

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Validace HPLC hodnocení amlodipinu a
atorvastatinu v kombinovaném léčivém
přípravku**



Vedoucí rigorózní práce: RNDr. Milan Mokřý, CSc.
Hradec Králové 2014

Mgr. Jana Kašková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé rigorózní práce RNDr. Milanovi Mokrému, CSc. za všestrannou pomoc, cenné rady, připomínky, odborné vedení práce a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Janě Langové za pomoc s grafickou stránkou této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Jana Kašková

Konzultant: RNDr. Milan Mokřý, CSc.

Název rigorózní práce:

Validace HPLC hodnocení amlodipinu a atorvastatinu v kombinovaném léčivém přípravku

Předmětem této rigorózní práce je validace chromatografické metody. Validovanou metodou je simultánní analýza účinných látek amlodipin-besylát a atorvastatin v komerčně vyráběných tabletách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Stacionární fází byla zvolena kolona 125x4 mm I. D. s náplní Nucleosil 120-5 C 18, Macherey-Nagel, mobilní fází směs o složení acetonitril – roztok dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (0,025 mol/l) v poměru 55 : 45, okyselená kyselinou fosforečnou na pH 4,4 a protékající rychlostí 1,0 ml/min, při teplotě 25°C propylparabenem jako vnitřním standardem. Detekce UV-VIS detektorem byla prováděna při vlnové délce 210 nm. Z validačních parametrů byla posuzována linearita, přesnost, správnost, robustnost a selektivita.

Linearita byla potvrzena analýzou vzorků standardů v rozsahu 50 – 150 % očekávané koncentrace léčivých látek. Pro ověření přesnosti bylo připraveno šest vzorků o stejném složení a z výsledků analýzy vypočítána relativní směrodatná odchylka, která se pohybovala v rozmezí 0,04 – 1,38 %. Správnost byla posuzována analýzou modelových vzorků, které byly připraveny přidáním známého množství účinných látek k placebo. Výtěžnost metody se pohybovala v rozmezí 97,93 – 101,98 %. Robustnost metody byla ověřena změnami parametrů mobilní fáze. Výsledky analýzy byly uspokojivé při různých hodnotách pH, odlišných koncentracích pufru i při úpravě poměrů anorganické a organické složky mobilní fáze. Selektivita metody byla potvrzena zjištěním, že žádné z látek obsažených v přípravku vzájemně neinterferují.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Candidate: Mgr. Jana Kašková

Consultant: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Title of Thesis:

Validation of HPLC evaluation of amlodipine and atorvastatin in combined dosage forms

The topic of this thesis is the validation of chromatographic method. Validated method is the simultaneous HPLC analysis of amlodipine besilate and atorvastatin in combined dosage form. Chromatographic column Nucleosil 125x4 mm 120-5 C18, Macherey-Nagel was used as stationary phase. Mobile phase was formed by mixture of acetonitrile and dibasic sodium phosphate dodecahydrate solution (0.025 mol/l), acidified with phosphoric acid at pH 4.4 in the ratio 55 : 45. A flow rate was 1.0 ml/min and the temperature was 25 ° C. There was used the internal standard propylparaben. The detection was performed at 210 nm using an UV-VIS detector. The method was validated for linearity, precision, accuracy, robustness and selectivity.

Linearity was confirmed by analyzing samples of standards in the range 50-150 % of their expected concentration. To verify the accuracy there were prepared six samples of the same composition and then relative standard deviation was calculated. RSD ranged from 0.04 to 1.38 %. Accuracy was assessed by analyzing the model samples that were prepared by adding known amounts of active substances to placebo. The recovery ranged from 97.93 to 101.98 %. The robustness of the method was verified by changing the parameters of the mobile phase. There were changed pH, concentration of buffer and ratio of aqueous and organic components of the mobile phase. During the selectivity experiments there weren't found any substances which would interfere with each other.

Obsah

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
1. Úvod.....	3
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	4
2.1. Chromatografie.....	4
2.1.1. Objev chromatografie.....	4
2.1.2. Definice chromatografie.....	4
2.1.3. Rozdělení základních chromatografických metod.....	4
2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	8
2.2.1. Vyhodnocování chromatografických křivek (chromatogram).....	9
2.2.2. Chromatograf.....	10
2.3. VALIDACE METODY.....	13
2.3.1. Validace analytických metod.....	13
2.3.2. Test způsobilosti chromatografické metody (System suitability test).....	16
2.4. Vlastnosti zkoumaných látek.....	16
2.4.1. Amlodipin.....	16
2.4.2. Atorvastatin.....	18
2.5. Práce zabývající se amlodipinem a atorvastatinem nebo jejich kombinací s jinými léčivými... 20	20
3. CÍL PRÁCE.....	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
4.1. Materiál a pomůcky.....	23
4.1.1. Chemikálie.....	23
4.1.2. Přístroje.....	23
4.1.3. Pomůcky.....	23
4.2. Chromatografické podmínky validované metody.....	23
4.3. Provedení linearity.....	24
4.4. Provedení přesnosti.....	24
4.5. Provedení správnosti.....	25
4.6. Provedení robustnosti.....	25
4.6.1. Změna pH mobilní fáze.....	26
4.6.2. Změna poměru složek mobilní fáze.....	26
4.6.3. Změna koncentrace pufru mobilní fáze.....	26
4.7. Provedení selektivity.....	26
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
5.1. Linearita.....	27
5.2. Přesnost.....	30
5.3. Správnost.....	32
5.4. Robustnost.....	35

5.4.1. Změna pH mobilní fáze	36
5.4.2. Změna poměru složek mobilní fáze.....	36
5.4.3. Změna koncentrace pufru mobilní fáze	37
5.5. Selektivita	38
6. ZÁVĚR.....	39
7. SEZNAM ZKRATEK.....	40
8. POUŽITÁ LITERATURA	41

1. ÚVOD

Farmacie je vědecký a zároveň praktický obor zabývající se zajištěním léčiv pro celou populaci za ekonomicky přijatelných podmínek v požadovaném množství. Nedílnou součástí farmacie je kontrola léčiv, která se spolu s dalšími farmaceutickými disciplínami podílí na zabezpečení jakosti, bezpečnosti a účinnosti léčiv.

V oblasti kontroly léčiv je v současnosti kladen důraz na vyvíjení rychlých, spolehlivých, jednoduchých a zároveň finančně méně náročných analytických metodik. Těmto požadavkům vyhovuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC), která je aktuálně jednou z nejprogresivnějších a nejpoužívanějších metod. Jedná se o separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaných látek a jiných substancí. V lékopisech nalezneme metodu HPLC pro stanovení obsahu, identifikaci a kontrolu nečistot zkoumaných látek, využití nachází při testování stability léčiv a hodnocení rozkladných produktů, klinická medicína a forenzní toxikologie používají HPLC k monitorování lékových hladin a metabolitů v biologických materiálech. Varianty uplatnění HPLC jsou velmi rozsáhlé a neustále dochází k modernizaci této instrumentální metody.

Ve své diplomové práci jsem se zabývala optimalizací HPLC metody pro současné hodnocení léčiv amlodipinu a atorvastatinu. Na českém trhu je již několik let k dispozici fixní kombinace tohoto antihypertenziva a hypolipidemika v jedné tabletě. Na výše zmíněnou problematiku navazují v této rigorózní práci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chromatografie

2.1.1. Objev chromatografie

V roce 1906 provedl ruský botanik, fyziolog a biochemik M. S. Cvet experiment, při kterém rozdělil rostlinné barvivo chlorofyl na jeho jednotlivé složky: chlorofyl A, chlorofyl B a karotenoidy. Experiment spočíval v tom, že petroletherový extrakt chlorofylu nechal v kolonce protékat přes sloupec uhlíčitanu vápenatého. Chlorofylový extrakt se při průchodu kolonkou rozdělil na jednotlivá barviva a na kolonce se tak vytvořily barevné zóny viditelné okem. Zjistil tedy, že listová barviva procházejí kolonkou s náplní nestejně rychle a lze je čistým rozpouštědlem postupně vymýt. Cvet tuto metodu pojmenoval „chromatografie“.^(1,2)

2.1.2. Definice chromatografie

Chromatografie je separační fyzikálně-chemická metoda umožňující analýzu směsí s možností kvalitativního a též kvantitativního hodnocení jednotlivých složek směsi.^(1,3) Tato metoda využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi. Jedna z fází je stacionární – nepohyblivá, která je v koloně nebo plošné vrstvě a druhá je mobilní – pohyblivá, která unáší separované látky. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím. Jednotlivé složky analyzované směsi se mezi obě fáze distribuují a dochází mezi nimi k postupnému, opakovanému vytváření rovnovážných stavů. Toto nestejnoměrné rozdělení složek analyzované směsi je základním obecným principem všech chromatografických metod. Předpokladem takového rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich rozdílná schopnost difundovat do nich.^(3,4,5)

2.1.3. Rozdělení základních chromatografických metod

Chromatografických metod již dnes existuje velké množství. Můžeme je rozdělit dle různých hledisek do několika skupin.

2.1.3.1. Dělení podle skupenství pohyblivé fáze

- **Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography - LC)**

Mobilní fází je zde kapalina. Tento typ chromatografie umožňuje rozdělení netěkavých kapalných látek, dále i látek tuhých, rozpustných v běžných organických rozpouštědlech nebo zředěných minerálních kyselinách.⁽⁶⁾

- **Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GC)**

Plynovou chromatografií lze identifikovat a stanovit nejen plyny, ale i látky kapalně a pevně, které je možné převést bez rozkladu do plynného stavu. Mobilní fází je zde nosný plyn pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. Nosný plyn je volen podle detekčního systému. Nejčastěji se používá dusík, helium nebo vodík. Existují dva typy kolon:

- Kolony náplňové – trubice z nerezové oceli nebo skla naplněné granulovaným adsorbentem nebo nosičem se zakotvenou kapalnou stacionární fází.
- Kolony kapilární – kapiláry z nerezové oceli nebo skla stočené do šroubovice, jejichž stěny jsou povlečeny kapalnou stacionární fází a zastávají tak funkci nosiče.^(3,6,7,8)

Plynová chromatografie nemá v analýze léčiv tak rozsáhlé uplatnění jako HPLC, přesto je využívána ve všech lékopisech vyspělých zemí. Výhodami této chromatografické metody jsou jednoduchost, vysoká citlivost a velmi vysoká separační účinnost.^(8,9,10)

2.1.3.2. Dělení podle uspořádání stacionární fáze

- Kolonová chromatografie

Stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně). Tímto typem chromatografie je právě HPLC.

- Plošná chromatografie

a) Tenkovrstvá chromatografie (TLC = Thin Layer Chromatography)

Je využívána jak pro důkaz substancí, tak pro identifikaci účinných látek v různých lékových formách, zejména ve složených léčivých přípravcích. Mnohdy se využívá kromě důkazu totožnosti léčiva současně pro ověření jeho čistoty.⁽³⁾

Dochází k rozdělování látek na tenké vrstvě, která je tvořena sorbentem (ten je stacionární fází soustavy), jímž je nejčastěji silikagel (oxid křemičitý), alumina (oxid hlinitý), křemičitan hlinitý a další, které jsou nanášeny na podložce z hliníku, skla nebo plastu. Pomocí mobilní fáze, která při analýze vzlíná stacionární fází, jsou chromatogramem „unášeny“ skvrny hodnocených látek. Kvalitativní analýza je prováděna pomocí retenčního faktoru, což je poměr vzdálenosti středu skvrny od startu chromatogramu a vzdálenosti mezi startem a čelem chromatogramu.^(11,12)

V současné době jsou často používané TLC chromatogramy, součástí jejichž sorbentu je fluorescenční látka s maximem fluorescence při 254 nm. Po vyvinutí chromatogramu se provádí detekce pod UV lampou.⁽³⁾

b) Papírová chromatografie

Tato metoda je dnes překonaná a nepoužívá se.

2.1.3.3. Dělení podle povahy děje, který převládá při separaci

- Rozdělovací chromatografie

Podstatou separace v rozdělovací chromatografii je rozdílná rozpustnost analyzovaných látek. Používán je dvoufázový systém, v němž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Existují dvě varianty tohoto typu chromatografie.

V prvním případě bývá stacionární fáze vodná a je zakotvená na hydrofilním nosiči (silikagel, křemelina, škrob, hydrofilní gely, prášková celulóza a další). Fáze organická bývá fází mobilní.

Mnohem častěji se využívá systém obrácených fází (reversed phase). V tomto případě slouží organické hydrofobní rozpouštědlo (např. silikonový olej) jako stacionární fáze, jenž je zakotvená na hydrofobním nosiči. Tento systém je vhodný k dělení méně polárních látek.^(5,8)

- Adsorpční chromatografie

Principem je schopnost pevné fáze adsorbovat látky z kapaliny nebo z plynu (mobilní fáze).

Mezi nejpoužívanější adsorbenty patří silikagel, oxid hlinitý, oxid hořečnatý, prášková celulóza a aktivní uhlí.^(5,9)

Principem metody je distribuce analyzovaných látek na základě jejich rozdílné adsorpční afinity k danému adsorbentu. Adsorbenty musí splňovat přísné požadavky jako např. nerozpustnost v mobilní fázi, chemickou inertnost a velkou adsorpční kapacitu.^(13,14,15)

- Gelová chromatografie

V gelové chromatografii dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu a nepohyblivou částí mobilní fáze nacházející se uvnitř pórů gelu. Jednotlivé molekuly jsou separovány podle svých rozměrů. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku své permeace do rozpouštědlem naplněných pórů. Gely určené pro chromatografii musí být chemicky inertní, stálé i v širším rozmezí teplot. Používané jsou zejména dextranové, polyakrylamidové nebo agarosové gely.^(16,17)

- Afinitní chromatografie

Tato chromatografie je založena na specifických reakcích funkčních skupin, které jsou zabudovány do molekul matrice stacionární fáze. Tyto reakce jsou typické pro určité biologické a biochemické procesy, kterých se účastní dvojice látek s vysokou selektivitou. Jako matrice jsou používány agarosové nosiče a jejich deriváty, polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely a další. Jako afinanty se používají aminokyseliny, enzymy, antigeny a protilátky. Využívá se při izolaci biologicky aktivních látek.^(5,18)

- Ion-párová chromatografie

Tento typ umožňuje separaci látek iontové povahy. Mezi analytem a ionty z mobilní fáze je vytvořen neutrální iontový komplex a s rostoucí koncentrací činidla se retence látky zvyšuje. K separaci kationtů jsou používány alkylsulfonové kyseliny, aminokyseliny nebo karboxylové kyseliny, u aniontů se využívají kvartérní amoniové soli nebo katecholaminy.⁽¹⁹⁾

- Iontově-výměnná chromatografie

Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, zpravidla v iontové formě, k iontovým skupinám stacionární fáze. Tou je tzv. iontoměnič tvořený makromolekulární matricí (dextran, celulóza, polystyren) nesoucí vhodné funkční skupiny kyselé nebo zásadité povahy. Každá tato funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Tento protiion je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi. Uplatňují se zde elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje. Iontoměniče se dělí na anexy,

jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů a katexy, jejichž funkční skupiny jsou kyselé a slouží k výměně kationtů.^(3,17)

- Chirální chromatografie

Tento druh chromatografie slouží k oddělení stereoizomerů – molekul se shodným sumárním a konstitučním vzorcem lišící se prostorovým uspořádáním. K separaci se používá opticky aktivní stacionární fáze, která interaguje s chirálním analytem.^(20,21)

2.1.3.4. Dělení podle použité pracovní techniky

- Frontální chromatografie

Tato technika spočívá v neustálém přivádění dělené směsi, která je rozpuštěná v mobilní fázi, na kolonu. Jednotlivé látky opouští kolonu v závislosti na afinitě ke stacionární fázi. Například u tříložkové směsi z kolony nejprve vychází čistá mobilní fáze, poté vytéká složka A, která má ke stacionární fázi nejmenší afinitu, dále směs látek A+B, jestliže má složka B středně velkou afinitu a nakonec po nasycení stacionární fáze složkou C, která má největší afinitu, vytéká roztok obsahující všechny 3 složky.⁽⁶⁾

- Vytěšňovací chromatografie

U této metody se na kolonu nanáší jednorázově pouze část chromatografické směsi. Později se nanáší a až do konce chromatografického procesu kontinuálně přivádí roztok látky, která má ke stacionární fázi větší afinitu než látky výše uvedené. Tato látka se používá jako tzv. vytěšňovadlo a uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky. Složka, která má ke stacionární fázi nejmenší afinitu, vytéká z kolony jako první, naopak vytěšňovadlo opouští kolonu jako poslední.⁽⁵⁾

- Eluční chromatografie

Tato chromatografická metoda je nejběžnější. Na kolonu se vnáší jen malá část analyzované směsi a kolona se eluuje mobilní fází, která má ke stacionární fázi minimální afinitu. Každá složka se vymývá nezávisle na ostatních. Opouští kolonu zcela odděleně v závislosti na afinitě ke stacionární fázi každé z nich.⁽⁵⁾

Existují 3 varianty eluční chromatografie:

Izokratická: používá se mobilní fáze o konstantním složení.

Vícetupňová: při eluci méně polárním rozpouštědlem se eluují dobře některé složky, jiné jsou příliš sorbovány a pro jejich eluci se pak zvolí polárnější rozpouštědlo.

Gradientová: při eluci se plynule mění koncentrace polárnější složky v mobilní fázi.⁽⁵⁾

2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je velmi progresivní a oblíbená metoda užívaná ve všech oblastech analýzy. Její uplatnění v technické praxi je velice rozsáhlé, je používána k dělení a identifikaci látek ve vícesložkových směsích, ke kontrole syntézy (odhalí doprovodné nečistoty (rezidua) výchozích produktů syntézy, rozkladné produkty atd.), ke kvantitativní analýze látek ve směsích, ke kontrole životního prostředí, k analýze jednotlivých komponent v tělních tekutinách (hormony, léčiva, jejich metabolity), k biochemické analýze atd.⁽²²⁾

V analýze léčiv má výsadní postavení, je široce využívána ve všech lékopisných monografiích. Hlavními přednostmi jsou současně kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek, dále vysoká citlivost měření, rychlost analýzy, minimální množství vzorku, které je k analýze potřeba a možnost automatizace, která se neustále zdokonaluje, a která dále urychluje průběh analýzy.⁽³⁾

Od klasické HPLC metody jsou odvozeny další metody lišící se jen určitými parametry. Patří mezi ně UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) metoda, která je aplikována při vysokém tlaku (100 MPa a více). Proto jsou používány sorbenty mající vysokou mechanickou pevnost. Kolony jsou speciálně přizpůsobeny vůči vysokému tlaku. Velikost zrn sorbentu je 1,5 µm a je zde mimořádná separační účinnost a krátká doba analýzy.⁽²⁰⁾ Dále vznikla například metoda HTLC (High Temperature Liquid Chromatography), která se od ostatních technik vyznačuje používáním vysokých teplot na kolonách (od 40 °C až k velmi kritickým teplotám).^(23,24)

2.2.1. Vyhodnocování chromatografických křivek (chromatogram)

Ke kvalitativní i kvantitativní analýze slouží chromatografická křivka. Tato křivka se skládá z jednotlivých píků různé výšky a šířky. Pro úspěšnou analýzu na kapalinovém chromatografu je potřeba najít takové chromatografické podmínky (optimální), aby každé složce analyzované směsi, odpovídal jeden ostrý, symetrický pík, jenž je rozdělený na základní linii.^(3,25)

2.2.1.1. Kvalitativní hodnocení

Základní kvalitativní veličinou je retenční čas. Je to doba od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Porovnáním chromatografických dat stanovované látky a standardu (referenční látky) lze potvrdit identitu analyzovaného vzorku. Některé UV detektory umožňují v maximu píku sejmutí UV spektrum, což je po srovnání s UV spektra standardu další identifikační charakteristikou.^(3,6,9)

2.2.1.2. Kvantitativní hodnocení

Kvantitativní veličinou je plocha pod křivkou píku stanovované látky. Tato plocha je přímo úměrná koncentraci stanovované látky. Pro zjištění obsahu látky ve vzorku se nejčastěji využívají metody vnějšího nebo vnitřního standardu.^(3,6)

Metoda vnějšího standardu spočívá v porovnávání píku standardu v jednom nástřiku a píku stanovované látky v nástřiku druhém. Jako vnější standard se obvykle používá standard jedné z analyzovaných složek směsi. Koncentrace látek se vypočítá jako poměr ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.⁽³⁾

Metoda vnitřního standardu spočívá v přidání přesně známého množství vnitřního standardu do vzorku a nástřiknutí této směsi na kolonu. Koncentrace stanovované látky se vypočítá poměrem ploch píků stanovovaných látek ku ploše píku vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a přesnější. Nicméně výběr vhodného vnitřního standardu bývá složitý, protože musí jít o látku mající podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je

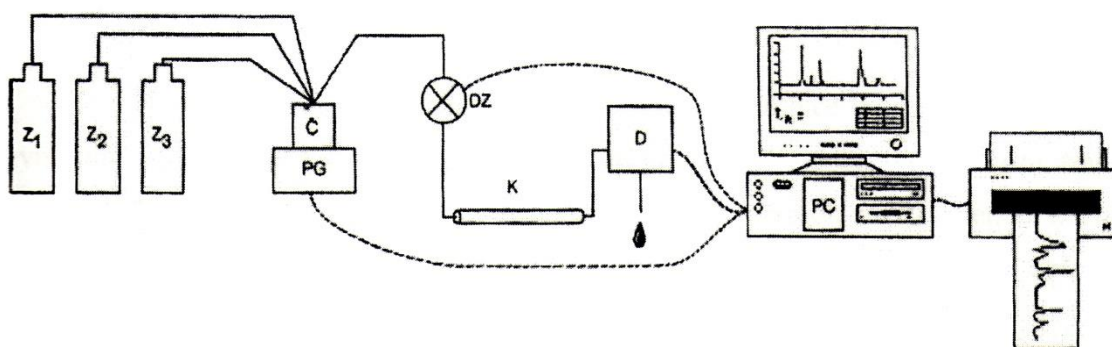
zjišťován, která se bude eluovat v blízkosti píků stanovovaných látek, zároveň od nich ale bude oddělená a nesmí s těmito látkami chemicky reagovat.^(3,6)

2.2.2. Chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které můžeme rozdělit dle jejich funkce na části zajišťující:

- Složení a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo)
- Dávkování vzorku (dávkovač manuální nebo automatický)
- Separaci látek (chromatografická kolona)
- Detekci látek (detektor)
- Registraci signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu (počítač s tiskárnou)

(3,26)



Obr. č. 1: Schéma kapalinového chromatografu

Z₁, Z₂, Z₃ - Zásobníky mobilní fáze

Č - vysokotlaké čerpadlo

PG - programovací jednotka

DZ - dávkovací zařízení

K - chromatografická kolona

D – detektor

PC – počítač Chyba! Záložka není definována.

Mobilní fáze je nasávána buď z jednoho, nebo více zásobníků do vysokotlakého čerpadla. Toto čerpadlo poté zprostředkovává konstantní bezpulsní tok mobilní fáze o malé rychlosti přes dávkovací zařízení do chromatografické kolony. Kolona je napojena přímo na detektor, z něhož jde signál do vyhodnocovacího zařízení.^(3,9)

2.2.2.1. Zásobníky mobilní fáze

Mobilní fáze je při izokratické eluci vedena z jednoho zásobníku, při gradientové eluci se mobilní fáze z více zásobníků míchá dle nastaveného programu ve směšovací zařízení umístěném před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Naprogramovaný směšovač může s využitím zásobníků naplněných různými kapalinami připravovat směsi stálého složení mobilní fáze nebo řídit změny v jejím složení v průběhu separace.^(27,28)

Zásobníky mobilní fáze jsou většinou skleněné, plastové nebo nerezové nádoby. Mívají uzávěr zabraňující unikání par rozpouštědla. Mobilní fáze používané při HPLC analýze musí být velmi čisté (filtrují se) a zbavené rozpuštěných plynů (např. působením ultrazvuku). U moderních kapalinových chromatografů je odplyňovací zařízení (degasser) součástí sestavy.^(26,28)

2.2.2.2. Vysokotlaká čerpadla mobilní fáze

Na čerpadla pro vysokoúčinné chromatografy jsou kladeny vysoké nároky. Musí být z materiálů odolávajících korozi i při použití agresivních mobilních fází. Tyto podmínky splňují např. ocel, titan a keramické materiály. Dále musí být schopna dávkovat mobilní fázi plynule bez kolísání, které by mohlo významně ovlivnit přesnost retenčních časů i ploch píků. Proto je důležité, aby čerpadlo poskytovalo stabilní a bezpulsní tok mobilní fáze. Také musí správně fungovat v širokém rozmezí tlaků (1 - 60 MPa) i průtokových rychlostí (0,1 – 10 ml/min).^(26,28)

Nastavení průtoku mobilní fáze musí být přesné a reprodukovatelné. Vnitřní objem čerpadel by měl být co nejmenší pro rychlou výměnu mobilní fáze nebo práci s gradientovou elucí.⁽⁸⁾

2.2.2.3. Dávkovací zařízení vzorků

Konstrukce dávkovacího zařízení významně ovlivňuje účinnost separace. Při nestejném dávkování vzorku na kolonu může dojít k významným změnám elučních zón. V současné době je nejpraktičtější a nejčastěji používaným typem dávkovacího zařízení automatický dávkovač (autosampler). Autosampler umožňuje konstantní aplikaci vzorku na kolonu bez přerušování toku mobilní fáze. Je spojen se zásobníkem vzorků, kde jsou umístěny mikronádobky (vialky), z kterých autosampler odebírá pomocí jehly dokonale rozpuštěný vzorek.^(8,27,29)

2.2.2.4. Kolony používané v HPLC

Chromatografická kolona je trubka nebo kapilára o délce 10 - 25 cm a vnitřním průměru 3 - 5 mm rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony musí být zkonstruován tak, aby udržel stacionární fází, byl chemicky inertní a odolný vůči vysokému tlaku. Nejčastěji používaný materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, sklo, vzácněji titan nebo organický polymer tzv. (polyetheretherketon).^(3,29,30)

Kolona je vyplněna vhodným sorbentem (stacionární fáze), kde dochází k separaci zkoumaných látek.

- a) Nejčastěji je používána chemicky vázaná stacionární fáze, jejíž základ je tvořen oxidem křemičitým (silikagel). Na hydroxylové skupiny silikagelu jsou navázány různé typy radikálů. Z nepolárních chemicky vázaných fází se jedná o uhlovodíkový řetěz obsahující 8 popř. 18 atomů uhlíku. U polárních fází je součástí radikálu např. skupina –NH₂ nebo –CN.⁽³⁾

Fyzikálně chemické vlastnosti silikagelu byly zmodernizovány a vylepšovány. Mezi novinky této stacionární fáze patří:

- Fused-Core: technologie tzv. pevného jádra se liší v užším rozložení porézních částic, větší hustotou rozložených vrstev a kratší cestou difuze, což vede ke zrychlení analýzy, ostřejším píkům, větší citlivosti a zvýšení rozlišení metody.
 - HS F5 kolony: vylepšení této kolony spočívá v navázání pentafluorofenylpropylové skupiny na silikagel, které poskytují vysokou selektivitu, ostré píky, stabilní separaci a reprodukovatelný výkon.
 - RP-Amide kolony: tato stacionární fáze se odlišuje zasazením amidové skupiny do řetězce C18, jenž je připojena na silikagel. Oproti klasické koloně C18 dokáže separovat malé, ve vodě rozpustné molekuly, což je u C18 díky své nízké smáčivosti mobilními fázemi, které mají převažující vodnou složku, obtížné. (31)
- b) Dále byly vyvinuty kolony tvořené oxidem zirkoničitým, jejichž výhodou je oproti silikagelu stabilita vůči různým hodnotám pH.
- c) Dalším pokrokem v HPLC analýze byla výroba monolitických kolon tvořených z jednoho kusu pórovitého materiálu. Jsou tvořeny dvěma typy pórů – makropóry zajišťující rychlý tok mobilní fáze skrz kolonu a zrychlují distribuci vzorku mezi pohyblivou a nepohyblivou fází a mesopóry poskytující velký povrch a tím i vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje nastavit vysokou rychlost protékající mobilní fáze bez příliš zvýšeného tlaku a bez ztráty separační účinnosti.^(29,32)

2.2.2.5. Detektory pro HPLC

Selektivita a citlivost HPLC analýzy závisí na detektoru, který je použit. Jeho funkcí je monitorování látky vycházející z kolony a převedení její kvantitativní hodnoty na proporcionálně závislý elektrický signál, který je dále registrován vyhodnocovacím zařízením.^(3,10)

Typy detektorů:

- Spektrofotometrický

Dnes nejčastěji používaným detektorem v metodě HPLC je detektor spektrofotometrický. Měří absorpenci elektromagnetického záření eluátu, který prochází celou detektorem. Výhodou je, že většina látek je schopna absorbovat v ultrafialové nebo viditelné oblasti (absorpce světla je podmíněna přítomností chromoforu v dané látce, který se právě v detekovaných léčivech často objevuje), proto je možné ho ve velké většině případů pro detekci použít.^(3,33)

Existuje několik typů spektrofotometrických detektorů:

-UV detektor s fixní vlnovou délkou, při které absorbuje většina léčiv (254 nebo 280 nm).

-UV-VIS detektor s nastavitelnou vlnovou délkou dle aktuální potřeby daného vzorku.

-scanning UV detektor dokáže snímat absorpční spektrum látky v maximu jejího píku.^(3,33)

-diode array detektor snímá celé spektrum v reálném čase, má nastavitelnou vlnovou délku v průběhu analýzy, záznam dat je vysílán formou trojrozměrné projekce.^(3,34)

- Fluorimetrický

Tento detektor je použitelný, pokud analyzované léčivo vykazuje fluorescenci (schopnost látek absorbovat záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce). Některé látky, které tuto schopnost postrádají, lze derivatizovat na fluoreskující deriváty.^(3,27)

- Refraktometrický

Tento druh funguje na základě rozdílného indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze unášející separovanou látku. Jsou univerzální, ale nevýhodou je jejich malá citlivost.⁽³⁾

- Elektrochemický

Princip tohoto detektoru je postaven na elektrochemické reakci na rozhraní elektroda – eluent. Detekovat se dají látky mající schopnost oxidace nebo redukce. Měří se elektrický proud procházející mezi polarizovatelnou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém elektrickém napětí.^(3,25)

- Hmotnostní spektrometr (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů.

V současné době je při detekci léčiv velmi často praktikováno spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Mimo kvalitní detekce poskytuje MS řadu údajů usnadňující určení identifikace jednotlivých složek analyzované směsi.

Po opuštění HPLC kolony eluentem je třeba odstranit mobilní fázi a molekuly léčiva převést do plynného stavu. Ve hmotnostním spektrometru jsou dále molekuly analyzované látky ionizovány, načež jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli rozděleny podle hmotnosti a náboje. Výsledkem je zaznamenané hmotnostní spektrum nabitých částic, viz výše.^(3,35)

2.2.2.6. Zařízení pro záznam a zpracování dat

K zaznamenání a vyhodnocování dat se používají počítače se speciálním softwarem, kterým lze ovládat téměř veškeré parametry chromatografu. Metodu lze tak provádět za předem optimalizovaných podmínek.⁽²⁵⁾

2.3. VALIDACE METODY

2.3.1. Validace analytických metod

Analytické metody používané pro hodnocení léčiv musí být vhodné, přesné a spolehlivé. Tyto vlastnosti musí být experimentálně ověřené a doložené. Proces zabývající se touto součástí analytické metody se nazývá validace.

Validace sestává ze série experimentů, které zjišťují nejpodstatnější charakteristiky metody. Cílem je vymezit hranice, ve kterých je metoda vhodná a použitelná a zajistit tak, aby se při její opakované aplikaci dostávalo spolehlivých výsledků.⁽³⁶⁾

Validace je prováděna při vývoji nové analytické metody, dále pokud byla metoda změněna a také jestliže má být přenesena do jiné laboratoře. Zjištěné hodnoty validačních parametrů se

zapracují do validačního protokolu, jehož součástí je i dokumentace vypovídající o výsledcích validačních parametrů.

Způsob, jakým je validace provedena, se odvíjí podle předpokládaného využití dané metody. Není vždy nutné ověřovat veškeré validační parametry.⁽³⁾

Obecné analytické parametry ověřované při validaci metod jsou:

2.3.1.1. Přesnost

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s jedním vzorkem. Přesnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD), která se stanoví z minimálně šesti analýz zhomogenizovaného vzorku. Analýza musí být provedena kompletním postupem včetně samotné přípravy vzorku.

Relativní směrodatná odchylka je definována jako rozptyl jednotlivých hodnot od průměru a vypočítá se ze vztahu:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Podle podmínek se rozlišují tři úrovně přesnosti:

- Opakovatelnost – metoda se provádí stejným způsobem, jedním pracovníkem, se stejnými činidly, na tomtéž přístroji a stejným zhomogenizovaným vzorkem. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře.
- Mezilehlá přesnost - provádí se s různými činidly, různými pracovníky i přístroji v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným zhomogenizovaným vzorkem.
- Reprodukovatelnost – metoda se provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku, ale v různé laboratoři, s různými činidly a na různých přístrojích. Jde tedy o přesnost při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé.^(3,36,37)

2.3.1.2. Správnost

Správnost je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Existují tři možnosti zjištění správné hodnoty. Zjistí se buď úplně jinou, nezávislou (referenční) metodou, jejíž správnost již byla ověřena, nebo analýzou modelového vzorku (placebo s přidaným standardem), popř. není-li k dispozici placebo, analýzou vzorku s přídatkem standardní látky. Jde o shodu naměřených výsledků a skutečných hodnot analýzy minimálně šesti vzorků. Tato shoda se označuje jako výtěžnost (recovery) a vypočítá se níže uvedeným vzorcem.^(3,37)

$$\text{Výtěžnost (\%)} = \frac{\text{naměřená hodnota} \times (100)}{\text{skutečná hodnota}}$$

2.3.1.3. Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Je požadováno stanovení minimálně pěti různých koncentrací v rozmezí 50 až 150% deklarované obsahu

analyzované látky. Roztoky je možné připravit ze standardů, jelikož rušivé vlivy, které by se mohly projevit při použití reálného vzorku, jsou hodnoceny jinými validačními parametry. Linearita metody se může doložit graficky. Graf (kalibrační křivka) vypovídá o závislosti výsledků (plochy píků) na koncentraci analyzované látky. Linearitu lze doložit též matematicky díky výsledkům lineární regrese analýzy. Uvádí se korelační koeficient (míra linearity), směrnice citlivosti a y-úsek (míra vedlejších vlivů).

Je-li metoda lineární, můžeme určit směrnici z jednoho kalibračního bodu, pokud tomu tak není, je potřeba vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky.^(3,36,38)

2.3.1.4. Rozsah

Tento parametr je odvozován z linearity. Je to interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky, v němž je látka stanovena s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace.⁽³⁶⁾

2.3.1.5. 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. Cílem je upozornit na vliv kolísání proměnných podmínek, které mohou ovlivnit výsledky metody, i když popsaný postup zůstává zachován. Při kapalinové chromatografii jsou typické proměnné: vliv změny pH mobilní fáze, vliv změn složení mobilní fáze, teplota, průtoková rychlost, jiná šarže kolon nebo chemikálií. Není nutné zkoumat všechny parametry u každé metody, záleží na účelu použití dané metody a stejně jako přijatelnost získaných hodnot parametrů, i jejich výběr musí posoudit analytik.^(3,36)

V této rigorózní práci jsou výsledky parametrů, kterými se testuje robustnost, vyjádřeny pomocí kapacitního faktoru. Kapacitní faktor (= hmotnostní distribuční objem) vyjadřuje míru sorpce analytu na koloně, tedy schopnost látky dělit se mezi dvě fáze. Vyjadřuje tak kapacitu kolony. K výpočtu je potřeba retenční čas (kapitola 2.2.1.1.) a tzv. mrtvý retenční čas, což je retenční čas inertní složky, která není v koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze – projde kolonou nejrychleji.^(39,40)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R – retenční čas

t_M – mrtvý čas

2.3.1.6. Selektivita

Selektivita je schopnost metody udávat správné a specifické výsledky analýzy zkoumané látky v přítomnosti látek jiných. Metoda nesmí být rušena dalšími složkami kombinovaného přípravku, pomocnými látkami v placebo, nečistotami z výroby, rozkladnými produkty,

zbytkovými rozpouštědly nebo neznámými látkami. U metod hodnotících stabilitu musí být doloženo oddělení rozkladných produktů.

Tento parametr se doloží rozdílem analýzy standardu bez nečistot a standardu s přidanými rozkladnými produkty, složkami placeba nebo různými nečistotami, dále např. rozdílem kompletního vzorku a vzorku bez analyzované látky obsahující všechny další složky přípravku. Tento rozdíl není třeba dokládat číselně, postačí chromatogramy s vybranou srovnávací analýzou (chromatogram placeba, rozkladných produktů atd).^(3,36)

2.3.1.7. Detekční limit

Detekčním limitem je vyjádřena citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky. U instrumentálních metod se tento limit může určit jako taková koncentrace látky, kdy má poměr signál k šumu hodnotu 3. Tato hodnota je získána z údajů o výšce píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku a o rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získané při slepé zkoušce.^(3,39)

2.3.1.8. Kvantitativní limit

Tento parametr také udává citlivost metody. Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu.⁽³⁾

2.3.2. Test způsobilosti chromatografické metody (System suitability test)

Při každém dalším použití nově vyvinuté validované metody se už validace neopakuje. Je potřeba otestovat speciální kritéria, která musí být splněna, aby bylo možné danou analytickou metodu spolehlivě použít. Zformování těchto kritérií je dalším cílem validačního procesu. Tato kritéria se nazývají test způsobilosti analytického (chromatografického) systému.⁽³⁶⁾

Pokud v konkrétním případě (v lékopisné monografii) není uvedeno jinak, testuje se faktor symetrie píku, maximální povolená RSD, mez detekce píku a mez stanovitelnosti. Mezi povolené změny chromatografických podmínek patří složení mobilní fáze (poměr, pH, koncentrace solí), u stacionární fáze je povolena změna délky kolony o $\pm 70\%$, změna vnitřního průměru kolony o $\pm 25\%$ a zmenšení velikosti částic až o 50% , průtoková rychlost může být upravena o $\pm 50\%$, teplota zvýšena nebo snížena o 10% (nejvýše však $60\text{ }^\circ\text{C}$) a velikost nastříkovaného objemu může být zmenšena.⁽³⁹⁾

2.4. Vlastnosti zkoumaných látek

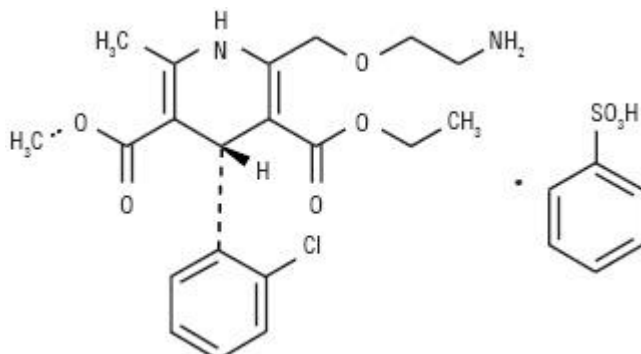
Léčivý přípravek, který představuje kombinaci amlodipinu a atorvastatinu, je indikován pro prevenci kardiovaskulárních příhod u pacientů s hypertenzí, u nichž se současně vyskytuje více kardiovaskulárních rizikových faktorů, a kteří mají mírně zvýšenou hladinu cholesterolu v plazmě.⁽⁴¹⁾

2.4.1. Amlodipin

2.4.1.1. Fyzikálně - chemické vlastnosti

Název: Amlodipini besilas (Amlodipin - besylát)⁽⁴²⁾

Strukturní vzorec:⁽⁴³⁾



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

Relativní molekulová hmotnost je 567,05.

Vzhled: Amlodipin-besylát je bílý nebo téměř bílý prášek.

Rozpustnost: těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v bezvodém ethanolu a těžce rozpustný v 2-propanolu.

Zkoušky totožnosti: IČ, UV, HPLC.

Zkoušky na čistotu: optická otáčivost, zkouška na příbuzné látky (pomocí TLC, HPLC), přítomnost vody (semimikrostanovením vody), limitní stanovení síranového popela.

Stanovení obsahu: pomocí HPLC - poměr ploch píků vzorku a amlodipin-besylátu CRL.

Skladování: ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.⁽⁴²⁾

2.4.1.2. Farmakologické vlastnosti

Terapeutická Indikace

Antihypertenzivum amlodipin je dihydropyridinový blokátor kalciových kanálů 3. generace. Všechny v současnosti používané blokátory vápníkových kanálů mají terapeutické uplatnění u pacientů s hypertenzí, chronickou stabilní anginou pectoris, Prinzmetalovou anginou, srdeční arytmií a chronickým srdečním selháním.^(44,45)

Dávkování

Pro hypertenzi i anginu je úvodní dávkou 5 mg amlodipinu denně perorálně. Dávka může být zvýšena na 10 mg denně v závislosti na odpovědi pacienta.

Kontraindikace

Terapie amlodipinem je kontraindikována u pacientů s precitlivělostí na pyridinové deriváty, hypotenzí, kardiogenním šokem, obstrukcí výtokové části levé komory a po nestabilním srdečním selhání.

Nežádoucí účinky

Nejčastěji hlášenými nežádoucími účinky během léčby byla ospalost, závrať, bolest hlavy, palpitate, zčervenání, bolest břicha, nevolnost, otok kotníků, edém a únava.

Farmakodynamické vlastnosti

Amlodipin inhibuje transmembránový vstup kalciových iontů do buněk hladkého svalstva cévních stěn a do srdečních buněk. Mechanismus antihypertenzního působení amlodipinu vyplývá z jeho relaxačního účinku na hladkou svalovinu cévní stěny. Jeho působením jsou rozšiřovány periferní arterioly, čímž se sníží celková periferní rezistence. Toto snížení srdeční zátěže zajišťuje nižší spotřebu energie a menší nároky myokardu na přísun kyslíku. Mechanismus účinku amlodipinu zahrnuje také dilataci koronárních tepen a arteriol.

Farmakokinetické vlastnosti

Při perorálním podání je amlodipin dobře absorbován. Nejvyšší plasmatické koncentrace je dosaženo za 6 -12 hodin od podání. Jeho biologická dostupnost je 64 - 80 %. Distribuční objem je asi 21 l/kg. Přibližně 97,5% amlodipinu v krevním oběhu je vázáno na plasmatické bílkoviny. Eliminační poločas se pohybuje v rozmezí 35 - 50 hodin. Amlodipin je ve větší míře metabolizován v játrech na neaktivní metabolity. Močí je vylučováno 60 % metabolitů a 10 % nezměněného léčiva.⁽⁴⁵⁾

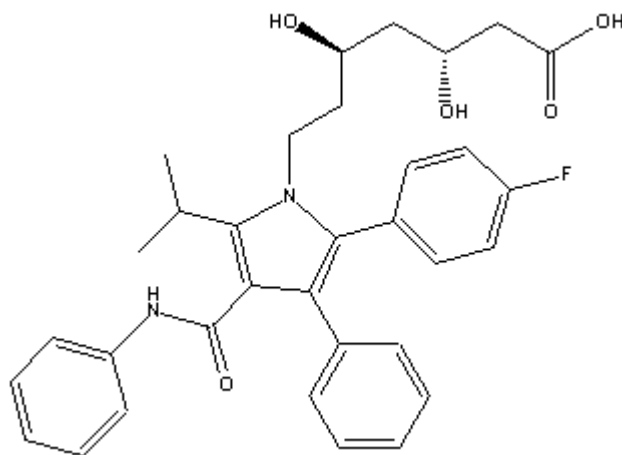
2.4.2. Atorvastatin

2.4.2.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Název: Atorvastatinum

(v přípravcích bývá ve formě soli atorvastatinum calcicum trihydricum)⁽⁴⁶⁾

Strukturní vzorec:⁽⁴⁷⁾



Definice: Je to ((3R,5R)-7-[3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-(4-fluorfenyl)-5-isopropyl-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxy-heptanová kyselina⁽⁴⁸⁾

Relativní molekulová hmotnost je 558,65.

Vzhled: Je to bílý krystalický prášek.

Rozpustnost: je nerozpustný ve vodě při pH 4 a nižším, velmi těžce rozpustný v destilované vodě, ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a v acetonitrilu, těžce rozpustný je v ethanolu, snadno rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti: IČ, HPLC, vizuální zkouška (pyrolýza)

Zkoušky na čistotu: limitní zkoušky na sodíkové ionty, těžké kovy a příbuzné látky pomocí HPLC

Stanovení obsahu: pomocí HPLC ⁽⁴⁵⁾

2.4.2.2. Farmakologické vlastnosti

Terapeutická indikace

Hypolipidemikum atorvastatin je kompetitivním inhibitorem hlavního enzymu biosyntézy cholesterolu, jímž je HMG-CoA reductáza. Je indikován jako doplněk k nízkocholesterolové dietě, ke snížení celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu u dospělých s hypercholesterolemií a také jako prevence kardiovaskulárních příhod u rizikových pacientů.^(44,49)

Dávkování

Než je nasazena léčba atorvastatinem, je třeba, aby pacient dodržoval nízkocholesterolovou dietu, ve které je třeba pokračovat po celou dobu léčby tímto hypolipidemikem. Dávka je zvolena individuálně na základě hodnot LDL-cholesterolu v krvi. Dále bývá upravována dle odezvy pacienta na léčbu.

Dávka se užívá perorálně ve večerních hodinách a pohybuje se mezi 10 – 80 mg denně.

Kontraindikace

Léčba atorvastatinem není doporučena pacientům s přecitlivělostí na statiny, v případě jaterního onemocnění, v těhotenství, laktaci a u žen ve fertilním věku, které neužívají vhodnou antikoncepci.

Nežádoucí účinky

Z nejčastějších nežádoucích účinků se může objevit zánět nosních cest, alergické reakce, zvýšení hladiny cukru v krvi, zvýšení hladiny kreatinkinázy v krvi, bolest hlavy, nevolnost, zácpa, plynatost, trávicí obtíže, průjem, bolest kloubů, bolest svalů, bolest zad, nespavost, závrať, pocit necitlivosti nebo mravenčení v prstech, poruchy chuti, ztráta, zastřené vidění, zvonění v uších, vyrážka, únava a další.

Farmakodynamické vlastnosti

Atorvastatin je kompetitivním inhibitorem HMG-CoA reductázy. Tento enzym katalyzuje přeměnu z 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzymu A na kyselinu mevalonovou, která je prekurzorem všech sterolů – cholesterol nevyjímaje. Atorvastatin snižuje hladinu cholesterolu a lipoproteinů v krevní plazmě mechanismem inhibice HMG-CoA reductázy a inhibice syntézy cholesterolu v játrech, také zvyšuje počet LDL receptorů na povrchu jaterních buněk, čímž je urychlena absorpce a rozklad LDL.

Farmakokinetické vlastnosti

Atorvastatin je po perorálním podání rychle absorbován. Maximální koncentrace v plazmě je dosaženo po 2 hodinách. Má poměrně nízkou systémovou dostupnost, která je připisována presystémové clearance na sliznici gastrointestinálního traktu a také first-pass metabolismu v játrech.

Atorvastatin je z téměř 99 % vázán na plazmatické bílkoviny. Metabolizace probíhá na cytochromu P450 3A4, což je důvod mnohých interakcí s jinými léčivými. Přibližně 70 % inhibiční aktivity HMG-CoA reductázy je připisováno aktivním metabolitům, na které je atorvastatin transformován. Atorvastatin je vylučován žlučí po hepatální a extrahepatální metabolizaci. Eliminační poločas atorvastatinu z plazmy je přibližně 14 hod.⁽⁴⁹⁾

2.5. Práce zabývající se amlodipinem a atorvastatinem nebo jejich kombinací s jinými léčivými

- A. K. Sharma a A. Dharamsi vyvinuli RP-HPLC analýzu atorvastatinu a amlodipinu v jednom léčivém přípravku. Stacionární fází byla kolona C18 (Phenomenex fenyl hexyl) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm a velikosti částic 5 um. Jako mobilní fáze byla použita směs vody s triethylaminem (0,4 %) a acetonitrilu s pH upraveným na 5,2 pomocí kyseliny fosforečné o průtoku 1 ml/min. Detekce UV detektorem byla provedena při vlnové délce 229 nm.⁽⁵⁰⁾
- A. Manzoor, Y. N. Manohara, M. C. Ravi vyvinuli a validovali HPLC pro současné stanovení atorvastatinu a amlodipin besylátu kombinované lékové formě. Navržená metoda RP - HPLC využívá kolonu C18, jejíž rozměry jsou 250 mm x 4,6 mm a velikost částic 5 um. Mobilní fáze měla složení octan amonný (0,05 mol/l) - acetonitril v poměru 55:45 s hodnotou pH upravenou na 6,1. UV detekce probíhala za vlnové délky 238 nm.⁽⁵¹⁾
- Saurabh K. Sinha, Prabhat K. Shrivastava a Sushant K. Shrivastava se zabývali RP-HPLC metodou pro simultánní analýzu amlodipinu a telmisartanu v kombinovaném léčivém přípravku. Chromatografické separace bylo dosaženo s použitím mobilní fáze acetonitril - dihydrogenfosforečnan sodný (0,05 mol/l) v poměru 60:40 upraveno na pH 6 na koloně C18 (Perfectsil) s rozměry 150 mm x 4,6 mm a velikosti částic 5 um. Mobilní fáze prochází systémem o průtokové rychlosti 0,8 ml/min a eluáty byly detekovány při vlnové délce 254 nm.⁽⁵²⁾
- R. Suresh, R. Manavalan a K. Valliappan se zabývali optimalizací metody RP-HPLC pro stanovení amlodipinu, ezetimibu a atorvastatinu zároveň v komerčních léčivých přípravcích. Mobilní fáze skládá z acetonitrilu, fosfátového pufru (20 mmol/l) a methanolu v poměru (36,74 : 20 : 43,26). Rychlost toku mobilní fáze je 1,2 ml/min a její pH je 5.⁽⁵³⁾
- Maha Abdalla Alnowaiser popsal vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii pro simultánní analýzu tablet obsahujících amlodipin a atorvastatin. Chromatografická separace bylo dosaženo použitím kolony Perfectsil s rozměry 4,6 cm x 250 mm a velikostí částic 5 um a mobilní fáze, kterou tvoří acetonitril a fosfátový pufr o pH 4,5 v poměru 55:45 při průtoku 1 ml/min. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 237 nm.⁽⁵⁴⁾

- H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem a B. A. El-Zeany vyvinuli podmínky pro RP - HPLC stanovení amlodipinu, valsartanu a hydrochlorothiazidu v jedné tabletě. Kompletní separace bylo dosaženo použitím kolony C18 (Nucleosil) a mobilní fáze skládající se z acetonitrilu, methanolu a isopropylalkoholu v poměru 55 : 41 : 4, jejíž pH se upraví na $8 \pm 0,1$ pomocí triethylaminu. Průtoková rychlost byla 1,2 ml/min. Detekční vlnové délky jsou 238, 248 a 271 nm pro amlodipin, valsartan a hydrochlorothiazid.⁽⁵⁵⁾
- K. Sharma, Y. Sharma a P. Sharma pracovaly na spektrofotometrické metodě pro současné stanovení vápenaté soli atorvastatinu a amlodipin-besylátu v jedné tabletě. Tato metoda využívá fosfátový pufr o pH 6,8. Maximální absorbance atorvastatinu je při vlnové délce 240 nm a amlodipinu při 369 nm.⁽⁵⁶⁾
- B. A. Moussa, A. A. El-Zaher, M. A. Mahrouse a M. S. Ahmed pracovali s tabletami léčivého přípravku Caduet, jenž spojuje amlodipin-besylát a atorvastatin. Vyvíjeli metodu spojující spektrofotometrii a HPLC pro současné stanovení obou léčivých látek. V metodě HPLC byly látky separovány na koloně C18 za použití směsi acetonitril : fosfátový pufr (0,015 mol/l) o pH 3 v poměru 45 : 55. Detekce fluorescence byla provedena s použitím excitační vlnové délky 361 a 274 nm a emisní vlnové délky 442 a 378 nm.⁽⁵⁷⁾
- S. Imre, K. Kacsó a D. L. Muntean se zabývaly simultánním stanovením atorvastatinu a amlodipinu v hromadně vyráběných tabletách kvantitativní spektrofotometrickou metodou a metodou HPLC s UV detekcí metodou gradientové eluce. Použili stacionární fázi Luna C18 (150 × 4.6 mm, 3 μm, Phenomenex). Mobilní fází byla směs dihydrogenfosforečnanu draselného (0,010 mol/l) s acetonitrilem a protékala rychlostí 1 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm.⁽⁵⁸⁾

3. CÍL PRÁCE

Tato práce navazuje na diplomovou práci, ve které byly optimalizovány chromatografické podmínky pro současnou HPLC analýzu amlodipinu a atorvastatinu a stanovení jejich obsahu v kombinovaném léčivém přípravku (tabletech). Cílem rigorózní práce bylo tuto metodu validovat. Optimalizovaná metoda byla validována z hlediska robustnosti, přesnosti, správnosti, linearity a selektivity.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

Acetonitril, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

Amlodipin-besilát, Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Atorvastatin, Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Brno, Česká republika

Jodid draselný, Lachema, Brno, Česká republika

Kyselina octová, p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika

Kyselina o-fosforečná 85 %, p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika

Methanol, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

Propylparaben, Fluka, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

4.1.2. Přístroje

Analytické váhy KERN ALS-220-4N, Německo

Ultrazvuková lázeň K 10, Kraitex, Slovensko

Acidimetr 333 Druopta Praha, Česká republika

Centrifuga IEC CL 31R Multispeed, Thermo Electron Corporation, Francie

Laboratorní magnetická míchačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Kapalinový chromatograf Prominence, Shimadzu, Japonsko složený z modulů:

- DGU-20A3
- LC-20AD
- SIL-20AC
- CBM-20A
- SPD-20A
- CTO-20AC
- Chromatografický software: LC Solution Version 1.22 SP1
- Chromatografická kolona: 125 x 4 mm I.D. s náplní Nucleosil 120-5 C18, Macherey-Nagel, Německo

4.1.3. Pomůcky

Filtrační papír

Laboratorní sklo

Lžičky

4.2. Chromatografické podmínky validované metody

V diplomové práci,⁽⁵⁹⁾ na kterou je zde navazováno, byly nalezeny chromatografické podmínky pro HPLC analýzu tablet obsahujících kombinaci léčivých látek, jimiž jsou

amlodipin-besylát a atorvastatin. Jako stacionární fáze byla zvolena chromatografická kolona 125x4 mm I.D. s náplní Nucleosil 120-5 C18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného 0,025 mol/l o poměru 55 : 45, jenž byla 85 % kyselinou fosforečnou upravena na pH 4,4. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml/min. Vzorky byly nanášeny na kolonu o objemu 20 µl. Vnitřním standardem byl zvolen propylparaben. Analyzované látky byly detekovány UV-VIS detektorem při vlnové délce $\lambda = 210$ nm. Pro stanovení obsahu účinných látek v léčivém přípravku byla využita metoda kalibrační křivky.

4.3. Provedení linearity

Linearita byla ověřena metodou kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla vytvořena za pomoci 5 pracovních roztoků. Vzorek č. 3 složením odpovídá kombinovanému léčivému přípravku.

- Pracovní roztoky pro sestrojení kalibrační křivky:

Pomocí zásobních roztoků (o koncentraci 1 mg/ml pro amlodipin, atorvastatin i vnitřní standard propylparaben) bylo připraveno pět pracovních roztoků do odměrných baněk o objemu 10 ml. V jednotlivých roztocích se postupně zvyšuje koncentrace amlodipinu a atorvastatinu, koncentrace propylparabenu zůstává konstantní. Roztoky byly doplněny mobilní fází po rysku odměrné baňky. Složení pracovních kalibračních roztoků je rozepsané v níže uvedené tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Koncentrace jednotlivých složek v porovnávacích roztocích pro sestrojení kalibrační křivky

Roztok číslo	Amlodipin [mg/ml]	Atorvastatin [mg/ml]	Propylparaben [mg/ml]
1	0,025	0,05	0,05
2	0,04	0,075	0,05
3	0,05	0,1	0,05
4	0,06	0,125	0,05
5	0,075	0,15	0,05

4.4. Provedení přesnosti

Přesnost byla provedena na úrovni opakovatelnosti. Příprava jednoho vzorku byla šestkrát zopakována a každý z nich byl třikrát nastříkovan na kolonu.

Nejprve bylo zváženo 10 tablet kombinovaného léčivého přípravku. Hmotnost těchto zhomogenizovaných tablet byla vydělena jejich celkovým počtem, čímž byla zjištěna průměrná hmotnost jedné tablety. Poté byly tablety v třence rozdrobeny na prach. Navážení množství, které odpovídá jedné tabletě, bylo připraveno šest roztoků. Nejprve byla každá

navážka převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml, dále bylo přidáno 5 ml vnitřního standardu propylparabenu o koncentraci 1 mg/ml. Tato směs byla rozpuštěna v methanolu a poté na 5 minut vložena do ultrazvukové lázně. Následně byla směs doplněna po rysku odměrné baňky methanolem. Po promíchání byl roztok centrifugován 5 minut při 5000 otáčkách. Nakonec byl supernatant převeden do vialky a analyzován v chromatografu.

Tabulka č. 1: Příprava vzorků pro přesnost

Vzorek číslo	Navážka prachu z tablet (g)
1	0,1035
2	0,1036
3	0,1032
4	0,1034
5	0,1035
6	0,1034

Průměrná hmotnost jedné tablety byla 0,10347 g.

4.5. Provedení správnosti

Parametr správnosti byl prověřen analýzou modelového vzorku, tedy použitím placeba léčivého přípravku s přídatkem množství standardu účinné látky, které deklaruje výrobce. Pro hodnocení správnosti bylo připraveno 6 vzorků následujícím postupem. Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo placebo. Množství placebo bylo vypočítáno takto: od průměrné hmotnosti tablety byly odečteny hmotnosti účinných látek v jedné tabletě. Tedy k 0,0884 g placebo bylo přidáno 5 ml zásobního roztoku amlodipinu o koncentraci 1 mg/ml a 10 ml zásobního roztoku atorvastatinu o koncentraci 1 mg/ml. Výsledná směs byla rozpuštěna v methanolu a následně extrahována 5 minut ultrazvukem. Poté bylo ke směsi přidáno 5 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/ml a dále byla odměrná baňka doplněna po rysku methanolem a promíchána. 10 ml směsi bylo pak vloženo do centrifugy na 5 min při 5000 otáčkách. Odebraný supernatant byl ve vialkách analyzován. Každý vzorek byl pětkrát nastříknut na kolonu v množství 20 ul.

4.6. Provedení robustnosti

Robustnost metody byla prověřována změnami 3 různých podmínek chromatografické analýzy. Na kolonu byl vždy nastříknutý vzorek odpovídající složení tablety Caduet s přídatkem známého množství vnitřního standardu. Vzorek měl tedy konstantní složení, měněny byly parametry mobilní fáze.

Pro následné výpočty kapacitních faktorů, jimiž byla robustnost metody porovnávána, bylo třeba určit mrtvý čas. Navážením 10 mg jodidu draselného do 10 ml odměrné baňky doplněné methanolem po rysku, byl připraven roztok o koncentraci 1mg/ml, který byl třikrát nastříknut na kolonu. Průměrnou hodnotou retenčních časů této analýzy, byl vypočten mrtvý čas.

4.6.1. Změna pH mobilní fáze

Změna pH mobilní fáze byla prováděna jejím postupným okyselením zředěnou kyselinou fosforečnou v rozmezí pH 3 - 6.

4.6.2. Změna poměru složek mobilní fáze

Obměna mobilní fáze byla provedena změnou poměrů acetonitrilu a vodného pufru, jímž byl hydrogenfosforečnan sodný. Poměr acetonitrilu byl postupně zvyšován od 50 do 60 % jeho obsažení v mobilní fázi.

4.6.3. Změna koncentrace pufru mobilní fáze

Obsah hydrogenfosforečnanu sodného byl postupně zvyšován v rozmezí koncentrací 0,02 – 0,03 mol/l.

4.7. Provedení selektivity

Pro hodnocení selektivity byl připraven jeden pracovní roztok. Bylo naváženo množství placebo, která odpovídá hmotnosti jedné tablety. Z této navážky byl připraven zkušební roztok přesně podle postupu v kapitole 4.4. s vynecháním přídatku účinných látek a vnitřního standardu.

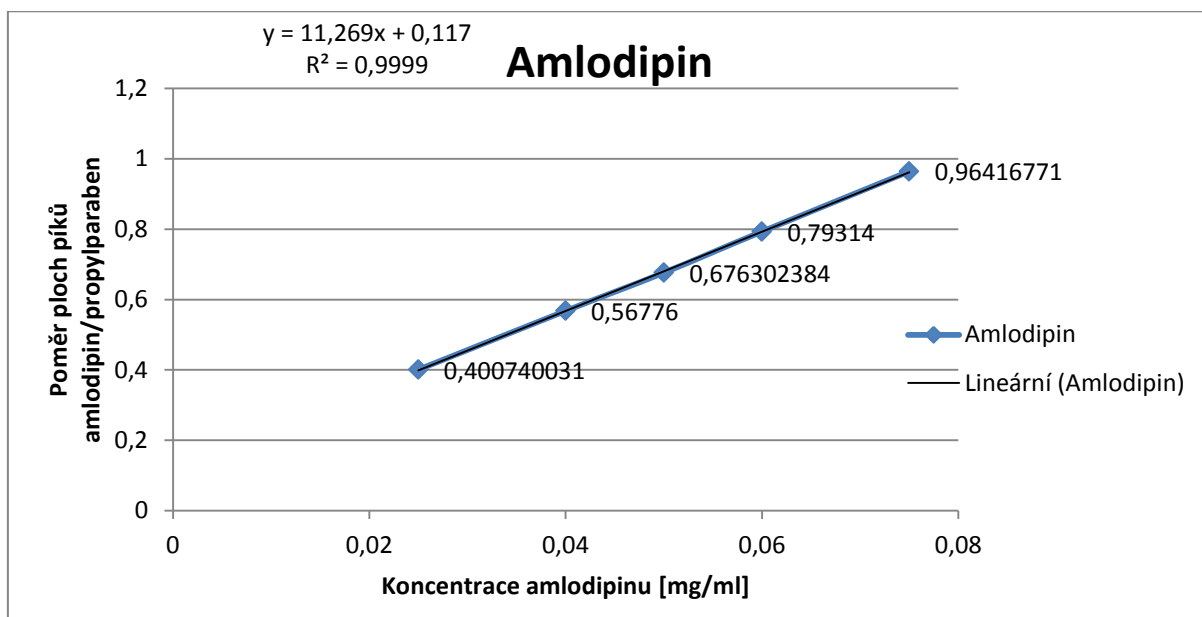
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Linearita

Pro potvrzení linearity bylo třeba připravit 5 pracovních vzorků o složení pohybujícím se v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného množství amlodipinu i atorvastatinu v léčivém přípravku. Každý pracovní roztok byl analyzován pětkrát. Pomocí chromatografických záznamů byly sestrojeny dvě kalibrační křivky. Každá z nich vyjadřuje závislost poměru ploch zkoumané látky k vnitřnímu standardu na koncentraci dané látky.

Tabulka č. 3: Hodnoty amlodipinu potřebné pro sestrojení kalibrační křivky

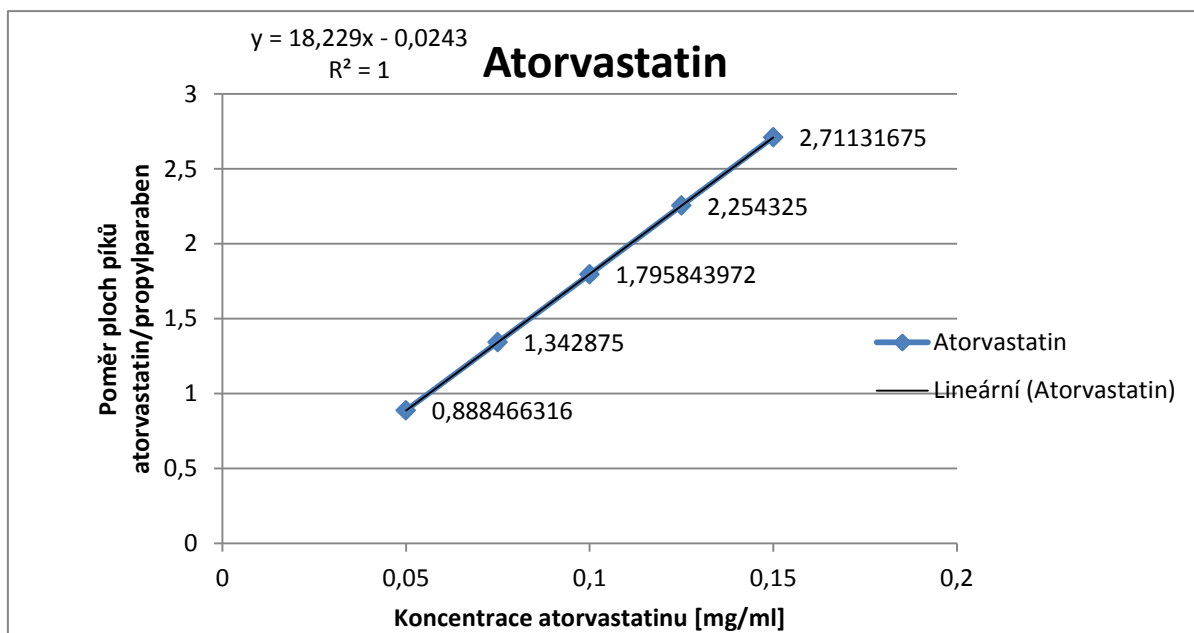
Koncentrace amlodipinu AM [mg/ml]	Koncentrace vnitřního standardu IS [mg/ml]	Číslo měření	Poměr ploch píků A_{AM} / A_{IS}	Průměrná hodnota A_{AM} / A_{IS}
0,025	0,05	1	0,402063	0,40074
		2	0,398806	
		3	0,402214	
		4	0,399878	
		5	0,40074	
0,04	0,05	1	0,56172	0,56776
		2	0,55781	
		3	0,56109	
		4	0,56074	
		5	0,59744	
0,05	0,05	1	0,679005	0,676302
		2	0,686926	
		3	0,670879	
		4	0,671763	
		5	0,67294	
0,06	0,05	1	0,79101	0,79314
		2	0,78989	
		3	0,79455	
		4	0,79113	
		5	0,79912	
0,075	0,05	1	0,962953	0,964168
		2	0,961406	
		3	0,968144	
		4	0,964066	
		5	0,96427	



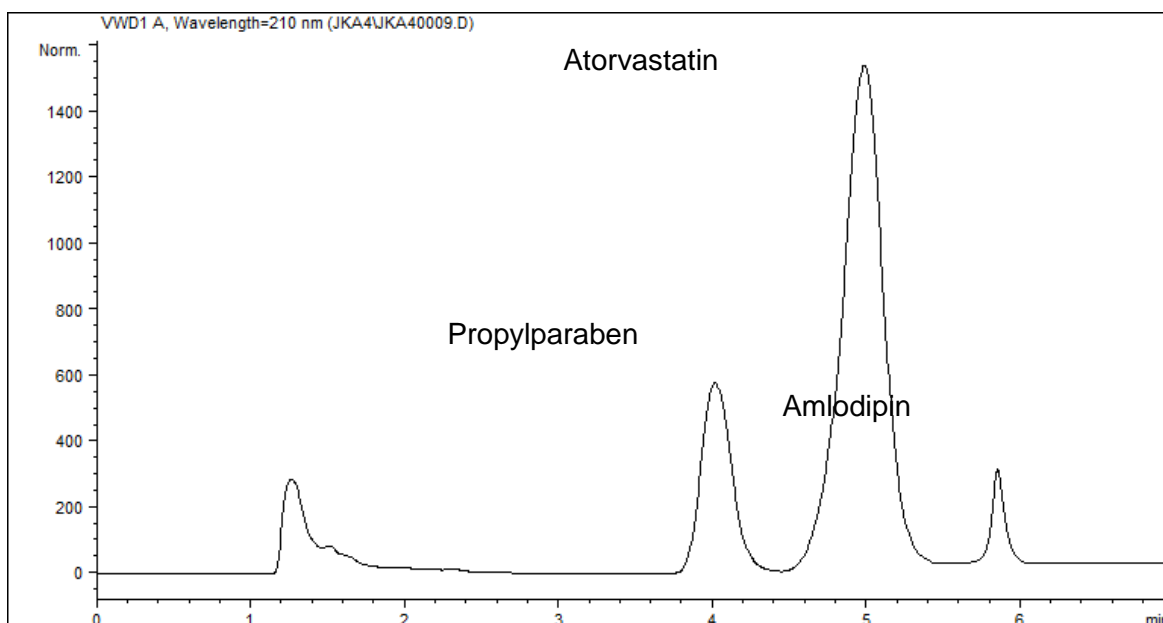
Obr. č. 2: Graf lineární regrese amlodipinu s odpovídající rovnicí a korelačním koeficientem.

Tabulka č. 4: Hodnoty atorvastatinu potřebné pro sestavení kalibrační křivky

Konzentrace atorvastatinu AT [mg/ml]	Konzentrace vnitřního standardu IS [mg/ml]	číslo měření	Poměr ploch píkú A_{AT} / A_{IS}	Průměrná hodnota A_{AT} / A_{IS}
0,05	0,05	1	0,888277	0,888466
		2	0,888434	
		3	0,88817	
		4	0,888466	
		5	0,888985	
0,075	0,05	1	1,348289	1,342875
		2	1,345059	
		3	1,339097	
		4	1,348801	
		5	1,333129	
0,1	0,05	1	1,797749	1,795844
		2	1,798253	
		3	1,793692	
		4	1,796726	
		5	1,792799	
0,125	0,05	1	2,259088	2,254325
		2	2,249889	
		3	2,253689	
		4	2,251468	
		5	2,257491	
0,15	0,05	1	2,711771	2,711317
		2	2,709642	
		3	2,712538	
		4	2,711214	
		5	2,71142	



Obr. č. 3: Graf lineární regrese atorvastatinu s odpovídající rovnicí a korelačním koeficientem.



Obr. č. 4: Chromatografický záznam jednoho z kalibračních roztoků amlodipinu (0,05 mg/ml) a atorvastatinu (0,1 mg/ml) s přidaným vnitřním standardem propylparabenem (0,05 mg/ml) za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.2.

Hodnocení linearity

Korelační koeficient amlodipinu je 0,9999 a atorvastatinu 1. Hodnoty koeficientu obou látek nejsou nižší než 0,999, čímž splňují požadavky na linearitu.

5.2. Přesnost

Pro ověření přesnosti bylo připraveno 6 vzorků. U každého z nich bylo provedeno 5 analýz, jejichž hodnoty poměrů ploch (plocha hodnocené látky ku ploše vnitřního standardu) byly zprůměrovány. Následně byly podle níže uvedeného vzorce vypočteny relativní směrodatné odchylky každého z měření.

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

RSD – relativní směrodatná odchylka

\bar{x} – průměr jednotlivých hodnot

x_i – jednotlivé hodnoty

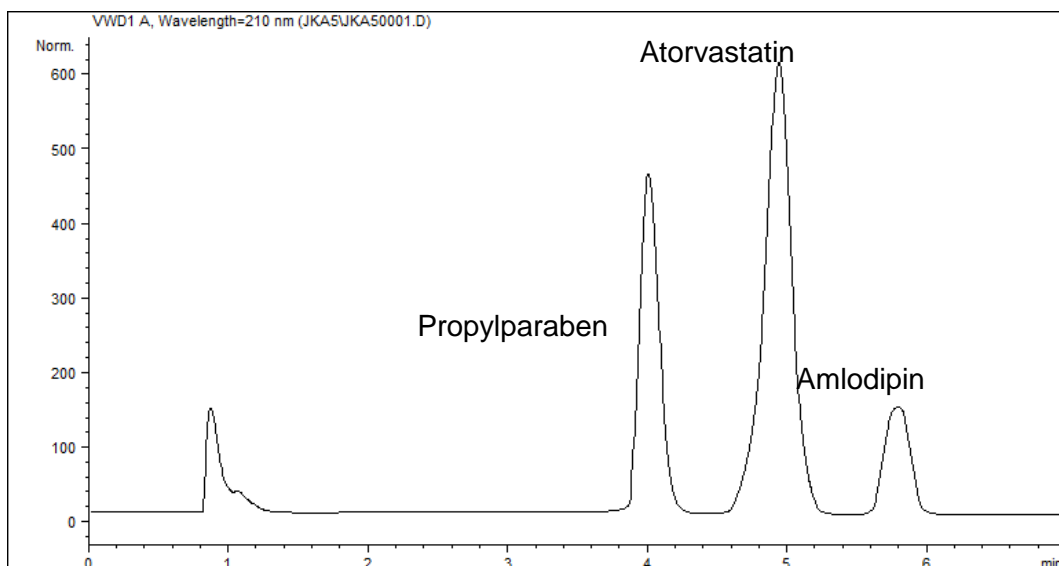
n – počet jednotlivých hodnot

Tabulka č. 5: Hodnoty amlodipinu pro přesnost

Číslo vzorku	Poměr ploch píků A_{AM}/A_{IS}	Průměrná hodnota	RSD [%]
1	1,3148	1,2942	1,38
	1,2829		
	1,2849		
2	1,2900	1,2908	0,08
	1,2913		
	1,2892		
3	1,3051	1,2896	1,04
	1,2818		
	1,2820		
4	1,2988	1,2862	0,85
	1,2800		
	1,2798		
5	1,2722	1,2749	0,18
	1,2762		
	1,2763		
6	1,2489	1,2529	0,32
	1,2568		
	1,2530		

Tabulka č. 6: Hodnoty atorvastatinu pro přesnost

Číslo vzorku	Poměr ploch píků A_{AT}/A_{IS}	Průměrná hodnota	RSD [%]
1	3,6347	3,6330	0,04
	3,6322		
	3,6320		
2	3,6359	3,3685	0,10
	3,6427		
	3,6370		
3	3,6021	3,5995	0,08
	3,6000		
	3,5965		
4	3,6102	3,6121	0,06
	3,6145		
	3,6115		
5	3,5709	3,5750	0,09
	3,5772		
	3,5769		
6	3,5513	3,5535	0,11
	3,5579		
	3,5515		



Obr. č. 5: Chromatografický záznam vzorku č. 2 při hodnocení přesnosti. Zobrazení amlodipinu (0,05 mol/l) a atorvastatinu (0,1 mg/ml) s přidáním vnitřním standardem propylparabenem (0,05 mg/ml) za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.2.

Hodnocení přesnosti

Průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky analýzy amlodipinu je 0,64 % a atorvastatinu 0,08 %. Relativní směrodatná odchylka obou látek vyhovuje požadavkům pro přesnost, které uvádí, že RSD nesmí přesahovat 2 %.

5.3. Správnost

K prověření správnosti bylo připraveno 6 vzorků. Každý z nich byl pětkrát proměřen. Průměrné hodnota poměru ploch píků (plocha analyzované látky ku ploše vnitřního standardu) každého vzorku byla dosazena do rovnice lineární regrese kalibrační křivky (kapitola 5.1) a následně vypočítána koncentrace látky ve vzorku. Z jednotlivých hodnot koncentrace byla za pomoci níže uvedeného vzorce vypočítána průměrná výtěžnost (recovery) amlodipinu i atorvastatinu.

- Rovnice lineární regrese pro amlodipin:
 $y = 11,269x + 0,117$
- Rovnice lineární regrese pro atorvastatin:
 $y = 18,229x - 0,0243$
- Vzorec pro výpočet výtěžnosti (recovery)

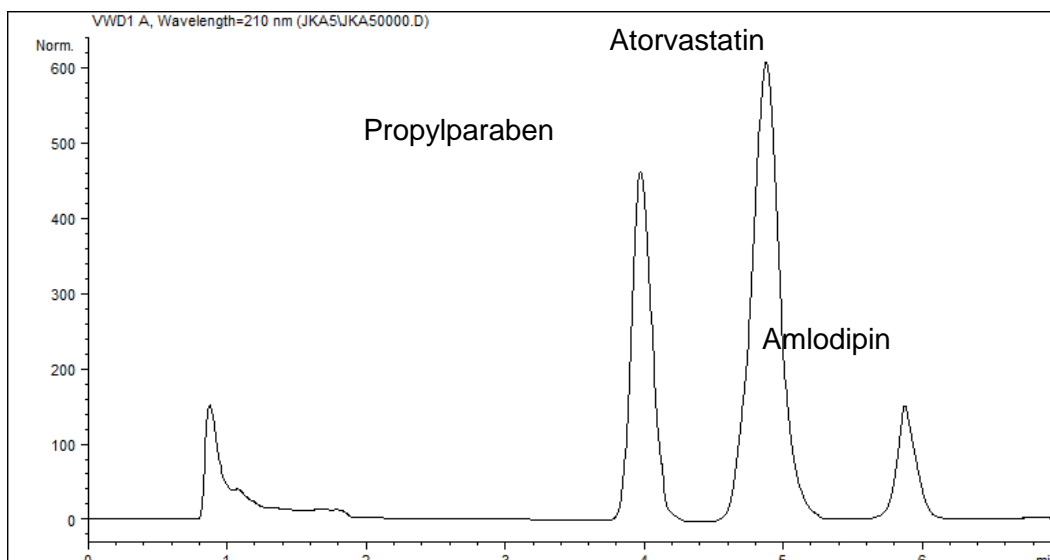
$$\text{Výtěžnost (recovery\%)} = \frac{\text{naměřená hodnota} \times (100)}{\text{skutečná hodnota}}$$

Tabulka č. 7: Hodnoty amlodipinu pro správnost

Vzorek číslo	Poměr ploch píkú A_{AM}/A_{IS}	Průměr	Přidáno [mg/ml]	Zjištěno [mg/ml]	Recovery [%]
1	0,6784	0,6716	0,05	0,0492	98,43
	0,6501				
	0,6815				
	0,6815				
	0,6666				
2	0,6399	0,6556	0,05	0,0478	95,59
	0,6394				
	0,6746				
	0,6552				
	0,6690				
3	0,6512	0,6707	0,05	0,0491	98,26
	0,6855				
	0,6856				
	0,6641				
	0,6670				
4	0,6694	0,6717	0,05	0,0492	98,44
	0,6665				
	0,6683				
	0,6694				
	0,6846				
5	0,6762	0,6773	0,05	0,0497	99,45
	0,6937				
	0,6725				
	0,6715				
	0,6727				
6	0,6669	0,6729	0,05	0,0493	98,67
	0,6996				
	0,6791				
	0,6598				
	0,6593				

Tabulka č. 8: Hodnoty atorvastatinu pro správnost

Vzorek číslo	Poměr ploch píků A_{AT}/A_{IS}	Průměrná hodnota	Přidáno [mg/ml]	Zjištěno [mg/ml]	Recovery [%]
1	1,7782	1,7815	0,10	0,0991	99,06
	1,7494				
	1,7821				
	1,7972				
	1,8008				
2	1,7874	1,7985	0,10	0,09994	99,99
	1,7735				
	1,7936				
	1,8006				
	1,8373				
3	1,8060	1,8293	0,10	0,1017	101,68
	1,8256				
	1,8282				
	1,8306				
	1,8561				
4	1,7559	1,7660	0,10	0,0982	98,21
	1,7560				
	1,7580				
	1,7622				
	1,7979				
5	1,8050	1,7926	0,10	0,0997	99,67
	1,7949				
	1,7748				
	1,7942				
	1,7943				
6	1,7697	1,7980	0,1	0,09996	99,97
	1,8050				
	1,8061				
	1,8050				
	1,8043				



Obr. č. 6: Chromatografický záznam vzorku č. 1 při hodnocení správnosti. Zobrazení amlodipinu (0,05 mol/l) a atorvastatinu (0,1 mg/ml) s přidaným vnitřním standardem propylparabenem (0,05 mg/ml) za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.2.

Hodnocení správnosti

Průměrná hodnota výtěžnosti analýz amlodipinu je 98,14 % a atorvastatinu 99,77 %.

Hodnoty tak splňují požadavek na výtěžnost, kterým je rozmezí 98 – 102 %.

5.4. Robustnost

Robustnost metody byla zkoumána změnami tří parametrů chromatografické analýzy.

Všechny se týkaly změn složení mobilní fáze. Vliv změn na analýzu byl vyjádřen za pomoci výpočtu kapacitního faktoru každého měření. Kapacitní faktor je vypočítán vzorcem:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R – retenční čas

t_M – mrtvý čas

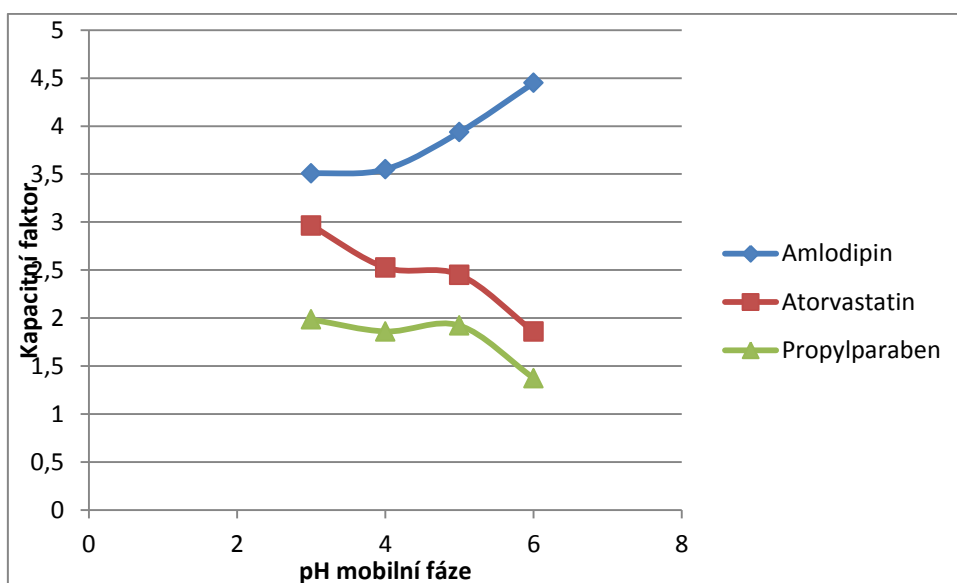
Hodnota t_M byla zjištěna analýzou kalii iodati, což je látka inertní k dané stacionární fázi.

Průměrná hodnota retenčního času kalii iodati je 0,7275 (=mrtvý čas).

5.4.1. Změna pH mobilní fáze

Tabulka č. 7: Hodnoty průměrných retenčních časů a z nich vypočítaných kapacitních faktorů měnících se v závislosti na rozdílném pH mobilní fáze pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben.

Ph	Průměrný t_R amlodipinu	Průměrný t_R atorvastatinu	Průměrný t_R IS	k amlodipinu	k atorvastatinu	k IS
3	3,2777	2,8837	2,1713	3,5054	2,9638	1,9847
4	3,3103	2,5653	2,0807	3,5503	2,5262	1,8600
5	3,5917	2,5093	2,1247	3,9370	2,4493	1,9205
6	3,9647	2,0790	1,7263	4,4497	1,8577	1,3730

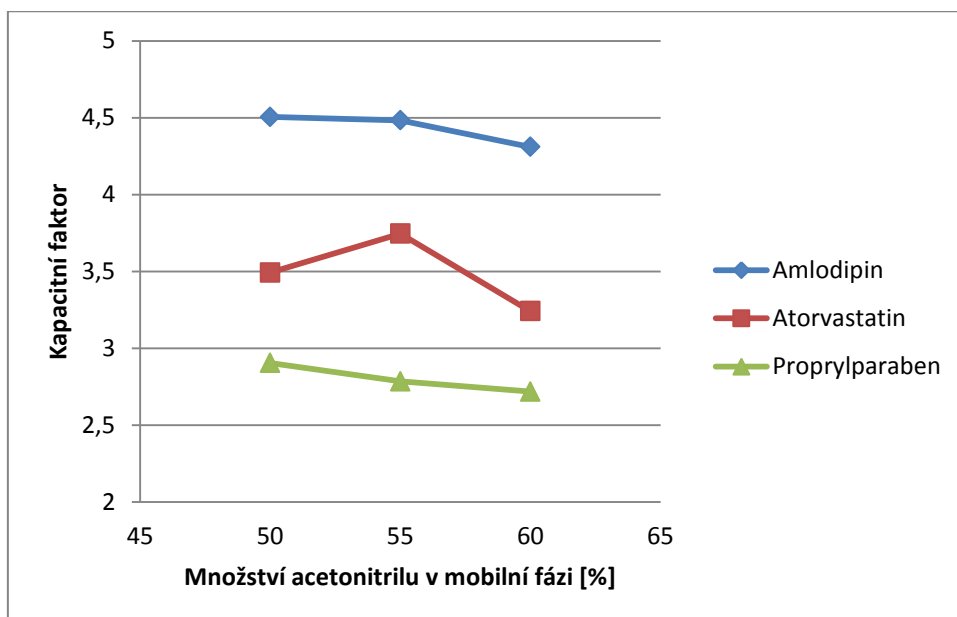


Obr. č. 7: Graf závislosti kapacitního faktoru na pH pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben. Hodnoty vyplývají z tabulky č. 7.

5.4.2. Změna poměru složek mobilní fáze

Tabulka č. 8: Hodnoty průměrných retenčních časů a z nich vypočítaných kapacitních faktorů měnících se v závislosti na rozdílném poměru vodné a organické složky mobilní fáze pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben.

% Množství organické složky (acetonitril) [%]	Průměrný t_R amlodipinu	Průměrný t_R atorvastatinu	Průměrný t_R IS	k amlodipinu	k atorvastatinu	k IS
50	4,0050	3,2690	2,8405	4,5052	3,4935	2,9045
55	3,9890	3,4525	2,7540	4,4832	3,7457	2,7856
60	3,8630	3,0860	2,7050	4,3100	3,2419	2,7182

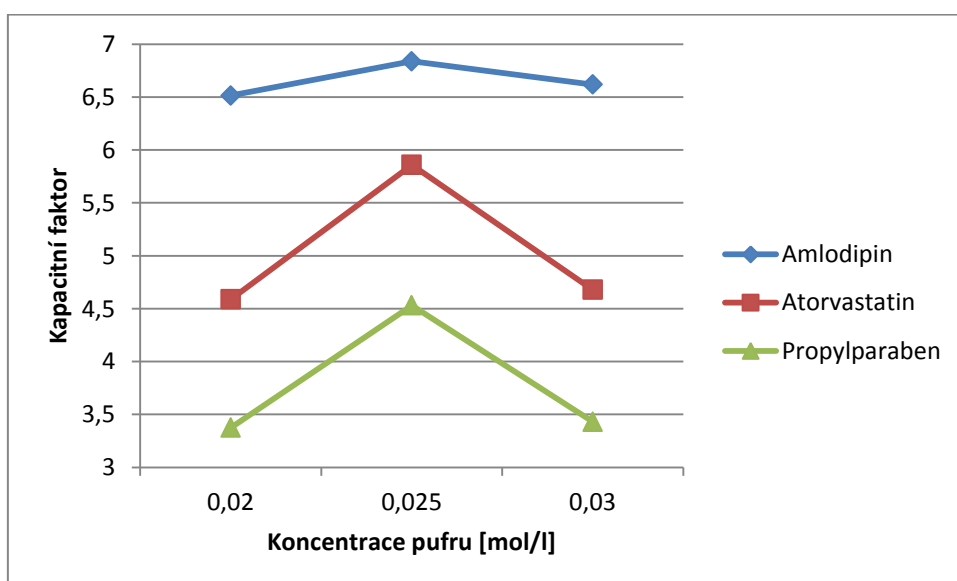


Obr. č. 8: Graf závislosti kapacitního faktoru na poměru vodné a organické složky mobilní fáze pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben. Hodnoty vyplývají z tabulky č. 8.

5.4.3. Změna koncentrace pufru mobilní fáze

Tabulka č. 9: Hodnoty průměrných retenčních časů a z nich vypočítaných kapacitních faktorů měnících se v závislosti na rozdílné koncentraci pufru mobilní fáze pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben.

Koncentrace pufru [mol/l]	Průměrný t_R amlodipinu	Průměrný t_R atorvastatinu	Průměrný t_R IS	k amlodipinu	k atorvastatinu	k IS
0,20	5,4660	4,0655	3,1820	6,5134	4,5883	3,3739
0,25	5,7015	4,9895	4,0235	6,8371	5,8584	4,5306
0,30	5,5420	4,1315	3,2235	6,6179	4,6790	3,4309



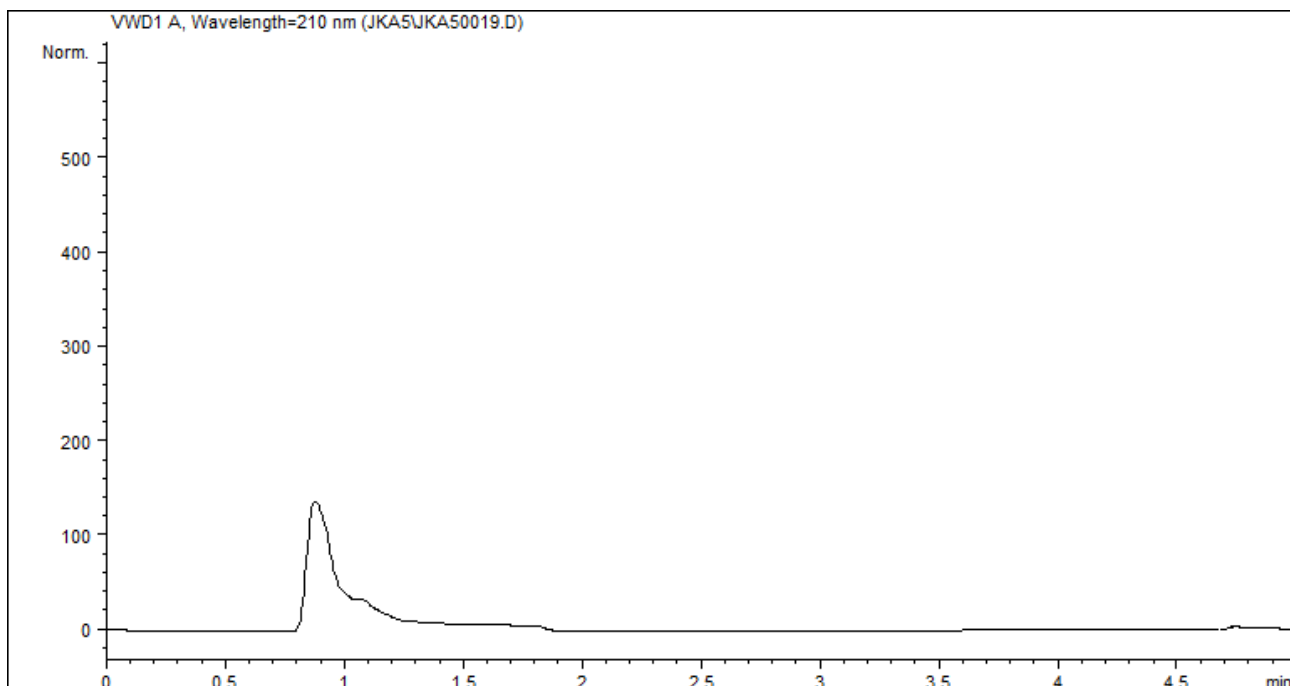
Obr. č. 9: Graf závislosti kapacitního faktoru na koncentraci pufru mobilní fáze pro amlodipin, atorvastatin a propylparaben. Hodnoty vyplývají z tabulky č. 9.

Hodnocení robustnosti

Výkyvy ve výsledcích kapacitního faktoru nejsou považovány za nijak markantní. Drobné odchylky od pH, koncentrace pufru, či poměru anorganické a organické složky mobilní fáze nemají vliv na separaci. Metoda je tedy robustní.

5.5. Selektivita

V rámci posuzování selektivity byl na kolonu nastříknut roztok placeba.



Obr. č. 8: Chromatogram placeba.

Hodnocení selektivity

V retenčních časech, ve kterých se eluují léčiva, se žádné pomocné látky léčivého přípravku neeluují, neruší tak analýzu. Metoda je zhodnocena jako selektivní.

6. ZÁVĚR

Cílem rigorózní práce bylo validovat HPLC metodu současného stanovení amlodipinu a atorvastatinu v tabletě, jejíž chromatografické podmínky byly optimalizovány v diplomové práci.⁽⁵⁹⁾ Z validačních parametrů byla prověřena linearita, přesnost, správnost, robustnost a selektivita.

Linearita byla prokázána metodou kalibrační křivky. Amlodipin byl analyzován v koncentracích od 0,025 do 0,075 mg/ml, jeho kalibrační křivka tak byla vyjádřena rovnicí regresní přímky $y = 11,269x + 0,117$ s korelačním faktorem 0,9999. Lineární závislost pro atorvastatin byla proměřována v koncentracích od 0,05 do 1,25 mg/ml s výslednou rovnicí kalibrační křivky $y = 18,229x - 0,0243$ a korelačním faktorem 1.

Pro ověření přesnosti bylo připraveno 6 roztoků a poté byl každý z nich analyzován.

Výsledkem je relativní směrodatná odchylka pro amlodipin 0,64 % a pro atorvastatin 0,08 %. RSD obou látek nepřesahuje 2 %, čímž odpovídá požadavku na přesnost.

Správnost metody byla zkoušena analýzou modelových roztoků. Tyto roztoky byly připraveny navážkou placeba a standardů léčiv. Výsledkem analýzy je výtěžnost, která je rovna 98,14 % pro amlodipin a 99,77 % pro atorvastatin. Tyto hodnoty jsou v rozmezí 98,0 – 102,0 % a tím odpovídají požadavku na správnost.

Z hlediska robustnosti byla metoda vystavena změnám parametrů mobilní fáze. Menší změny koncentrace pufru, poměru anorganická a organická fáze ani pH mobilní fáze významně neovlivnily výsledky analýzy, metoda je tudíž robustní.

Selektivita byla provedena pro určení, zda v dané metodě některé z pomocných látek nekorelují s analyzovanými léčivy. Analýzou vzorku placeba bez účinných látek byla ověřena nulová interference mezi zkoumanými látkami.

7. SEZNAM ZKRATEK

A_{AM} – plocha amlodipinu (area)

A_{AT} – plocha atorvastatinu

A_{IS} – plocha vnitřního standardu

CRL – chemická referenční látka

GC – gas chromatography

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA

HPLC – high performance liquid chromatography

HTLC – high temperature liquid chromatography

I.D. – inner diameter

IČ – infračervené záření

LC – liquid chromatography (kapalinová chromatografie)

LDL - low density lipoprotein (lipoprotein o nízké hustotě)

RP – reversed phase (reverzní fáze)

RSD – relativní směrodatná odchylka

TLC – thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)

t_M – mrtvý čas

t_R – retenční čas

UPLC – ultra performance liquid chromatography

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné záření

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/materialy_B.htm (19.1.2014)
2. F. Renger, J. Kalous: Analytická chemie I., Univerzita Pardubice, Pardubice 1998
3. J. Klimeš a kol.: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Nucleus HK, Hradec Králové 2011
4. F. Vláčil: Úvod do dělicích metod. In: J. Zýka a kol.: Analytická příručka I., SNTL, Praha 1988
5. O. Mikeš: Základní typy chromatografie. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
6. Z. Holzbecher, J. Churáček: Analytická chemie, SNTL, Praha 1987
7. R. Komers, M. Krejčí: Plynová chromatografie. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
8. J. Churáček a kol.: Analytická separace látek, SNTL, Praha 1990
9. R. Karlíček a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
10. K. Volka a kol.: Analytická chemie II, VŠCHT, Praha 1997
11. J. Gasparič, J. Churáček: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
12. O. Motl, L. Novotný: Chromatografie na tenké vrstvě. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
13. V. Kiselev, J. I. Jašin: Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie, SNTL, Praha 1988
14. O. Motl, L. Novotný: Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie, In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
15. M. Hejtmánek: Kapalinová chromatografie. In: J. Zýka a kol.: Analytická příručka I., SNTL, Praha 1988
16. V. Tomášek: Gelová chromatografie. In: J. Zýka a kol.: Analytická příručka I., SNTL, Praha 1988
17. http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC/hplc.html (19.1.2014)
18. J. Turková: Afinitní chromatografie. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
19. C. F. Poole, S. K. Poole: Chromatography today, Elsevier, Amsterdam 1991
20. K. Štulík a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2004
21. <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/stereoizomery> (20.1.2014)
22. J. Churáček, P. Jandera: Separace látek - Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, SNTL, Praha 1986
23. <http://www.hplc.cz/UPLC/> (29.1.2014)
24. C. V. McNeff, B. Yan, D. R. Stoll, R. A. Henry: Practice and theory of high temperature liquid chromatography, J. Sep. Sci 30, 1672 – 1685 (2007)
25. J. Churáček a kol.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academica, Praha 1993

26. B. Meloun: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii.
In: O. Mikeš a kol: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
27. P. Klouda: Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavko, Ostrava 2003
28. J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, SNTL, Praha 1984
29. http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html (29.1.2014)
30. V. R. Meyer.: Practical high-performance liquid chromatography, Wiley, Chichester 2010
31. D. Kameníčková, Diplomová práce: HPLC stanovení vybraných insekticidů v kosmetickém přípravku, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy 2012
32. http://www.merckmillipore.cz/chemicals/chromolith-dirty-samples-webcast/c_vMSsHfETPFgAAAFBeVgxtbdf (23.1.2014)
33. http://web.vscht.cz/~koplkr/UV_VIS_spektrometrie.pdf (26.1.2014)
34. http://hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html (26.1.2014)
35. http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek_2013/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf (26.1.2014)
36. Šabartová, J.: Validace analytických metod v kontrole léčiv, Věstník SÚKL 1, 6-8 (1994)
37. <http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni3.htm> (26.1.2014)
38. <http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html> (26.1.2014)
39. J. Klimeš a kol.: Chromatografické metody, veličiny a výpočty, seminář Monitorování lékových hladin, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, 2010
40. <http://www.hplc.cz/Teorie/uvod.html> (28.1.2014)
41. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, souhrn SPC, 83/616/05-C, poslední revize textu 25.8.2010
42. Český lékopis 2009, Grada publishing, Praha 2009
43. <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/4309/amlodipinu-besilat> (26.1.2014)
44. D. Lincová, H. Farghali a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2007
45. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, souhrn SPC, 83/136/07-C, datum revize textu 25.2.2012
46. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.1, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg 2011
47. http://www.patentdocs.org/2006/12/pfizers_austral.html (27.1.2014)
48. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_01_3-14.pdf (27.1.2014)
49. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, souhrn SPC, 31/478/06-C, datum poslední revize textu 29.11.2006
50. K. Sharma, A. Dharamsi: Development and validation of RP-HPLC and spectrophotometric method for simultaneous estimation of atorvastatin and amlodipine in pharmaceutical dosage forms, Int. J. Pharm. Sci. Res. 3, 1202-1207 (2012)
51. Manzoor, Y.N. Manohara, M.C. Ravi: RP-HPLC method development and validation

- for simultaneous estimation of Atorvastatin calcium and Amlodipine besylate, *Int. J. Chem. Tech. Res.* 4, 337-345 (2012)
52. S. K. Sinha, P. K. Shrivastava, S. K. Shrivastava: Development and validation of a HPLC method for the simultaneous estimation of amlodipine and telmisartan in pharmaceutical dosage form, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 312 – 315 (2012)
53. R. Suresh, R. Manavalan, K. Valliappan: Developing and optimizing a validated RP-HPLC method for the analysis of amlodipine and ezetimibe with atorvastatin in pharmaceutical dosage forms applying response surface methodology, *Int. J. Pharm. Sci.* 4, 550-558 (2012)
54. M. A. Alnowaiser: Simultaneous determination of amlodipine and Atorvastatin in Caduet® tablets using HPLC, *Am. J. Applied Sci.* 10, 849-852 (2013)
55. H. W. Darwish, S. A. Hassan, M. Y. Salem, B. A. El-Zeany: Rapid and sensitive TLC and HPLC with on-line wavelength switching methods for simultaneous quantitation of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms, *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4, 345 – 356, (2013)
56. K. Sharma, Y. Sharma, P. Sharma: Validated method development for estimation of atorvastatin and amlodipine in solid dosage regimens, *Int. J. Res. Develop. Pharm. Life Sci.* 2, 344 - 348 (2013)
57. B. A. Moussa, A. A. El-Zaher, M. A. Mahrouse, M. S. Ahmed: Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatin Calcium in Binary Mixture by Spectrofluorimetry and HPLC Coupled with Fluorescence Detection, *Anal Chem Insights* 8, 107 – 115 (2013)
58. S. Imre, K. Kacsó, D. L. Muntean: Simultaneous Determination of Atorvastatin and Amlodipine in Industrial Tablets by Apparent Content Curve and HPLC Methods, *Acta Medica Marisiensis* 59, 44 – 48 (2013)
59. J. Kašková, Diplomová práce: HPLC hodnocení vybraných léčiv V., Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy 2012