

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A
KONTROLY LÉČIV

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**HPLC stanovení obsahu amlodipinu a perindoprilu v
kombinovaném léčivém přípravku**



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Milanu Mokrému, CSc., vedoucímu mé rigorózní práce, za obětavou pomoc, cenné rady a trpělivost při vypracování této práce.

OBSAH

Obsah.....	4
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod.....	9
2.2. Teoretické základy chromatografického procesu.....	16
2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	20
2.3.1. Vývoj HPLC.....	20
2.3.2. Instrumentace.....	21
2.3.2.1. Zásobníky mobilní fáze.....	22
2.3.2.2. Čerpadla mobilní fáze.....	22
2.3.2.3. Tvorba gradientu mobilní fáze.....	23
2.3.2.4. Dávkovací zařízení.....	24
2.3.2.5. Kolona a její plnění.....	25
2.3.2.6. Detektory pro HPLC.....	26
2.3.2.7. Automatická zařízení pro zpracování dat.....	29
2.3.3. Vyhodnocování výsledků.....	30
2.4. Validace.....	31
2.5. Vlastnosti amlodipinu a perindoprilu.....	34
3. CÍL PRÁCE.....	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
4.1. Použité přístroje, chemikálie a pomůcky.....	41
4.2. Výběr chromatografických podmínek pro stanovení amlodipinu a perindoprilu.....	43
4.3. Optimalizace chromatografických podmínek.....	47
4.3.1. Závislost vymývání na pH mobilní fáze.....	47
4.3.2. Kapacitní poměr v závislosti na složení mobilní fáze.....	47
4.4. Validace metody.....	48
4.4.1. Linearita.....	48
4.4.2. Přesnost.....	49
4.4.3. Správnost.....	49
4.4.4. Selektivita.....	49
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50

5.1. Výběr vhodných chromatografických podmínek.....	51
5.2. Optimalizace chromatografických podmínek	56
5.2.1. Závislost vymývání na pH mobilní fáze.....	56
5.2.2. Kapacitní poměr v závislosti na složení mobilní fáze.....	56
5.3. Validace metody.....	58
5.3.1. Linearita.....	58
5.3.2. Přesnost.....	61
5.3.3. Správnost.....	65
5.3.4. Selektivita.....	67
6. ZÁVĚR.....	68
7. LITERATURA.....	70
SOUHRN.....	74
ABSTRACT.....	76

1. ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je v dnešní době jednou z nejrychleji se rozvíjejících analytických metod. Svou podstatou se jedná o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Mezi její nesporné přednosti totiž patří rychlost analýzy, citlivost stanovení a zároveň minimální množství vzorku potřebné pro analýzu. HPLC ve farmacii slouží k identifikaci a kvantitativnímu hodnocení léčiv, ke sledování jejich stability a čistoty.

Perindopril patří mezi nejčastěji používané dlouhodobě působící inhibitory ACE. Jako inhibitor ACE snižuje koncentraci cirkulujícího angiotenzinu II a vyvolává pokles degradace bradykininu. S úspěchem se využívá u nemocných se srdečním selháním, u všech asymptomatických nemocných se systolickou dysfunkcí a významně se uplatňuje i v léčbě některých forem arteriální hypertenze.

Amlodipin je blokátor kalciových kanálů třetí generace. Jedná se o dihydropyridinový derivát, který blokuje L-typ vápníkového kanálu. Používá se především u hypertenze, srdečních arytmií a ischemické choroby srdeční.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Definice chromatografie a rozdělení jednotlivých metod

Název „chromatografie“ zahrnuje v současné době neobyčejně širokou rodinu vysoce účinných separačních technik a tvoří zdaleka nejdůležitější součást celého spektra moderních analytických separací. ⁽¹⁾

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálně-chemických interakcí. Během chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Složky směsi látky, které jsou přítomné v mobilní fázi, se pohybují podél stacionární fáze různou rychlostí, protože jsou interakcí se stacionární fází více či méně zpomalovány v závislosti na hodnotách distribučních konstant. Látky, které interagují silněji se stacionární fází, se pohybují pomaleji než látky, jejichž interakce jsou slabší. ^(2,3)

Chromatografický proces může nabývat mnoha různých forem a je tudíž obtížné navrhnout takové roztrídění, které by všechny tyto formy vystihovalo. Vzhledem ke značné různorodosti je možné dělit podle několika hledisek ⁽⁴⁾:

1. skupenství mobilní a stacionární fáze
2. použité techniky
3. způsobu vyvíjení
4. separačního děje

Podle charakteru mobilní fáze

Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GS)

Plynová chromatografie má v analýze léčiv menší uplatnění než HPLC, nicméně je využívána ve všech lékopisech vyspělých zemí. Hlavními výhodami této metody jsou jednoduchost, vysoká citlivost a velmi vysoká separační účinnost. Přitom je možné plynovou chromatografií identifikovat a stanovit nejen plyny, ale i látky kapalné a pevné, které je možné převést bez rozkladu do plynného stavu. Plynová chromatografie je založena na mechanismu adsorpce, rozdělování nebo vylučování. Mobilní fází je zde nosný plyn pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. Nejčastěji se používá dusík nebo helium pro náplňové kolony, zatímco pro kapilární kolony je to dusík, helium a vodík. ⁽³⁻⁶⁾

Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC)

Je založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. Kapalinová chromatografie je založena zejména na mechanismu adsorpce, rozdělování, výměny iontů, vylučování nebo stereochemických interakcích. ⁽⁵⁻⁷⁾

V klasickém provedení kolonové kapalinové chromatografie se mobilní fáze pohybovala pouze gravitací, separace byly tudíž málo účinné a doba analýzy značně dlouhá. Pro separaci komplikovaných směsí látek je tato metoda prakticky nepoužitelná a k těmto účelům v současné době slouží vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kde je průtok mobilní fáze zajištěn vysokým tlakem. ⁽¹⁾

Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography – SFC)

Tento typ chromatografie je méně rozšířen a je využíván tam, kde GC a HPLC selhávají; tedy pro analýzu málo těkavých nebo tepelně labilních látek, kde nelze použít GC a kde HPLC vykazuje nižší účinnost a delší dobu analýzy. ⁽¹⁾

Stacionární fází je zde kapalina vázaná na nosiči, mobilní fáze je tekutina v nadkritickém stavu. ⁽⁷⁾

Podle způsobu vyvíjení

Frontální chromatografie

Spočívá v tom, že se na kolonu kontinuálně a v konstantní koncentraci zavádí směs látek, které mají být separovány. Látky se postupně dělí v závislosti na svých rozdělovacích poměrech a vzniká stupňovitý chromatogram, kde první stupeň odpovídá čisté složce s nejmenším rozdělovacím poměrem. Nejprve tedy vytéká složka A, později začne vytékat směs A + B a nakonec – po nasycení stacionární fáze složkou C, která má největší rozdělovací poměr - vytéká roztok obsahující složky A + B + C ve stejném složení, v jakém byl přiváděn na kolonu. Tato technika není vhodná k preparativním účelům, ale byla vyvinuta k účelům analytickým. Typickým příkladem je spalování v organické elementární analýze. ^(1,8)

Vytěšňovací chromatografie

Princip metody spočívá v tom, že se na kolonu vnese vzorek směsi látek, která má být separována (např. složky A,B,C) za podmínek, kdy se všechny soluty pevně sorbují a nejsou vymývány mobilní fází. Potom se až do konce chromatografování

kontinuálně přivádí roztok látky D, která má ke stacionární největší afinitu. Proto tato látka – tzv. vytěšňovadlo – uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky a tlačí je před sebou jako píst. Vytěšňovací chromatografie má význam především jako metoda preparativní, nehodí se však k analytickým účelům. ^(1,8)

Eluční chromatografie

Je zdaleka nejběžnější analytickou chromatografickou metodou. Směs látek, které mají být rozděleny, se dávkuje do kolony a kontinuálně protékající mobilní fáze ji unáší kolonou, přičemž se látky postupně rozdělí. Jednotlivé složky opouštějí kolonu ve formě zcela oddělených zón, které označujeme jako jejich eluční křivky nebo píky. Poloha píku charakterizuje kvalitu každé složky, obsah plochy pod píkem je úměrný jejímu množství. ^(1,8)

Nejjednodušší variantou eluční chromatografie je prostá neboli izokratická eluce. K eluci se používá stále stejná mobilní fáze až do konce chromatografování. Velmi silně sorbované složky se nedají z kolony eluovat a je nutné použít jiný postup. Tato metoda je vhodná pro případy, kdy se dělené látky od sebe příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi, takže jejich zóny se eluují v nepříliš dlouhých intervalech. ^(4,8)

Druhou variantou je stupňovitá eluce. Ta se provádí postupným promýváním kolony několika eluenty, z nichž každý následující má vždy vyšší eluční schopnost. Takové mobilní fáze uvolňují jednotlivé složky směsi z vazby na stacionární fázi a vymývají je. Píky složek mohou být pak značně nesymetrické, sestupná část křivky je protáhlá a dochází k tzv. chvostování. ⁽⁸⁾

Třetím typem eluční chromatografie je gradientová eluce. Při eluci se postupně plynule mění koncentrace polárnější složky v mobilní fázi. Tímto způsobem se dosáhne toho, že sestupná část píku je eluována vždy mobilní fází s trochu větší eluční schopností než vzestupná část. Tento gradient proto zužuje zóny a zabraňuje tzv. chvostování. Gradientová eluce se používá zejména při dělení komplikovanějších směsí. ^(4,8)

Podle podstaty separačního procesu

Adsorpční chromatografie

Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce z pohyblivé fáze na povrch adsorbentu. V důsledku rozdílné adsorpční afinity složek dochází k jejich distribuci

mezi stacionární a mobilní fází, a tím k chromatografické separaci. Adsorbentem (stacionární fáze) bývá nejčastěji oxid hlinitý, hořečnatý, silikagel, prášková celulóza nebo aktivní uhlí. Pohyblivou fází tvoří buď čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady nebo směsi rozpouštědel. Obvykle se v adsorpční chromatografii používají nepolární rozpouštědla, ačkoli vysoce polární a hydrofilní složky se dají separovat na silikagelu za použití polárních rozpouštědel. Na tomto principu pracuje jak kapalinová, tak i plynová chromatografie a závěry jsou platné pro oba typy. ^(4,5,8,9)

Rozdělovací chromatografie

Směs složek, která je rozpuštěná v soustavě dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalných fází, se mezi ně dělí na základě rozpustnosti jednotlivých složek v jednotlivých fázích, resp. podle jejich afinity k nim. Látky se tedy dělí podle svých různých rozdělovacích koeficientů. Rozdělovací koeficient je poměr rovnovážné koncentrace jedné složky ve stacionární fázi ke koncentraci téže látky ve fázi mobilní za předpokladu, že se daná složka vyskytuje v obou fázích v téže formě. ⁽⁸⁾

Při rozdělovací chromatografii se zpravidla užívá dvofázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Zakotvena bývá fáze vodná, a to na pevných hydrofilních nosičích (silikagel, křemelina, silikáty, celulóza). Fáze organická bývá zpravidla mobilní. Systém obrácených fází (RP – reversed phase), kdy organické hydrofobní rozpouštědlo slouží jako zakotvená fáze a mobilní fází je hydrofilní rozpouštědlo, se používá v kapalinové chromatografii nejčastěji a je vhodný k dělení méně polárních látek. ^(4,8)

Vyvíjení se provádí elučním způsobem a vlastní provedení a vyhodnocení jsou obdobné jako u adsorpční chromatografie. ⁽⁴⁾

Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Iontově výměnná chromatografie může být charakterizována jako výměnná adsorpce. Sorbent zachycuje určitý druh iontů a namísto toho vysílá do roztoku jiný ion. Sorbentem jsou měniče iontů neboli ionexy. Jde o nerozpustné látky, které ve styku s vodnými roztoky bobtnají a uvolňují elektrolytickou disociací ionty. Tyto uvolněné ionty pak mohou být nahrazeny ionty přítomnými v roztoku, které mají k měniči větší afinitu. Je to proces vratný a průběh reakce nezávisí jen na afinitě iontů k měniči, ale především na jejich koncentraci. ^(5,8)

Nerozpustná struktura ionexů, která nese ionogenní skupiny, může být podle

svého chemického složení buď anorganická (např. různé minerály), nebo organická (např. syntetické pryskyřice). Podle původu jsou ionexy přírodní nebo syntetické. Pro chromatografické účely mají největší význam organické syntetické ionexy a také ionexové deriváty celulosy, polydextranu a agarosy. Ionogenní skupiny ionexů podmiňují jejich funkci, a proto se také nazývají funkční skupiny. Ionexy, které uvolňují a vyměňují kationty, se označují jako měniče kationtů neboli katexy. V podstatě se jedná o nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny. Obdobně měniče aniontů neboli anexy uvolňují a vyměňují anionty. Analogicky jsou to v podstatě nerozpustné polymerní polyvalentní báze. ⁽⁸⁾

Gelová chromatografie

Tato chromatografická metoda dělí látky na základě tzv. molekulového síťového efektu gelu. Obecně se využívá k separaci biologických makromolekul. Stacionární fází je zde nabobtnalý gel (např. dextranový gel Sephadex) a látky se dělí podle velikosti molekul resp. své molární hmotnosti. Částice sorbentu obsahují póry o známé velikosti a tyto póry jsou zaplněny tzv. stagnující mobilní fází.

Jako první opouští kolonu složka s největšími molekulami, které do gelu vůbec nemohly vniknout, a jsou proto mobilní fází nejvíce unášeny. Středně velké molekuly, které mohly cestou částečně difundovat do stacionární fáze, jsou tím poněkud brzděny. Malé molekuly během průtoku kolonou pronikly difúzí bez zábran do obou fází, rovnováha jejich distribuce byla ve srovnání s ostatními posunuta ve prospěch gelu a to způsobilo jejich značné zbrzdění. Opouštějí proto kolonu jako poslední. ^(5,8,9)

Afinitní chromatografie

Je určena k separaci biologických makromolekul, které lze jinak velice obtížně separovat. Afinitní chromatografie je založena na principu, kdy je na nosič navázán kovalentní vazbou vhodný ligand, který je schopen vytvářet specifický komplex s určitou biologickou makromolekulou. Možnosti použití tohoto typu chromatografie k čištění a zkoumání složitých biologických interakcí jsou zřejmé na první pohled. Specifické adsorbenty lze využít např. k čištění enzymů, protilátek, nukleových kyselin a kofaktorů, vitaminů, represorů a receptorových proteinů, umožňujících transport nebo vzájemných léčiva nebo hormony. ^(5,10)

Do kolony naplněné takto připravenou stacionární fází se vnese roztok vzorku a po promytí zůstává určitý druh biomolekul vázaný v koloně, zatímco ostatní složky vzorku jsou vymyty. Vytvořený komplex je reverzibilní, vázané biomolekuly je možno

z komplexu uvolnit při použití vhodného tlumivého roztoku nebo rozpustného protiligandu. Jako nosiče pro navázání ligandu se používají částice, jejichž základem jsou polysacharidy nebo zesíťovaný polyakrylamid. Jako ligandy slouží např. specifické inhibitory, na kterých lze separovat enzymy. ⁽⁵⁾

Podle použité techniky

Chromatografie na papíře (PC)

V zásadě se jedná o rozdělovací chromatografii v plošném uspořádání. Pro chromatografické účely se používá speciální, velmi čistý (bez přítomnosti kovů) a stejnorodý filtrační papír. Stacionární fází zde je voda, které papír obsahuje kolem pěti procent. Mobilní fází bývá obvykle směs rozpouštědel upravená např. přídavkem kyseliny, zásady, komplexotvorných látek a nasycená stacionární fází. Hlavní předností papírové chromatografie je její jednoduchost, nenáročnost a pohodlná práce s papírem. Velkou nevýhodou je dlouhá doba vyvíjení, proto je tato metoda dnes již překonaná. ^(4,11)

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Nepohyblivou fází tvoří tenká vrstva sorbentu naneseného na inertní podložce. Nejpoužívanějšími sorbenty jsou silikagel, oxid hlinitý, prášková celulóza nebo polyamid. Tato metoda má mnoho výhod, které zapříčiňují její široké používání. Je to zejména jednoduché provedení, rychlost dělení látek, snadné vyhodnocování a možnost používání mikrogramových množství vzorků. ^(4,11)

Uvedený způsob chromatografie má největší význam při identifikaci a stanovení látek ve složitých směsích. Ve farmacii slouží např. k analýze glykosidů, alkaloidů, při studii obsahových látek v drogách apod. ⁽⁴⁾

Sloupcová chromatografie

Zde je stacionární fáze umístěná v koloně. Nejčastěji je využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). ⁽⁷⁾

Podle skupenství mobilní a stacionární fáze

Tento typ klasifikace rozděluje chromatografické metody podle skupenství mobilní fáze. Podkategorie se rozdělují podle skupenství stacionární fáze. Označení chromatografických systémů je zpracováno v tabulce č. 1 ⁽¹¹⁾

Tab. 1 Chromatografické systémy

Stacionární fáze	Mobilní fáze	
	Kapalina	Plyn
Pevná látka	Liquid-solid chromatography (LSC)	Gas-solid chromatography (GSC)
Kapalina	Liquid-liquid chromatography (LLC)	Gas-liquid chromatography (GLC)

2.2. Teoretické základy chromatografického procesu

Teorie metody je významná pro praxi chemika tím, že mu dovoluje určit nebo odhadnout výhodné podmínky experimentu. Zabývá se především třemi charakteristikami, které je snadné odečíst přímo z chromatogramu :

- polohou (pozicí) píku v chromatogramu, který vypovídá o kvalitě analytu
- tvarem píku, který vypovídá o účinnosti separace na chromatografické koloně
- velikostí píku, tj. plochou pod křivkou; ta charakterizuje kvantitativní obsah analytu ve vzorku. ⁽¹²⁾

Separace směsi solutů a následný popis základních charakteristik závisí na řadě parametrů. Ke kvantitativnímu posouzení tohoto složitého děje je třeba definovat řadu veličin, které vyjadřují průběh separace v závislosti na experimentálních podmínkách. Veličiny, které se vztahují ke stacionární fázi, se označují indexem s , veličiny vztahující se k mobilní fázi indexem m . ⁽²⁾

První charakteristika, tedy pozice píku v chromatogramu, je nejčastěji charakterizována retencí. Retenci v kapalinové chromatografii lze charakterizovat retenčním časem t_R nebo retenčním objemem V_R . Obě veličiny označují celkový čas, resp. celkový objem mobilní fáze proteklé kolonou od nástřiku látky až po eluci koncentračního maxima píku chromatografované látky. Tyto dvě veličiny spolu souvisí vztahem

$$V_R = t_R \cdot F_m$$

kde F_m je průtok mobilní fáze kolonou za jednotku času. ^(12,13)

Mrtvý retenční objem (V_M) patří v chromatografii nepochybně mezi významné parametry. Lze ho definovat např. jako objem mobilní fáze obsažené v koloně. V_M je obvykle zjišťován jako objem mobilní fáze, který je třeba k vymytí vhodné nesorbované (v koloně nezadržované) látky z místa nástřiku na konec kolony. Pokud je průtok mobilní fáze (F_m) kolonou konstantní, je nesorbovaná látka vymyta z kolony za mrtvý retenční čas t_M . Mezi retenčním časem a retenčním objemem platí vztah :

$$V_M = t_M \cdot F_m \quad (14)$$

Redukovaný retenční čas t'_R je retenční čas t_R zmenšený o mrtvý retenční čas t_M .

Redukovaný retenční čas t'_R nebo redukovaný retenční objem V'_R tedy je :

$$V'_R = t'_R F_m = (t_R - t_M) F_m = V_R - V_M \quad (13,14)$$

Retenční čas či objem jsou hodnoty, které jsou za daných experimentálních podmínek

charakteristické pro jednotlivé soluty a jsou tedy jedním z prostředků identifikace látek.

(2)

K charakterizaci retence byla použita bezrozměrná veličina k označovaná jako kapacitní poměr, pro níž platí následující vztahy :

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Kapacitní poměr analyzované látky k patří k základním chromatografickým veličinám. Umožňuje porovnávat vzájemně retence analyzovaných látek, posuzovat vliv změn chromatografických podmínek na separaci, jakož i srovnávat analýzy např. v různých laboratořích. Je definován jako poměr množství solutu přítomného ve stacionární fázi k množství solutu v mobilní fázi za podmínek rovnováhy. Je mírou retence solutu v koloně, tzn. čím větší je hodnota k , tím víc je solut v koloně zadržován, a je tedy z kolony eluován později. Kapacitní poměr je bezrozměrná veličina a platí pro ni tyto vztahy :

$$k = K_D \frac{V_S}{V_M} = K_D \cdot S$$

kde K_D je distribuční konstanta analyzované látky, která odpovídá fyzikálně chemickým vlastnostem mobilní a stacionární fáze, V_S – objem stacionární fáze v koloně a V_M – objem mobilní fáze v koloně, který je totožný s mrtvým retenčním objemem. Kapacitní poměr tedy udává, kolikanásobku mrtvého objemu (času) je třeba k eluci příslušné látky. ^(2,13,14)

Hlavním cílem chromatografie je rozdělení látek obsažených ve vzorku směsi, proto má v chromatografii prvořadý význam veličina nazývaná rozlišení R , která umožňuje toto rozdělení kvantitativně vyjádřit. Rozlišení mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce :

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

kde značí:

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

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

Za chromatograficky dobře rozlišitelné dvě složky lze považovat případ, kdy $R = 1,5$.

Rozlišení lze zvýšit dvěma způsoby; zlepšením selektivity systému (volbou mobilní a stacionární fáze) a zvýšením účinnosti separace. ^(6,12,13)

V chromatografické praxi je zpravidla základním úkolem nalézt chromatografický systém s dostatečnou selektivitou pro oddělení všech složek vzorku. K popsání separačních schopností kolon se užívá parametru účinnosti kolony, který je vyjádřen počtem teoretických pater N . Počet teoretických pater kolony, který charakterizuje rozmývání zóny solutu transportovaného kolonou, je definován vztahem:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

kde t_R je retenční čas testované látky a W je šířka píku při jeho základně. Veličina N je bezrozměrná. Čím vyšší je počet teoretických pater kolony pro daný solut, tím méně je jeho zóna v koloně rozmývána. ^(13,14)

Výškový ekvivalent teoretického patra je definován vztahem :

$$H = \frac{L}{N}$$

kde L je délka kolony vyjádřená v metrech, N je počet teoretických pater. Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky a je tedy možné jej označit jako délku kolony připadající na jedno teoretické patro. Tato veličina a tedy i účinnost kolony je určována řadou parametrů jako je např. viskozita mobilní fáze, teplota, vlastnosti chromatografované látky, její difúzní koeficient v mobilní fázi ,ale nejdůležitějším parametrem je zde průtoková rychlost mobilní fáze kolonou. Chceme-li dosáhnout účinné separace, je nutné, aby hodnota výškového ekvivalentu teoretického patra H činila 0,01 – 1,00 mm. ^(5,13)

Důležitým parametrem je i selektivita kolony α pro látky 1 a 2, nazývá se relativní retence neboli retenční (eluční) poměr a je dána vztahem :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde t_{R2} a t_{R1} odpovídají hodnotám retenčních časů látek 2 a 1, t_M retenčnímu času mobilní fáze, k_2 a k_1 jsou hodnoty kapacitních poměrů látek 1 a 2. Čím větší je hodnota α , tím jsou těžiště elučních křivek od sebe více vzdálena a tím je tedy systém selektivnější. ^(1,13)

Skutečnost, že chromatografický systém nikdy není v rovnováze, se odráží v dynamické difúzní teorii nazývané též van Deemterova. Podle této teorie je rozšiřování zóny složky během chromatografického procesu způsobeno čtyřmi faktory, které mají statistický charakter, jsou vzájemně nezávislé a aditivní. Jsou to :

- vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi,
- molekulární (axiální) difúze v mobilní fázi,
- odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi,
- odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi.

Celkovou výšku ekvivalentní teoretického patru lze tedy vyjádřit jako sumu příspěvků všech procesů probíhajících v koloně, za předpokladu, že tyto děje probíhají současně. Označíme-li jejich příspěvky symboly $\mathbf{H}_F, \mathbf{H}_L, \mathbf{H}_M$, a \mathbf{H}_S , můžeme psát

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_F + \mathbf{H}_L + \mathbf{H}_M + \mathbf{H}_S$$

kde \mathbf{H} je celková výška teoretického patra zkoumaného chromatografického systému, \mathbf{H}_F – příspěvek vířivé difúze, \mathbf{H}_L – příspěvek molekulární difúze, \mathbf{H}_S – příspěvek odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi, \mathbf{H}_M – příspěvek odporu proti převodu hmoty ve fázi mobilní. Všechny příspěvky jsou v konzistentních délkových jednotkách.

(2.5)

2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik. Nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv a je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Jde o separační metodu, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Předností této metody je ostřejší rozdělení, kratší doba dělení, spotřeba menšího množství vzorku, minimální difúze a zvýšená detekční citlivost. Z HPLC záznamu lze získat detailní informace o identitě, obsahu i čistotě analyzovaného léčiva. ^(3,15,16)

Základní výhodou HPLC je široký obor použitelnosti (lze analyzovat až 80% veškerých známých látek, které se podstatně liší v chemických i fyzikálních vlastnostech). Je možné analyzovat látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Doplnjuje tak vhodně plynovou chromatografií. Další předností je možnost účinně ovlivňovat separaci nejen volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, která na rozdíl od GC není inertní, ale významně se podílí na separaci. Naopak nevýhodou ve srovnání s plynovou chromatografií je náročnější a dražší instrumentace a podstatně složitější mechanismus separačního děje. ^(1,2)

U HPLC se nejčastěji užívá eluční techniky chromatografie. Směs látek, které mají být rozděleny, se dávkuje do kolony a kontinuálně protékající mobilní fáze ji unáší kolonou, přičemž se látky postupně rozdělí. Zóny chromatografovaných látek označujeme jako jejich eluční křivky nebo píky. K dělení látek lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, síťový efekt gelu, iontová výměna, rozdělování), je tudíž možné nalézt vhodný chromatografický systém pro separaci směsí prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. ^(1,4)

2.3.1. Vývoj HPLC

Objev chromatografie v její moderní podobě je všeobecně připisován ruskému botanikovi Cvětovi, který kolem roku 1903 poprvé provedl separaci látek kolonovou eluční metodou. Poté metoda upadla v zapomenutí a až téměř po třiceti letech byla znovu objevena. V roce 1941 se Martinovi s Syngeovi podařilo rozdělit směs acetylovaných aminokyselin kapalinovou chromatografií v systému tvořeném stacionární vodnou fází zakotvenou na inertním nosiči a organickou mobilní fází. Tak

vznikla rozdělovací chromatografie, za kterou tito autoři obdrželi Nobelovu cenu. Zároveň definovali pojem výškového ekvivalentu teoretického patra, který se stal všeobecně uznávaným jako měřítko účinnosti chromatografické kolony. ^(2,17,18)

Koncem šedesátých a začátkem let sedmdesátých došlo k prudkému rozvoji teorie a instrumentace moderní kolonové kapalinové chromatografie. Původní technika využívala poměrně velké kolony, které byly naplněny částicemi stacionární fáze s typickým průměrem od 0,05 do 1 mm. Kapalná mobilní fáze protékala kolonou gravitační silou, přičemž typické průtokové rychlosti činily jednotky ml za minutu. Takto prováděné separace vyžadovaly velká množství chemikálií, zejména organických rozpouštědel, která jsou většinou drahá, separační účinnost kolon byla nízká a doba analýzy dlouhá. Z těchto důvodů byla klasická kapalinová chromatografie šířeji využívána jen při separacích v jednoduchých systémech. Jakmile je však směs látek složitější, a zejména pokud jsou vlastnosti jednotlivých složek směsi podobné, je tato klasická metoda chromatografie prakticky nepoužitelná. ^(2,17)

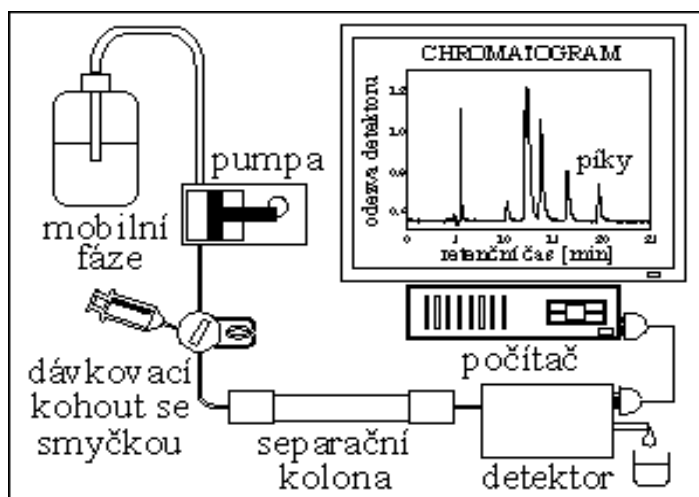
Možnosti separací velmi složitých směsí látek se podstatně rozšířily, když se v polovině šedesátých let začala rozvíjet vysokoúčinná kapalinová chromatografie. K jejímu vzniku vedly především rozvoj instrumentace, lepší pochopení mechanismu separace v kapalných fázích, dále neobyčejný pokrok v technologii přípravy stacionárních fází a plnění kolon a především vývoj citlivých detekčních zařízení. Konstrukce detektorů byla po dlouhou dobu hlavním omezujícím faktorem vývoje HPLC. ⁽²⁾

Metody HPLC se stále velmi rychle rozvíjejí. Kromě zdokonalování teorie a instrumentace se především rozvíjejí metody zpracování signálu a postupně se přechází na práci v mikroměřítku. Tato miniaturizace sice přináší náročné problémy z hlediska instrumentace, avšak má několik významných předností. Především je potřeba podstatně menšího množství drahých chemikálií a rozpouštědel. Další výhodou je kratší doba analýzy, lepší separační účinnost, možnost spojení kolony s vysoce selektivními detektory jako je hmotnostní spektrometr. ⁽²⁾

2.3.2. Instrumentace

V technické koncepci konstrukce kapalinových chromatografů existují dva přístupy. První přístup představuje kompaktní systém s fixním propojením pracovních jednotek v jediné skříni. Je navržen z hlediska zajištění minimálních mrtvých objemů vytvářených propojujícími kapilárami, ovšem za cenu mnohdy snížené servisní přístupnosti. Druhou možností je modulární neboli stavebnicový systém, který

umožňuje flexibilní přestavbu, připojení přídatných zařízení nebo snadnější přístup při opravách. Kapalinový chromatograf se obecně skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Blokové schéma moderního kapalinového chromatografu je uvedeno na obr.1. Může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno řazení základních elementů za sebou. V každém případě je vyžadována dokonalá reprodukovatelnost dílčích postupů a dlouhodobá funkční schopnost systému. (8,13,18)



Obr.1 Schéma kapalinového chromatografu (19)

2.3.2.1. Zásobníky mobilní fáze

Jako zásobník mobilní fáze lze použít libovolnou uzavřenou nádobu chemicky odolnou vůči používaným rozpouštědlům. Ze zásobníku se mobilní fáze čerpá přes filtr, aby se zabránilo pronikání částic pevných nečistot do čerpadla. Některé přístroje umožňují odplynění mobilní fáze přímo v zásobníku. Odplynění je nezbytné, aby se předešlo tvorbě bublinek při poklesu tlaku na výstupu z kolony, což by rušilo jak detekci, tak funkci čerpadla. Konstrukčním materiálem zásobníků bývá nejčastěji sklo, plasty nebo nerezová ocel. (2,8,18,20)

2.3.2.2. Čerpadla

Čerpadlo je jednou z nejdůležitějších a nejdražších částí kapalinového

chromatografu. Účelem čerpadla HPLC je dopravovat mobilní fázi konstantním průtokem pod vysokým tlakem a s minimem tlakových pulsů, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru. Čerpadla musí být konstruována z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází jako jsou tlumivé roztoky, slabě kyselé a bazické roztoky nebo organická rozpouštědla. Vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze, eventuálně práci s gradientem, tvořeným v nízkotlaké části přístroje. ^(2,5,8,13,17)

Principiálně můžeme vysokotlaká čerpadla rozdělit do dvou hlavních skupin podle toho, zda pracují při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. Pro analytickou kapalinovou chromatografii se v dnešní době používají čerpadla druhého typu. Oba typy pracují zpravidla tak, že ze zásobníku vytlačují pístem či membránou mobilní fázi. Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělována na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý, kdežto bezpulsni pracují s objemem pracovní komory daleko větším. Bepulsni čerpadla zpravidla poskytují hladší průtok mobilní fáze a nevyžadují speciální přídavné zařízení pro tlumení tlakových pulsů. ^(5,18)

2.3.2.3. Tvorba gradientu mobilní fáze

Gradientová eluce je v kapalinové chromatografii velmi často využívána k dělení směsí, jejichž složky se vyznačují širokým rozsahem retenčních konstant. Technických způsobů vytvoření gradientu mobilní fáze je mnoho, ale v moderní HPLC se v zásadě používají jen dva. První způsob využívá vytváření gradientu směřováním proudů složek za nízkého tlaku. Tento způsob je podstatně levnější. Stačí k němu jediné čerpadlo a vícecestný ventil, který podle povelů mikroprocesoru střídavě přidává čisté složky mobilní fáze do mísicí komůrky. Velkou nevýhodou zde ovšem je, že k mísení dochází daleko od kolony. Skutečné složení mobilní fáze v koloně je tedy vždy poněkud odlišné od známého složení v mísicí komůrce. Druhý způsob tvorby gradientové eluce využívá směřování za vysokého tlaku. Složky mobilní fáze umístěné v zásobnících jsou dvěma vysokotlakými čerpadly dopravovány do směřovací komůrky malého vnitřního objemu, odkud jsou vedeny již v jednom proudu do kolony. Složky se mísí těsně před kolonou, ovšem za cenu podstatně složitější a dražší aparatury. Tento způsob je nejčastěji užívaným principem vysokotlakého směřování. ^(2,18)

Většina moderních komerčních kapalinových chromatografů je vybavena elektronickým programátorem, který buď umožňuje tvorbu gradientu s několika předvolitelnými tvary s různou strmostí, nebo se průběh gradientu přímo zadá

programem pro mikroprocesor jako řada různě dlouhých a různě strmých na sebe navazujících lineárních úseků. ⁽¹⁸⁾

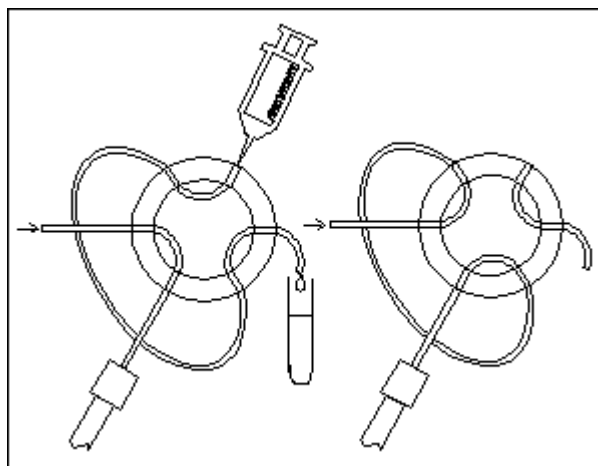
2.3.2.4. Dávkovací zařízení

Většina dávkovacích zařízení v HPLC byla odvozena z plynové chromatografie, ovšem jejich konstrukce je podstatně složitější. Účinnost celého chromatografického systému je do značné míry závislá i na dokonalém dávkování vzorku. ^(2,18)

Do chromatografického systému je možno dávkovat ručně (manuální dávkovací ventil) nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru). ⁽²¹⁾

a) Dávkování pomocí vysokotlakých dávkovacích ventilů

Dnes se používají vysokotlaké dávkovací ventily se smyčkou, které umožňují dávkování i proti tlakům 60 až 80 MPa. Nejčastěji se jedná o šesticestný kohout, kde se při dávkování nejprve naplní smyčka vzorkem a potom se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony. ^(2,7)



Obr. 2 Vysokotlaký ventil se smyčkou ⁽²²⁾

b) Dávkování pomocí autosampleru

Automatické dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. K zamezení kontaminace vzorků (crossover, cross contamination) se používá oplach jehly a to jak vnitřní, tak vnější oplach. Prostor pro vzorky je v současné době většinou temperován (0-50 °C) a chráněn před světlem. Technické principy vlastního dávkování vzorku jsou poněkud odlišné. Buď je vzorek dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů nebo pomocí několika třicestných ventilů. ⁽²³⁾

2.3.2.5. Kolona a její plnění

Kolony lze považovat za „srdce chromatografu“. Jejich vlastnosti významně ovlivňují separaci analyzovaných složek a jejich průměr zásadním způsobem ovlivňuje citlivost celé chromatografické metody. Při volbě kolony je třeba splnit tři základní faktory. Je nutné správně zvolit sorbent, správně zvolit materiál a dimenze trubky pro konstrukci kolony a konečně zamezit existenci volných prostorů jak v koloně, tak na vstupu a výstupu z kolony. ^(14,16,17)

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Rovnoměrné naplnění jemným materiálem je velmi náročné, obvykle se proto používají již naplněné kolony dodávané komerčně. Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fází, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky:

1. musí být chemicky inertní
2. musí odolávat poměrně vysokým tlakům
3. vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký .

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel (typ 316), plasty (PEEK) nebo sklo, nyní i titan. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem. ⁽²⁴⁾

V kapalinové chromatografii se používá mnoho typů stacionárních fází, jako jsou:

- silikagel, oxid hlinitý nebo porézní grafit používané v chromatografii s normálními fázemi, kde je separace založena na rozdílech v adsorpci a/nebo rozdělování,
- pryskyřice nebo polymery s kyselými nebo zásaditými skupinami používané v iontoměničové chromatografii, kde je separace založena na konkurenci iontů, které mají být odděleny, a iontů, které jsou obsaženy v mobilní fázi,
- porézní silikagel nebo polymery používané ve vylučovací chromatografii, kde separace je založena na rozdílech v objemech molekul,
- různé druhy chemicky modifikovaných nosičů připravených z polymerů, silikagelu nebo porézního grafitu používané v chromatografii s obrácenými fázemi, kde je separace založena hlavně na rozdělování molekul mezi mobilní a stacionární fází,

- speciální chemicky modifikované stacionární fáze, např. deriváty celulosy nebo amylosy, bílkoviny nebo peptidy, cyklodextriny atd. používané pro separaci enantiomerů (chirální chromatografie). ⁽⁶⁾

Většina separací je založena na mechanismu rozdělování a využívá chemicky modifikovaný silikagel jako stacionární fázi a polární rozpouštědlo jako mobilní fázi. Vnitřní struktura silikagelu je reprezentována jednak specifickým povrchem sorbentu, jednak objemem pórů sorbentu. Chemický charakter sorbentu je důležitým faktorem ovlivňujícím selektivitu kolony. Oxid křemičitý se svými silanolovými skupinami na povrchu je základním sorbentem pro chromatografii s normálními fázemi. V tomto případě slouží jako slabé mobilní fáze uhlovodíky, jako silné mobilní fáze alkoholy a voda. Obrácené hodnoty eluotropní řady vykazují tzv. reverzní fáze. To jsou sorbenty, na jejichž povrch je chemicky vázána vrstva nepolárních řetězců, nejčastěji alifatických uhlíkových o délce 8 nebo 18 uhlíků. Tyto fáze v současné kapalinové chromatografii naprosto převažují. Uhlíkové řetězce mohou být nahrazeny methylovou, fenylovou nebo aminovou skupinou. Jako mobilní fáze nejčastěji slouží voda ve směsi s acetonitrilem nebo methanolem. ^(2,6,8,13,14)

Omezená stabilita silikagelových kolon při vyšším pH mobilní fáze vedla k vývoji alternativních HPLC kolon na bázi oxidů kovů (oxidu titaničitého, oxidu hlinitého), ale zejména oxidu zirkoničitého. Materiály na bázi ZrO_2 mají vynikající stabilitu při pH až do 14 a vysokou tlakovou i tepelnou odolnost, takže je lze využít i pro rychlé separace při vysokých teplotách (i nad $100^\circ C$). Na rozdíl od silikagelu nejsou na povrchu silanolové skupiny vykazující silné interakce s basickými látkami, přítomnost adsorpčních center charakteru silných Lewisových kyselin však vyžaduje přísadu pufrů, které kompenzují silné interakce center s hydroxylovými, fosfátovými, fluoridovými či karboxylovými funkčními skupinami v molekulách látek. Selektivita zirkonových stacionárních fází je odlišná od alkylsilikagelových fází, často umožňuje lepší separace stereoisomerů a silně polárních látek. ^(25,26)

2.3.2.6. Detektory pro HPLC

Detektory slouží k indikaci látek, které vycházejí z chromatografické kolony. Detektor sleduje některou z vlastností eluátu pomocí vhodného snímače a signál se po zesílení přivádí do zapisovače. Ten poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. ⁽¹⁸⁾

Při volbě detektoru je třeba vzít v úvahu několik obecně platných a

hodnotitelných vlastností detektorů. Dobrý detektor by měl vykazovat především vysokou citlivost, dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón. Velmi důležité je, aby linearita odezvy byla v co nejširším rozmezí koncentrací. Zkušenosti ukazují, že detektor, který by splňoval všechny uvedené požadavky bez výjimky, prakticky neexistuje. ^(4,14,18)

V podstatě rozlišujeme dva typy detektorů – univerzální a selektivní. Univerzální neboli nespecifické detektory jsou založené na měření určité vlastnosti systému jako celku, která se mění se změnou složení systému (např. index lomu, elektrolytická vodivost nebo relativní permitivita). Detekovaná látka musí mít vlastnosti podstatně odlišné od vlastností ostatních složek mobilní fáze, aby při změnách její koncentrace docházelo k výrazné změně signálu. Tento typ detektorů má ale řadu nevýhod. Jsou obecně méně citlivé, signál bývá zatížen větším šumem a jsou nepoužitelné při gradientové eluci. Nejužívanější univerzální detektor je refraktometrický. U druhého typu detektorů se měří vlastnost, která selektivně závisí na koncentraci sledované složky. Takové měření je většinou citlivější než měření celkových vlastností systému a zároveň je zde selektivita výhodou při analýzách složitých směsí látek. ^(2,8,18,22)

Mezi nejužívanější typy patří skupina detektorů optických zahrnující detektory spektrofotometrické, fluorimetrické a univerzální refraktometrické, dále detektory elektrochemické, vodivostní, reakční a speciální. ⁽²²⁾

Spektrofotometrické detektory

Tento typ detektorů je v analytické kapalinové chromatografii a při HPLC analýze léčiv nejrozšířenější. Jejich předností je vysoká univerzálnost, dobrá odezva mnoha významných organických látek, dobré detekční limity, značný rozsah dynamické linearity a použitelnost při gradientových technikách. Jejich výsledky nejsou příliš ovlivňovány změnami teploty nebo rychlosti toku mobilní fáze. Obecně tento typ detektorů pracuje na principu proměření absorbance elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektoru. ^(3,7,14)

Vůbec nejběžnější je měření v UV oblasti spektra, mnohem méně v oblasti viditelné a minimálně v infračervené oblasti spektra. Nejužívanějšími UV detektory jsou :

1. **UV detektor s fixní vlnovou délkou** – jedná se o nejjednodušší a nejlevnější detektory. Pracují nejčastěji při vlnové délce 254 nm, při níž absorbuje většina

léčiv. ^(2,3)

2. **UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou** – předností tohoto typu detektoru je podstatné rozšíření počtu látek, na které detektor poskytuje odezvu, jakož i rošíření počtu látek, které lze použít jako mobilní fázi. Můžeme totiž volit pracovní vlnovou délku tak, aby mobilní fáze při této délce neabsorbovala záření, zatímco solut vykazuje dostatečnou absorbanci. ^(3,14)
3. **scanning UV detektor** (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva) ⁽³⁾
4. **diode array detektor** - tyto typy spektrofotometrických detektorů jsou dnes asi nejdokonalějšími detektory a identifikačními jednotkami v kapalinové chromatografii. Výsledkem je třírozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu. Spektrum, které se uloží do paměti počítače, může být vyvoláno a zpracováno. ^(3,4,14)

Fluorimetrické detektory

Patří k nejcitlivějším detektorům používaným v kapalinové chromatografii. Současně s tím vede možnost poměrně jednoduché konstrukce měrných cel o dostatečně malém objemu k častému využití fluorimetrických detektorů s kolonami malých průměrů. Fluorimetrický detektor slouží k registraci fluorescenční zářivé energie, která byla vzbuzena ozářením roztoku sledované látky. Primární světlo je eliminováno vhodným filtrem a emitovaná zářivá energie se měří fotočlánkem. Základní nevýhodou těchto detektorů je omezení vyplývající z malého počtu látek, které vykazují fluorescenci. Této nevýhodě se čelí předkolonovou nebo postkolonovou chemickou derivatizací analyzovaných látek. Tato nevýhoda je však kompenzována vysokou citlivostí detekce. ^(8,12,14)

Refraktometrický detektor

Diferenciální refraktometr je detektorem značně univerzálním a používá se zejména tehdy, když vzorek neabsorbuje v ultrafialové oblasti nebo když použitá mobilní fáze má velmi značnou absorbanci. Činnost diferenciálního refraktometru je založena na měření rozdílů indexů lomu mobilní fáze a fáze, ve které je rozpuštěna sledovaná látka. Hlavní předností je univerzálnost, neboť poskytuje odezvu na každou změnu indexu lomu v efluentu z chromatografické kolony. V důsledku toho je tento typ detektoru zcela nevhodný při použití gradientové eluce. Vyžaduje rovněž

termostatování. Nejčastěji je využíván v souvislosti se separací a stanovením makromolekulárních látek gelovou chromatografií. ^(8,12)

Elektrochemické detektory

Do kategorie elektrochemických detektorů můžeme zařadit detekční systémy, které využívají elektrické veličiny jako analytické vlastnosti efluentu. Proměňují elektrochemické veličiny, jejichž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Mohou se sledovat nejenom elektrochemické reakce na elektrodách, měřené např. na principu amperometrie, potenciometrie či polarografie, ale i pohyblivost iontů (konduktometrie), permitivita a jiné veličiny. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Vysoce citlivý a přitom selektivní je amperometrický detektor. Elektrochemické detektory jsou obecně značně citlivé, ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci. ^(3,4,12)

Hmotnostní spektrometr

Pro identifikaci látek ve složitých směsích je prakticky nezastupitelná metoda spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (MS). Principem MS je ionizace neutrálního atomu či molekuly za vzniku iontů a jejich fragmentů, které jsou dále separovány a detekovány na základě poměru m/z , kde m je hmotnost iontu a z je náboj iontu. Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně velmi náročné. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. Metoda LC-MS našla významné uplatnění v oblasti strukturní charakterizace a kvantifikace léčiv. Je často využívána pro studium kinetiky a mechanismu odbourávání léčiv v organismu a strukturní identifikaci vznikajících metabolitů. ⁽¹⁻³⁾

2.3.2.7. Automatická zařízení pro zpracování dat

Užití mikroprocesorů zasáhlo a ovlivnilo konstrukci vysokoúčinných kapalinových chromatografů. Počítačová technika je využívána jak ke kontrole vlastního chromatografického procesu, tak ke kvalitativnímu a kvantitativnímu vyhodnocení signálu z detektorů. Kontrola řízení chromatografického procesu je principiálně zajištěna dvěma systémy. První systém provádí evidenci

chromatografických parametrů zadaných pracovníkem a druhý systém automaticky kontroluje, zda přístroj dodržuje nastavené parametry. Je schopný zasahovat do jeho režimu a vést analýzu v optimálních, předem určených podmínkách. Počítačem řízená kapalinová chromatografie zajišťuje maximální reprodukovatelnost zadaných parametrů charakterizujících chromatografický proces. ^(13,18)

2.3.3. Vyhodnocování výsledků

Hlavním úkolem kvalitativní analýzy je zjištění či potvrzení identity analyzované látky. K identifikaci látek se využívá retenčních časů nebo retenčních objemů. Množství chromatografovaných látek se většinou zjišťuje podle velikosti ploch pod elučními křivkami, méně často i podle výšky píků. ^(2,18)

Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody :

- metoda vnějšího standardu

Spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). Nejprve se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po vyhodnocení chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky, označovaný CRL (chemická referenční látka), nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. ⁽¹⁵⁾

- metoda vnitřního standardu

Analýza se provádí pouze z jediného nástřiku, přičemž jeho velikost není nutné znát. To je také hlavní přednost této techniky. Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkne na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci a musí být chemicky inertní. ^(14,15)

2.4. Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Jejím cílem je určení podmínek, za kterých je uvedený postup použitelný, dále zajištění spolehlivosti při opakovaném použití metody. Validace se provádí při vývoji nové metody, nebo byla-li metoda změněna, či má-li být přenesena do jiné laboratoře a při průkazu rovnocennosti dvou metod. Následující parametry se ověřují podle toho, jestli má analytická metoda sloužit k identifikaci látek nebo stanovení obsahu látek ve vzorku. ⁽¹⁵⁾

Správnost (Accuracy)

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Obvykle se zjišťuje analýzou nejméně šesti vzorků a vyjadřuje se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost (recovery) :

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 \times \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

Modelový vzorek se připravuje ze všech složek zkoumaného přípravku a přesně přidaného standardu. Pokud nejsou k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje se přípravek se známým přídatkem standardu. ⁽¹⁵⁾

Linearita (Linearity)

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Může se zde pracovat s reálnými vzorky i s roztoky standardů. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného obsahu. ^(15,27)

Přesnost (Precision)

Přesnost kvantifikuje variabilitu výsledku metody v závislosti na jednotlivých pracovnících, změně přístrojového vybavení a prostředí různých laboratoří. Je to míra shody mezi jednotlivými výsledky metody za použití jednoho homogenního vzorku. Tento vzorek se obvykle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti stanovení. Rozlišujeme tři různé úrovně přesnosti :

Opakovatelnost (Repeatability)

Metoda je opakována stejným způsobem jedním pracovníkem za použití stejných

činidel na tomtéž přístroji.

Mezilehlá přesnost (Intermediate precision)

Metoda se provádí v různých dnech se stejným homogenním vzorkem ve stejné laboratoři, ale za použití různých činidel, analytiky i přístrojů.

Reprodukovatelnost (Reproducibility)

Měření se opakuje se stejným zhomogenizovaným vzorkem, ale s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den a v různých laboratořích. ⁽¹⁵⁾

Selektivita, specifita (Specificity)

Selektivita udává rozsah, ve kterém může být daná látka změřena správně a specificky v přítomnosti jiných látek, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami ve směsi. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku. Metoda, která je naprosto selektivní, se nazývá specifická. ^(15,28)

Detekční limit (Limit of detection, LOD)

Vyjadřuje nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, nestanovované kvantitativně. Je to parametr, který vyjadřuje citlivost metody. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku. ⁽¹⁵⁾

Kvantitativní limit (Limit of quantitation, LOQ)

Je to parametr metody, který vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, stanovitelnou s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit je možné vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne relativní směrodatné odchylky 10 %. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. ^(15,29)

Rozsah (Range)

Validovaný rozsah je interval koncentrace analytu, v kterém může být metoda používána. Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody, nicméně použitý interval koncentrace analytu nemusí být totožný s intervalem pro kalibraci. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně. ^(15,30)

Robustnost (Robustness)

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Tyto podmínky by měly být identifikovány a míra jejich vlivu na výsledek analýzy upřesněna testy.

Robustnost analytické metody je mírou její kapacity zůstat netečný vůči malým, ale záměrným změnám parametrů metody a poskytuje informaci o její spolehlivosti během běžného používání. Obvykle se sledují parametry jako např. složení mobilní fáze, teplota na koloně, pH vodné složky mobilní fáze, rychlost průtoku. ^(15,31)

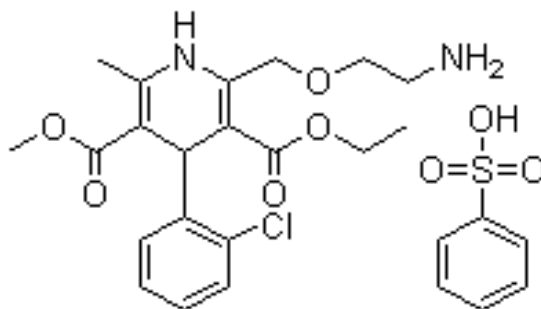
Test způsobilosti (System suitability test)

Test způsobilosti analytického systému je nedílnou součástí validace analytické metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. V případě, že některý parametr neodpovídá, upraví se chromatografické podmínky v rozsahu, aby byla splněna kritéria způsobilosti, ale aniž by přitom došlo k podstatnému pozměnění metody. Je vhodné vyhnout se několikanásobnému upravování, které může mít kumulativní vliv na účinnost chromatografického systému. Rozsah povolených změn je uveden v příslušné lékopisné monografii. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace. Jednotlivé části použitého zařízení musí být kvalifikovány a musí být schopny dosáhnout přesnosti požadované pro provedení zkoušky nebo stanovení obsahu. ^(6,15)

2.5. Vlastnosti amlodipinu a perindoprilu

Amlodipin

Název : Amlodipini besilas



Strukturní vzorec :

Sumární vzorec : C₂₆ H₃₁ ClN₂ O₈ S

Mr = 567,05

CAS : 111470-99-6

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

Fyzikálně – chemické vlastnosti : Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v propan-2-olu.⁽⁶⁾

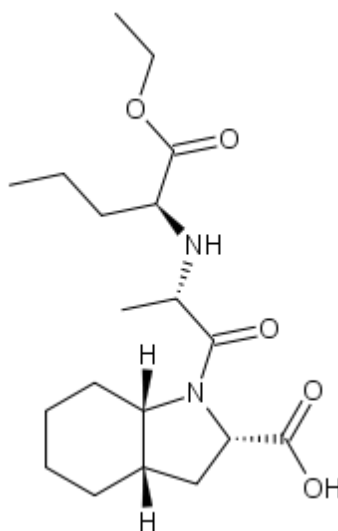
Farmakologické vlastnosti : Amlodipin se řadí do III. generace blokátorů kalciových kanálů. Jedná se o dihydropyridinový derivát s vysokou selektivitou k cévám a velmi pomalým nástupem účinku, který specificky inhibuje průnik vápníkových iontů kalciovými L-kanály. Výsledným účinkem je snížení tonu věnčitých tepen v místě excentrické stenózy a v oblasti rezistenčních arteriol, snížení kontraktivity myokardu. Hlavní terapeutické uplatnění má amlodipin u hypertenze a srdečních arytmií, v léčbě anginy pectoris a myokardiální ischemie. Lze jej podávat i u srdečního selhání.⁽³²⁻³⁵⁾

Perindopril

Název : Perindoprilum

Lékopisný je perindopril erbuminát, nověji se používá jako arginát.

Strukturní vzorec :



Chemický název : (2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[(1S)-1-

(ethoxykarbonyl)butyl]amino}propanoyl]oktahydroindol-2-karboxylová kyselina

Fyzikálně – chemické vlastnosti : Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je slabě hygroskopický. Snadno se rozpouští ve vodě a v ethanolu 96%, je mírně rozpustný v dichlormethanu. Je polymorfní. ⁽⁶⁾

Farmakologické vlastnosti : Perindopril se řadí do skupiny léčiv s názvem inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin. Tím, že perindopril inhibuje ACE, zabraňuje přeměně neúčinného angiotenzinu I na vysoce účinný angiotenzin II. Dále zabraňuje degradaci bradykininu a způsobuje pokles produkce aldosteronu. Výsledkem působení inhibitoru ACE je tedy významný pokles periferní cévní rezistence a mírný venodilatační účinek. Tato látka tedy snižuje krevní tlak u pacientů s renovaskulárním onemocněním a u pacientů s esenciální hypertenzí. Další indikace chronického užívání inhibitorů ACE je dysfunkce levé komory a známky srdečního selhání, asymptomatická dysfunkce levé komory, infarkt myokardu přední stěny a ostatní stavy po infarktu myokardu. ^(32,34,35)

Klinické studie kombinace léčiv amlodipin/perindopril :

1. Autoři ve studii ASCOT-BPLA zkoumali efekt fixní kombinace léčiv atenolol/thiazid versus amlodipin/perindopril v léčbě infarktu myokardu a ischemické choroby srdeční. Jednalo se o multicentrickou, perspektivní, randomizovanou klinickou studii. ⁽³⁶⁾
2. CAFE jako vedlejší projekt studie ASCOT, se věnovala tonometrii na radiální tepně, zjištění indexu odrazu a výpočtu centrálního krevního tlaku při léčbě kombinací amlodipin/perindopril a atenolol/thiazidové diuretikum. ⁽³⁷⁾

Práce zabývající se HPLC analýzou amlodipinu :

1. kolona : Kromasil C18
mobilní fáze : 0.02 M fosfátový pufr, acetonitril v poměru 70:30, v/v, pH 3.0
detekce : UV, 221 nm ⁽³⁸⁾
2. kolona : kolona s navázanou C18 reverzní fází
mobilní fáze : 0.1% *orto*-fosforečná kyselina (pH 3): acetonitril (20:80)
detekce : UV, 238 nm ⁽³⁹⁾
3. kolona : kolona s navázanou C18 reverzní fází
mobilní fáze : 0.1 (v/v) *orto*-fosforečná kyselina (pH 3.0) acetonitril (60:40, v/v)
detekce : UV, 238 nm ⁽⁴⁰⁾
4. kolona : kolona ODS
mobilní fáze : 0.05 M fosfátový pufr, methanol a acetonitril v poměru 50:35:15
detekce : UV, 361 nm ⁽⁴¹⁾

Práce zabývající se analýzou perindoprilu :

1. kolona : YMC-Pack s navázanou C8 reverzní fází
mobilní fáze : acetonitril, fosfátový pufr (0.05 M) (37:63, v/v) (pH 2.5)
detekce : UV, 215 nm ⁽⁴²⁾
2. kolona : Eclipse XDB s navázanou C8 reverzní fází
mobilní fáze : fosfátový pufr , acetonitril (65:35) (pH 2.6)
detekce : UV, 210 nm ⁽⁴³⁾

3. kolona : Xterra s navázanou C18 reverzní fází
mobilní fáze : NaH_2PO_4 pufr (pH 2.0; 0.005 M) acetonitril (75 + 25, v/v)
detekce : UV, 215 nm ⁽⁴⁴⁾

4. kolona : BDS hypersil s navázanou C18 reverzní fází
mobilní fáze : KH_2PO_4 (pH 2.6) a acetonitril (65:35)
detekce : UV, 210 nm ⁽⁴⁵⁾

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo vypracování chromatografických podmínek pro současnou analýzu amlodipinu a perindoprilu s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vypracovanou metodu validovat.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje, chemikálie a pomůcky

Chromatografické kolony

Kolona Separon SGX, C₁₈ (7 μm), 150 x 3 mm I.D., Tessek Ltd., Praha, ČR

Kolona Nucleosil 120-5, C₈ (5 μm), 125 x 4 mm I.D., Macherey-Nagel, Düren, Německo

Kolona LiChroCART 250-4, LiChrospher 100, RP – 18 (5 μm), 250 x 4 mm I.D., Merck, Darmstadt, Německo

Přístroje

Chromatografická sestava, Hewlett Packard Agilent 1100 Series Binary Pump, HPST s. r. o., Praha, Česká republika, zahrnující:

- vysokotlaké čerpadlo
- autosampler
- vakuový degaser
- UV detektor s proměnnou vlnovou délkou
- počítač s chromatografickým softwarem

Analytické váhy, Helago, Česká republika

Magnetická míchačka, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Acidimetr, DRUOPTA, Česká republika

Ultrazvuková lázeň – KRAINTEK, s.r.o., typ K-10, Slovensko

Centrifuga, Trigon-plus, Česká republika

Třepačka, Kavalier, Česká republika

Spektrofotometr UV 2401 PC, Shimadzu, Japonsko

Pomůcky

Laboratorní sklo – pipety, kádinky, zkumavky, baňky, váženka, lžička,

Chemikálie

Methanol, pro HPLC, Merck, Darmstadt, Německo

Octan amonný p.a., Balex, Pardubice, Česká republika

Hydrogenfosforečnan amonný p.a., Lachema, Brno, Česká republika

Hydroxid sodný p.a., Lachema, Brno, Česká republika

Kyselina fosforečná p.a., Lachema, Brno, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, Brno, Česká republika
Sulpirid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Risperidon, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Nimesulid, Sigma- Aldrich, Steinheim, Německo
Bromhexin, Sigma- Aldrich, Steinheim, Německo
Sukcynylsulfathiazol, Farmakon Olomouc, Česká republika
Sulfadimidin, Farmakon Olomouc, Česká republika
Pyridoxin HCl, Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Velká Británie
Thiamin HCl, Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Velká Británie
Benetazon, Léčiva, Praha, Česká republika
Antazolinum mesylicum, Léčiva, Praha, Česká republika
Indometacin, Galenická laboratoř, Ostrava, Česká republika
Fenacetin, Léčiva, Praha, Česká republika
Butylparaben, Léčiva, Praha, Česká republika
Ethylparaben, Léčiva, Praha, Česká republika
Propylparaben, Léčiva, Praha, Česká republika
Acetanilid, Léčiva, Praha, Česká republika
Ambroxol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Diklofenak, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Triethylamin, Merck, Darmstadt, Německo
Amlodipin, Merck, Darmstadt, Německo
Perindopril, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Voda čištěná reverzní osmózou

4.2. Výběr chromatografických podmínek pro stanovení amlodipinu a perindoprilu

Pro stanovení obsahu amlodipinu a perindoprilu v léčivém přípravku bylo nejprve třeba najít optimální chromatografické podmínky. Hledala jsem správné složení mobilní fáze, vhodnou průtokovou rychlost, objem nastříkovaného vzorku a optimální vlnovou délku pro detekci. Za těchto vhodných podmínek byl chromatografický záznam s dobře oddělenými a ostrými píky stanovovaných látek.

Výběr mobilní fáze

Byla zkoušena tato složení mobilní fáze při různé vlnové délce, objemu nastříkovaného vzorku, pH i teploty fáze. Postupně jsem vystřídala 3 různé kolony.

1) Kolona Separon SGX

Na této koloně byla všechna měření prováděna při konstantní teplotě $t=30^{\circ}\text{C}$.

1. voda : methanol 40:60 (v/v) ; $v=0,7$ ml/min
2. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : methanol 40:60 (v/v) ; pH= 5,6 ; $v=0,7$ ml/min
3. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH = 5,6 ; $v=0,7$ ml/min
4. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 3,0 – okyseleno přídatkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v=0,7$ ml/min
5. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 3,0 – okyseleno přídatkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v=0,7$ ml/min
6. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 3,0 – okyseleno přídatkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v=0,7$ ml/min
7. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 3,0 – okyseleno přídatkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v=0,7$ ml/min
8. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 3,0 – okyseleno přídatkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v=0,7$ ml/min
9. Fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) : acetonitril 45 : 55 (v/v) ; pH= 3,0 –

- okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 0,5$ ml/min ; $\lambda= 210$ nm ; $V= 10$ μl
10. Octan amonný (0,05 mol/l) : acetonitril 45 : 55 (v/v) ; pH= 6,0 ; $v= 0,5$ ml/min
11. Octan amonný (0,05 mol/l) : acetonitril 40 : 60 (v/v) ; pH= 6,0 ; $v= 0,7$ ml/min

2) Kolona Nucleosil

Na této koloně byla opět všechna měření prováděna při konstantní teplotě $t=30^\circ\text{C}$.

1. Octan amonný (0,05 mol/l) : methanol 40 : 60 ; pH= 3,3 – upraveno přídavkem 10% CH_3COOH ; $v= 0,8$ ml/min
2. Octan amonný (0,05 mol/l) : methanol 40 : 60 ; pH= 7,5 ; $v= 0,8$ ml/min
3. Octan amonný (0,01 mol/l) : methanol 20 : 80 ; pH= 7,5 ; $v= 0,8$ ml/min
4. Octan amonný (0,01 mol/l) : methanol 20 : 80 ; pH= 5,2 – upraveno přídavkem 10% CH_3COOH ; $v= 0,6$ ml/min

3) Kolona LiChroCART

Zde už byla měření zkoušena za různých teplot.

1. Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l) : methanol 20 : 80 ; pH= 3,2 – okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 1,0$ ml/min; $t= 30^\circ\text{C}$
2. Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l) : methanol 30 : 70 ; pH= 4,6 – okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 1,0$ ml/min; $t= 30^\circ\text{C}$
3. Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l) : methanol + 0,1% triethylaminu 30 : 70 ; pH= 3,5 – okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 1,0$ ml/min; $t= 30^\circ\text{C}$
4. Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l) : methanol + 0,1% triethylaminu 30 : 70 ; pH= 3,5 – okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 1,0$ ml/min; $t= 40^\circ\text{C}$
5. Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l) : methanol + 0,1% triethylaminu 30 : 70 ; pH= 3,5 – okyseleno přídavkem H_3PO_4 0,1 mol/l ; $v= 1,0$ ml/min; $t= 50^\circ\text{C}$

Výběr vnitřního standardu

Při hledání vnitřního standardu byly zkoušeny tyto látky.

- sulpirid
- risperidon
- nimesulid
- bromhexin
- sukcinylsulfathiazol

- sulfadimidin
- pyridoxin
- thiamin
- benetazon
- antazolinum mesylicum
- indometacin
- fenacetin
- butylparaben
- ethylparaben
- propylparaben
- acetanilid
- ambroxol
- diklofenak

Výběr optimální vlnové délky

Optimální vlnová délka pro detekci byla vybrána na základě UV spekter hodnocených látek změřených v methanolu. Pro měření byly zásobní roztoky (1 mg/ml) naředěny na koncentraci 0,05 mg/ml opět methanolem.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena ve složení:

Hydrogenfosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH= 3,5)	30%
Methanol	70%

Ke směsi bylo přidáno 0,1% triethylaminu.

Nejprve byl připraven zásobní roztok hydrogenfosforečnanu amonného o koncentraci 0,01 mol/l navážením 1,3205 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněním vodou po rysku. Následně bylo odměřeno 150 ml zásobního roztoku do kádinky. K roztoku bylo přidáno 350 ml methanolu. K této směsi bylo po kapkách přidáno 0,5 ml triethylaminu. Výsledného pH směsi bylo docíleno pozvolným okyselením roztoku zředěnou kyselinou fosforečnou (30%) za současného měření pH na acidimetru. Celý roztok byl následně přefiltrován.

Příprava roztoků

Zásobní roztoky amlodipinu, perindoprilu i benetazonu byly připraveny o koncentraci 1mg/ml navážením 10 mg látky do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním methanolem po rysku.

4.3. Optimalizace chromatografických podmínek

4.3.1. Závislost vymývání na pH mobilní fáze

K určení závislosti vymývání na pH byly připraveny 4 roztoky mobilní fáze, každý o objemu 150 ml a daném pH dle tabulky č. 2. Všechny roztoky byly připraveny odměřením 45 ml zásobního roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ do kádinky, přidáním 105 ml methanolu. K této směsi bylo přidáno 0,15 ml triethylaminu. Daného pH směsi bylo docíleno pozvolným okyselením roztoku zředěnou kyselinou fosforečnou (30%) za současného měření pH na acidimetru. Celý roztok byl následně přefiltrován.

Tab. 2 pH jednotlivých roztoků

Číslo roztoku	1	2	3	4
pH	6	5	4	3,5

4.3.2. Kapacitní poměr v závislosti na složení mobilní fáze

Nejprve bylo potřeba určit mrtvý retenční čas jodidem draselným. Roztok KI o koncentraci 1 mg/ml byl připraven navážením 10 mg KI do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním methanolem po rysku.

Jednotlivé roztoky mobilní fáze o objemu 150 ml byly připraveny podle tabulky č. 3. Nejprve bylo odměřeno příslušné množství pufru do kádinky a přidáno příslušné množství methanolu. Ke směsi bylo následně přidáno 0,15 ml triethylaminu a celá směs byla okyselena zředěnou kyselinou fosforečnou (30%) na pH 3,4.

Tab. 3 Složení roztoků podle obsahu methanolu a pufru

Číslo roztoku	Poměr methanol : pufr	Množství methanolu [ml]	Množství pufru [ml]
1	80 : 20	120	30
2	70 : 30	105	45
3	60 : 40	90	60
4	50 : 50	75	75
5	40 : 60	60	90

4.4. Validace metody

4.4.1. Linearita

Linearita metody byla vyhodnocena na základě kalibrační křivky, která znázorňuje závislost koncentrace stanovovaných léčivých látek na poměru plochy píku stanovovaných léčivých látek a plochy píku vnitřního standardu. Bylo připraveno 5 roztoků, z nichž každý měl různou koncentraci amlodipinu a perindoprilu, ale vždy stejnou koncentraci benetazonu jako vnitřního standardu. Dané koncentrace obou hodnocených látek se pohybovaly v rozmezí 0,05 – 0,2 mg/ml.

Byly připraveny roztoky amlodipinu, perindoprilu a benetazonu o koncentraci 1 mg/ml pro měření linearity navážením 50 mg příslušné látky do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněním methanolem po rysku. Jednotlivé vzorky pro měření linearity byly připraveny pipetováním příslušného množství sledovaných látek i vnitřního standardu (viz tab.4) do odměrné baňky o objemu 5 ml a doplněním methanolem po rysku.

Tab. 4 Složení kalibračních roztoků

Roztok	1	2	3	4	5
Koncentrace amlodipinu, perindoprilu [mg/ml]	0,05	0,07	0,1	0,15	0,2
Pipetované množství aml.,per. [ml]	0,25	0,35	0,5	0,75	1
Koncentrace benetazonu [mg/ml]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Pipetované množství ben. [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4.4.2. Přesnost

Přesnost byla hodnocena jako opakovatelnost. Následujícím postupem bylo připraveno a analyzováno šest vzorků. Nejdříve byla zvážením deseti tablet zjištěna průměrná hmotnost jedné tablety (0,1054 g). Potom byly tablety rozetřeny na prach a bylo odváženo vždy množství ekvivalentní průměrné hmotnosti jedné tablety. Navážka vzorku byla extrahována 10 ml methanolu v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Extrakt byl poté centrifugován 5 min při otáčkách 5000/min a laboratorní teplotě (24 °C). Pak byl supernatant převeden do 50 ml odměrné baňky, byl přidán roztok vnitřního standardu a baňka byla doplněna mobilní fází po rysku. Každý vzorek byl nastříkovan třikrát a z každého nástřiku byl vypočítán obsah.

4.4.3. Správnost

Bylo připraveno šest modelových vzorků smícháním přesně asi 5 mg perindoprilu a 5 mg amlodipinu a 95,4 mg placebo (lactosum monohydricum, cellulosum microcristallinum, silica colloidalis anhydrica, magnesii stearas). Každý vzorek byl analyzován 3× výše uvedeným způsobem a byl vypočítán obsah.

4.4.4. Selektivita

Selektivita se dokazuje nástřikem roztoku placebo. Bylo tedy naváženo 100 mg placebo (lactosum monohydricum, cellulosum microcristallinum, silica colloidalis anhydrica, magnesii stearas) a extrahováno 10 ml methanolu v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Po následné centrifugaci byl supernatant nastříkovan na kolonu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Výběr vhodných chromatografických podmínek

Stacionární fáze

Nejprve byla použita kolona Separon SGX, která byla naplněna sorbentem s C 18. Tvar píků obou stanovovaných látek a neuspokojivá detekce perindoprilu vedla po řadě pokusů s různým složením mobilní fáze k obměně kolony. Jako druhá v pořadí byla zkoušena kolona Nucleosil s náplní C 8, ovšem ani u té nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Vyhovující byla až další kolona LiChroCART s reverzní fází C 18.

Mobilní fáze

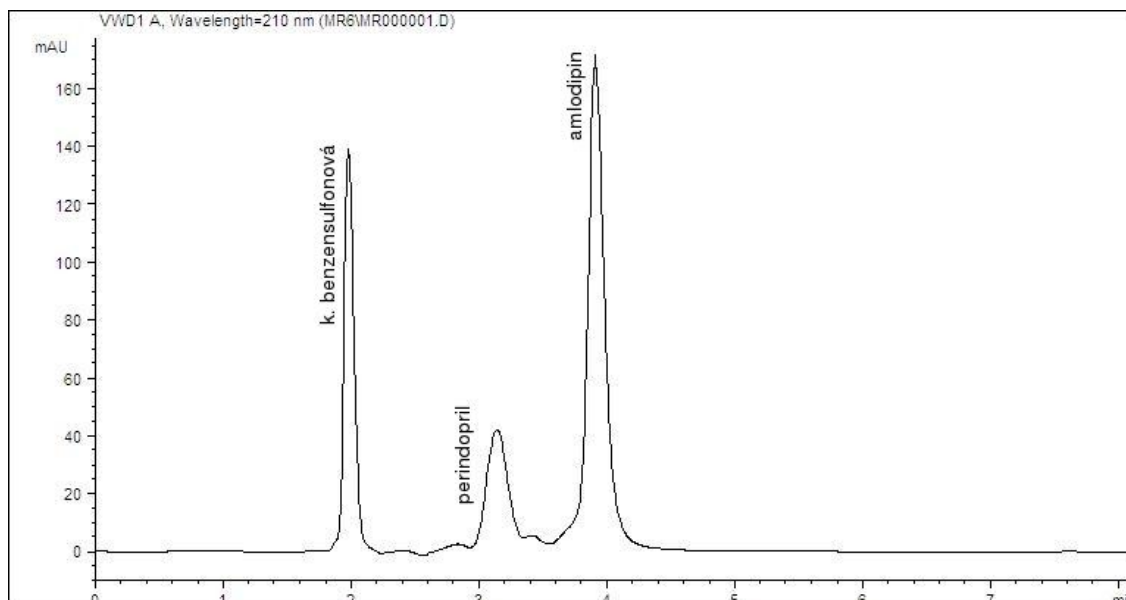
Hledání vhodné mobilní fáze trvalo poměrně dlouho. Bylo nutné vyzkoušet tři různé kolony, velké množství směsí různých roztoků o různých koncentracích a vzájemné poměry jednotlivých složek. Nutná byla také úprava teploty kolony. Hlavním problémem byla nedostatečná eluce perindoprilu a příliš časná eluce amlodipinu.

Na první koloně byla nejprve zkoušena směs methanolu s vodou, dále dihydrogenfosforečnan draselný ve směsi s methanolem a dihydrogenfosforečnan draselný s acetonitrem. Byly zkoušeny různé vzájemné poměry, rozdílná průtoková rychlost a množství nastříknutého vzorku. Očekávaný výsledek však nepřinesla ani směs acetonitrilu s octanem amonným. Hlavním problémem všech těchto směsí byla příliš časná eluce amlodipinu a zároveň nedostatečně ostrý pík perindoprilu.

Na druhé koloně byl zkoušen octan amonný s methanolem o různých hodnotách pH. Úprava pH v rozmezí 3,3 – 7,5 byla dosažena přidávkem 10% CH₃COOH. Ovšem ani zde nebylo dosaženo výrazného úspěchu a pík perindoprilu byl stále nedostatečně ostrý.

Na třetí a zároveň poslední koloně byla zkoušena směs hydrogenfosforečnanu amonného s methanolem ve vzájemném poměru 20 : 80 a 30 : 70. Poměr 30 : 70 se ukázal jako vhodnější, přidávek 0,1% triethylaminu přispěl k větší symetrii a zostření píků. Na této koloně byly také zkoušeny různé teploty mobilní fáze, 30, 40 a 50°C.

Jako nejvhodnější mobilní fáze byla zvolena směs hydrogenfosforečnanu amonného s methanolem v poměru 30 : 70 s přidávkem 0,1% triethylaminu, jejíž pH bylo upraveno na 3,5 pomocí 30% kyseliny fosforečné, při průtokové rychlosti 1 ml/min a o teplotě kolony 50°C.



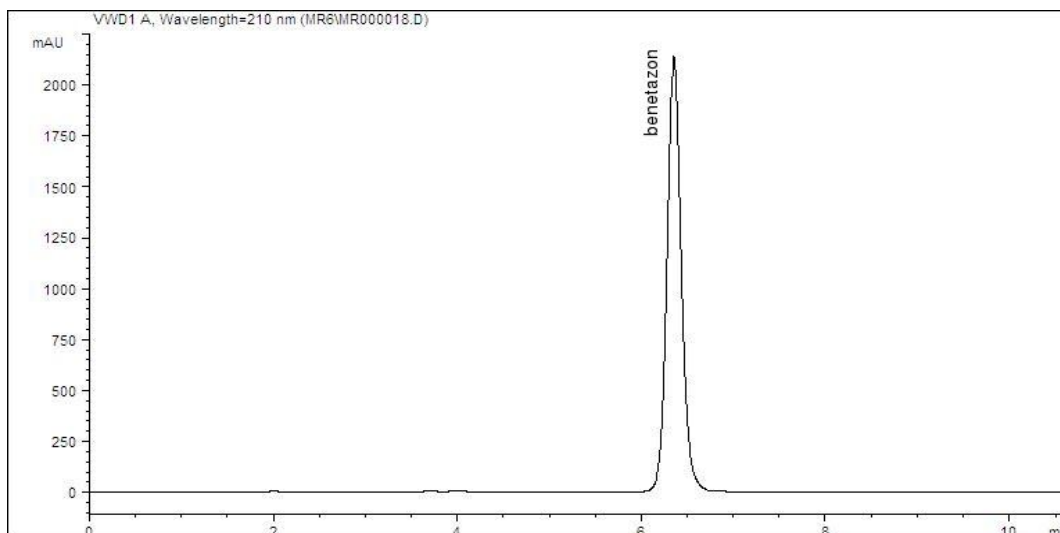
Obr. 3 Chromatografický záznam směsi standardů obsahových látek, chromatografické podmínky viz str. 52

Chromatografické podmínky

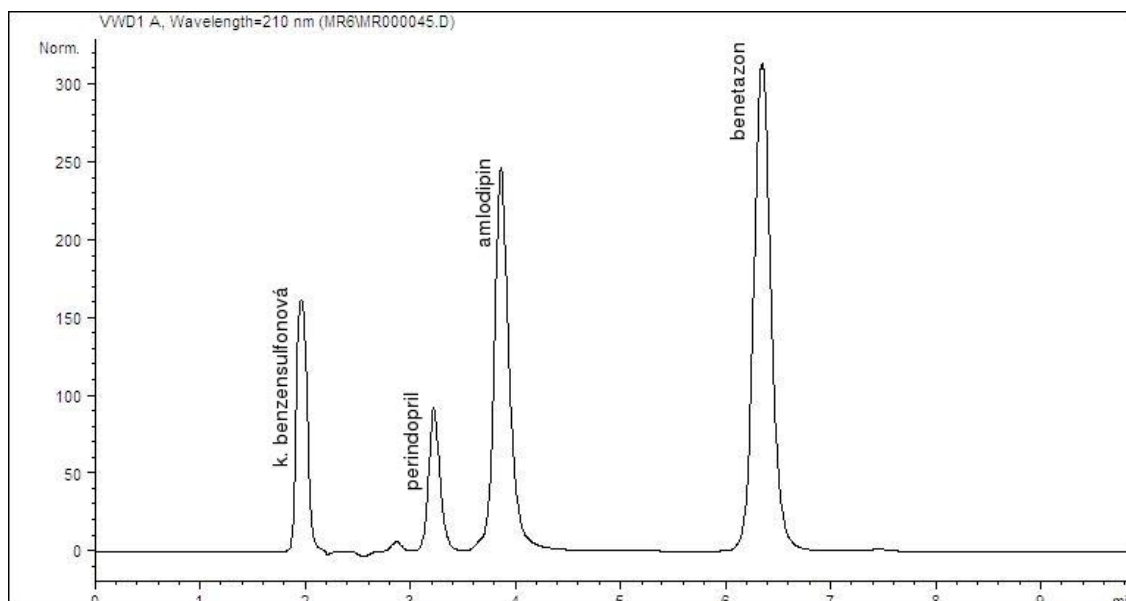
Jako stacionární fáze byla zvolena kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 C 18. Směs pro mobilní fázi byla použita ve složení hydrogenfosforečnan amonný s methanolem v poměru 30 : 70 s přidavkem 0,1% triethylaminu, pH směsi bylo upraveno na 3,5 pomocí 30% kyseliny fosforečné, při průtokové rychlosti 1 ml/min a o teplotě kolony 50°C. Zkoumané látky byly detekovány UV detektorem při 210 nm.

Výběr vnitřního standardu

Výběr vnitřního standardu byl poměrně složitý. Vyzkoušeno bylo hodně látek, ale naprostá většina z nich se eluovala již po první minutě. V dalších případech se retenční čas látek shodoval s retenčním časem amlodipinu. Nejvhodnější se nakonec ukázal být benetazon, jehož retenční čas se pohyboval kolem osmé minuty, pík byl ostrý a nijak nekolidoval s píky amlodipinu a perindoprilu. Proto byl benetazon zvolen vnitřním standardem.



Obr. 4 Chromatografický záznam benetazonu (vnitřní standard), chromatografické podmínky viz str. 52

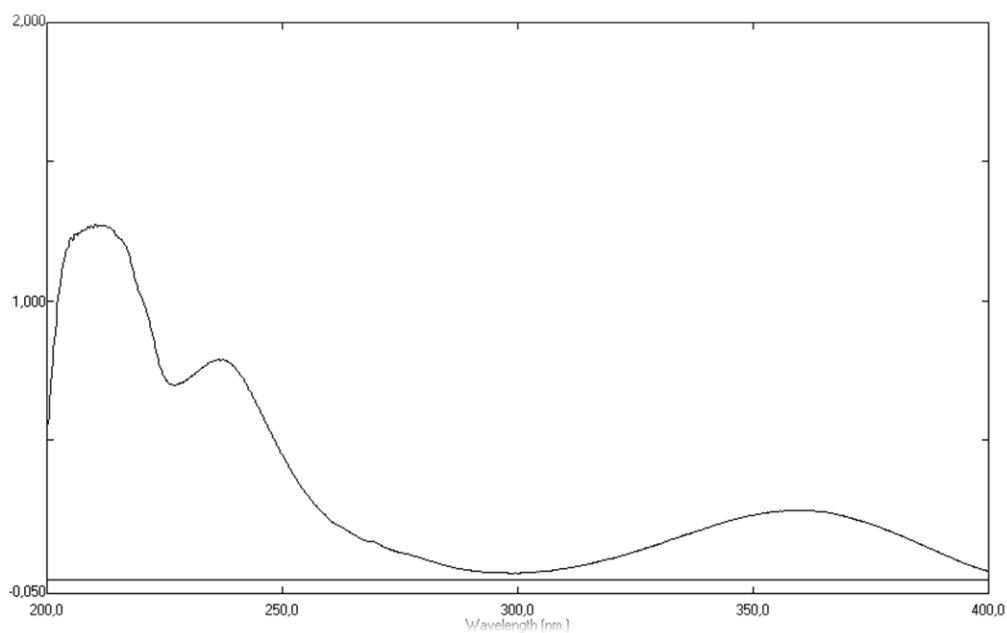


Obr. 5 Chromatografický záznam směsi standardů včetně vnitřního (benetazon), chromatografické podmínky viz str. 52

Výběr optimální vlnové délky

Vzorky zásobních roztoků amlodipinu, benetazonu a perindoprilu byly proměřeny ve spektrometru v rozmezí vlnových délek 200 až 400 nm a jejich absorpční maxima včetně absorpčních spekter zaznamenána. Pro amlodipin platí maximum absorbance při 210,2 nm, pro benetazon při 204,4 nm a pro perindopril při 204,6 nm. Proto byla zvolena jako optimální pro měření těchto tří látek ve společném vzorku vlnová délka 210 nm.

Amlodipin

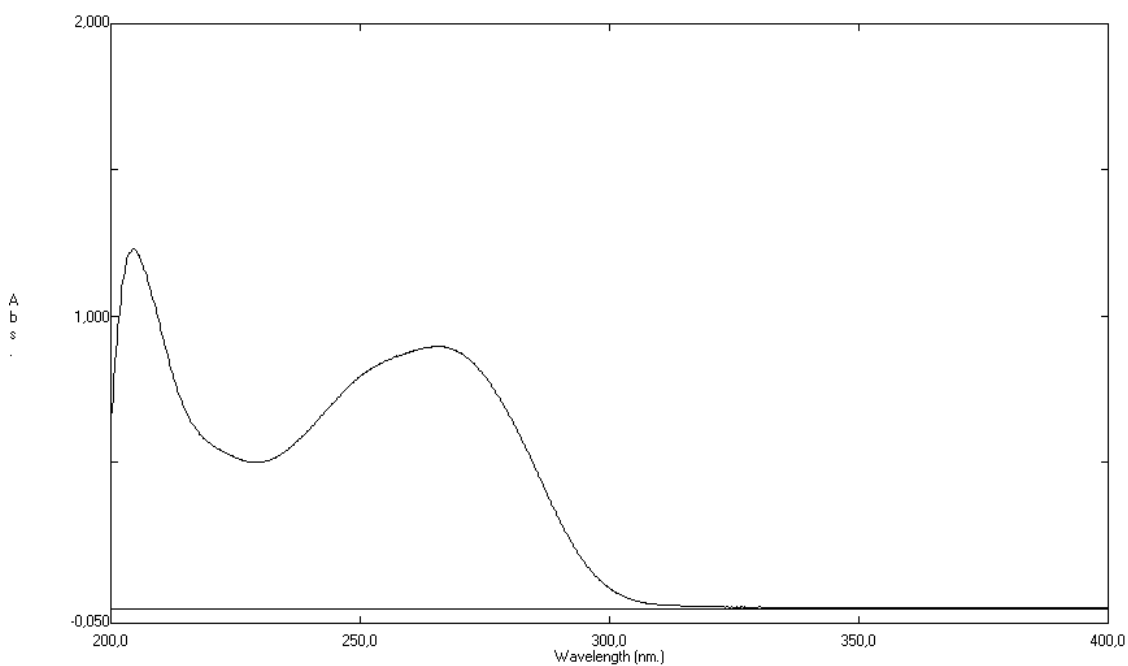


Obr. 6 Absorpční spektrum amlodipinu

Absorpční maxima :

Číslo	Vlnová délka (nm)	Absorbance
1	360,20	0,2493
2	236,40	0,7896
3	210,20	1,2757

Benetazon

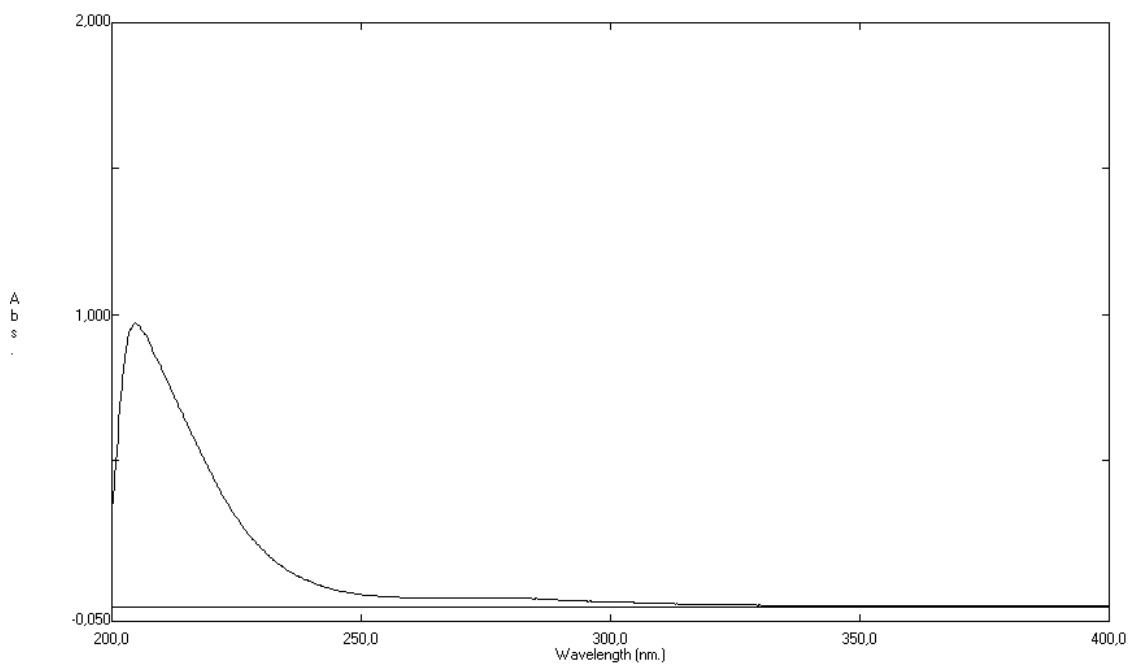


Obr. 7 Absorpční spektrum benetazonu

Absorpční maxima :

Číslo	Vlnová délka (nm)	Absorbance
1	352,80	0,0043
2	346,20	0,0046
3	265,80	0,8970
4	204,40	1,2316

Perindopril



Obr. 8 Absorpční spektrum perindoprilu

Absorpční maxima :

Číslo	Vlnová délka (nm)	Absorbance
1	356,40	0,0042
2	272,80	0,0315
3	204,60	0,9712

5.2. Optimalizace chromatografických podmínek

5.2.1. Závislost vymývání na pH mobilní fáze

Vzorek obsahující amlodipin, perindopril i benetazon o koncentraci 0,1 mol/l byl nastříknut na kolonu dvakrát u každé mobilní fáze s daným pH. Následně byly retenční časy jednotlivých látek zaznamenány do tabulky č. 5. Z výsledků vyplývá, že s klesajícím pH mobilní fáze se prodlužovaly retenční časy všech zkoumaných látek.

Tab. 5 Retenční časy zkoumaných látek [min] v závislosti na pH

Látka	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3,5
Amlodipin	1,947	1,948	1,949	1,962
Perindopril	3,720	3,835	3,730	3,863
Benetazon	4,418	4,425	5,694	6,350

5.2.2. Kapacitní poměr v závislosti na složení mobilní fáze

K určení kapacitního poměru bylo nejprve třeba určit mrtvý retenční čas t_0 . K jeho stanovení byl použit roztok jodidu draselného o koncentraci 1 mg/ml, jehož vzorek byl nastříknut na kolonu a daný retenční čas zaznamenán.

Vzorek obsahující amlodipin, perindopril i benetazon o koncentraci 0,1 mol/l byl nastříknut dvakrát u každé směsi mobilní fáze, retenční časy t_r jednotlivých látek zaznamenány a následně byly vypočteny kapacitní poměry látek podle vzorce $k = (t_r - t_0) / t_0$ a výsledky zaznamenány do tabulky č. 6. Z grafu kapacitních poměrů vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem methanolu ve směsi mobilní fáze se zmenšují kapacitní poměry jednotlivých látek.

Tab. 6 Kapacitní poměry látek

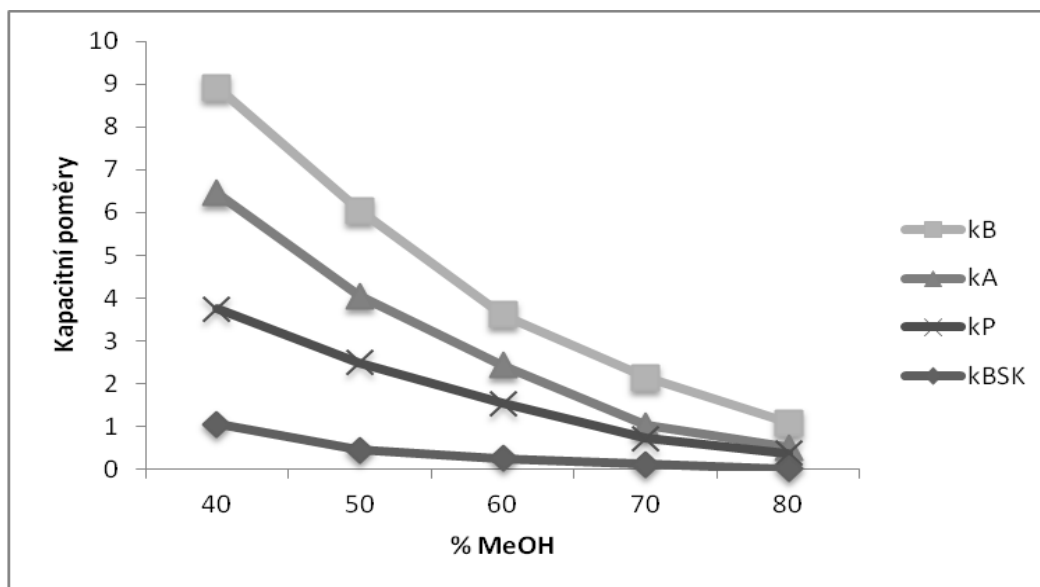
Číslo vzorku	%MeOH	k_{BSK}	k_P	k_A	k_B
1	40	1,05	3,75	6,45	8,92
2	50	0,45	2,49	4,05	6,05
3	60	0,25	1,54	2,43	3,61
4	70	0,11	0,72	1,03	2,14
5	80	0,01	0,37	0,51	1,08

Pozn.: k_{BSK} = kapacitní poměr benzensulfonové kyseliny

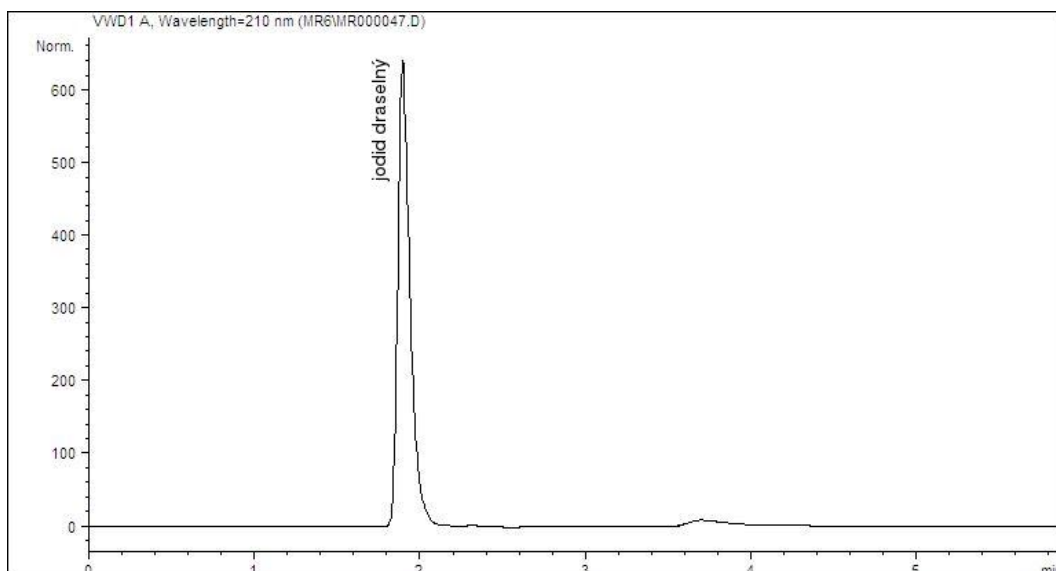
k_P = kapacitní poměr perindoprilu

k_A = kapacitní poměr amlodipinu

k_B = kapacitní poměr benetazonu



Obr. 9 Kapacitní poměry látek



Obr. 10 Chromatografický záznam jodidu draselného

5.3. Validace metody

5.3.1. Linearita

Linearita byla ověřena kalibrační křivkou, která zde znázorňuje závislost koncentrace amlodipinu (perindoprilu) na poměru plochy píku amlodipinu (perindoprilu) a plochy píku benetazonu, resp. znázorňuje závislost koncentrace stanovovaných léčivých látek na poměru plochy píku stanovovaných léčivých látek a plochy píku vnitřního standardu. Přesné složení kalibračních roztoků je uvedeno v tabulce č. 4.

Každý roztok o dané koncentraci byl měřen pětkrát a výsledky zaznamenány do tabulky. Výsledných pět hodnot každé koncentrace u obou zkoumaných látek bylo zprůměrováno a vyneseno do kalibračních křivek. Jejich parametry jsou :

- Kalibrační křivka amlodipinu
Rovnice regresní přímky : $y = 7,2013x + 0,0281$
Koeficient korelace : $R^2 = 0,9975$
- Kalibrační křivka perindoprilu
Rovnice regresní přímky : $y = 2,1789x + 0,0224$
Koeficient korelace : $R^2 = 0,9990$

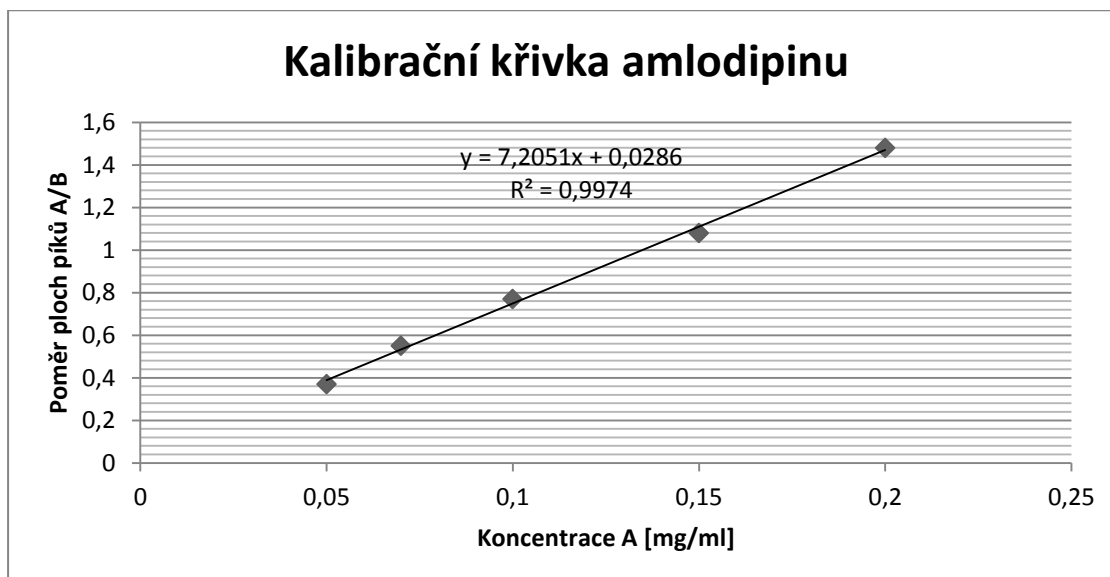
Tab. 7 Plochy píkù amlodipinu

Koncentrace amlodipinu [mg/ml]	Číslo měření	Plocha píku amlodipinu	Plocha píku benetazonu	Poměr ploch píků A/B	Průměr hodnot A/B
0,05	1	1515,3	3056,9	0,37	0,3660
	2	1138,4	3013,0	0,3778	
	3	1093,1	3014,8	0,3626	
	4	1082,0	3014,1	0,3590	
	5	1087,1	3014,1	0,3607	
0,07	1	1657,2	2979,8	0,5561	0,5518
	2	1641,0	2982,5	0,5502	
	3	1645,6	2987,4	0,5508	
	4	1661,1	3014,1	0,5511	
	5	1658,4	1012,2	0,5506	
0,1	1	2349,1	3048,7	0,7705	0,7684
	2	2365,3	3049,2	0,7757	
	3	2325,5	3050,2	0,7624	
	4	2353,7	3053,5	0,7708	
	5	2331,9	3057,9	0,7626	
0,15	1	3390,4	3143,6	1,0785	1,0842
	2	3386,2	3141,7	1,0778	
	3	3419,5	3142,3	1,0882	
	4	3420,9	3144,5	1,0879	
	5	3420,7	3142,6	1,0885	
0,2	1	4590,8	3110,1	1,4761	1,4752
	2	4603,6	3120,0	1,4755	
	3	4592,3	3113,8	1,4748	
	4	4597,6	3117,3	1,4749	
	5	44598,3	3118,5	1,4745	

Pozn. A - amlodipin

Poměr ploch píků A/B – poměr ploch píků amlodipinu a benetazonu

Průměr hodnot A/B – průměr poměrů ploch píků amlodipinu a benetazonu



Obr. 11 Kalibrační křivka amlodipinu

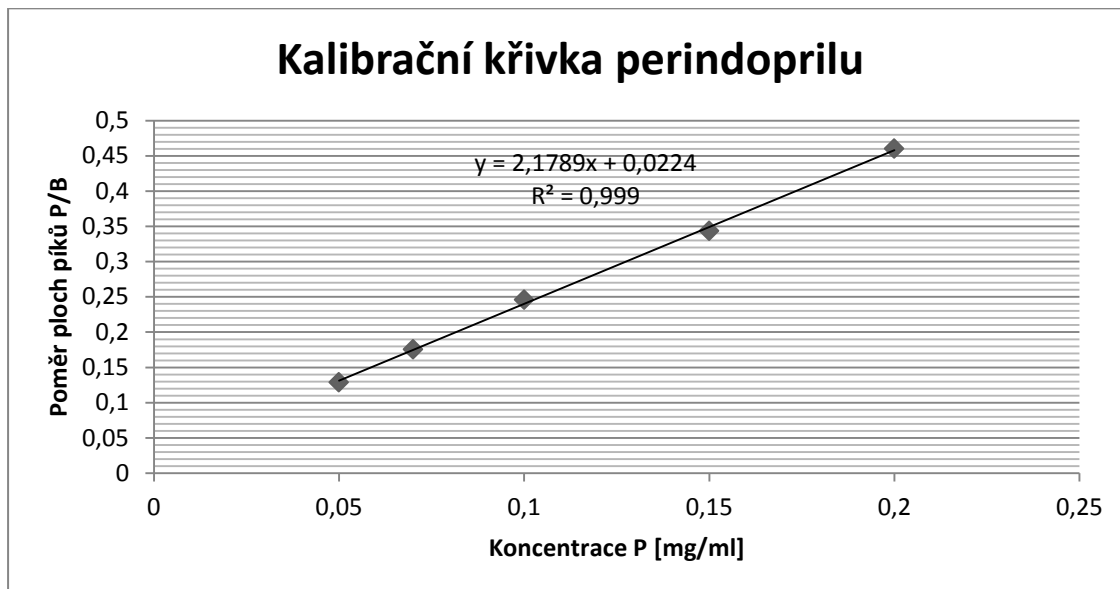
Tab. 8 Plochy píků perindoprilu

Koncentrace perindoprilu [mg/ml]	Číslo měření	Plocha píku perindoprilu	Plocha píku benetazonu	Poměr ploch píků P/B	Průměr hodnot P/B
0,05	1	421,8	3056,9	0,1380	0,1289
	2	391,4	3013,0	0,1300	
	3	381,0	3014,8	0,1264	
	4	375,6	3014,1	0,1246	
	5	378,2	3014,1	0,1255	
0,07	1	525,5	2979,8	0,1764	0,1756
	2	522,5	2982,5	0,1752	
	3	524,0	2987,4	0,1754	
	4	528,5	3014,1	0,1753	
	5	528,9	3012,2	0,1756	
0,1	1	750,5	3048,7	0,2462	0,2460
	2	753,8	3049,2	0,2472	
	3	747,1	3050,2	0,2450	
	4	752,5	3053,5	0,2464	
	5	749,1	3057,9	0,2450	
0,15	1	1077,4	3143,6	0,3427	0,3436
	2	1075,4	3141,7	0,3423	
	3	1081,8	3142,3	0,3443	
	4	1082,7	3144,5	0,3443	
	5	1082,3	3142,6	0,3444	
0,2	1	1430,1	3110,1	0,4598	0,4600
	2	1435,0	3120,0	0,4599	
	3	1432,3	3113,8	0,4600	
	4	1434,3	3117,3	0,4601	
	5	1435,0	3118,5	0,4602	

Pozn. P - perindopril

Poměr ploch píků P/B – poměr ploch píků perindoprilu a benetazonu

Průměr hodnot P/B – průměr poměrů ploch píků perindoprilu a benetazonu



Obr. 12 Kalibrační křivka perindoprilu

5.3.2. Přesnost

Bylo připraveno 6 roztoků, každý roztok byl nastříknut třikrát, výsledky zaznamenány do tabulky č.7 a z každého nástřiku byl vypočítán obsah daných látek a relativní směrodatná odchylka. Obsah látek byl vypočítán podle následujícího vzorce :

$$m (\%) = \frac{x \cdot 50 \cdot 0,1055 \cdot 100}{n \cdot 5},$$

kde x – hodnota vypočítaná z rovnice regresní přímky kalibrační křivky

50 – zředění

n – navážka

0,1055g – průměrná hmotnost jedné tablety

5 – deklarované množství amlodipinu a perindoprilu v jedné tabletě

Z jednotlivých výsledků byl spočítán průměrný obsah obou účinných látek.

Tab. 9 Obsahy ploch pod píkem

Číslo vzorku	Navážka	amlodipin	perindopril	benetazon
1	n=0,1048 g	2295,8	746,1	3025,6
		2315,4	751,9	3008,9
		2301,6	745,6	3000,1
2	n=0,1051 g	2325,1	755,3	3038,7
		2305,8	748,7	3052,6
		2341,7	743,8	3055,9
3	n=0,1054 g	2287,6	758,4	3129,5
		2303,4	749,3	3091,7
		2280,7	749,2	3088,1
4	n=0,1055 g	2359,1	754,6	3085,4
		2300,7	748,3	3063,2
		2338,6	760,2	3074,7
5	n=0,1045 g	2275,9	747,7	3101,3
		2299,6	751,2	3129,8
		2310,4	749,1	3082,5
6	n=0,1053 g	2375,1	745,2	3066,7
		2348,3	753,8	3045,2
		2361,7	754,9	3046,1

Tab. 10 Průměrný obsah a relativní směrodatná odchylka amlodipinu

Číslo vzorku	Obsah A [%]	Průměrný obsah A [%]	Směrodatná odchylka A	RSD A [%]
1	102,05	102,9	0,6436	0,63
	103,55			
	103,22			
2	102,64	102,2	0,6820	0,67
	101,28			
	102,80			
3	97,60	98,6	0,8011	0,81
	99,56			
	98,66			
4	102,18	101,4	0,7881	0,78
	100,30			
	101,62			
5	98,85	99,6	1,0053	1,01
	98,97			
	101,04			
6	103,74	103,6	0,2410	0,23
	103,28			
	103,86			

Pozn. RSD A – relativní směrodatná odchylka amlodipinu

Průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky amlodipinu činila 0,69 %.

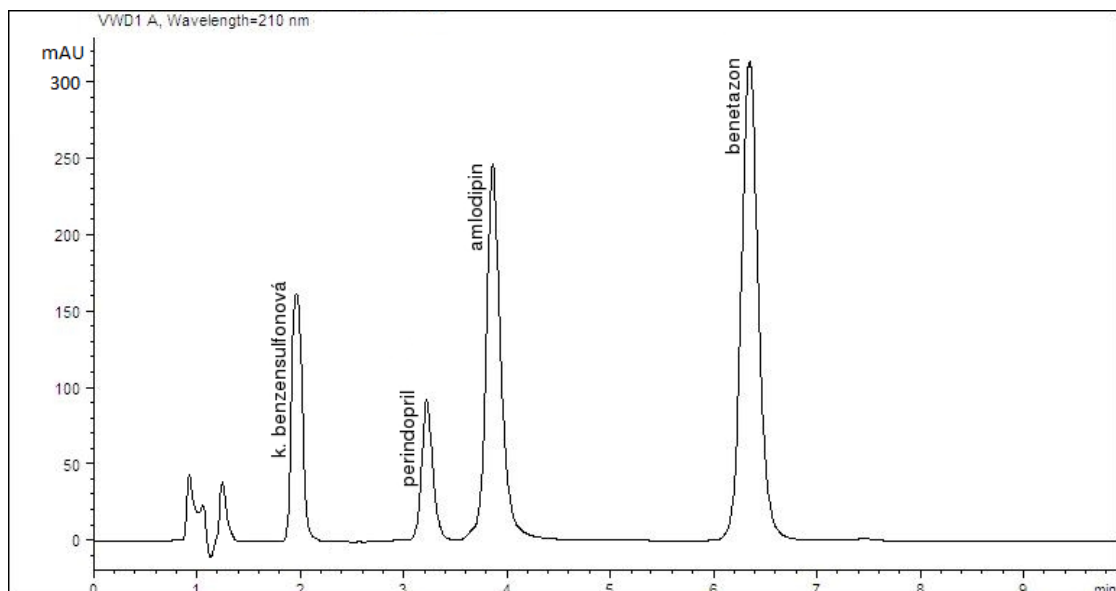
Tab. 11 Průměrný obsah a relativní směrodatná odchylka perindoprilu

Číslo vzorku	Obsah P [%]	Průměrný obsah P [%]	Směrodatná odchylka P	RSD P [%]
1	103,48	104,3	0,6236	0,60
	105,00			
	104,37			
2	104,09	102,8	0,9796	0,95
	102,58			
	101,72			
3	100,94	101,0	0,0544	0,05
	100,95			
	101,06			
4	101,87	102,2	0,6081	0,60
	101,74			
	103,09			
5	101,23	101,4	0,5749	0,57
	100,73			
	102,12			
6	101,34	102,8	1,0151	0,97
	103,42			
	103,56			

Pozn. RSD P – relativní směrodatná odchylka perindoprilu

Průměrná relativní směrodatná odchylka perindoprilu činila 0,63 %.

Z výsledků vyplývá, že bylo stanoveno 101,4 % deklarovaného obsahu amlodipinu a 102,4 % deklarovaného množství perindoprilu. Relativní směrodatná odchylka se u amlodipinu pohybovala v rozmezí 0,23 – 1,01 %, u perindoprilu v rozmezí 0,05 – 0,97 %.



Obr. 13 Záznam výluhu z tablet

5.3.3. Správnost

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Bylo analyzováno 6 vzorků s přesným množstvím přidaného standardu. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze stanoveného množství standardu byla vypočítána výtěžnost (recovery).

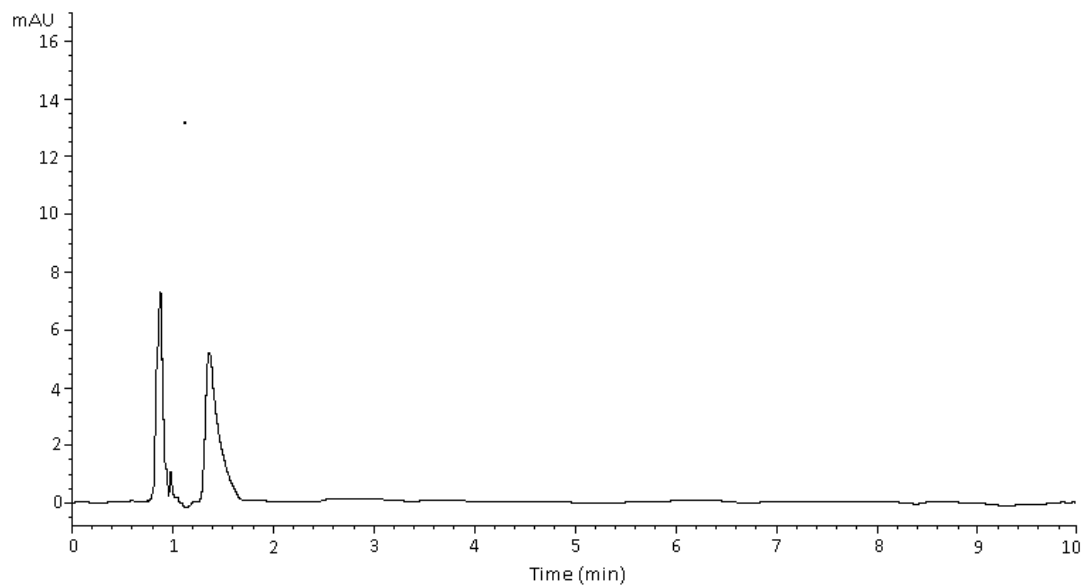
Tab. 12 Recovery jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Přidáno standardu [mg/ml]	Stanoveno standardu [mg/ml]	Recovery ^{a)} [%]
1	0,1062	0,1045	98,7
		0,1053	
		0,1047	
2	0,0988	0,0987	99,3
		0,0982	
		0,0975	
3	0,0970	0,0964	100,1
		0,0970	
		0,0978	
4	0,1032	0,1010	98,2
		0,1017	
		0,1012	
5	0,1048	0,1058	100,2
		0,1052	
		0,1040	
6	0,1034	0,1042	100,5
		0,1043	
		0,1032	

a) průměr ze 3 hodnot

5.3.4. Selektivita

Selektivita byla doložena nástřikem roztoku placeba.



Obr. č.14 Chromatografický záznam roztoku placeba.

6. ZÁVĚR

Během mé rigorózní práce byly vypracovány podmínky pro analýzu amlodipinu a perindoprilu v kombinovaném léčivém přípravku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jako stacionární fáze byla zvolena kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 C 18 a pro mobilní fázi byla použita směs ve složení hydrogenfosforečnan amonný s methanolem v poměru 30 : 70 s přídavkem 0,1% triethylaminu. pH celé směsi bylo upraveno na 3,5 pomocí 30% kyseliny fosforečné. Průtoková rychlost byla stanovena na 1 ml/min a teplota kolony na 50°C. Zkoumané látky byly detekovány UV detektorem při 210 nm.

Dále byla celá metoda validována pomocí linearitu, přesnosti, správnosti a selektivity. Pro linearitu byla použita kalibrační křivka, jejíž parametry pro amlodipin jsou rovnice : $y = 7,2013x + 0,0281$; koeficient korelace je roven : $R^2 = 0,9975$. Pro perindopril byla stanovena rovnice : $y = 2,1789x + 0,0224$ s koeficientem korelace : $R^2 = 0,9990$. Přesnost metody byla hodnocena jako opakovatelnost. Z výsledků šesti vzorků byl vypočítán obsah a z něj následně relativní směrodatná odchylka. Bylo stanoveno 101,4 % deklarovaného obsahu amlodipinu a 102,4 % deklarovaného množství perindoprilu. Průměrná relativní směrodatná odchylka u amlodipinu činila 0,69 %, u perindoprilu 0,63 %. Správnost metody byla ověřena jako výtěžnost a pohybovala se mezi 98,2 a 100,5%. Selektivita byla ověřena nástřikem roztoku placeba.

7. LITERATURA

1. Štulík, K. a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2004
2. Pacáková, V., Štulík, K. : Vysokoučinná kapalinová chromatografie, SPN, Praha 1986
3. Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006
4. Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum 2005
5. Churáček, J. a kol.: Analytická separace látek, SNTL, Praha 1990
6. Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada, Praha 2009
7. Volka, K. a kol.: Analytická chemie II, VŠCHT, Praha 1995
8. Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
9. Hanai, T. .: Liquid Chromatography in Biomedical Analysis, Elsevier, New York 1991
10. Lowe, C., Dean, P.: Afinitní chromatografie, SNTL, Praha 1979
11. Miller, J.: Separation Methods in Chemical Analysis, John Wiley & Sons, Kanada 1975
12. Krejčí, M.: Mikrokolonová a kapilární kapalinová chromatografie, SNTL, Praha 1990
13. Klíma, J., Graffnetterová, J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
14. Krejčí, M. a kol.: Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii, SNTL, Praha 1990
15. Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha 2007
16. Babjuk, J., Perlík, F., Šídlo, Z.: Bioanalytika léků, Avicenum, Praha 1990
17. Done, J., Knox, J., Loheac, J.: Applications of high-speed liquid chromatography, John Wiley & Sons, Velká Británie 1974
18. Churáček, J., Jandera, P.: Úvod do vysokoučinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984
19. Coufal, Pavel. High Performance Liquid Chromatography [online]. 28.7.2004 [cit. 2012-1-23]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
20. Cvačka, Josef. Instrumentace pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii [online]. 10.11.2010 [cit. 2012-1-23]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
21. Cvačka, Josef. Instrumentace pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii [online]. Publikováno 10.11.2010 [cit. 2012-4-22]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
22. Pospíšil, M.: Instrumentální metody výzkumu a analýzy II, ČVUT, Praha 1996

23. Douša, Michal. Autosamplery HPLC [online]. Publikováno 15.11.2007 [cit. 2012-4-22]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/autosamplers.html>
24. Douša, Michal. Chromatografická kolona [online]. Publikováno 10.9.2009 [cit. 2012-2-10]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html
25. Douša, Michal. Separace na reverzní fázi v extrémních oblastech pH [online]. Publikováno 27.5.2008 [cit. 2012-2-11]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/separation_pH.htm
26. Jandera, Pavel. HPLC 01 Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC – současný stav a perspektivy [online]. Publikováno 2003 [cit. 2012-2-11]. Dostupné z: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc
27. Riley, C.M., Rosanske T.W.: Development and Validation of Analytical Methods, Elsevier Science Ltd, Velká Británie 1996
28. Mestek, O.: Validace stanovení olova v živočišných a rostlinných materiálech metodou izotopové zředovací hmotnostní spektrometrie. Chem.Listy 1999, 93, 394-398
29. Currie, L. A.: Nomenclature In Evaluation Of Analytical Methods Including Detection And Quantification Capabilities. Pure &Appl. Chem. 1995, 67, 1699-1723
30. Thompson, M. et al: Harmonized Guidelines For Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure &Appl. Chem. 2002, 74, 835–855
31. Douša, Michal. Robustnost metody [online]. Publikováno 26.1.2011 [cit. 2012-1-17]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/robustnost.html#_1
32. Aschermann, M.: Kardiologie, Galén, Praha 2004
33. Patočka, Jiří. Amlodipin – nejlepší antihypertenzivum roku 2006 [online]. Publikováno 5.5.2007 [cit. 2012-2-10]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=106>
34. Klener, P. et al: Vnitřní lékařství, Galén, Praha 2001
35. Lincová, D.; Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2007
36. Dahlöf, B. et al: Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. The Lancet. 2005, 366, 895 - 906
37. The CAFE Investigators et al: Differential Impact of Blood Pressure-Lowering

- Drugs on Central Aortic Pressure and Clinical Outcomes: Principal Results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) Study. *Circulation*. 2006, 113, 1213-1225
38. Chitlange, S. S., et al: RP-HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine and metoprolol in tablet formulation. *Asian J.of Pharm.* 2008, 2, 232-234
 39. Basavaiah, K.: Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Amlodipine Besylate in Pharmaceuticals. *Sci. Asia*. 2005, 31, 13-21
 40. Malesuik, M. D., et al.: Determination of Amlodipine in Pharmaceutical Dosage Forms by Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry. *J. AOAC International* 2006, 89, 359-364
 41. Kamat, K.; Chaturvedi, S.C.: Stability indicating assay method for amlodipine tablets. *Indian J. Pharm.Sci.* 2005, 67, 236-239
 42. Medenica, M.: Evaluation of impurities level of perindopril tert-butylamine in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 1087-1094
 43. Prajapati, J., et al.: Analytical method development and validation of Amlodipine besylate and Perindopril erbumine in combine dosage form by RP-HPLC. *Internat. J. PharmTech Research* 2011, 3, 801-808
 44. Jogia, H., et al.: Development and Validation of a Stability-Indicating Assay Method for Simultaneous Determination of Perindopril and Indapamide in Combined Dosage Form by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. AOAC International* 2010, 93, 108-115
 45. Pathak, A.K., et al: A Selective Reverse Phase HPLC Method For Simultaneous Determination of Perindopril and Indapamide In Solid Dosage Form And Bulk Drug. *J. Pharm.Research* 2011, 4, 2512-2513

SOUHRN

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

HPLC stanovení obsahu amlodipinu a perindoprilu v kombinovaném léčivém přípravku

Rigorózní práce

Mgr. Martina Kolouchová

V této rigorózní práci byly vypracovány chromatografické podmínky pro analýzu amlodipinu a perindoprilu v kombinovaném léčivém přípravku. Jako nejvhodnější byla zvolena kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 C 18 za použití směsi mobilní fáze ve složení hydrogenfosforečnan amonný s methanolem v poměru 30 : 70 s přidavkem 0,1% triethylaminu. Celá směs byla upravena na pH 3,5 pomocí 30% kyseliny fosforečné. Průtoková rychlost byla stanovena na 1 ml/min a teplota kolony 50°C. Zkoumané látky byly detekovány při 210 nm pomocí UV detektoru. Jako vnitřní standard byl použit benetazon.

Chromatografické podmínky byly optimalizovány nejprve zkoumáním závislosti vymývání na pH mobilní fáze. S klesajícím pH mobilní fáze se prodlužovaly retenční časy všech zkoumaných látek. Poté byly zkoumány kapacitní poměry látek v závislosti na složení mobilní fáze. Z výsledků vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem methanolu ve směsi mobilní fáze se zmenšují kapacitní poměry jednotlivých látek.

Validace metody byla ověřena pomocí linearitu, přesnosti, správnosti a selektivity. Pro linearitu byla použita kalibrační křivka. Parametr kalibrační křivky pro amlodipin je rovnice : $y = 7,2013x + 0,0281$ s koeficientem korelace : $R^2 = 0,9975$. Pro perindopril byla stanovena rovnice : $y = 2,1789x + 0,0224$. Koeficient korelace se rovná : $R^2 = 0,9990$. Přesnost metody byla hodnocena jako opakovatelnost. Z výsledků šesti vzorků byl vypočítán obsah a následně relativní směrodatná odchylka. Dle výsledků vyplývá, že bylo stanoveno 101,4 % deklarovaného obsahu amlodipinu a

102,4 % deklarovaného množství perindoprilu. Průměrná relativní směrodatná odchylka byla u amlodipinu 0,69 %, u perindoprilu 0,63 %. Správnost metody byla ověřena jako výtěžnost a byla v rozmezí 98,2 - 100,5 %. Selektivita byla ověřena nástřikem roztoku placebo.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of pharmaceutical chemistry and drug analysis

HPLC quantification of Amlodipine and Perindopril in Combined Dosage form

Rigorous Thesis

Mgr. Martina Kolouchova

Chromatographic conditions for the analysis of amlodipine and perindopril in a combined dosage form were elaborated in this thesis. For the stationary phase LiChroCART 250-4 column with LiChrospher 100 C 18 cartridge was chosen and a mixture of mobile phase in composition of ammonium hydrogen phosphate and ammonia in ratio 30 : 70 with addition of 0,1% triethylamine was evaluated as optimal. The mixture was adjusted to pH of 3,5 by 30% phosphoric acid. Flow rate was set for 1 ml/min and temperature of column for 50°C. Detection was performed by UV detector at 210 nm wave length. Benetazon was used as an internal standard.

Chromatographic conditions were optimized first by examination of elution dependence on pH of mobile phase. As pH of mobile phase decreased, retention times of all researched substances extended. Then the capacity ratios of all researched substances were examined in dependence on mobile phase composition. It is obvious according to results, that as the amount of methanol in mobile phase composition increases, capacity ratios of particular substances decrease.

Method validation was verified by linearity, precision, accuracy and selectivity. For linearity a calibration curve was used. Calibration curve parameter of amlodipine is an equation : $y = 7,2013x + 0,0281$ with a correlation coefficient : $R^2 = 0,9975$. An equation for perindopril is : $y = 2,1789x + 0,0224$. Correlation coefficient equals : $R^2 = 0,9990$. Precision of the method was valuated as a reproducibility. From results of six samples their volumes and relative standard deviations were calculated. 101,4 % of

declared amount of amlodipine and 102,4 % of declared amount of perindopril was quantified from results. Average relative standard deviation for amlodipine was 0,69 %, for perindopril it was 0,63 %. Accuracy of the method was verified by recovery and it ranged between 98,2 - 100,5 %. Selectivity was verified by injection of placebo solution.