (+bisoprolol fumarát), Loradur (+amilorid), Lorista H (+losartan), ... (16) (17)

2.8.5 Vlastnosti indapamidu

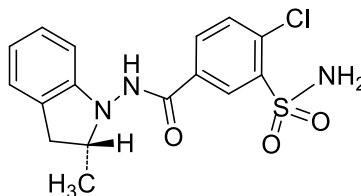
2.8.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti indapamidu

Lékopisný název: Indapamid, Indapamidum

Sumární název: C₁₆H₁₆ClN₃O₃S

Chemický název: 4-chlor-N-[(2R)-2-methyl-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl]-3-sulfamoylbenzamid

Strukturní vzorec:



M_r 365, 83

Indapamid je bílý nebo téměř bílý prášek. Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96 % . (8)

2.8.5.2 *Farmakologické vlastnosti indapamidu*

Charakteristika

Indapamid je sulfamoylbenzamidové saluretikum s arteriolodilatačním účinkem.

Farmakokinetika

Po perorálním podání se úplně vstřebává. Biotransformuje se extenzivně v játrech na neúčinné metabolity. Vylučuje se především močí, z 60-70 % ve formě metabolitů, z 5-7 % v nezměněné formě. Částečně se také vylučuje žlučí (23 %). Biologický poločas indapamidu je 14 -15 hodin. Účinek nastupuje za 1-3 hodiny.

Dávkování a způsob podání

Indapamid se používá ve formě retardované i neretardované.

Neretardované lékové formy se užívají nejlépe ráno, 1 x denně, 2,5 mg, u arteriální hypertenze. Při prevenci recidivy cévní mozkové příhody je vhodná kombinace s perindopilem erbuminem v dávce 2,5 mg/ 4 mg 1 x denně. Doporučuje se předchozí čtyřtýdenní monoterapie perindopilem erbuminem.

Retardované lékové formy se podávají u arteriální hypertenze nejlépe 1x denně 1,5 mg ráno.

Léky s látkou

Mezi léčivé přípravky obsahující pouze léčivou látku indapamid patří Indap, Indapamid HF, Indapamid Stada, Indapamid Teva, Rawel a

Tertensif. Indapamid se využívá i jako kombinační léčivo v kombinaci s léčivou látkou perindoprilum erbuminum v přípravcích Perinpa, Prenewel, Prestarium Combi a Prestarium Neo Combi. (16)

2.9 PRÁCE TÝKAJÍCÍ SE PROBLEMATIKY HPLC A LL

Pro společnou nebo samostatnou analýzu amlodipinu, perindoprilu, valsartanu, hydrochlorothiazidu a indapamidu byly vypracovány do současné doby různé metody a podmínky. Analýza těchto látek byla prováděna nejčastěji pomocí HPLC, spektrofotometrie a TLC.

1. Současná HPLC analýza perindoprilu a losartanu v čisté formě tablety. Práce byla zaměřena na určení podmínek v binární směsi. Separace byla provedena na reverzní fázi C18 (LUNA). MF byla složena z fosfátového pufru o pH 6,8 a MeOH v poměru 15:85 (v/v). Měření probíhalo při průtokové rychlosti 0,8 ml/min při 20 °C. (21)

2. Společná HPLC analýza perindoprilu a indapamidu v kombinovaném přípravku. Jako stacionární fáze byla použita kolona C18 (Thermo Hypersil BDS, 250 × 4,6 mm). MF se skládala z fosfátového pufru, okyseleného na pH 3,6 a MeOH v poměru 80:20 (v/v). Měření probíhalo při vlnové délce 215 nm, průtokové rychlosti 0,8 ml/min. (22)

3. Za použití HPLC a kapilární elektroforézy pro stanovení perindopril erbumin byly zjištěny podmínky pro měření: chirální stacionární fáze (ChiraDex tvořená β -cyklodextrinem), MF 0,05 M fosfátový pufr o pH 3,0 a ACN v poměru 45:55 (v/v). Průtoková rychlost 1,0 ml/min, vlnová délka 210 nm. (23)

4. HPLC stanovení u kaptoprilu, indapamidu a jejich příbuzných sloučenin ve formě tablet. SF 250 × 4,6 mm Xterra RP8, vlnová délka 210 nm, MF 0,03 M fosfátového pufru o pH 2,8, upravený kyselinou fosforečnou, MeOH a ACN v poměru 6:2:2 (v/v/v). Sledování kinetiky degradace kyselin a zásad. (24)

5. Společné stanovení pomocí HPLC u látek perindopril erbumin a indapamid v kombinované tabletě. SF na inertsil ODS 3V (4,6 mm x 250 mm; velikost částic 5 μ m). MF voda o pH 2,5 okyseleno pomocí kyseliny chloristé a ACN. Průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 215 nm. (25)
6. Metody HPLC a TLC pro stanovení amlodipinu besilas a indapamidu v kombinovaném dávkování. SF ODS intersil C 18 sloupec (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), při teplotě 25 °C, průtoková rychlost 1 ml/min, MF 0,02 M fosfátový pufr o pH 4,0 okyselený k. fosforečnou a ACN a MeOH v poměru 20:20:60 (v/v/v), vlnová délka 240 nm (26)
7. Společné stanovení HPLC a spektrofotometrie u látek perindoprilu a indapamidu v binární směsi ve farmaceutických lékových formách. Kolona s reverzní fází. MF fosfátový pufr o pH 2,4 a ACN v poměru 70:30 (v/v) (27)
8. HPLC metoda, SF Inertsil ODS C18 (100x4,6mm), průtoková rychlost 1,0 ml/min, 250 nm, MF fosfátový pufr a ACN 65:35 (v/v) (28)
9. HPLC společné stanovení valsartanu a ezetimibu v kombinované tabletě. Stacionární fáze C18, MF fosfátový pufr a ACN v poměru 58:42 (v/v), pH 3,15, průtoková rychlost 0,8 ml/min, vlnová délka 230 nm. Výhody metody: jednoduchost, preciznost, přesnost, reprodukovatelnost, konkrétnost. (29)
10. RP-HPLC metoda, MF 0,01M octan amonný o pH 5,5 a ACN, vlnová délka 240 nm, stacionární fáze C18 (250x4,6 mm, 5 μ m), Průtoková rychlost 1,5 ml/min (30)

11. HPLC metoda, Valsartan a Irbesartan v kombinovaném léčivém přípravku, stacionární fáze C18 reverzní fáze, MF ACN a fosfátový pufr o pH 3, průtoková rychlost 1,5 ml/min, vlnová délka 254 nm (31)

12. SF Konvenční RP-C18 (Intersil® ODS-3) a kalixarenový sloupec (Caltrex BIII®). Kalixarenová stacionární fáze se liší od konvenčního RP-C18 v tom, že jsou v cyklodextrinu z dutin. Odlišné účinky na retenci analytů. Bylo zjištěno, že chemická struktura a vlastnosti analytů mají účinnou roli v jejich oddělení. (32)

13. HPLC metoda, valsartan, losartan, irbesartan v kombinované lékové formě, SF C18, MF ACN a 0,025 M fosfátového pufru o pH 3,65, průtoková rychlost 1ml/min, vlnová délka 254 nm (33)

14. RP-HPLC metoda, irbesartan, amlodipin besylát, SF Zorbax CN, MF 0.01 M fosfátového pufru o pH 3,0 a ACN v poměru 70:30 (v/v), průtoková rychlost 0,9 ml/min, vlnová délka 240 nm (34)

15. RP-HPLC metoda, hydrochlorothiazid, amlodipin, olmesartan v kombinovaném LP, SF Symmetry C 18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Značka: XTerra), MF TEA pufr, pH bylo upraveno na 3,5 pomocí kyseliny fosforečné a ACN v poměru 40:60, průtoková rychlost 0,8 ml/min, vlnová délka 230 nm (35)

16. RP-HPLC metoda, společné stanovení hydrochlorothiazidu, amlodipinu, olmesartanu v hromadném LP, SF Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Značka: Xterra), TEA pufr, jehož pH bylo upraveno na 3,5 pomocí kyseliny fosforečné a ACN v poměru 40:60, průtoková rychlost 0,8 ml/min, vlnová délka 230 nm (36)

17. HPLC metoda, Fimasartan a amlodipin v LF tablet, Nucleosil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), 40 °C, MF ACN a 0,02 M fosfátového pufru o pH 2,2 v poměru 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 237 nm (37)
18. RP-HPLC, HPTLC, UV spektrofotometrie, Amlodipim besilas, hydrochlorothiazid, valsartan v kombinovaném přípravku, v tabletách, SF C18, MF fosfátový pufr 0,05 M o pH 3,7, s 0,2 % triethylaminu jako modifikátoru a ACN v poměru 56:44 (v/v), vlnová délka 232 nm (38)
19. RP-HPLC, Amlodipin besilas, atorvastatin calcium, SF Waters X-Terra, C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), MF MeOH a 0,01 M octanu sodného pufovaného na pH 4 v poměru 70:30 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 240 nm (39)
20. RP-HPLC, Telmisartan, ramipril, amlodipin besylát, atorvastatin calcium, MF 0,025 M fosfátový pufr (pH 6,0) a ACN v poměru 60:40 (v/v), vlnová délka 205 nm, SF Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), průtoková rychlost 1,5 ml/min (40)
21. HPLC, Amlodipin, Telmisartan, hydrochlorothiazid, Atenolol a Losartan, SF Inertsil C18 (100 mm, 4,6 mm vnitřní průměr., 5 μ m), MF 0,01 M fosfátový pufr a MeOH 95:5 (v/v), průtoková rychlost 1,5 ml/min, při teplotě 40 °C, vlnová délka 217 nm (41)
22. HPLC, Amlodipin besilát, telmisartan, tablety, SF Athena C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ velikost částic), MF MeOH a fosfátový pufr (pH 4), v poměru 70:30 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 240 nm (42)
23. RP-HPLC, Quinapril, hydrochlorothiazid-hromadný prášek, SF Zorbax Eclipse XDB, C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), při teplotě 30 °C, MF

ACN : fosfátový pufr, pH 4 pomocí kyseliny o-fosforečné v poměru 35:65 (v/v), průtoková rychlost 0,9 ml/min, vlnová délka 210 nm (43)

24. HPLC, Olmesartan, medoxomil, hydrochlorothiazid-kombinované tablety, SF 4,6 mm ID x 200 mm, 5 µm cyano sloupce, MF MeOH a 0,01 M fosfátový pufr, obsahující 0,1% triethylamin (pH 2,5) v poměru 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 260 nm, vnitřní standart-valsartan (44)

25. RP-HPLC, Telmisartan, hydrochlorothiazid, MF MeOH: ACN v poměru 70:30 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 270 nm, Vnitřní standart-rabeprazol (45)

26. RP-HPLC, hydrochlorothiazid a irbesartan, SF C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), MF MeOH a 0,05 M fosfátový pufr o pH 2,5 v poměru 60:40 (v/v), průtoková rychlost 0,8 ml/min, při teplotě 40 °C, vlnová délka 226 nm (46)

27. RP-HPLC, enalapril, hydrochlorothiazid, SF C18, ODS UG sloupec 250x4,5mm), MF acetátový pufr, MeOH, ACN v poměru 60:20:20 (v/v/v) o pH 5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, vlnová délka 232 nm (47)

28. HPLC, irbesartan, hydrochlorothiazid u kombinovaných LP, SF Chromolith® Výkon RP-18, MF fosfátový pufr o pH 4 a ACN v poměru 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml/min, vlnová délka 270 nm (48)

29. RP-HPLC, losartan draselný, valsartan, telmisartan, irbesartan a hydrochlorothiazid. Gradientní metoda HPLC byla vyvinuta pro stanovení několika sartanů za přítomnosti hydrochlorothiazidu, MF 0,025 M

fosfátového pufru o pH 6,0 a ACN v poměru 80:20 (v/v), vlnová délka 220 nm, SF ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 um), průtokové rychlosti 1,5 ml/min (49)

30. HPLC metoda pro stanovení perindoprilu a indapamidu. SF Hypersil BSD C18 (250 mm x 4,6 mm), MF fosfátový pufr o pH 3,5 a MeOH v poměru 65:35 (v/v). Průtoková rychlost 1 ml/min, vlnová délka 215 nm. (47)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

3.1.1 Použité Chemikálie

Acetonitril, PhEur.	Merck Německo
Amlodipin	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Fosforečnan amonný střední, p. a.	Penta, Chrudim, ČR,
Hydrochlorothiazid	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Indapamid	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Kyselina octová, p. a.	Penta, Chrudim, ČR
Methylalkohol, p. a.	Penta, Chrudim, ČR
Octan amonný, p. a.	Penta, Chrudim, ČR,
Perindopril	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Valsartan	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Voda čištěná reverzní osmózou	

3.1.2 Použité přístroje

Acidimetr 333,	Druopta, Praha, Česká Republika
Analytické váhy,	Kern ALS-4N, Německo
Kapalinový chromatograf Hewlett Packard Series 1100,	HPST, Praha, ČR

3.1.3 Chromatografický materiál – SF

Chromatografická kolona Discovery®Cyano, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, Bellefonte, USA

Chromatografická kolona Discovery®HS F5, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, Bellefonte, USA

Chromatografická kolona Discovery®HS C18, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, Bellefonte, USA

3.2 VYPRACOVÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO HPLC LL

Pro současné hodnocení amlodipinu, hydrochlorothiazidu, perindoprilu, valsartanu a indapamidu bylo zapotřebí stanovit optimální chromatografické podmínky.

3.2.1 Výběr stacionární a mobilní fáze

Pro separaci byly použity různé typy stacionárních fází, na kterých byly zkoušeny různé složení mobilní fáze. Při použití stacionární fáze HS C18, Cyano a HS F5, byla mobilní fáze složena z organického rozpouštědla acetonitrilu nebo methanolu a fosfátového nebo octanového pufru.

3.2.1.1 Chromatografická kolona- Chromatografická kolona Discovery@HS C18

- ACN : 0,01 M fosfátový pufr	60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,01 M octanový pufr	60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,01 M fosfátový pufr (pH=3)	60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,01 M octanový pufr	60 : 40 (v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,7)	60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,7)	60 : 40 (v/v)

3.2.1.2 Chromatografická kolona- Chromatografická kolona Discovery@Cyano

- MeOH : 0,01 M fosfátový pufr (pH=3,9)	60 : 40 (v/v)
- MeOH: 0,01 M fosfátový pufr (pH=3,7)	70 : 30(v/v)
- ACN : 0,01 M fosfátový pufr (pH=3,8)	60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,7)	60 : 40 (v/v)

- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,2) 60 : 40(v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3, 5) 60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,025 M fosfátový pufr (pH=3,3) 85 : 15(v/v)
- ACN : 0,025 M fosfátový pufr (pH=5,6) 85 : 15 (v/v)
- ACN : 0,01 M fosfátový pufr (pH=3,1) 85 : 15 (v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,5) 50 : 50 (v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=4,8) 50 : 50 (v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=7) 50 : 50 (v/v)

3.2.1.3 *Chromatografická kolona- Chromatografická kolona Discovery®HS F5*

- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr 60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,5) 60 : 40 (v/v)
- ACN : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,3) 70 : 30 (v/v)
- MeOH : 0,005 M fosfátový pufr (pH=3,5) 60 : 40 (v/v)

Analýzy probíhaly při **průtokových rychlostech** 0,5 – 1,0 ml/min.

3.2.2 **Výběr vlnové délky pro UV detekci**

Vhodná vlnová délka byla zvolena na základě již provedených prací (citace 2-5, 15, 16, 21, 23, 26, 29, 30) u amlodipinu, valsartanu, hydrochlorothiazidu, indapamidu a perindoprilu a na základě lékopisu. (8)

3.3 PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE A ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se připraví tak, že nejprve se připraví pufr (fosfátový nebo octanový) o různé koncentraci rozpuštěním hydrogenfosforečnanu amonného respektive octanu amonného. Pro přípravu pufru se naváží potřebné množství hydrogenfosforečnanu amonného (octanu amonného) do odměrné baňky a čištěnou vodou se doplní po rysku. K připravenému pufru se přidá organické rozpouštědlo v daném poměru. Pokud je zapotřebí MF okyselit, okyselí se pufr pomocí 50 % kyseliny fosforečné (kyseliny octové) a pomocí acidimetru se skleněnou elektrodou se okyselí na potřebné pH. MF je připravena k měření.

Příprava pufrů:

Roztok octanu amonného (0,01 mol/l) v poměru 40 : 60 (v/v)

Vodný roztok octanu amonného o koncentraci 0,01 mol/l se připravil navážením 0,3821 g octanu amonného a přidáním 500 ml vody čištěné reverzní osmózou.

Roztok fosforečnanu amonného (0,01mol/l, 0,005mol/l, 0,025mol/l) v poměru 60 : 40(v/v), 85:15(v/v)

Vodný roztok fosforečnanu amonného o dané koncentraci se připravil navážením 0,6866 g (0,3433 g) fosforečnanu amonného a přidáním 500 ml (200 ml) vody čištěné reverzní osmózou.

Roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l, 0,005 mol/l) v poměru 60:40 (v/v), 50:50 (v/v), 70:30 (v/v)

Vodný roztok fosforečnanu amonného o dané koncentraci se připravil navážením 0,6866 g (0,3433 g) fosforečnanu amonného a přidáním 500 ml vody čištěné reverzní osmózou.

3.3.2 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky všech látek v koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky v methanolu a doplněním v odměrné baňce po rysku. Ředěním zásobních roztoků mobilní fázi byly připraveny pracovní roztoky.

- Amlodipin v koncentraci 0,05 mg/ml
- Hydrochlorothiazid v koncentraci 0,05 mg/ml
- Valsartan v koncentraci 0,08 mg/ml
- Indapamid v koncentraci 0,025 mg/ml
- Perindopril v koncentraci 0,1 mg/ml

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 VÝVOJ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

PRO HPLC ANALÝZU

AMLODIPINU, HYDROCHLOROTHIAZIDU, VALSARTANU, PERINDOPRILU A INDAPAMIDU

4.1.1 Stacionární fáze

Při hledání optimálních chromatografických podmínek pro společné hodnocení amlodipinu, hydrochlorothiazidu, indapamidu, valsartanu a perindoprilu byly vyzkoušeny různé stacionární fáze. Jako nejvhodnější byla vybrána chromatografická kolona Discovery®HS C18.

4.1.2 Mobilní fáze

Bylo zapotřebí najít vhodnou mobilní fázi, pro oddělení směsi daných léčivých látek, tak aby eluovaly s vhodným retenčním časem. Bylo vyzkoušeno mnoho mobilních fází v různém složení a v různých poměrech. Separace byla problematická z důvodu různé chemické povahy jednotlivých látek. Jako nejvhodnější byla zvolena mobilní fáze obsahující methanol jako organickou složku a fosfátový pufr v koncentraci 0,01 M v poměru 60:40 (v/v). Mobilní fáze byla okyselená na pH 3,5 pomocí 50 % kyseliny fosforečné.

4.1.3 Detekce

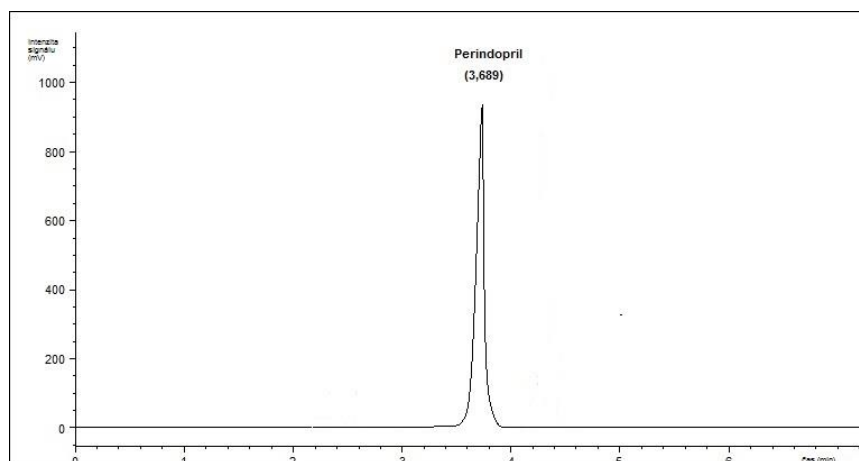
Hodnoty vlnových délek pro současnou analýzu perindoprilu, amlodipinu, valsartanu, indapamidu a hydrochlorothiazidu byly za optimální vzaty 215 nm a 225 nm jako kompromis na základě studií (citace 2-5, 9, 15, 16, 18, 21, 23, 26, 30), údajů z lékopisu a praktického vyzkoušení. Při této vlnové délce bylo dosaženo potřebné citlivosti a absorbovala zde všechna léčiva.

Použité chromatografické podmínky

V následujících tabulkách jsou uvedeny zkoušené chromatografické podmínky u jednotlivých roztoků standardů a roztoku směsi standardů, které při hodnocení látek vynesly vyhovující chromatogram. Jsou zde uvedeny použité stacionární fáze, mobilní fáze skládající se z pufru a organického rozpouštědla v daném poměru, pH pufru, teplota a vlnová délka, při které hodnocení probíhalo. U každé tabulky jednotlivých standardů je uveden chromatogram, který odpovídá vyhovujícím podmínkám pro eluování ve směsi standardů.

Tab. č. 1 Perindopril

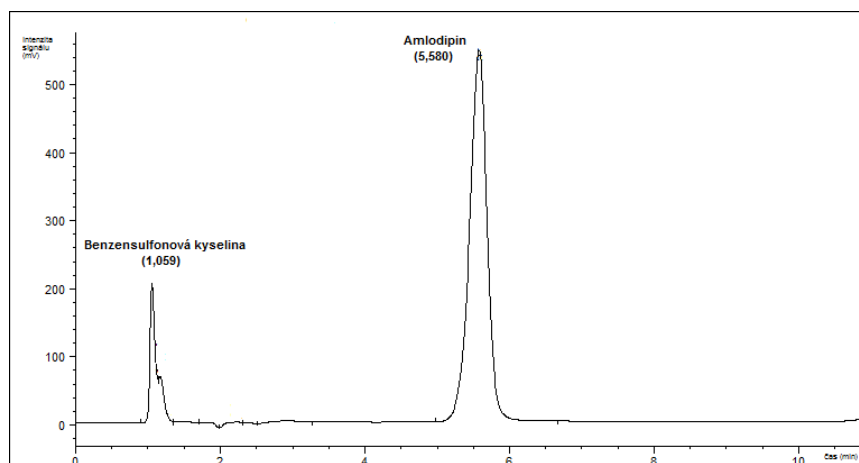
Standard LL	PERINDOPRIL			
	SF	MF	T (°C)	λ (nm)
Chromatografické podmínky měření	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,2 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	40	215



Obr. č. 2 Chromatografický záznam roztoku perindoprilu (koncentrace 0,1 mg/l), chromatografická kolona Discovery®HS C18, mobilní fáze MeOH: fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40), teplota 40 °C, vlnová délka 215 nm

Tab. č. 2 Amlodipin

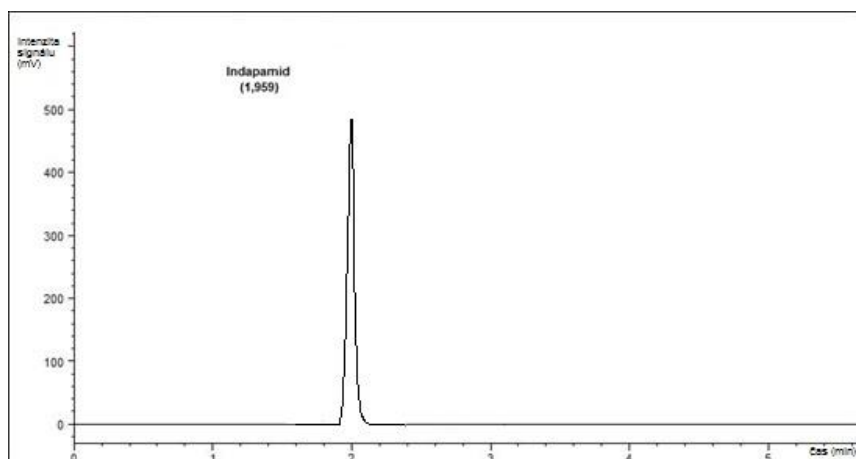
Standard LL	AMLODIPIN			
Podmínky měření	SF	MF	T (°C)	λ (nm)
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	20	215
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,92 (60:40)	20	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,92 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,2 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	40	215
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	Dle ČL 09	50	215



Obr. č. 3 Chromatografický záznam roztoku amlodipinu (koncentrace 0,05 mg/ml), (viz. Obr.č. 2)

Tab. č. 3 Indapamid

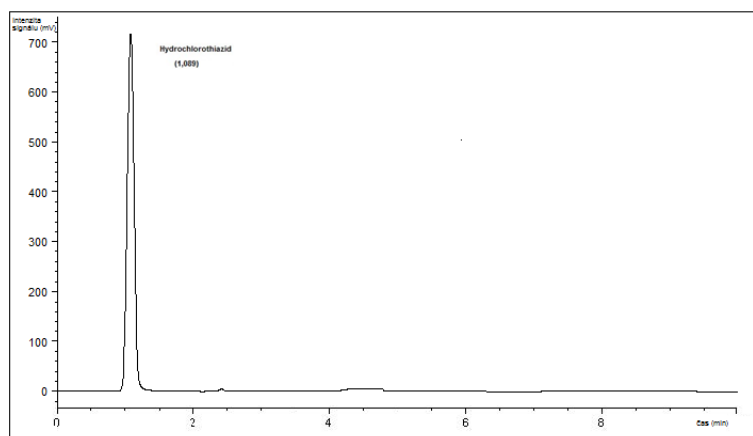
Standard LL	INDAPAMID					
Podmínky měření	SF		MF		T (°C)	λ (nm)
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18		MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na 3,7 (60:40)		20	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano		MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na 3,9 (60:40)		20	225
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18		MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na 3,9 (60:40)		40	225
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18		MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na 3,7 (70:30)		40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano		ACN: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na 3,7 (60:40)		40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano		MeOH: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na 3,2 (60:40)		40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano		ACN: 0,005M fosfátový pufr okyselený na 3,7 (60:40)		40	225



Obr. č. 4 Chromatografický záznam roztoku indapamidu (koncentrace 0,025 mg/ml), vlnová délka 225nm, (viz. Obr.č.2)

Tab. č. 4 Hydrochlorothiazid

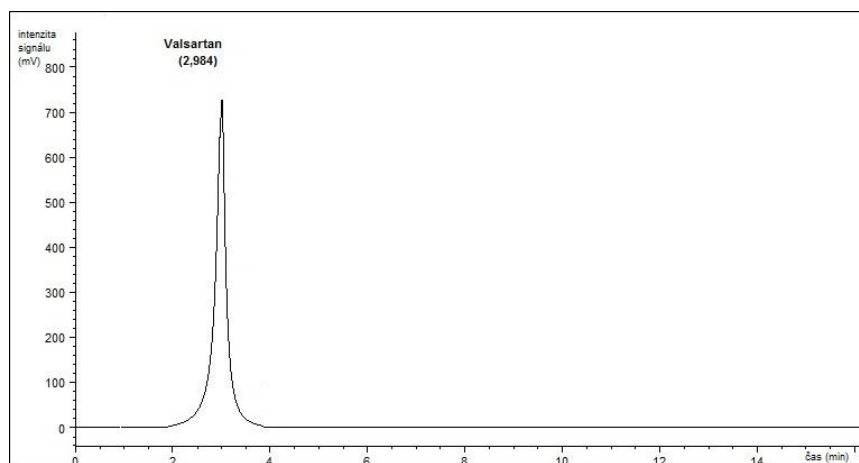
Standard LL	HYDROCHLOROTHIAZID			
Podmínky měření	SF	MF	T (°C)	λ (nm)
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	ACN:0,01 M fosfátový pufr (60:40)	20	225
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40)	20	225
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,9 (60:40)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,9(60:40)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (70:30)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,2 (60:40)	40	225



Obr. č. 5 Chromatografický záznam roztoku hydrochlorothiazidu (koncentrace 0,05 mg/ml), vlnová délka 225nm, (viz. Obr.č.2)

Tab. č. 5 Valsartan

Standard LL	VALSARTAN			
Podmínky měření	SF	MF	T (°C)	λ (nm)
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	ACN:0,01 M fosfátový pufr (60:40)	20	225
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,9 (60:40)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,9 (60:40)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (70:30)	40	225
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,2 (60:40)	40	225



Obr. č. 6 Chromatografický záznam roztoku valsartanu (koncentrace 0,08 mg/ml), vlnová délka 225 nm, (viz. Obr.č.2)

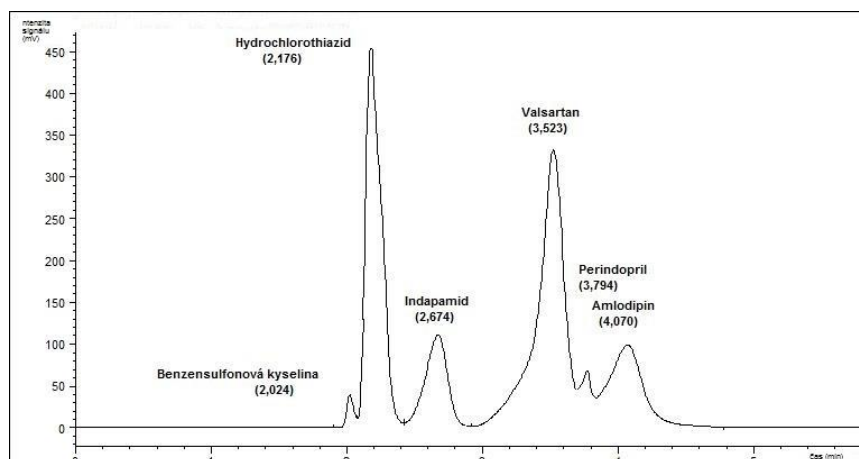
Směs standardů:

Tab. č. 6 Směs standardů

Standard LL	Směs standardů (Amlodipin, Valsartan, Hydrochlorothiazid, Perindopril, Indapamid)			
Podmínky měření	SF	MF	λ (nm)/ T (°C)	Průtoková rychlost (ml/min)
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselen na pH 3,5 (60:40)	215 40	1
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH:0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,5 (60:40)	225 40	0,8
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,5 (60:40)	225 40	0,5
	Chromatografická kolona Discovery®HS C18	MeOH: 0,01 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (70:30)	225 40	1
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	MeOH: 0,005 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,2 (60:40)	225 40	1
	Chromatografická kolona Discovery®Cyano	ACN: 0,025 M fosfátový pufr okyselený na pH 3,3 (60:40)	225 40	1

Separace byla velmi nedokonalá.

Optimální separace bylo dosaženo při podmínkách za použití chromatografické kolony Discovery®HS C18, mobilní fáze MeOH: fosfátový pufr okyselený na pH 3,7 (60:40), teploty 40 °C, vlnové délky 215 nm .viz. Obr.č.8.



Obr. č. 7 Chromatografický záznam roztoku směšného vzorku, Chromatografická kolona Discovery®HS C18, MF MeOH: fosforečnanový pufr 0,01 M okyselený na pH 3,7 (70:30), průtoková rychlost 1 ml/min, teplota 40°C, vlnová délka 225nm, Benzonsulfonová kyselina, Hydrochlorothiazid, Indapamid, Valsartan, Perindopril, Amlodipin

4.2 STUDIUM CHROMATOGRAFICKÉHO CHOVÁNÍ

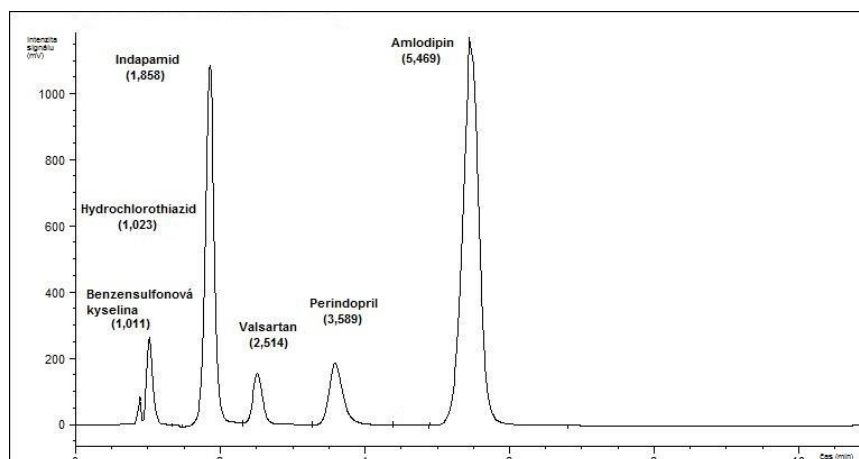
Byly zjišťovány retenční data u léčiv při změnách pH a procentuálním zastoupení organické složky v mobilní fázi. Získané hodnoty byly použity pro výpočet hmotnostního distribučního poměru.

4.2.1 Hmotnostní distribuční poměr

V následujících tabulkách je uvedeno poměrné množství organické složky (MeOH) v mobilní fázi. Vyhovující množství methanolu dle měření a výpočtu hmotnostního distribučního poměru bylo vzájemně potvrzeno.

Tab. č. 8 Závislost hmotnostního distribučního poměru na množství organické složky (MeOH) v MF

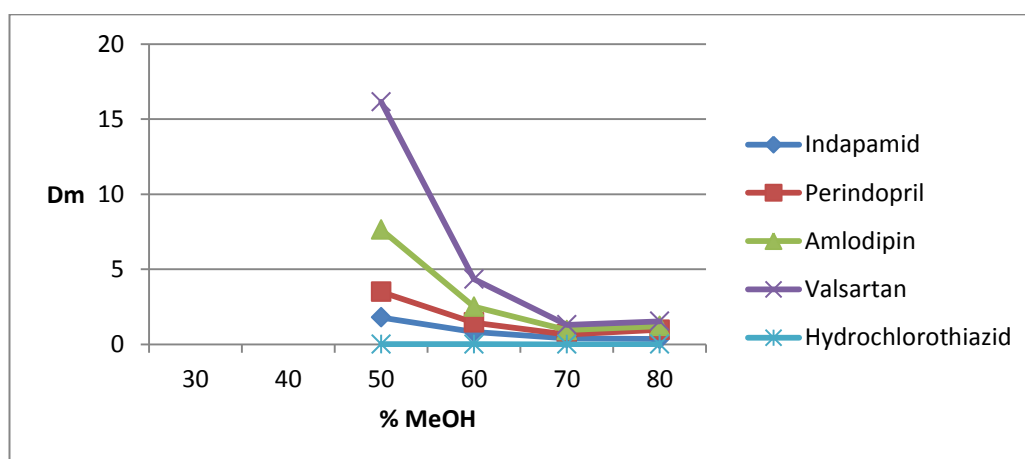
<i>Procentuální zastoupení organické složky v MF (% MeOH)</i>	<i>30</i>	<i>40</i>	<i>50</i>	<i>60</i>	<i>70</i>	<i>80</i>
Standardy látek						
Hydrochlorothiazid	Dlouhá dobá na rozdělení, nemá význam	Neoddělilo se do 30min	1,01	0,01	0	Špatné oddělení
Indapamid			1,74	0,81	0,40	
Perindopril			3,48	1,46	0,66	
Amlodipin			7,66	2,50	0,95	
Valsartan			16,15	4,32	1,31	



Obr. č. 8 Chromatogram hmotnostního distribučního poměru a závislosti pH, směsný vzorek Benzensulfonová kyselina (t_0), Hydrochlorothiazid, Indapamid, Valsartan, Perindopril, Amlodipin,

Podmínky: Chromatografický záznam roztoku směsného roztoku, kolona Discovery®HS C18, mobilní fáze MeOH a fosfátový pufr 0,01 M okyselený na pH 3,5 v poměru 60:40 (v/v), teplota 40 °C, vlnová délka 215 nm

Graf hmotnostního distribučního poměru:



Obr. č. 9 Graf hmotnostního distribučního poměru, Vzorek směsného standardu: Benzensulfonová kyselina (t_0), Indapamid, Perindopril, Amlodipin, Valsartan, Hydrochlorothiazid.

4.2.2 pH

Při měření byly vyzkoušeny různé hodnoty pH a bylo zjištěno, že nejlépe se látky oddělí při okyseleném pH 3,5 pomocí 50 % kyseliny fosforečné

Tab. č. 9 Závislost pH pufru na dokonalosti oddělení látek

<i>pH fosfátového pufru</i>	9,3	8,0	7,9	5,1	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0
Standardy látek									
Hydrochlorothiazid							0,01	0,01	0,01
Indapamid			0,17	0,25	0,79	0,81	0,82	0,84	0,71
Perindopril			0,74	0,62	1,29	1,87	1,75	1,56	1,09
Amlodipin			4,7	3,08	2,66	2,65	2,67	3,19	1,98
Valsartan						3,35	4,22	5,32	3,23

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro současnou HPLC analýzu indapamidu, valsartanu, amlodipinu, hydrochlorothiazidu a perindoprilu v kombinovaných léčivých přípravcích.

Při hledání optimálních chromatografických podmínek pro společné hodnocení byly vyzkoušeny různé stacionární fáze. Jako nejvhodnější byla vybrána chromatografická kolona Discovery®HS C18.

Bylo zapotřebí najít vhodnou mobilní fázi, pro oddělení směsi daných léčivých látek, tak aby eluovaly ve vhodném retenčním čase. Bylo vyzkoušeno mnoho mobilních fází v různém složení a v různých poměrech. Separace byla problematická z důvodu různé chemické povahy jednotlivých látek. Jako nejvhodnější byla zvolena mobilní fáze obsahující methanol jako organickou složku a fosfátový pufr v koncentraci 0,01 M v poměru 60:40 (v/v). Mobilní fáze byla okyselena na pH 3,5 pomocí 50 % kyseliny fosforečné.

Hodnoty vlnových délek pro současnou analýzu byly za optimální vzaty 215 nm, 225 nm jako kompromis na základě studií, údajů z lékopisu a praktického vyzkoušení. Při této vlnové délce bylo dosaženo potřebné citlivosti a absorbovala zde všechna léčiva.

Pro současnou analýzu byla za optimální vzata teplota 40 °C.

Použitelnost vypracovaných chromatografických podmínek pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaných látek vyskytujících se v různých kombinacích v antihypertenzivních přípravcích bude potvrzena následující validací.

SEZNAM ZKRATEK

- ACEi inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
- ACN acetonitril
- AMLO amlodipin
- AT 1 angiotenzin 1
- CYP cytochrom
- GC plynová chromatografie
- HCl hydrochlorothiazid
- IČ infračervené záření
- ICHS ischemická choroba srdeční
- IND indapamid
- KF 50% kyselina fosforečná
- KO kyselina octová
- LL léčivá látka
- M molární koncentrace
- MeOH methanol
- MF mobilní fáze
- PC počítač
- PER perindopril
- Pufr fosforečnan amonný
- RP-HPLC reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- SF stacionární fáze
- TLC tenkovrstevná chromatografie
- UHPLC ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
- UV ultrafialové záření
- VAL valsartan
- VIS viditelné spektrum

6 CITOVANÁ LITERATURA

1. <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/382003/69718/article.pdf>. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
2. Naushad, Mu, M. Rizwan Khan, UPLC Mass Spectrometry: Evaluation and Applications in Food Analysis. CRC Press, 2014. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
3. <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>. [Online] [Citace: 10. 9 2014.]
4. <http://www.sciencezoom.cz/hry-a-kvizy/kapalinova-chromatografie>. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]
5. Klimeš et al. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
6. Nováková, L. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3. .
7. Separáčn $\acute{\text{e}}$ metody, 2.2. Chromatografie, http://old.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/A03.pdf. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
8. Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
9. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. [Online] [Citace: 24. 9 2014.]
10. http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic_columns.htm. [Online] 18. 2 2015.
11. Nugent, Kerry, Kennedy. "Mobile phase preparation device for liquid chromatography." U.S. Patent No. 8,658,034. 25 Feb. 2014.
12. Meloun, B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Lab. Chrom. Metod. SNTL, Praha 1980.

13. Coufal, P. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online] 2. 3 1996. [Citace: 6. 9 2014.]
14. http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]
15. Cvačka, J. <http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc3.pdf>. [Online] 24. 11 2010.
16. Remedia, Compendium, čtvrté vydání, ISBN 978-80-902806-4-9, 2009 Panax Co, spol, s.r.o.
17. Lullmann, Heinz, Klaus Mohr, Martin Wehling. Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1. .
18. Český lékopis 2009: doplněk 2012. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024742427.
19. Český lékopis 2009: český lékopis 2009, doplněk 2010 : český lékopis 2009, doplněk 2011. Praha: Grada, 2011, 1 DVD.
20. Český lékopis 2009: doplněk 2013. Praha: Grada, 2013. ISBN 9788024746791.
21. Vijayalakshmi, R., et al. "RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Perindopril and Losartan in Pure Form and Tablet Formulations." *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 6.1 (2014). [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
22. Saravanan, G., B. Parveena. "Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous analysis of Perindopril and Indapamide in bulk and combined pharmaceutical dosage form." *Asian Journal of Research In Chemistry* 7.2 (2014): 182-186. [Online]
23. El-Gizawy, Samia M., et al. "Chiral separation of perindopril erbumine enantiomers using high performance liquid chromatography and capillary

electrophoresis." Anal. Methods 6.3 (2014): 825-830. [Online] [Citace: 10. 9 2014.]

24. El-Gindy, Alaa, et al. "Stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of captopril, indapamide, and their related compounds." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 37.5 (2014): 696-712. [Online] [Citace: 5. 9 2014.]

25. Ganduri, R. Babu, D. Mallikarjuna Rao Tippa, J. Reddy. "Stability indicating liquid chromatographic method for the determination of related substances of perindopril erb. and ind. from combined tbl. dosage form." Int. J. Pharm. Res. Sci., 2014,02(4),255. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

26. Chitlange, et al. "Development and Validation of HPLC and HPTLC Methods for Determination of Amlodipine Besylate and Indapamide in Combined Dosage Form." [Online] [Citace: 31. 8 2014.]

27. Erk, Nevin. "Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations." J. Pharm. Biomed. Anal. 26.1 (2001): 43-52. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

28. Rao, G. Sivasankara, et al. "Development and validation of new RP-HPLC assay method for valsartan in pure and in formulations. " Int. J. Pharm. Sci. Res. 5.2 (2014). [Online] [Citace: 6. 9 2014.]

29. Ramachandran, Sridevi, Badal Kumar Mandal, Sameer G. Navalgund. "Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Valsartan and Ezetimibe in Pharmaceuticals." Tropic. J. Pharm. Res. 13.5 (2014): 809-817. [Online] [Citace: 5. 9 2014.]

30. Hafez, H. M., et al. "Quantitative Determination of Amlodipine Besylate, Losartan Potassium, Valsartan and Atorvastatin Calcium by HPLC in their Pharmaceutical Formulations." Pharm. Anal. Acta. 5.300 (2014). [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

31. Youssef, Reem, Adnan Hbash, Ahmad Hassan. "Development and Validation of RP-HPLC Method for the Estimation and Separation of Valsartan, Losartan and Irbesartan in Bulk and Pharmaceutical Formulation." *International Journal of Pharmaceutical Sciences R*. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
32. Elhenawee, H. Hisham, A. E. Ibrahim. "Comparison between calixarene and conventional HPLC-stationary phases concerning with separation of antihypertensive drugs." *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37.1 (2014): 1-25. [Online] [Citace: 5. 9 2014.]
33. Youssef, Reem, Adnan Hbash, Ahmad Hassan. "Determination and Separation of Valsartan, Losartan and Irbesartan in Bulk and Pharmaceutical Formulation by RP-HPLC." [Online]
34. Bodapati, Kamala, et al. "Stability indicating RP-HPLC studies for the estimation of irbesartan, amlodipine besylate in pharm. foations and identification and charact. of degradants by using LC-MS ." *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* [Online] [Citace: 8. 9 2014.]
35. Kumar, S. Ashutosh, et al. "A new and rapid analytical method development & validation for simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine & olmesartan in tablet dosage form by using RP-HPLC." *J. Chem. Pharm. Res.* 6.5. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
36. Kumar, S. Ashutosh, et al. "Stability indicating Method Development and Validation for simultaneous estimation of Hydrochlorothiazide, Amlodipine and Olmesartan in tablet dosage form by using RP-HPLC." *Asian Journal of Research In Chemistry* 7.5 (2014): 53. [Online]
37. Moon, Hyeon Woo, et al. "Evaluation of stability and simultaneous determination of fimasartan and amlodipine by a HPLC method in combination tablets." *Asian J. Pharm. Sci.* (2014). [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

38. Sharma, Manish, et al. "Concurrent Estimation of Amlodipine Besylate, Hydrochlorothiazide and Valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV–Spectrophotometry." *J. Chromatogr. Sci.* 52.1 (2014): 27-35. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
39. Haritha, P., B. Sreenivasa Rao, Y. Sunandamma. "Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatin Calcium by RP-HPLC Technique." *Asian J. Res. Chem.* 7.4 (2014): 438-445. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]
40. Elshanawane, Abdullah A., et al. "Quantitative determination of telmisartan, ramipril, amlodipine besylate, and atorvastatin calcium by hplc." *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37.2 (2014): 195-206. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]
41. Kolhal, S., et al. "A Validated RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Multicomponent Dosage Form Containing Amlo, Telmi, HCl, Atenolol, and Losartan." *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 25(2), Mar-Apr 2014. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
42. Kranthi, M., A. Srinivas. "Analytical method development and validation and force degradation studies for simultaneous estimation of amlo. besylate and telmisartan in tablet dosage form by using RP-HPLC." *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.* [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
43. Kanchukommula, H., et al. "Method Development and Validation of Hydrochlorothiazide and Quinapril in bulk and tablet dosage form by RP-HPLC." *J. Pharm. Chem.* 1.1 (2014): 10-14. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
44. Sagirli, O., et al. "Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and in vitro dissolution studies." *Chromatographia* 66.3-4 (2007): 213-218. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
45. Bhat, Leena R., et al. "Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical

Formulation." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30.20 (2007): 3059-3067. [Online] [Citace: 10. 9 2014.]

46. Kalyankar, T. M., et al. "Development and Validation of RP-HPLC method for Estimation of Hydrochlorothiazide and Irbesartan in Pharmaceutical Preparation." Development 6.1 (2014): 330-336. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

47. Kumar, S. Ashutosh, et al. "A new and rapid analytical method development & validation for simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine & olmesartan in tablet dosage form by using RP-HPLC." Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6. [Online]

48. Alanazi, Amer M., et al. "HPLC method with monolithic column for simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets." Acta Pharm. 64.2 (2014): 187-198. [Online] [Citace: 6. 9 2014.]

49. Elshanawane, Abdullah A., et al. "Quantitative determination of four angiotensin II receptor antagonists in presence of hydrochlorothiazide by a gradient technique HPLC in their pharmaceutical preparations." Journal of Liquid Chromatography & Related Tech. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]

50. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online] [Citace: 15. 9 2014.]

51. <http://analyticalventura.com/services/chromatography/rp-hplc/>. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

52. Inchebio, Inovace studijních programů, Speciální chemicko-biologické obory na Univerzitě Pardubice, CZ 1.07/2.2.00/07.0139, Kapalinová chromatografie.

53. um.mendelu.cz/akademie/.../29_chob_n_kapalinova_chromatografie.pdf. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]

54. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>). [Online] [Citace: 6. 9 2014.]

55. Sekora, D., E. Tesařová. "Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC." Chem. Listy 101 (2007): 190-199.
56. Saravanan, G., B. Parveena. "Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous analysis of Perindopril and Indapamide in bulk and combined pharmaceutical dosage form." Asian J. Res. Chem. 7.2 (2014): 182-186. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]
57. Ramesha, B., et al. Development and validation of stability-indicating gradient RP-UHPLC method for the determination of impurities in atorvastatin drug substance." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 37.3 (2014): 275-297. [Online] [Citace: 5. 9 2014.]
58. Soni, Hiral, et al. "Simultaneous Determination of Atorvastatin Calcium and Olmesartan Medoxomil in a Pharmaceutical Formulation by RP-HPLC, HPLTLC, and UV Spectrophotometrie." J. AOAC Int., Volume 97, Number 3. [Online] [Citace: 12. 9 2014.]