

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Využití chromatografických metod při hodnocení léčiv XIII
(Hodnocení stability amisulpridu)



Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Milanu Mokrému za všestrannou pomoc, trpělivost, neocenitelné rady a odborné vedení při jejím vypracování.

OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod.....	8
2.2. Teoretické základy chromatografického procesu.....	13
2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
2.3.1. Instrumentace v HPLC.....	16
2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze.....	17
2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze.....	17
2.3.1.3. Dávkovací zařízení.....	18
2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně.....	18
2.3.1.5. Detektory.....	19
2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat.....	22
2.3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu.....	23
2.4. Validace analytických metod.....	24
2.5. Stabilita léčiv.....	27
2.6. Amisulprid a jeho vlastnosti.....	31
2.6.1. Farmakologické vlastnosti amisulpridu.....	32
2.6.2. Indikace a kontraindikace amisulpridu.....	33
2.6.3. Interakce amisulpridu.....	33
2.6.4. Nežádoucí účinky amisulpridu.....	33

2.6.5. Intoxikace amisulpridem.....	33
2.6.6. Přehled publikovaných prací zabývajících se analýzou amisulpridu.....	34
3. CÍL PRÁCE.....	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie	39
4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení amisulpridu pomocí HPLC s UV detekcí.....	41
4.3. Studium stability amisulpridu.....	44
4.4. Stanovení obsahu amisulpridu v tabletách.....	45
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC analýzu amisulpridu.....	47
5.2. Výsledky studia stability amisulpridu.....	50
5.2.1. Stabilita amisulpridu v roztoku H ₂ O ₂	50
5.2.2. Stabilita amisulpridu v roztoku HCl.....	55
5.3. Výsledky stanovení obsahu amisulpridu v tabletách.....	57
6. ZÁVĚR.....	61
7. LITERATURA.....	63

1.ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC) patří v dnešní době k nejmodernějším, nejprogresivnějším, a nejvíce používaným separačním metodám. Přednostmi kapalinové chromatografie jsou její citlivost, selektivita, rychlost analýzy, minimální množství vzorku potřebného k analýze, možnost kvalitativního, a současně i kvantitativního, hodnocení z jednoho chromatografického záznamu a možnost úplné automatizace. Pomocí HPLC je možné sledovat čistotu a stabilitu léčiv a následovně pak hodnotit případné nečistoty a rozkladné produkty.

Amisulprid patří mezi atypická antipsychotika někdy také označována jako antipsychotika II.generace, pro které je charakteristický nízký výskyt extrapyramidových nežádoucích účinků typických pro klasická neuroleptika, a jsou proto velmi perspektivními léčivy.

2.TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody prvořadý význam.

Princip chromatografického dělení

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, druhá, pohyblivá mobilní fáze pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení.

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy

- separačního děje
- použité techniky
- způsobu vyvíjení
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze ⁽¹⁾

Podle podstaty separačního děje

Tab. 1: Rozdělení metod ⁽²⁾

Název chromatografické metody	Povaha hlavního procesu	Veličiny určující velikost afinity dělených látek k fázi
adsorpční	adsorpce	adsorpční izoterma
rozdělovací	extrakce, rozpouštění	rozdělovací konstanta
iontově výměnná	elektrostatická interakce a difúze	náboj, disociační konstanta a efektivní průměr iontu
gelová	difúze	efektivní molekulární objem
afinitní	Specifická interakce s afinantem	obecná veličina zatím chybí

ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce z pohyblivé fáze na povrch adsorbentu. Adsorbentem (nepohyblivá fáze) bývá nejčastěji oxid hlinitý, hořečnatý, silikagel, prášková celulóza nebo aktivní uhlí. Pohyblivou fází tvoří buďto čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady nebo směsi rozpouštědel. ⁽¹⁾

ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

K dělení látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Zpravidla se používá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Chromatografický sloupec je naplněn inertním nosičem (silikagel, křemelina, silikáty, celulóza), na jehož povrchu je zakotvená účinná stacionární kapalná fáze (na celulóze nejčastěji voda). Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průtoku mobilní fáze (organické rozpouštědlo, nemísitelné se stacionární fází) k opakovanému rozdělování (extrakci) součástí směsi mezi obě kapalně fáze, při plynové chromatografii mezi kapalnou a plynnou fází. ^(1,2)

IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE

Na povrchu stacionární fáze dochází k interakci iontů dělených látek s ionogenními skupinami těchto fází. Ionty vázané na povrchu stacionární fáze se vyměňují na základě náboje, velikosti iontů a disociační konstanty za ionty přítomné v mobilní fázi. Podle typu vázaného iontu pak rozlišujeme anexy (aniony) a katexy (kationy).^(1,3)

GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Při tomto druhu chromatografie jsou látky děleny podle velikosti a tvaru molekuly. Stacionární fáze je tvořena gelem, jímž je inertní zesítěná nerozpustná polymerní matrice nasycená kapalinou, nejčastěji vodou. Stejná kapalina je použita jako mobilní fáze. Inertní matrice polymeru vytváří v gelu póry různé velikosti, podle druhu použitého materiálu. Látky tvořící dělenou směs jsou z kolony eluovány v pořadí podle své klesající molekulové hmotnosti.⁽⁴⁾

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Podmínky afinitní chromatografie se různí podle druhu izolovaných biologicky aktivních látek, neboť jsou dány výjimečnou specifickou biologickou povahou jejich selektivní interakce s daným afinantem. Afinantem pro izolaci protilátek je antigen, pro izolaci antigenu protilátka. Pomocí vhodných afinantů lze izolovat nukleové kyseliny, transportní a represorové bílkoviny, hormony i jejich receptory a řadu dalších látek.⁽⁵⁾

Podle použité techniky

KOLONOVÉ USPOŘÁDÁNÍ

PLOŠNÉ USPOŘÁDÁNÍ - papírová

-tenkovrstvá^(1,6)

Podle způsobu vyvíjení

FRONTÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

Tato technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu až do konce chromatografického procesu. Vzorek je tedy rozpuštěn v mobilní fázi.

Nejdříve vychází z kolony složka s nejmenší afinitou, která je tudíž nejméně brzděna. Frontální technika není vhodná k preparativním účelům, neboť v čisté formě lze izolovat jen část složky vycházející jako první.⁽²⁾

VYTĚŠŇOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

Princip této metody spočívá v tom, že se na chromatografickou kolonu jednorázově vnese jen část chromatografické směsi, poté se až do konce chromatografování kontinuálně přivádí roztok látky, která má ke stacionární fázi největší afinitu. Proto toto – tzv. vytěšňovadlo – uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky. Složka, která má nejmenší afinitu ke stacionární fázi, opouští kolonu jako první, jako poslední vytéká vytěšňovadlo. Tato metoda nemůže vést k úplnému rozdělení složek. Jestliže následující složka má uvolňovat předešlou z interakce se stacionární fází, musí být všechny složky v kontaktu a dochází k částečnému mísení složek.⁽²⁾

ELUČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Na kolonu se vnese jen malá část roztoku směsi a kolona se eluuje mobilní fází, které má ke stacionární fázi menší afinitu než kterákoliv ze složek. Složky se pohybují poměrně pomalu, k jejich postupu je třeba poměrně velkého množství rozpouštědla. Látky jsou vymývány v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fázi a často od sebe rozděleny mobilní fází. Při jednoduché (izokratické) eluci se kolona promývá stále stejnou mobilní fází tak dlouho, až dojde k oddělení jednotlivých složek a oddělené látky postupně opustí kolonu v roztoku eluátu. Stupňovitá eluce se provádí postupným promýváním kolony několika eluenty, z nichž každý následující má vždy vyšší eluční schopnost. Tyto mobilní fáze postupně uvolňují jednotlivé složky směsi z vazby na stacionární fázi a vymývají je. Při gradientové eluci se postupně plynule mění pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fázi. Tento způsob vyvíjení se používá zejména při dělení komplikovanějších směsí a jeho cílem je zkrácení doby analýzy a získání ostřejšího rozdělení látek.^(1,2)

Podle skupenství fází

KAPALINOVÁ – mobilní fáze je kapalina a stacionární fází je nemísitelná kapalina nebo pevná látka

PLYNOVÁ – mobilní fází je plyn a stacionární fází kapalina nebo pevná látka^(1,6)

2.2. Teoretické základy chromatografického procesu

Charakteristickou veličinou pro každou látku v daném chromatografickém procesu je retenční (eluční) čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima píku a retenční objem je objem mobilní fáze, která proteče kolonou od nástřiku po eluci koncentračního maxima píku. Tyto dvě veličiny spolu souvisí vztahem:

$$V_R = t_R \cdot v$$

kde v je průtoková rychlost mobilní fáze.

Retenční objem je dán součtem veličin:

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde V'_R je skutečný retenční objem a V_M (mrtvý objem) odpovídá celkovému objemu mobilní fáze od nástřiku až po detektor. U většiny dobře sestrojených přístrojů je tento objem minimální a proto jej lze zanedbat.

Analogicky platí tento vztah i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_M$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_M je mrtvý čas kolony, tj. čas látky, která se v koloně nezadržuje.

Dále se k charakteristice retence používá hmotnostní distribuční poměr D_m (známý jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k), pro který platí vztahy:

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

Hmotnostní distribuční poměr vyjadřuje poměr mezi celkovým množstvím chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky ve fázi mobilní. Je přímo úměrný rovnovážnému distribučnímu koeficientu K_C (známý též jako distribuční konstanta), který je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích.

$$D_m = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

kde V_S je objem stacionární fáze a V_M objem mobilní fáze. Hmotnostní distribuční poměr dovoluje odhadnout eluci látek z kolony v přijatelném čase a retenčním objemu. Pokud je D_m malé (1 až 10) je trvání analýzy krátké.

K popisu účinnosti separace látek se používá veličina rozlišení R_S . Rozlišením se rozumí rozdíl vzdálenosti dvou píků separovaných látek a platí pro ně vztah:

$$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

kde $t_{1,2}$ jsou retenční časy píků a $w_{1,2}$ jsou šířky píků v poloviční výšce. Dokonalého rozlišení až na základní linii se dosáhne při hodnotě $R_S = 1,5$. Rozlišení souvisí s kapacitním poměrem, distribuční konstantou a účinností.

Separční účinnost kolony se vyjadřuje pomocí parametru účinnosti kolony, který je vyjádřen počtem teoretických pater N , pro které platí:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Při výpočtu množství teoretických pater se používá retenční čas t_R testované látky a šířka píku v polovině jeho výšky w_h . Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

Pro srovnání účinnosti různých kolon se používá parametru výškového ekvivalentu patra H , který je poměrem délky kolony L vyjádřené v metrech a počtu teoretických pater N dle vztahu:

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

Výškový ekvivalent teoretického patra závisí na řadě parametrů, důležitým je průtoková rychlost U . Závislost popisuje Van Deemterova rovnice:

$$H = \frac{A + B}{U + CU}$$

kde A je příspěvek turbulentní difúze, B je příspěvek molekulární difúze, C charakterizuje příspěvek odporu vůči převodu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra. Pro dosažení účinné separace je nutné, aby hodnota ekvivalentu teoretického patra činila 0.01 – 1.00 mm. Dalšími faktory ovlivňujícími tuto veličinu je mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku.

Důležitým parametrem je také selektivita kolony. To je míra relativní separace dvou složek směsi:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t_{R1}} = \frac{D_{m2}}{D_{m1}}$$

Selektivitu v kapalinové chromatografii je možné ovlivnit složením mobilní fáze, změnou pH mobilní fáze, teplotou a také náplní kolony.^(7,8,9)

Další parametr je poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek. Vypočítá se ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku.

h značí absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20-ti násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku pozorovaného v místě rovnoměrně situovaného okolo místa, kde by se tento pík nacházel.^(10,11)

2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná chromatografie je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv a široce je využívána ve všech moderních lékopisných monografiích.⁽⁶⁾

Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), je možno nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, ve zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.⁽¹⁾

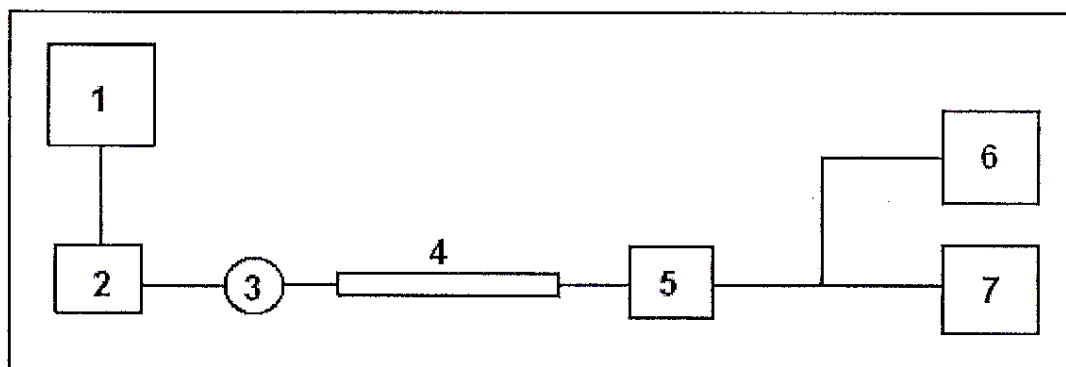
Vývoj

Principy a možnosti kolonové chromatografie byly známy od Cvetova objevu chromatografie (1906). Po více než padesát let zůstala kapalinová chromatografie na okraji zájmu analytické chemie, co do významu daleko za chromatografií papírovou, chromatografií na tenké vrstvě a především za plynovou chromatografií. Klasická kolonová kapalinová chromatografie byla velice pracná a zdlouhavá, účinnost dělení většinou nízká. Prvními kapalinovými chromatografy byly automatické analyzátory aminokyselin, vyvinuté začátkem padesátých let. V polovině šedesátých se objevily první gelové chromatografy. Prudký vývoj začal v sedmdesátých letech objevy v oblasti mikroelektroniky a makromolekulární chemie. Byly dosaženy reprodukovatelné průtoky mobilní fáze procházející kolonou pod tlakem desítek MPa, vyvinuty citlivé detektory s vnitřním objemem průtokové cely menších než 10 nebo 15 μl a připraveny náplně kolon s definovanými vlastnostmi velmi malými rozměry částic. Rozvoj mikroelektroniky umožnil detekci na podkladě kontinuálního měření absorpce záření v ultrafialové, či viditelné oblasti, popř. měřením indexu lomu.^(2,8,9)

2.3.1. Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony (může být použit i regulátor teploty kolony), detektoru a zařízení na zpracování dat (integrátoru či počítače). Mobilní fáze je do

systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků a protéká obvykle konstantní rychlostí kolonou a poté detektorem.⁽¹¹⁾



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu
1-zásobník(y) mobilní fáze; 2-vysokotlaké čerpadlo; 3-dávkovací zařízení;
4-kolona; 5-detektor; 6,7-zařízení na zpracování dat

2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze

Konstrukčním materiálem zásobníků bývá nejčastěji sklo, plasty (polyethylen, polypropylen, polytetrafluorethylen) nebo nerezová ocel. Často je třeba zbavit mobilní fázi pohlcených plynů, a proto jsou některé typy zásobníků uzavřené víčkem se dvěma vývody. Jeden vývod je určen pro přívod helia nebo jiného inertního plynu, druhý je pro připojení na vakuovou linku. K propojení chromatografických systémů se většinou používá kapilár z plastů. Mnohem pevnější spojení je voleno u systémů pracujících s vysokými tlaky, kde se užívají kapiláry z nerezové oceli.⁽⁷⁾

2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze

Čerpací systémy jsou potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí. Kolísání tlaku má být co nejmenší, čehož se dosahuje např. průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. Zároveň je třeba, aby konstrukční materiál byl chemicky odolný proti korozivním účinkům dopravovaných kapalin. Důležitý je rovněž výstupní tlak na čerpadlech od 1 do 60 MPa, průtoková rychlost od 0,1 do 10 ml/min, dobrá reprodukovatelnost nastavení průtoku a vysoká přesnost. V dnešní době se nejčastěji používají dvou až tří pístová

čerpadla s registrací okamžitého tlaku a následnou regulací frekvence impulzů, které řídí chod elektromotoru pumpy. Pro zajištění minimálního kolísání tlaku je nutné dokonalé odplynění mobilní fáze. Čerpadla pracující s konstantním průtokem využívají mechanického pohonu pístu v komoře, kde zdrojem hnací síly jsou elektromotory.^(7,11,12)

2.3.1.3. Dávkovací zařízení

Vzorek, který se má chromatograficky rozdělit, se nejprve dokonale rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi a dávkuje se do kolony. Účinnost celého chromatografického systému je do značné míry závislá i na dokonalém dávkování vzorku. Dávkovací zařízení používající techniku nástřiku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze se již prakticky nepoužívají. U moderních přístrojů se používají buď smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače. Principem je systém pevného pouzdra s otočným jádrem a teflonovými kroužky. Injekční stříkačkou se naplní dávkovací kapilára bez přerušování průtoku mobilní fáze a otočením jádra se zařadí do průtoku. Vzorek je vytlačen proudící mobilní fází na chromatografickou kolonu. Dávkovací zařízení umožňuje vpravení konstantního objemu do kolony, a tak není nutné přesně odměřovat množství vzorku.^(7,9,13)

2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně

Chromatografické kolony jsou tvořeny trubicí z různého materiálu, naplněné sorbentem. V dnešní době se zhotovují převážně z trubic z antikorozní oceli s leštěným vnitřním povrchem. Do tlaků cca 20 MPa lze použít i kolony ze speciálního tvrzeného skla, které se z bezpečnostních důvodů umísťují do kovového pouzdra.⁽¹⁴⁾

Pro analytická měření se používají analytické kolony v délce 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Náplně mají velikost částic 3 – 10 μm . Díky uvedenému zrnění obsahují tyto kolony až 5.000 nebo 10.000 teoretických pater na 10 cm délky. U většiny separací se využívá chemicky modifikovaný oxid křemičitý (silikagel), který se upravuje reakcí s různými silanizačními činidly za vzniku kovalentně vázaných silylových derivátů, které pokrývají proměnlivé množství aktivních míst na povrchu, a tak určují jeho vlastnosti. Sorbenty lze rozdělit podle jejich polarit. Nepolárním sorbentem je silikagel modifikovaný na svých

hydroxylových skupinách alifatickým řetězcem s 8 nebo s 18 uhlíky (= Si-(CH₂)₇-CH₃ , = Si-(CH₂)₁₇-CH₃). Jedná se o tzv. reverzní fáze. Středně polární fázi představuje tříuhlíkatý řetězec obsahující skupinu -CN, -NH₂, -OH (= Si-(CH₂)₃-CN , = Si(CH₂)₃-NH₂ , = Si-(CH₂)₃-OH). Jako polární sorbent se používá silikagel. Je vhodný pro většinu látek mimo silně bazických, které interagují s jeho slabě kyselým centrem. Dále také oxid hlinitý, který se používá pro dělení nepříliš polárních látek, které se od sebe stéricky liší. Mezi polární sorbenty patří také oxid hořečnatý.^(7,9,11,15,16,17)

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek několik kolon najednou, jedná se o techniku přepínání spřažených kolon (column switching). Kolony bývají napojeny za sebou a mohou se lišit délkou, náplní atd. Metoda se používá ke zlepšení separace látek a zkracuje čas analýzy.⁽⁹⁾

2.3.1.5. Detektory

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Zpravidla se od nich požaduje, aby sledovaly koncentraci separovaných složek v eluátu. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase.

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze. V podstatě rozlišujeme dva typy detektorů – univerzální a selektivní. Na detektor se kladou zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci⁽⁹⁾

Tab. 2: Přehled veličin měřených detektory⁽⁹⁾

Měřená veličina	Název detektoru
absorpce záření	fotometrický (spektrofotometrický) v ultrafialové, viditelné a infračervené oblasti
index lomu	refraktometrický
fluorescence	fluorimetrický
elektrolytický proud	polarografický
elektrická vodivost	vodivostní
permitivita	kapacitní, permitivní
elektroodový potenciál	potenciometrický
ionizační proud	transportní s plamenoionizační detekcí
sorpční teplo (teplota)	mikroadsorpční
radioaktivita	radiometrický

Nejpoužívanější jsou fotometrické metody pracující v ultrafialové oblasti nebo viditelné oblasti světelného záření, následují detektory fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické. V dnešní době jsou také častěji používány i detektory hmotnostní.⁽¹⁴⁾

Spektrofotometrické detektory

Proměřují absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra. V praxi se uplatňují především UV detektory, event. UV-VIS detektory.

Nejužívanější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm a nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Jsou poměrně jednoduché konstrukce a cenově nejdostupnější.
- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou (libovolně měnitelná dle potřeb)
- scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva)

- diode array detektor (řízený počítačem, trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí)

Spektrofotometrické detektory se vyznačují značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je použít při gradientové eluci.⁽⁶⁾

Fluorimetrické detektory

Využívají se v případech, kdy analyzované léčivo (rozkladný produkt) vykazuje fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzálnější než UV detektory, ale citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.⁽⁶⁾

Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, tj. oxidačně-redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda. Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvouelektrodových nebo častěji tříelektrodových systémů (skládajících se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody).

Ampérometrické detektory používají tuhé měrné elektrody zhotovené nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty nebo kovů. Nevýhodou těchto materiálů je zanášení a postupná dezaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru při kvantitativní analýze.

Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se pravidelně obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti (detekční limit 10^{-9} až 10^{-11} g/ml). Důležité při jejich používání je však důkladné odplynění mobilní fáze, abychom dosáhli stabilní nulové linie a měli reprodukovatelné výsledky. Mobilní fáze musí být vodivá, takže tyto detektory nelze použít při chromatografii v systémech s normálními fázemi.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Umožňují dosáhnout větší citlivosti detekce než ampérometrické detektory.^(9,14)

Refraktometrické detektory

Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Jsou prakticky univerzální (vyhodnotí jakoukoliv látku), ale při analytickém hodnocení léčiv se používají ojediněle pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování (odezva detektoru je značně závislá na teplotě) a nelze je použít při gradientové eluci.⁽⁶⁾

Hmotnostní detektory

Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Po výstupu z HPLC kolony je nutno z eluentu odstranit mobilní fází a molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektronizací. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně velmi náročné.⁽⁶⁾

2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat

K vyhodnocení a dalšímu zpracování chromatografických dat se dříve používaly jedno- i vícekanálové integrátory vybavené mikroprocesorem. Dnes se používají hlavně počítače vybavené speciálním softwarem pro zpracování chromatografických dat. Počítač přímo ovládá pracovní parametry chromatografu (složení mobilní fáze, průtok mobilní fáze, teplota, citlivost detektoru).⁽¹⁴⁾

2.3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nečastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Některé moderní UV detektory umožňují v maximu chromatografického píku sejmout UV spektrum; shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku. Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody:

- A) **Metoda vnějšího standardu**, která spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.
- B) **Metoda vnitřního standardu** – ke známému roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píku, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní.^(6,18)

2.4. Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je demonstrovat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné i různých laboratořích.

Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, má-li být přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. Zjištěné hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačního protokolu, který musí obsahovat patřičnou dokumentaci.

Analytické metody používané pro monitorování kvality léčiv musí splňovat určité požadavky, které vyplývají ze zamyšleného použití. Podle toho, k jakému účelu má analytická metoda sloužit, ověřují se následující parametry:

- správnost
- přesnost
- selektivita
- detekční limit
- kvantitativní limit
- linearita
- rozsah
- robustnost

Správnost

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Zjistit správnou hodnotu může být problém. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Nejsou-li k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje se přípravek se známým přídatkem standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost:⁽¹⁸⁾

$$\text{výtěžnost} = 100 \cdot \text{nalezená hodnota} / \text{správná hodnota}$$

Přesnost

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom zhomogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji. V tomto případě jde o přesnost při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé.

Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze šesti nezávislých analýz zhomogenizovaného vzorku, provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Jedná se tedy o chybu celého analytického postupu, jak instrumentální části, tak postupu přípravy vzorku. Nestačí proto jen např. šestkrát nastříknout jeden vzorek, ale je nutné připravit kompletním postupem šest roztoků vzorku.⁽¹⁹⁾

Selektivita

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí. Interference matrice se projevuje tím, že analytický signál neodpovídá stanovovanému analytu, ale tento signál je superponován signálem rušivé složky (čistota signálu). Prokazování selektivity metody je do jisté míry závislé na použité instrumentální technice, a proto je nutné pro každý použitý systém vypracovat individuální program prokazování selektivity metody.⁽²⁰⁾

Detekční limit

Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně. U neinstrumentálních metod se detekční limit hledá experimentálně. 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.⁽¹⁸⁾

Kvantitativní limit

Je též parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.⁽¹⁸⁾

Linearita

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Pokud je metoda lineární, lze s výhodou určit směrnice z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, je třeba výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky.⁽¹⁸⁾

Rozsah

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearitě metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při překročení už přístroj nepracuje přesně.⁽¹⁸⁾

Robustnost

Robustnost je míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Je to míra schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsany postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky.⁽¹⁹⁾

2.5 Stabilita léčiv

Pojem stabilita ve farmacii zahrnuje více aspektů. Na prvním místě se v této souvislosti uvádí chemická stabilita léčiva nebo lékové formy, tj. obsah účinné látky, obsah konzervačních látek a čistota – rozkladné produkty. Vývoj stabilního a účinného léku, který se zavádí do výroby, však zahrnuje nejen chemickou stabilitu, ale i další farmaceutické vlastnosti (disoluce, mikrobiologická čistota, výběr obalu). Podle směrnice SZO je stabilita definována jako schopnost léčivého přípravku zachovat si chemické, fyzikální, mikrobiologické a biofarmaceutické vlastnosti v určených limitech během celé doby použitelnosti. Doba použitelnosti je časový úsek, během kterého lék, pokud je správně uchováván, vyhovuje specifikům určeným ve studiích stability.

Léčivý přípravek se pokládá za stálý, pokud je schopný plnit funkci, pro kterou byl vyroben. Mírou stability je čas, po který léčivo splňuje všechny určené kvalitativní požadavky. Podle mezinárodních doporučení se léčivý přípravek považuje za stálý, pokud obsahuje nejméně 90% deklarovaného množství účinných látek a pokud vzniklé chemické a fyzikální změny, ale i změny mikrobiologického původu, negativně neovlivňují jeho aplikaci, biologickou dostupnost léčiva, nezvyšují toxicitu a nevyvolávají pochybnost či nedůvěru k jeho kvalitě.

Obecně se rozlišuje a sleduje 5 typů stability, podle povahy možných změn, které mohou v léčivých přípravcích nastat:

- **chemická stabilita** – všechny účinné látky si v léku zachovávají chemickou integritu a obsah ve specifických rozmezech
- **fyzikální stabilita** – v léku jsou zachované původní vlastnosti charakterizované po fyzikální stránce (vzhled, chuť, jednotnost, rozpustnost, roztřepatelnost apod.)
- **mikrobiologická stabilita** - je zachována sterilita nebo mikrobiální čistota léku v souladu se specifickými požadavky
- **terapeutická stabilita** – lék má nezměněný terapeutický účinek
- **toxikologická stabilita** – v léku je jen nevýznamně zvýšený výskyt toxicity⁽²¹⁾

Faktory ovlivňující stabilitu léčiv lze rozdělit na :

Vnitřní faktory – souvisí s vlastnostmi jednotlivých složek lékové formy. Stabilitu léku může ovlivňovat každá jeho složka buď terapeuticky účinná a nebo neúčinná. Prvořadou úlohu mají chemické vlastnosti a kvalita léčiva, pomocných látek a obalového materiálu. Nezanedbatelný vliv mají i další faktory, jako je velikost částic, pH, vlastnosti použitých rozpouštědel a také přítomnost chemických reziduí.

Vnější faktory – jsou nejčastěji teplota, světlo, radiace, vzduch (kyslík, CO₂) a vlhkost. Značně dokáží ovlivnit stabilitu léku. Mohou navodit přeměny týkající se jednak vlastnosti lékové formy, jednak změn v účinných a pomocných látkách obsažených v léku. Také sem řadíme způsoby zpracování – technologické postupy – všech složek léku v konečné lékové formě a také způsob balení a uchovávání. Všechny tyto vlivy mohou mít dopad nejen na stabilitu, ale také na biologickou dostupnost léčiva, a tedy i na účinnost a bezpečnost připraveného léku.

Stabilita léčiv a léků se ověřuje pomocí testů stability, které zahrnují sérii testů určených na získání informace o stabilitě léku s cílem definovat dobu použitelnosti a intervalu použití léku v určitém obalu při určitých podmínkách skladování. Kvalita léku musí být zachována i v době užívání spotřebitelem.

Testy stability lze rozdělit na:

- **testy zátěžové** – používají se v předformulačních studiích na ověření stability léčiva
- **testy zrychlené** – slouží ke studiu kinetiky rozkladu léčiva a lékové formy, k výběru vhodného složení a obalu
- **testy dlouhodobé** – studium stability za normálních podmínek skladování
- **testy stability léku při jeho používání**

Prvním krokem při vývoji nového léku jsou tedy tzv. předformulační studie (po nich teprve následuje vývoj vhodné lékové formy). Tyto studie se zaměřují na hodnocení organoleptických vlastností léčiva, fyzikálně-chemických a chemických vlastností léčiva, včetně jeho chemické, fyzikální a mikrobiologické stability. Je třeba poznat stabilitu léčiva, jeho citlivost resp. odolnost vůči působení různých

faktorů vnějšího prostředí jako jsou teplota, vlhkost, světlo, odolnost vůči působení kyselého i zásaditého prostředí, oxidujících nebo redukujících látek. Tak se zjistí odolnost léčiva vůči rozkladnému působení klimaticky nepříznivých podmínek a agresivních chemických látek. Tyto vlastnosti se ověřují pomocí tzv. zátěžových (stresových) testů. V zásadě se jedná o krátkodobé zkoušky, při kterých se snažíme vyvolat rozklad léčiva, který je možno potvrdit vhodnými kontrolními analytickými metodami. Doba trvání i zátěžové (stresové) podmínky závisí na vlastnostech sledovaného léčiva.

Tab. 3: Běžné testovací podmínky používané při zátěžových testech

Faktor ovlivňující stabilitu	Zátěžové podmínky
teplota	4 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C
teplota, vlhkost	21 °C/45 %, 25 °C/60 %, 30 °C/60 %, 30 °C /70 %, 40 °C/75 %
světlo	denní světlo, UV záření při 254 nm a 366 nm definované zdroje světla (xenonová lampa)
oxidace	vystavení léčiva atmosféře kyslíku působení H ₂ O ₂ , (KMnO ₄ , K ₂ Cr ₂ O ₇)
pH	působení HCl, NaOH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 při 25 °C a 37 °C (40 °C)
fyzikální stres	drcení, mletí

Teplota – léčivo v tuhém stavu i v roztoku se vystaví působení tepla. Důležitý je výběr vhodných teplot, které mohou vyvolat měřitelný rozklad ve vhodném časovém úseku. Testuje se stabilita při různých teplotách dle charakteru látky, požadavků zadavatele studie či zákonných norem.

Teplota a vlhkost – vlhké teplo se nechá působit na povrchu substance léčiva.

pH – ve vodném roztoku léčiva nebo substance se vhodně upraví pH pomocí tlumivého roztoku. Lze také případně hodnotit i vliv koncentrace tlumivého roztoku. Nejčastěji se však vliv pH testuje pomocí silných kyselin a zásad za laboratorní, ale i vyšší teploty.

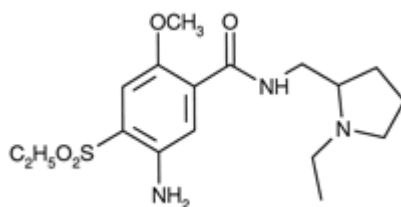
Oxidace – vodný roztok nebo suspenze se vystaví působení oxidačních činidel. Substance účinné látky se vystaví působení atmosférického kyslíku.

Světlo – substance i roztok léčiva se vystaví na několik hodin působení rozptýleného denního světla, ultrafialového světla nebo definovanému zdroji světla.

Testování stability léčiv a léků se provádí s cílem zaručit, že si léky zachovávají kvalitu, účinnost a bezpečnost od okamžiku výroby až do konce doby jejich použitelnosti. Na základě údajů získaných z testů stability se po jejich vyhodnocení navrhne doba použitelnosti a určí vhodný způsob uchování léku, garantující jeho kvalitu – účinnost a bezpečnost.⁽²¹⁾

2.6. Amisulprid a jeho vlastnosti

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₁₇H₂₇N₃O₄S

Chemický název:

4-amino-N-[[1-ethylpyrrolidin-2-yl]methyl]-5-(ethylsulfonyl)-2-methoxybenzamid

M_R: 369,48

2.6.1. Farmakologické vlastnosti amisulpridu

Amisulprid je chemicky derivátem benzamidů, substituovaných amidů kyseliny benzoové. Substituované benzamidy byly původně vyvíjeny jako nová antiemetika, odvozená od antiarytmika prokainamidu. Všechny tyto deriváty také antiemeticky účinkují, ale minimalizovaly svůj antiarytmický potenciál. Benzamidy jsou nejvíce používány jako antipsychotika (amisulprid, sulpirid), prokinetika gastrointestinálního traktu (metoklopramid, cisaprid) nebo antiemetika (metoklopramid, kleboprid). Amisulprid byl syntetizován v laboratořích firmy Synthelabo v roce 1978, tedy 10 let po objevu sulpridu a registrován pod názvem Solian jako antipsychodikum ve Francii v roce 1988, Velké Británii 1997, Německu 1998 a ČR v roce 1999.⁽²²⁾

Amisulprid selektivně blokuje dopaminové D2/D3 receptory, aniž ovlivňuje další nervová zakončení serotoninová, adrenalinová, histaminová či muskarinová. Jedinou výjimkou je inhibice vazby GABA na GABA receptory. Selektivní blokáda D2/D3 receptorů amisulpridem je vyšší než klasickými neuroleptiky a podobná sulpiridu. Blokáda dopaminových D2 a D3 je přibližně stejná in vitro, ale ex vivo amisulprid dvakrát více antagonizuje D3 než D2 nervová zakončení (oproti tomu zástupce I.generace neuroleptik haloperidol se desetkrát více váže na D2 než na D3 receptory). Význam tohoto jevu spočívá v tom, že blokáda dopaminových D3 receptorů vyvolá nižší ovlivnění psychomotoriky než D2 nervových zakončení při současném antipsychotickém působení.^(23,24,25)

Amisulprid po vstřebání z gastrointestinálního traktu dosahuje v plazmě dvou vrcholů koncentrace – po 1 a 3–4 hodinách po požití (druhý vrchol je vyšší než první). Jídlo mění absorpční profil tak, že zůstává jen jeden vrchol absorpce. Jen jídlo bohaté na sacharidy a velké množství tekutin zpomalují absorpci. Amisulprid se vyznačuje poněkud nižší biologickou využitelností 43–48%.

Metabolizmus amisulpridu je omezený a většina léku je vylučována nezměněna močí (35 %) a stolicí (64 %). Amisulprid vytváří dva hlavní metabolity, ale oba jsou biologicky inaktivní. Farmakokinetika amisulpridu je lineární a vazba na plazmatické bílkoviny nízká (17 %). Distribuční objem činí 5,8 l/kg a lipofilita amisulpridu je poněkud vyšší než u sulpiridu. Vylučovací poločas ($t_{1/2}$) byl stanoven na 12 hodin, a proto stabilizované hladiny v séru je dosahováno za 2–3 dny. Vylučovací poločas se prodlužuje s věkem a při renální dysfunkci.^(26,27,28)

2.6.2. Indikace a kontraindikace amisulpridu

Indikací amisulpridu jsou schizofrenní poruchy s pozitivní a negativní symptomatikou a depresivními příznaky. Nástup účinku amisulpridu při léčbě schizofrenní poruchy lze očekávat mezi 1.–2. týdnem podávání. Další indikací jsou dystymie.

Kontraindikace podávání amisulpridu tvoří feochromocytom, prolaktin dependentní nádory jako karcinom prsu nebo adenom hypofýzy a snížená clearance ledvin pod 10 ml/min.^(22,32)

2.6.3. Interakce amisulpridu

Amisulprid antagonizuje účinek levodopy a dopaminomimetik; minimálně ovlivňuje působení lorazepamu, haloperidolu a alkoholu.^(29,30,31)

2.6.4. Nežádoucí účinky amisulpridu

Běžné (1-10%): spavost, nespavost, úzkost, zažívací poruchy, jako je sucho v ústech, zácpa, nauzea, zvracení. Vzácné (0,1-1%): agitovanost.

Amisulprid vyvolává zvýšení plazmatické hladiny prolaktinu, které je po vysazení léku reverzibilní. To může vyvolat galaktoreu, amenoreu, gynekomastii, mastodynii, poruchy orgasmu a impotenci. Během léčby může dojít k přírůstku hmotnosti, může se objevit akutní dyskineze nebo akutní dystonie (spastická tortikolis, okulogyrické záchvaty, trismus) při podávání antiparkinsonik reverzibilní i bez vysazení přípravku.⁽³²⁾

2.6.5. Intoxikace amisulpridem

Intoxikace amisulpridem se z počátku projevuje neklidem a postupně přechází do somnolence, soporu a kómatu, dále mydriázou, epileptickými záchvaty, hypertermií, hypotenzí, extrapyramidovou symptomatikou a prodloužením QT intervalu. Z 8 případů intoxikací se u jednoho nemocného po požití 7 g dostavila fibrilace komor a následná srdeční zástava, u dalšího došlo k náhlému úmrtí po druhé injekci amisulpridu po 800 mg v průběhu 24 hodin a třetí pacient byl nalezen mrtvý po požití neznámého množství amisulpridu. Jelikož není známo antidotum, je léčba symptomatická s monitorováním vitálních funkcí včetně EKG záznamu. Amisulprid není možno odstranit z organismu hemodialýzou.^(27,33)

2.6.6. Přehled publikovaných prací zabývajících se analýzou amisulpridu

Jelikož amisulprid byl syntetizován a jako první registrován ve Francii a poté i v Německu, jsou publikované práce zabývajících se jeho analýzou převážně z těchto zemí.

1. M. Bohbot, L. Doare a B. Diquet se zabývali stanovením amisulpridu v lidské plazmě pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla použita kolona s reverzní fází RP-18, 25×4,6 mm i.d.; zrnitost 5 µm (Altex, ODS II, Beckman Instruments). Mobilní fáze obsahovala methanol-vodu-diethylamin (532:468:0,8). Průtoková rychlost 1ml/min, detekce pomocí UV při vlnové délce 226 nm.⁽³⁴⁾
2. Studie autorů V. Ascalone, M. Ripamonti, B. Malavasi se zabývala stanovením enantiomerů amisulpridu v lidské plazmě a moči. Stanovení prováděli pomocí HPLC, kde jako stacionární fáze byla použita chirální kolona Chiralpak AS, 25×0,46 cm i.d. (J.T. Baker, Deventer, Netherlands), která byla chráněna kolonou, 2×0,46 cm i.d., s náplní Pelliguard Si 40 µm (Supeclo, Bellefonte, PA, USA). Mobilní fáze obsahovala n-hexan-ethanol, (67:33, v/v) a 0,2% diethylaminu nebo n-heptan-ethanol, (70:29,8, v/v) a 0,2% diethylaminu. Byla použita průtoková rychlost 0,5 ml/min a UV nebo fluorimetrická detekce při vlnové délce 280 nm.⁽³⁵⁾
3. B. Malavasi, M. Locatelli, M. Ripamonti, V. Ascalone se opět zabývali stanovením amisulpridu (racemátu) v lidské plazmě a moči pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla použita kolona, 150×4,6 mm i.d., s náplní 5-µm Hypersil C₁₈ BDS (Shandon, Runcorn,UK), chráněná kolonou, 20×4,6 mm i.d., 40-µm Pelliguard LC₈ (Supeclo, Bellefonte, PA, USA). Mobilní fáze byla připravena smícháním 25 ml 1 mol/l roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného, 950 ml vody a 1ml triethylaminu, pH bylo upraveno na 3 pomocí kyseliny fosforečné a roztok zředěn do 1 l vody, poté bylo odebráno 850 ml a zředěno do 1 l acetonitrilu. Průtoková rychlost 1,0 ml/min, detekce spektrofluorimetricky pomocí LC detektoru Model 821-FP (Jasco, Tokio, Japan)⁽³⁶⁾

4. Studie autorů J. Sachse, S. Härtter, H. Weigmann, Ch. Hiemke se zabývala stanovením amisulpridu v séru nebo plazmě pomocí HPLC s UV detekcí při vlnové délce 254 nm. Jako stacionární fáze byla použita kolona Lichrospher CN; 250×4,6 mm i.d.; zrnitost 5 μm. Mobilní fáze obsahovala 50% acetonitrilu a 50% roztoku fosforečnanu draselného (0,008 mol/l, pH 6,4). Průtoková rychlost 1,5 ml/min.⁽³⁷⁾

5. F. Péhourcq, S. Ouariki, B. Bégaud se zabývali stanovením amisulpridu v lidské plazmě pomocí HPLC pro toxikologické účely. Chromatografická separace byla provedena na koloně Spherisorb[®] S5 C₈; 4,6×150 mm i.d.; zrnitost 5 μm. Mobilní fáze obsahovala acetonitril- fosfátový pufr ($6,2 \times 10^{-2}$ mol/l, 9,08 g KH₂PO₄ a 11,60 g K₂HPO₄ v 1000 ml vody) (25:75, v/v). K této směsi byly přimíchány další činidla: 500 μl diethylaminu a originální lahvička obsahující pentansulfonovou kyselinu (Pic B5[®] Low UV). Pomocí kyseliny orthofosforečné bylo pH upraveno na 6,4. Průtoková rychlost 2 ml/min, detekce při vlnové délce 280 nm.⁽³⁸⁾

6. Studie autorů Ch. Frahnert, M.L. Rao, K. Grasmäder se zabývala stanovením amisulpridu v lidském séru pomocí HPLC s UV detekcí při vlnové délce 230 nm. Jako stacionární fáze byla použita kolona, 250×4,6 mm i.d., s náplní Nucleosil 100-5-Protect 1, zrnitost 5 μm (Macherey a Nagel, Düren, Německo). Mobilní fáze obsahovala dihydrogenfosforečnan draselný (25 mmol/l, pH 7,0) – acetonitril (60:40, v/v), průtoková rychlost byla 1 ml/min.⁽³⁹⁾

7. M.H. Gschwend, P. Arnold, J. Ring, W. Martin se zabývali stanovením amisulpridu v lidské plazmě pomocí HPLC, jako detekce byla využita hmotnostní spektrometrie. Chromatografická separace byla uskutečněna pomocí kolony Phenomenex Synergi Polar-RP, 75×4,6 mm i.d.; zrnitost 4 μm. Mobilní fáze obsahovala mravenčan amonný (5nmol/l) – acetonitril (30:70, v/v), průtoková rychlost byla 0,8 ml/min.⁽⁴⁰⁾

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování optimálních chromatografických podmínek pro HPLC analýzu amisulpridu a následně ji aplikovat pro studium stability a stanovení obsahu tohoto léčiva v tabletách.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Chromatografický materiál

- Chromatografická kolona- 150×3 mm i.d., s náplní Separon SGX C18, 7 μm, Tessek, Praha, Česká Republika
- Chromatografická kolona - 150×3 mm i.d., s náplní Separon SGX CN, 7 μm, Tessek, Praha, Česká Republika

Přístroje

- Analytické váhy, Helago, Česká Republika
- Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká Republika
- Vysokotlaké čerpadlo LCP 4020, Ecom s.r.o., ČR
- UV detektor Spektra 100, Spektra Physics, Santa Clara, USA
- PC s chromatografickým programem CSW, Data Apex, Praha, Česká Republika
- Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko
- Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovensko
- Smyčka 20 μl

Pomůcky

- Mikrostříkačka- 25 μl, Hamilton, Švýcarsko
- Laboratorní sklo

Chemikálie

- Amisulprid, Sigma-Aldrich, Německo
- Sulpirid, Sigma-Aldrich, Německo
- Fosforečnan amonný, Lachema Brno, Česká Republika
- Kyselina fosforečná p.a., Lachema Brno, Česká Republika
- Methanol p.a., Lachema Brno, Česká Republika
- Nitril kyseliny octové p.a., Lachema Brno, Česká Republika
- Peroxid vodíku 30% p.a., Balex, Pardubice, Česká Republika
- Voda čištěná reverzní osmózou
- Sodná sůl kyseliny hexansulfonové, Sigma-Aldrich, Německo

Octan sodný, Lachema Brno, Česká republika
Octan amonný, Lachema Brno, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný, Chemapol Brno, Česká Republika
Methylparaben, Lachema Brno, Česká Republika
Propylparaben, Lachema Brno, Česká Republika
Ethylparaben, Lachema Brno, Česká Republika
Ambroxol, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Phenacetin, Sigma-Aldrich, Německo
Acetanilid, Sigma-Aldrich, Německo
Glibenklamid, Biomedicals Inc.
Sulfadimidin, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Sulfofurazol, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Theophylinum, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Chloramphenikol, Galenická laboratoř Ostrava,
Isoprenalin sulfát, Galena Opava,
Paracetamol, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Trimethoprim, Sigma-Aldrich, Německo
Nimesulid, Sigma chemical
Chloracetanilid, Sigma-Aldrich, Německo
Ibuprofen, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Acetylsulfathiazol, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika
Acetylaminobenzensulfonamid, Léčiva a.s., Praha, Česká Republika

4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení amisulpridu pomocí HPLC s UV detekcí

Pro stanovení amisulpridu bylo nutné nejprve najít vhodné chromatografické podmínky, které zahrnují volbu optimální stacionární fáze, mobilní fáze, průtokové rychlosti, vhodné vlnové délky pro UV detekci a vnitřního standardu.

Výběr stacionární a mobilní fáze

Jako první stacionární fáze byla použita chromatografická kolona C18 s náplní Separon SGX (7 μm), 150 \times 3 mm (č.1). Poté byla použita chromatografická kolona s náplní Separon SGX CN (7 μm), 150 \times 3 mm (č.2).

Na jednotlivých chromatografických kolonách byly zkoušeny tyto mobilní fáze: na koloně číslo č.1:

1. methanol : octanový pufr (octan sodný 0,01 mol/l; pH 7,6 – upraveno 5% NH_3) v poměru 40:60 (v/v)
2. methanol : octanový pufr (octan sodný 0,01 mol/l; pH 7,4 – upraveno 5% NH_3) v poměru 30:70 (v/v)
3. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 7,7 - upraveno 5% NH_3) v poměru 30:70 (v/v)
4. methanol : octan amonný (0,01 mol/l; pH 7,0 – upraveno 5% NH_3) v poměru 30:70 (v/v)
5. methanol : dihydrogenfosforečnan draselný (0,01 mol/l; pH 3,5 - upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)
6. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 3,6 –upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)
7. acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 3,6 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)
8. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 3,1 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)
9. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 4,5 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)
10. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,0 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 50:50 (v/v)

11. methanol : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,6 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 50:50 (v/v)
12. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 5,5 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 50:50 (v/v)
13. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 6,0 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 50:50 (v/v)
14. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 5,0 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 50:50 (v/v)
15. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 5,0 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
16. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 4,8 – upraveno 10% H₃PO₄)
+ sodná sůl kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; v poměru 50:50 (v/v)

na koloně č.2

17. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 4,7 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 50:50 (v/v)
18. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 4,5 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
19. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 5,0 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
20. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 3,3 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
21. methanol : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 6,7 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
22. acetonitril : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 4,3 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 40:60 (v/v)
23. acetonitril : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 5,3 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 60:40 (v/v)
24. acetonitril : fosforečnan amonný (0,02 mol/l; pH 4,8 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 30:70 (v/v)
25. acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 5,0 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 30:70 (v/v)
26. acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,1 – upraveno 10% H₃PO₄)
v poměru 30:70 (v/v)

Analýzy probíhaly při průtokových rychlostech 0,4 – 0,5 ml/min. Na základě změřených spekter amisulpridu byly vyzkoušeny vlnové délky 230 nm a 280 nm.

Příprava mobilní fáze

Při hodnocení stability amisulpridu a stanovení jeho obsahu v tabletách byla použita mobilní fáze ve složení acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,1 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 30:70. Nejdříve byl připraven vodný roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) a poté smíchán s acetonitrem v uvedeném poměru. Postupně byla po kapkách přidávána kyselina fosforečná 10%-ní za současného měření pH. Takto připravená mobilní fáze pak byla odplyňována 15 minut na ultrazvukové lázni a 10 minut probublávána heliem.

Příprava roztoků

Amisulprid byl používán ve formě ve vodě nerozpustné báze. Pracovní roztok amisulpridu používaný pro zkušební nástřiky při vývoji chromatografických podmínek byl připraven rozpuštěním amisulpridu v methanolu v koncentraci 0,1mg/ml. Tento roztok byl nastříkovan na kolonu v objemu 20 μ l.

Pracovní roztok pro stabilitní studii amisulpridu v přítomnosti oxidačního činidla (H_2O_2), byl připraven tak, že 50 mg amisulpridu bylo rozpuštěno v malém množství methanolu a poté převedeno do 50 ml baňky a doplněno methanolem po značku. U stabilitní studie v prostředí HCl byl pracovní roztok připraven stejným způsobem, jen navážka činila 100 mg.

Zásobní roztok amisulpridu používaný pro přípravu kalibračních roztoků byl připraven rozpuštěním 10 mg substance v malém množství methanolu a poté převeden do 10 ml baňky a doplněn methanolem po značku. Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok sulpiridu, který sloužil při stanovení jako vnitřní standard.

Výběr vhodného vnitřního standardu

Při výběru vhodného vnitřního standardu byla otestována tato léčiva: methylparaben, propylparaben, ethylparaben, ambroxol, fenacetin, acetanilid, glibenklamid, sulfadimidin, sulfafurazol, theofylin, chloramfenikol, isoprenalin sulfát, paracetamol, trimethoprim, nimesulid, chloracetanilid, ibuprofen, acetylsulfathiazol, acetylamino-benzensulfonamid.

4.3. Studium stability amisulpridu

Ke studiu vybraných aspektů stability byl používán amisulprid ve formě ve vodě nerozpustné báze. Stabilita této látky byla studována v roztoku H_2O_2 za laboratorní teploty a v roztoku HCl při teplotě 40°C.

Stabilita v roztoku H_2O_2

Pro zjištění stability amisulpridu v přítomnosti oxidačního činidla byl použit peroxid vodíku o koncentraci 3% a 30%. Zatěžovaný roztok byl připraven smícháním 10 ml pracovního roztoku pro stabilitní studii s 10 ml 3%, resp. 30%-ního H_2O_2 . Byl promíchán a ponechán v klidu reagovat. Po 0, 2, 4, 6, 8 hodinách působení jednotlivých peroxidů byl z obou vzorků odebrán 1 ml do odměrné baňky 5 ml a doplněn po značku mobilní fází. Tyto roztoky o výsledné koncentraci amisulpridu 0,1 mg/ml byly nastříkovány (každý vzorek dvakrát) na kolonu v objemu 20 μ l. V každém časovém intervalu byl také nastříkovaný kontrolní roztok degradačního média (mobilní fáze + methanol + H_2O_2) a kontrolní vzorek amisulpridu (vnější standard) připravený odebráním 0,5 ml pracovního roztoku a doplněn methanolem po značku 5 ml baňky. Získané údaje byly vyhodnoceny a zpracovány do tabulky a grafu.

Stabilita v roztoku HCl při teplotě 40°C

Pro zjištění stability amisulpridu bylo použito roztoku HCl (1mol/l). Testovaný roztok byl připraven v 50 ml baňce smícháním 12,5 ml pracovního roztoku pro stabilitní studie s roztokem HCl. Roztok byl zahříván při 40°C pod zpětným chladičem. Každé dvě hodiny v rozmezí 24 hodin byl odebrán 1 ml vzorku do odměrné 5 ml baňky a doplněn po značku mobilní fází. Tento roztok o výsledné koncentraci amisulpridu 0,1 mg/ml byl nastříkovaný (třikrát) na kolonu v objemu 20 μ l. V každém časovém intervalu byl také nastříkovaný kontrolní roztok degradačního média (mobilní fáze + methanol + HCl) a kontrolní vzorek amisulpridu (vnější standard) připravený odebráním 0,5 ml pracovního roztoku a doplněn methanolem po značku 5 ml baňky. Získané údaje byly vyhodnoceny a zpracovány do tabulky a grafu.

4.4. Stanovení obsahu amisulpridu v tabletách

Pro stanovení obsahu amisulpridu v tabletách bylo použito originálního balení Solian 50 mg por. tbl. nob. Před vlastním stanovením obsahu amisulpridu v tabletách předcházelo sestrojení kalibrační křivky.

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost poměru plochy píku amisulpridu a plochy píku sulpiridu (vnitřní standard) na příslušných koncentracích amisulpridu. Pro její sestavení byly použity roztoky o 5 různých koncentracích amisulpridu (0,08 mg/ml; 0,09 mg/ml; 0,10 mg/ml; 0,11 mg/ml; 0,12 mg/ml) a roztoku sulpiridu o jedné neměnné koncentraci (0,1 mg/ml). Kalibrační roztoky byly připraveny naředěním příslušného množství zásobního roztoku mobilní fáze na objem 10,0 ml a nastříkovány na kolonu. Měření u každé koncentrace vzorku bylo provedeno třikrát. Získané údaje byly vyhodnoceny, zpracovány do tabulky a na jejich základě sestrojena kalibrační křivka.

Dále následovala extrakce amisulpridu z tablet. Po zjištění průměrné hmotnosti jedné tablety bylo odváženo příslušné množství z rozdrobněných tablet a tato navážka dispergována v methanolu. Po filtraci byl roztok převeden do 100 ml baňky a doplněn po značku methanolem, z něj odebrán 1 ml do 5 ml baňky, do které bylo přidáno 0,5 ml zásobního roztoku sulpiridu (vnitřní standard) a doplněno mobilní fází po značku. Takto připravený roztok byl nastříkovan na kolonu v objemu 20 μ l. Získané údaje byly vyhodnoceny, zpracovány do tabulky a na jejich základě byl z kalibrační křivky odečten obsah amisulpridu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5. 1. Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC **analýzu amisulpridu**

Stacionární fáze

Při vývoji optimálních podmínek pro hodnocení amisulpridu byly vyzkoušeny dvě stacionární fáze. Nejdříve byla vyzkoušena chromatografická kolona s náplní Separon SGX C18 (7 μm) a poté chromatografická kolona s náplní Separon SGX CN (7 μm), která byla také vybrána jako vhodnější stacionární fáze, protože poskytovala optimální separaci a u stanovovaných složek ostré píky.

Mobilní fáze

Volba vhodné mobilní fáze byla poměrně náročná a zdlouhavá. Bylo nutné najít mobilní fázi, při které by docházelo k dělení amisulpridu při současném zachování akceptovatelného tvaru píku amisulpridu. Nejprve byly použity směsi methanolu a fosforečnanu amonného v různých poměrech a pH hodnotách. Při těchto mobilních fázích nedocházelo k dělení nebo vznikaly píky nevhodných tvarů. Byla provedena také obměna složení mobilní fáze přidáním ionto-parového činidla (sodné soli hexansulfonové kyseliny), která nevedla k výraznější změně při separaci.

Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vybrána směs acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,1 – upraveno 10% H_3PO_4) v poměru 30:70 (v/v). Při jejím použití docházelo k optimálnímu dělení píku amisulpridu a píku jeho rozkladného produktu. Tato mobilní fáze také umožňovala využití vnitřního standardu při kvantitativním hodnocení. Při použití ostatních mobilních fází nedocházelo k úplnému rozdělení piků.

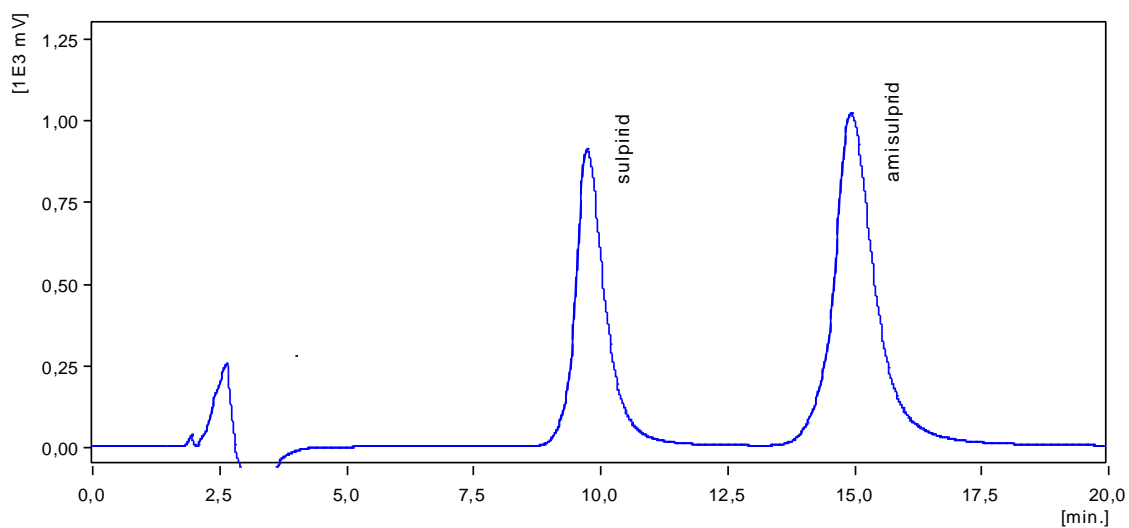
Průtoková rychlost byla zvolena 0,4 ml/min, protože poskytovala optimální tvary piků analyzovaných látek.

Detekce

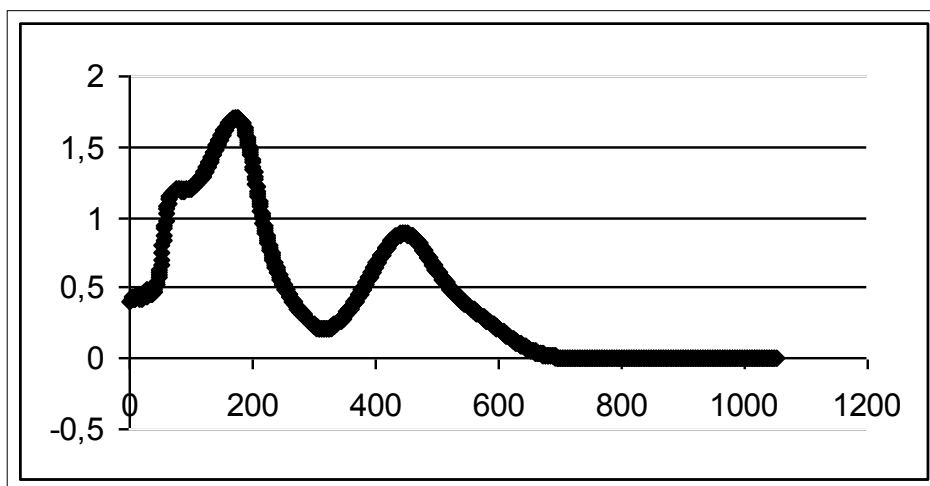
Detekce byla prováděna v oblasti UV spektra, amisulprid měl dvě maxima, při 280 nm a 230 nm. Jako vhodnější vlnová délka se jevila 230 nm.

Vnitřní standard

Při výběru bylo především sledováno je-li vnitřní standard eluován v blízkosti píku stanovovaného amisulpridu a je-li možné jej použít v podobných koncentracích. Mnohá léčiva měla velmi krátký retenční čas, nebo naopak příliš dlouhý. Některá měla retenční čas velmi blízký amisulpridu, tudíž zase nedocházelo k úplnému rozdělení píků. Jako nejvhodnější vnitřní standard byl vybrán strukturně blízký sulpirid, jehož retenční čas je kratší o 5 minut a dochází tak k rozdělení jednotlivých píků až na základní linii.



Obr.2: Chromatografický záznam amisulpidu a vnitřního standardu sulpiridu
 retenční čas: amisulpid - 14,99 min
 sulpirid – 9,77 min



Obr.3: Absorpční spektrum amisulpidu v methanolu

5.2. Výsledky studia stability amisulpridu

5.2.1. Stabilita amisulpridu v roztoku H₂O₂

Změna stability amisulpridu v přítomnosti oxidačního činidla byla studována pomocí působení H₂O₂ 3% a 30% -ního. V daných intervalech byly odebírány vzorky a nastříkovány na kolonu v objemu 20 µl, (viz. Kapitola 4.3.). Na chromatogramech byl detekován pík potencionálního oxidačního produktu. Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestavena tabulka hodnot zkoumaného vzorku, průměrná hodnota plochy píku vnějšího standardu činila 38,56. Poté byla sestrojena křivka závislosti logaritmu koncentrace na době působení peroxidu vodíku 3% -ního, resp. 30% -ního. Ta vykazovala v obou případech v daném časovém rozmezí lineární průběh. Rozklad amisulpridu vlivem oxidačního činidla lze tedy považovat za reakci pseudo-prvního řádu.

1. 3% H₂O₂

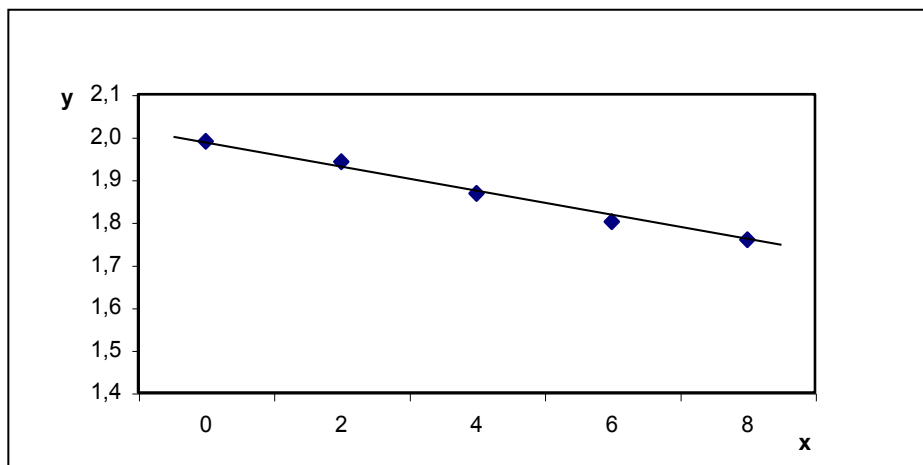
Tab. 4: Stabilita amisulpridu v roztoku 3% -ního H₂O₂

Čas působení H ₂ O ₂ [hod]	Plocha amisulpridu	Koncentrace amisulpridu [mg/ ml]	Průměrná hodnota [mg/ ml]	Koncentrace [µg/ml]	Log c
0	63,23	0,095435	0,096944	96,944	1,9865209
	64,51	0,098452			
2	60,22	0,088338	0,087478	87,478	1,9418988
	59,49	0,086617			
4	52,06	0,069100	0,073686	73,686	1,867385
	55,95	0,078271			
6	47,67	0,058751	0,063289	63,289	1,8013262
	51,52	0,067827			
8	45,54	0,053729	0,057430	57,430	1,7591411
	48,68	0,061132			

Závislost log c na době působení peroxidu vodíku 3% -ního vykazovala v daném časovém rozmezí lineární průběh.

Rovnice regresní přímky: $-0,03 x + 1,992$

Korelační koeficient: 0,9961



Obr.4: Závislost stability amisulpridu v roztoku 3% -ního H₂O₂ na čase

x = čas působení 3% -ního H₂O₂ [hod]

y = log koncentrace amisulpridu

2. 30% H₂O₂

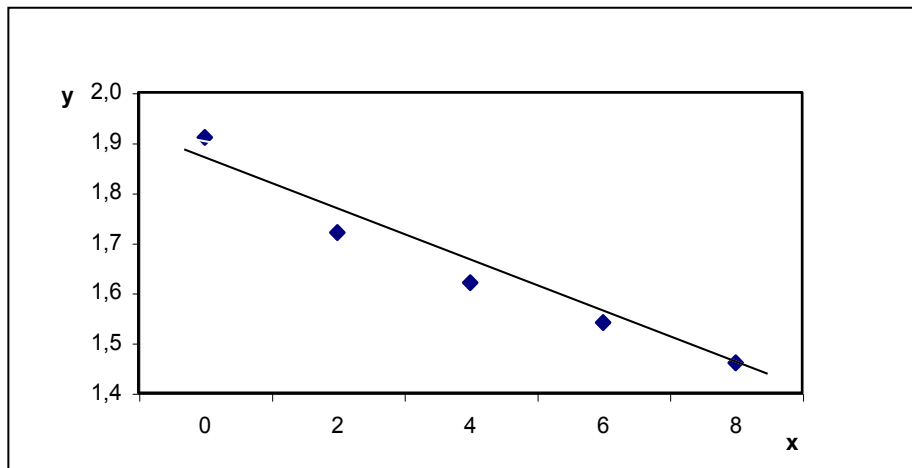
Tab.5: Stabilita amisulpridu v roztoku 30% -ního H₂O₂

Čas působení H ₂ O ₂ [hod]	Plocha amisulpridu	Koncentrace amisulpridu [mg/ ml]	Průměrná hodnota [mg/ ml]	Koncentrace [µg/ml]	Log c																												
0	56,37	0,079262	0,081466	81,466	1,9109764																												
	58,24	0,083670				2	44,14	0,050435	0,052362	52,362	1,7190162	45,78	0,054289	4	41,23	0,043568	0,041835	41,835	1,6215398	39,76	0,040102	6	36,32	0,031992	0,034468	34,468	1,5374161	38,42	0,036943	8	35,50	0,030066	0,028866
2	44,14	0,050435	0,052362	52,362	1,7190162																												
	45,78	0,054289				4	41,23	0,043568	0,041835	41,835	1,6215398	39,76	0,040102	6	36,32	0,031992	0,034468	34,468	1,5374161	38,42	0,036943	8	35,50	0,030066	0,028866	28,866	1,4603866	34,49	0,027666				
4	41,23	0,043568	0,041835	41,835	1,6215398																												
	39,76	0,040102				6	36,32	0,031992	0,034468	34,468	1,5374161	38,42	0,036943	8	35,50	0,030066	0,028866	28,866	1,4603866	34,49	0,027666												
6	36,32	0,031992	0,034468	34,468	1,5374161																												
	38,42	0,036943				8	35,50	0,030066	0,028866	28,866	1,4603866	34,49	0,027666																				
8	35,50	0,030066	0,028866	28,866	1,4603866																												
	34,49	0,027666																															

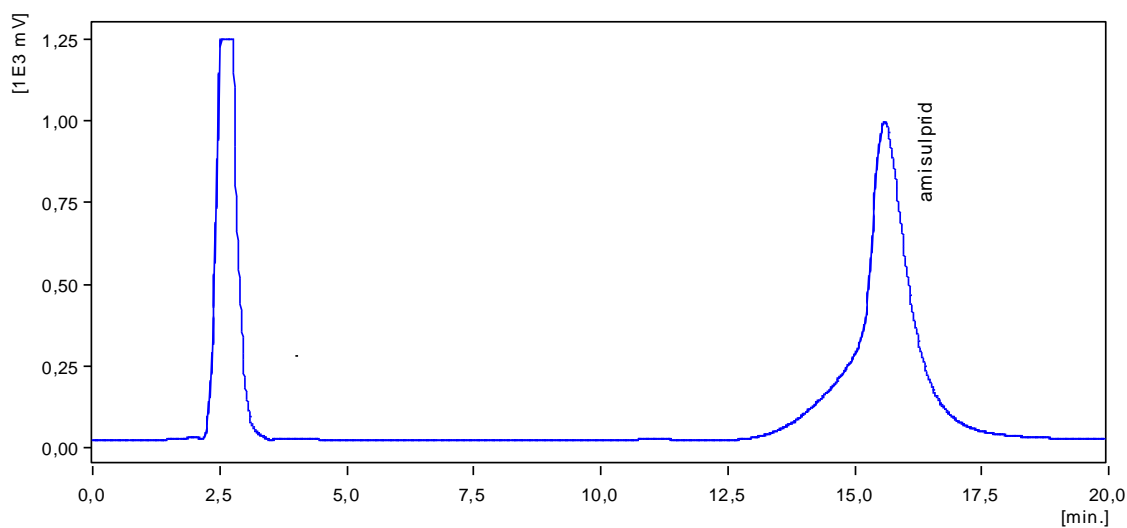
Závislost log c na době působení peroxidu vodíku 30% -ního vykazovala v daném časovém rozmezí lineární průběh.

Rovnice regresní přímky: $-0,054 x + 1,866$

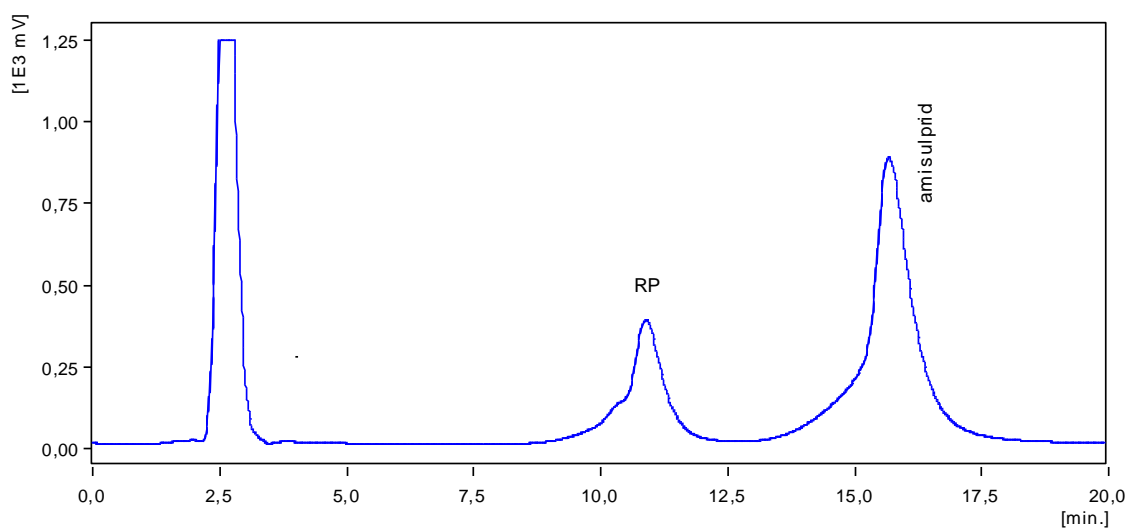
Korelační koeficient: 0,979



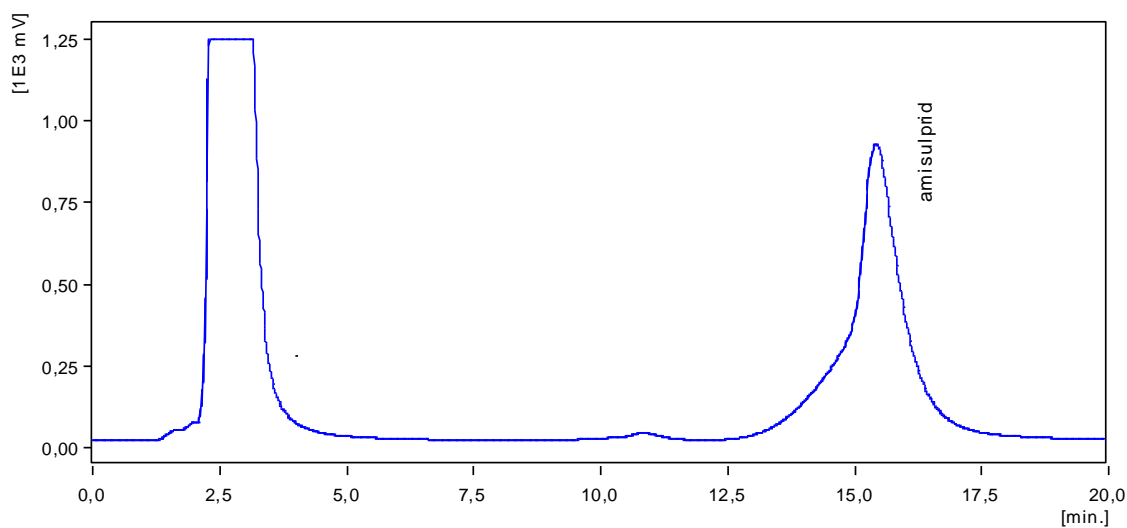
Obr.5: Závislost stability amisulpridu v roztoku 30% -ního H_2O_2 na čase
x = čas působení 30% -ního H_2O_2 [hod]
y = log koncentrace amisulpridu



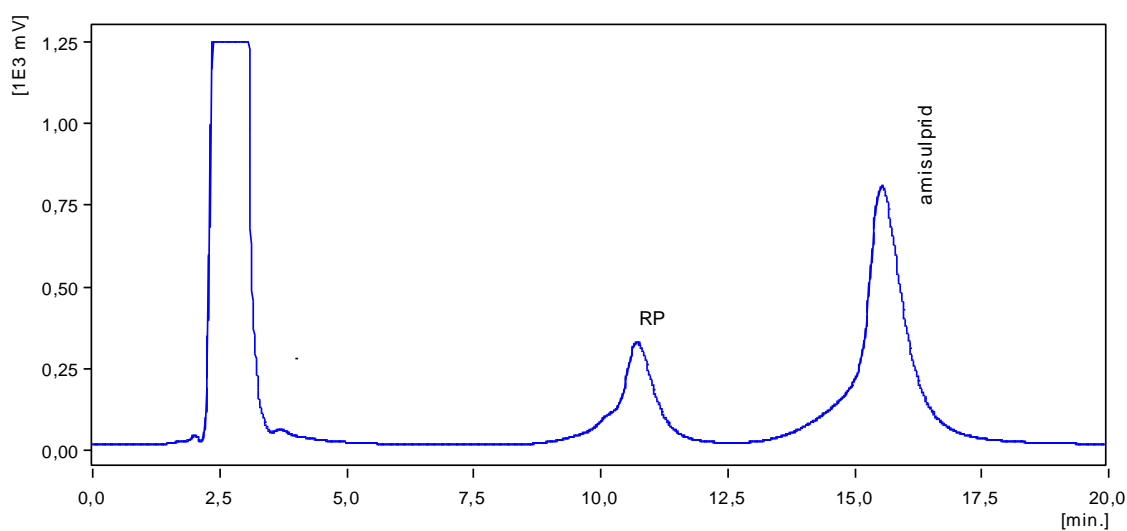
Obr.6: Chromatografický záznam působení 3% -ního H₂O₂ na amisulprid v čase t = 0 hod
 retenční čas : amisulprid – 15,65 min



Obr.7: Chromatografický záznam působení 3% -ního H₂O₂ na amisulprid v čase t = 8 hod
 retenční čas : amisulprid – 15,72 min
 retenční čas : rozkladný produkt (RP) – 10,93 min



Obr.8: Chromatografický záznam působení 30% -ního H_2O_2 na amisulprid v čase $t = 0$ hod
 retenční čas : amisulprid – 15,48 min



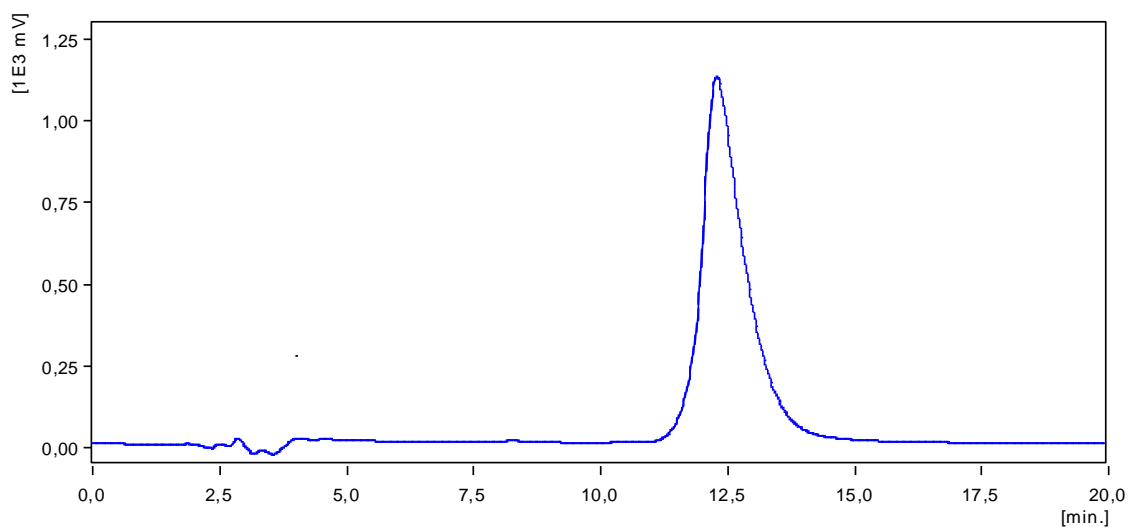
Obr.9: Chromatografický záznam působení 30% -ního H_2O_2 na amisulprid v čase $t = 8$ hod
 retenční čas : amisulprid – 15,60 min
 retenční čas : rozkladný produkt (RZ) – 10,76 min

5.2.2. Stabilita amisulpridu v roztoku HCl

Změna stability amisulpridu v kyselém prostředí byla studována pomocí působení roztoku HCl (1 mol/l) při teplotě 40°C. V daných intervalech byly odebírány vzorky a nastříkovány na kolonu v objemu 20 µl (viz. Kapitola 4.3.). Po 24 hodinovém působení roztoku HCl nebyly na chromatogramech detekovány žádné potencionální rozkladné produkty. U chromatografických záznamů došlo ke zkrácení retenčního času vlivem změny pH. Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestavena tabulka hodnot zkoumaného vzorku, průměrná hodnota plochy píku vnějšího standardu činila 59,29.

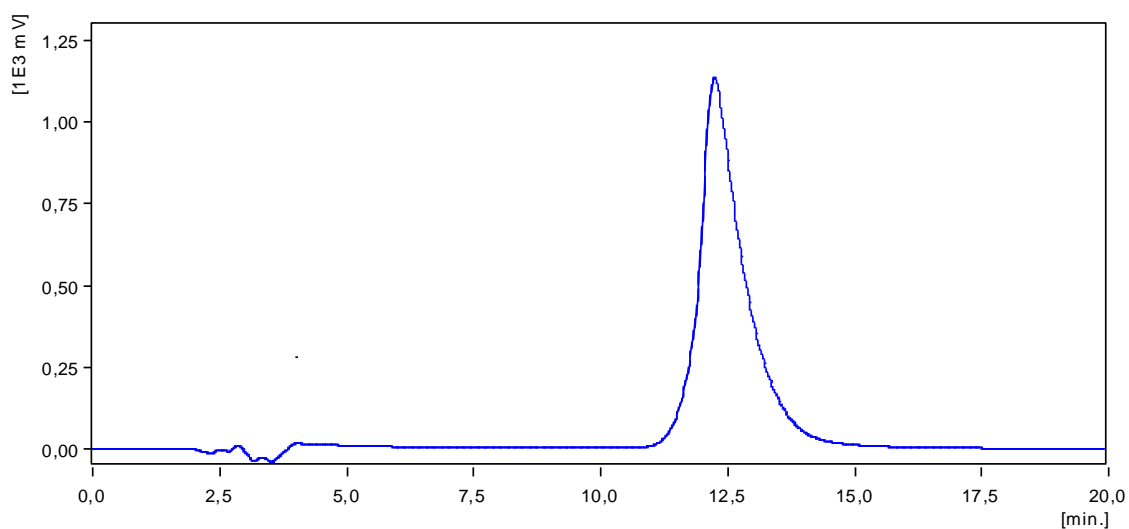
Tab.6: Stabilita amisulpridu v roztoku HCl (1 mol/l)

Čas působení HCl [hod]	Plocha amisulpridu	Koncentrace amisulpridu [mg/ ml]	Průměrná hodnota [mg/ ml]
0	96,27	0,093974	0,093629
	95,82	0,093284	
2	96,31	0,094035	0,092479
	94,28	0,090923	
4	95,87	0,093361	0,092042
	94,15	0,090723	
6	94,16	0,090738	0,092815
	96,87	0,094893	
8	94,30	0,090953	0,092716
	96,60	0,094480	
10	97,60	0,096013	0,095169
	96,50	0,094326	
12	95,04	0,092088	0,093951
	97,47	0,095814	
14	95,72	0,093131	0,093529
	96,24	0,093927	
16	97,24	0,095461	0,093406
	94,56	0,091352	
18	93,47	0,089681	0,092372
	96,98	0,095063	
20	97,31	0,095567	0,093268
	94,31	0,090969	
22	96,11	0,093728	0,093876
	96,27	0,094024	
24	97,17	0,095360	0,093249
	94,42	0,091137	



Obr.10: Chromatografický záznam působení roztoku HCl (1 mol/l) na amisulprid
v čase t = 0 hod

retenční čas : amisulprid – 12,33 min



Obr.11: Chromatografický záznam působení roztoku HCl (1 mol/l) na amisulprid
v čase t = 24 hod

retenční čas : amisulprid – 12,29 min

5.3. Výsledky stanovení obsahu amisulpridu v tabletách

Obsah amisulpridu v tabletách byl odečten z kalibrační křivky, k jejímu sestrojení bylo použito pět různých koncentrací amisulpridu a jedné neměnné koncentrace sulpiridu (viz. Kapitola 4.4.).

Tab.7: Naměřené hodnoty amisulpridu

Koncentrace amisulpridu [mg / ml]	Měření č.	Plocha píku amisulpridu	Průměr ploch píku amisulpridu
0,08	1	55,84	56,09
	2	56,26	
	3	56,18	
0,09	1	59,56	55,96
	2	54,40	
	3	53,91	
0,10	1	61,74	58,56
	2	56,99	
	3	56,94	
0,11	1	63,49	60,25
	2	61,96	
	3	55,30	
0,12	1	63,74	62,16
	2	61,55	
	3	61,19	

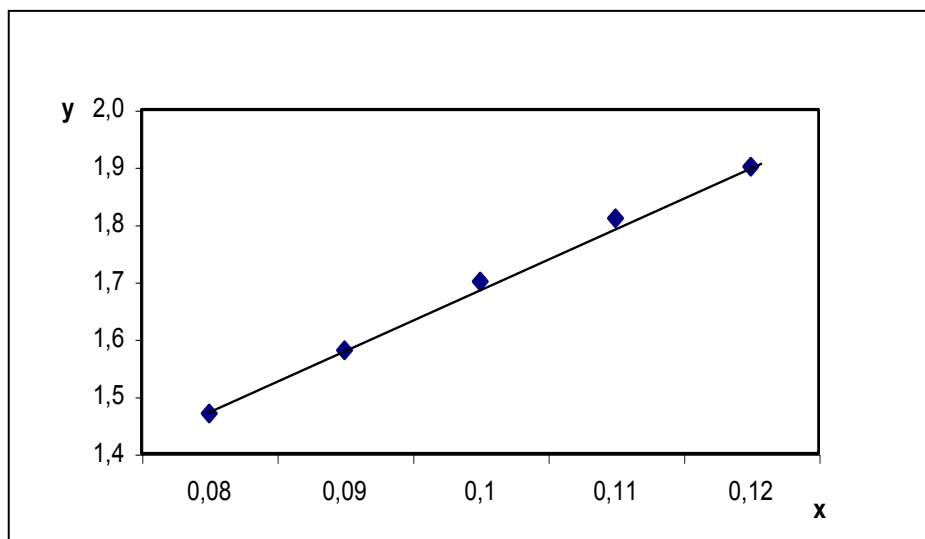
Tab.8: Naměřené hodnoty sulpiridu

Koncentrace sulpiridu [mg / ml]	Měření č.	Plocha píku sulpiridu	Průměr ploch píku sulpiridu
0,10	1	37,78	38,25
	2	38,53	
	3	38,45	
0,10	1	36,00	35,44
	2	35,15	
	3	35,16	
0,10	1	32,57	34,45
	2	34,62	
	3	36,16	
0,10	1	32,81	33,29
	2	36,35	
	3	30,71	
0,10	1	32,42	32,72
	2	31,78	
	3	33,96	

Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost poměru ploch píku amisulpridu a ploch píku sulpiridu na rostoucí koncentraci amisulpridu), která vykazuje lineární průběh v rozmezí daných koncentrací. Její parametry jsou:

Rovnice regresní přímky: $y = 11x + 0,59$

Korelační koeficient: 0,9954



Obr.12: Kalibrační křivka

x = koncentrace amisulpridu [mg / ml]

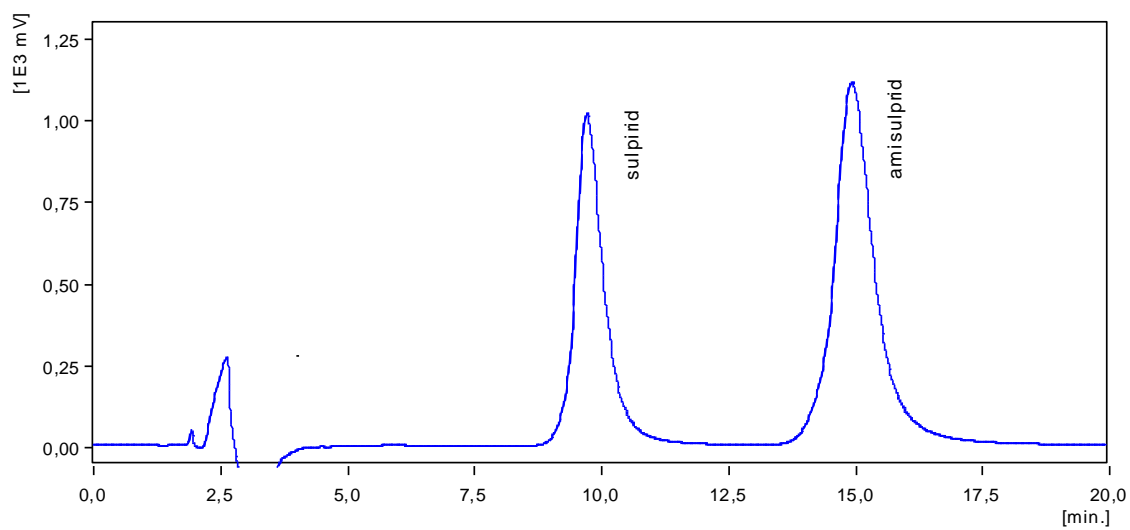
y = plocha píku amisulpridu / plocha píku sulpiridu

Tab.9: Naměřené hodnoty vzorku roztoku amisulpridu izolovaného z tablet a sulpiridu (vnitřní standard)

Měření Č.	Plocha píku vzorku	Průměrná hodnota	Plocha píku sulpiridu	Průměrná hodnota
1	50,55	49,80	29,38	30,31
2	48,12		30,38	
3	49,23		30,59	
4	49,39		30,59	
5	51,71		30,61	

Tab.10: Vyhodnocení obsahu amisulpridu v tabletách

Poměr plochy píku vzorku a sulpiridu	Koncentrace amisulpridu ve vzorku [mg / ml]	Obsah amisulpridu v 1 tabletě [%]
1,643	0,0957293	95,73



Obr.13: Chromatografický záznam amisulpridu izolovaného z tablet

retenční čas : sulpirid – 9,75 min

retenční čas : amisulprid izolovaný z tablet – 15,14 min

6. ZÁVĚR

V diplomové práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu amisulpridu.

Měření bylo prováděno na koloně o rozměrech 150×3 mm i.d., s náplní Separon SGX CN, 7 µm. Použita byla mobilní fáze ve složení acetonitril : fosforečnan amonný (0,01 mol/l; pH 6,1 – upraveno 10% H₃PO₄) v poměru 30:70 (v/v). Průtoková rychlost byla 0,4 ml/min při tlaku nepřekračující 20 MPa. K detekci byl použit UV detektor, který pracoval při vlnové délce 230 nm. Vzorky byly nastříkovány pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl.

Vypracovaná HPLC metoda pro stanovení amisulpridu byla použita pro studium vybraných aspektů stability a stanovení obsahu amisulpridu v tabletách. Změny stability byly sledovány v roztocích H₂O₂ 3% a 30% -ního za laboratorní teploty a v prostředí roztoku HCl (1 mol/l) při teplotě 40°C. Ke stanovení obsahu amisulpridu v tabletách bylo využito originálního balení Solian 50 mg por. tbl. nob.

Při studiu stability amisulpridu v přítomnosti oxidačního činidla byl na chromatogramech detekován rozkladný produkt. Na základě záznamů byla sestrojena křivka závislosti logaritmu koncentrace na době působení oxidačního činidla, ta vykazovala v obou případech lineární průběh. Po několika hodinovém působení roztoku HCl (1 mol/l) nebyly zaznamenány na chromatogramech žádné potencionální rozkladné produkty. Za daných podmínek amisulprid nepodléhal kyselé hydrolyze.

Po sestrojení kalibrační křivky byl odečten obsah amisulpridu v jedné tabletě a vyjádřen v procentech, výsledný obsah činil 95,73 %.

7. LITERATURA

- 1) Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
- 2) Mikeš, O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 3) Mikeš, O.; Štamberg, J.; Hejtmánek, M.; Šebesta, K.: Iontově výměnná chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 4) Tomášek, V.: Gelová chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 5) Turková, J.: Afinitní chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 6) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 7) Meloun, B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 8) Klíma, J.; Grafnetterová, J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
- 9) Churáček, J.; Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984
- 10) Český lékopis 2002 (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- 11) Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada, Praha 2005
- 12) Churáček, J.; Jandera, P.: Nové trendy v teorii a instrumentace vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993

- 13) Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.: Fundamentals of analytical chemistry - Seventh Edition, Orlando Florida, USA 1997
- 14) Jandera, P.: Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie. In.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
- 15) Szepezi, G.: How to use reverse phase HPLC, VCH Publisher Inc., USA 1992
- 16) Klimeš, J.: Základy kontroly chemických léčiv I., SNP, Praha 1990
- 17) Jandera, P.: Teorie kolonové kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi. In: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
- 18) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004
- 19) Věstník SÚKL 1/94, Validace analytických metod v kontrole léčiv
- 20) Center, V.: Validace analytických metod, EffiChem (<http://www.efficem.cz>).
- 21) Beňo, P.; Truplová, E.; Ostravská, V.; Stankovičová, M.: Stabilita liečiv a liekov, VEDA, Bratislava 2003
- 22) Švestka, J.: Nová psychofarmaka: Amisulprid – atypický preparát ve skupině antipsychotik 2. generace. Psychiatrie 3, 191–200, 2000
www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH300/08svesta.htm
- 23) Maitre, M. et al.: Displacement of [3H] gamma-hydroxybutyrate binding by benzamide neuroleptics and prochlorperazine but not by other antipsychotics. Eur. J. Pharmacol. 256, 211–214, 1994 Cit. dle 22
- 24) Scatton, B. et al.: Amisulpride: From animal pharmacology to therapeutic action. Int. Clin. Psychopharmacol. 12, 29-36, 1997 Cit. dle 22

- 25) Barik, S.; de Beaurepaire, R.: Evidence for a functional role of the dopamine D3 receptors in the cerebellum. *Brain Res.* 737, 347–350, 1996 Cit. dle 22
- 26) Divour, A.; Desanti, C.: Pharmacokinetic and metabolism of amisulpride. *Ann. Psychiatr.* 3, 298–305, 1988 Cit. dle 22
- 27) Coukell, A.J.; Spenser, C.M.; Benfield, P.: Amisulpride. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia. *CNS Drugs* 6, 237–256, 1996 Cit. dle 22
- 28) Hamon-Vilcot, B. et al.: Safety and pharmacokinetic of single oral dose of amisulpride in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 405–409, 1998 Cit. dle 22
- 29) Mattila, M.J. et al.: Single oral doses of amisulpride do not enhance the effects of alcohol on the performance and memory of healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 51, 161–166, 1996 Cit. dle 22
- 30) Peretti, C.S. et al.: Effects of haloperidol and amisulpride on motor and cognitive skill learning in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 131, 329–338, 1997 Cit. dle 22
- 31) Perrault, G. et al.: Psychopharmacological profile of amisulpride. An antipsychotic drug with presynaptic D2/D3 dopamine receptor antagonist activity and limbic selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 73–82, 1997 Cit. dle 22
- 32) Vinař, O.: Deniban tbl. 59465, AISLP WIN ČR, Praha, 31.10.2001
- 33) Tracqui, A. et al.: Amisulpride poisoning: A report on two cases. *Hum. Exp. Toxicology* 4, 294–298, 1995 Cit. dle 22
- 34) Bohbot, M.; Doare, L.; Diquet, B.: *J. Chromatogr.* 416, 414–419, 1987

- 35) Ascalone, A.; Ripamonti, M.; Malavasi, B.: J. Chromatogr. B 676, 95-105, 1996
- 36) Malavasi, B. et al.: J. Chromatogr. B 676, 107-115, 1996
- 37) Sachse, J. et. al.: J. Chromatogr. B 784, 405-410, 2003
- 38) P  hourcq, F. et. al. : J. Chromatogr. B 789, 101-105, 2003
- 39) Frahnert, Ch. et. al. : J. Chromatogr. B 794, 35-47, 2003
- 40) Gschwend, M.H. et. al. : J. Chromatogr. B 831, 132-139, 2006

