



**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS INSTITUTAS  
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA**

**Joana Miloš**

Pagrindinių studijų programa - Farmacinė chemija  
Magistro studijų baigiamasis darbas

**ANTIHIPERTENZINIŲ PREPARATŲ PERINDOPRILIO  
PAGRINDU TYRIMAS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS  
METODU**

**Darbo vadovas:**  
prof. habil. dr. Audrius Padarauskas

---

*(leidimas ginti, data, parašas)*

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Vilnius, 2020

# TURINYS

ĮVADAS .....	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	4
1.1 Antihipertenziniai vaistai perindoprilio pagrindu .....	4
1.2 Vaistų perindoprilio pagrindu analizės metodų apžvalga .....	7
1.2.1 Dujų chromatografija .....	7
1.2.2 Fluorescencinė analizė .....	8
1.2.3 Spektrofotometrija .....	8
1.2.4 Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC) .....	9
1.3 Farmacinių preparatų analizės metodo validavimas .....	12
2. EKSPERIMENTO METODIKA .....	14
2.1 Aparatūra .....	14
2.2 Reagentai ir tirpalai .....	14
2.3 Procedūros .....	14
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	16
3.1 Chromatografinio atskyrimo ir UV detektavimo sąlygų parinkimas .....	16
3.2 Metodo validavimas .....	22
3.3 Farmacinių preparatų analizė .....	27
IŠVADOS .....	29
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	30
SANTRAUKA .....	33
SUMMARY .....	34

## IVADAS

Arterinė hipertenzija (AH) arba padidėjęs kraujo spaudimas (arterinis kraujo spaudimas daugiau kaip 140/90 mm Hg) – dažniausia liga tiek Lietuvoje, tiek ir visame pasaulyje. AH yra susijusi su padidėjusia širdies ir kraujagyslių, smegenų kraujagyslių ir inkstų ligų rizika. Nepakankama padidėjusio spaudimo kontrolė – pagrindinė mirtingumo priežastis. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad didžiausia arterinės hipertenzijos gydymo nauda susijusi su paties gydymo efektyvumu, t. y. kaip pavyksta sumažinti arterinį kraujospūdį iki tikslinio ir jį tokį išlaikyti [1]. Esant nedidelio laipsnio hipertenzijai galima kurį laiką gydyti be vaistų. Tačiau jeigu nemedikamentinės priemonės nepaveda ir po 3 mėnesių kraujospūdis išlieka didesnis nei 140/90, paskiriamas medikamentinis gydymas. Vienas iš plačiausiai naudojamų vaistų AH gydyti – angiotenziną konvertuojančio fermento slopintojas (AKF inhibitorius) perindoprilis. Pvz., 2018 m. duomenimis Lietuvoje perindoprilis užima 4-tą vietą dažniausiai vartojamų vaistų sąrašė [2]. Pastaraisiais metais vis labiau populiarėja AH gydymas panaudojant dviejų ar trijų vaistų derinius vienoje tabletėje. Naudojant vaistų derinius išvengiama didelių dozių skyrimo bei sumažinami šalutiniai poveikiai. Perindoprilis įprastai derinamas su diuretiku indapamidu ir/arba su kalcio kanalų blokatoriumi amlodipinu.

Naujų vaistų derinių įvedimas taip pat inicijuoja efektyvių metodų poreikį veikliosoms medžiagoms šiuose deriniuose nustatyti.

**Magistro baigiamojo darbo tikslas** – optimizuoti ir validuoti skysčių chromatografijos metodą antihipertenzinių vaistų perindoprilio pagrindu analizei.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Optimizuoti perindoprilio, amlodipino ir indapamido chromatografinio atskyrimo ir UV detektavimo sąlygas.
2. Ištirti perindoprilio, amlodipino ir indapamido atsparumą išorės veiksniams (**ši užduotis dėl karantino nebuvo atlikta**).
3. Atlikti metodo validavimą ir skirtingų gamintojų antihipertenzinių vaistų analizę.

## I. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1 Antihipertenziniai vaistai perindoprilio pagrindu

Arterinė hipertenzija yra viena iš labiausiai paplitusių širdies ir kraujagyslių sistemos patologijų, kuriai būdingas nuolatinis kraujo spaudimo padidėjimas iki 140/90 mm gyvsidabrio stulpelio ar aukštesnis.

Daugumai pacientų hipertenzija ilgą laiką nesukelia jokių nusiskundimų. Nepaisant to, padidėjusį kraujospūdį būtina pastoviai gydyti. Vaistai ir jų dozės parenkamos labai individualiai. Gydant kraujospūdis turi būti tolygus, kadangi jo nepastovumas ypač blogai veikia kraujagysles. Negalima staiga liautis gėrus vaistus, nes kraujospūdis gali staiga labai padidėti. Turi būti parenkami veiksmingiausi ir mažiausiai šalutinių reiškinių sukeltantys vaistai [3]. Pagal savo poveikį kraujospūdį mažinantys vaistai skirstomi į atitinkamas grupes, kurios susistemintos 1.1 lentelėje.

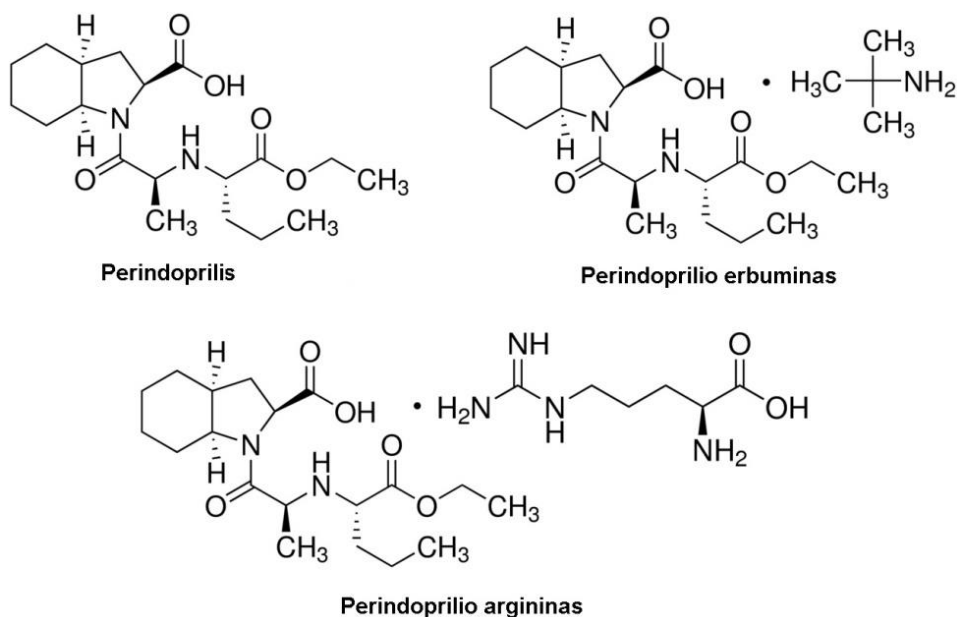
1.1 lentelė. Kraujospūdį mažinančių vaistų grupės [3]

Grupės pavadinimas	Veikliųjų medžiagų pavyzdžiai
AKF inhibitoriai (angiotenziną konvertuojančio fermento slopintojai)	Kaptoprilis – seniausias šios grupės preparatas, trumpo veikimo. Ilgalaikiam gydymui tinka zofenoprilis, perindoprilis, ramiprilis, trandolaprilis, kvinaprilis, fozinoprilis, spiraprilis, lizinoprilis, enalaprilis. Kuo ilgiau vartojami ilgalaikio veikimo preparatai, tuo jie geriau užtikrina paros kraujospūdžio kontrolę.
Angiotenzino II receptorių blokatoriai	Losartanas, telmisartanas, olmesartanas, irbesartanas, valsartanas, kandesartanas, eprosartanas. Šie vaistai naudingi, kai kartu su arterine hipertenzija yra inkstų disfunkcija, sustorėjęs širdies raumuo (kairiojo skilvelio hipertrofija), diagnozuotas cukrinis diabetas ar metabolinis sindromas.
Kalcio kanalų blokatoriai (skirstomi į tris grupes: dihidropiridinai, benzotiazepinai ir fenilalkilaminai)	Dihidropiridinai: pirmosios kartos - ilgai veikiantis nifedipinas; antrosios kartos - nitrendipinas, felodipinas, nikardipinas; trečiosios kartos - lacidipinas, amlodipinas, lerkanidipinas. Benzotiazepinai: trumpo ir ilgo veikimo diltiazemas. Fenilalkilaminai: trumpo ir ilgo veikimo verapamilis.
Betaadrenoreceptorių blokatoriai.	Pirmos kartos betaadrenoblokatoriai - propranololis (šiuo metu hipertenzijos gydymui neskiriamas, nes blokuoja ir širdies, ir kraujagyslių receptorių). Antros kartos - metoprololis, betaksololis, bisoprololis, acebutololis, atenololis (jie yra kardioselektyvūs). Trečios kartos - nebivololis, karvedilolis (pasižymi

	kraujagysles plečiančiomis savybėmis).
Diuretikai (skirstomi į grupes: tiazidiniai, kilpiniai, kalį sulaikantys ir indolino dariniai)	Tiazidiniai - hydrochlorotiazidas. Kilpiniai – furozemidas, torazemidas. Kalį sulaikantys - spironolaktonas, eplerenonas. Indolino dariniai - indapamidas (specialiai hipertenzijos gydymui sukurtas diuretikas, kuris veikia švelniai ir ilgai).
Centrinio poveikio vaistai	Arterinės hipertenzijos gydymui plačiai naudojami rilmenidinas ir moksonidinas (imidazolino receptorių agonistai). Metildopa (alfa-2 receptorių agonistu) ir labetololiu iki šiol gydoma nėščiųjų hipertenzija, kadangi kiti vaistai gali sukelti pavojų vaisiui. Klonidinas (klofelinas - alfa-2 ir imidazolino receptorių agonistas) tinkamas tik greitam kraujospūdžio sumažinimui, tačiau visai netinka pastoviam hipertenzijos gydymui dėl šalutinių reiškinių: sausumo burnoje, mieguistumo, galvos skausmų, depresijos, o nutraukus vaistą - staigaus kraujospūdžio padidėjimo sindromo.
Alfaadrenoblokatoriai	Seniausias iš jų - prazosinas, vartojamas retai, nes kraujospūdį numuša per greitai, sukelia širdies plakimą, galvos svaigimą, skausmą, be to, veikia neilgai. Naujesnieji – ilgo veikimo doksazosinas, terazosinas - pradeda veikti lėčiau ir yra efektyvūs vartojant vieną kart per parą.

Kadangi magistro darbas skirtas antihipertenzinių vaistų perindoprilio pagrindu tyrimui, toliau bus aptarti tik šio tipo preparatai.

**Perindoprilis** – ilgalaikio gydymo AKF inhibitorius, geriamas 1-2 kartus per parą. Efektyviai mažina kraujospūdį, išplėsdamas arterijas. Jis stabdo kraujagysles siaurinančio hormono angiotenzino II susidarymą slopindamas angiotenziną konvertuojantį fermentą. Sumažėja kraujagyslių tonusas, spazmai, padidėja kraujagyslių spindis, pagerėja organų ir audinių kraujotaka. Pasižymi daugeliu papildomų poveikių: mažina kairiojo skilvelio hipertrofiją ir remodeliavimą, gerina endotelio funkciją, širdies raumens sistolinę ir diastolinę funkcijas, turi nefroprotekcinę savybę, mažina atsparumą insulinui, netrikdo medžiagų apykaitos, stabdo aterosklerozę. Organoprotekcinis poveikis priklauso nuo lipofiliškumo ir afiniškumo audiniams [3]. Perindoprilis – dažniausiai Lietuvoje naudojamas antihipertenzinis vaistas [2]. Įprastai į antihipertenzinius preparatus jis yra pridedamas erbumino arba arginino druskų pavidalu (1.1 pav.).

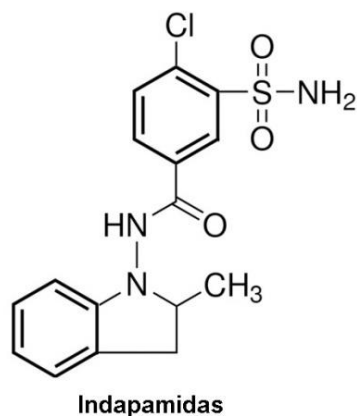


**1.1 pav.** Perindoprilio ir jo druskų struktūros.

Ilgą laiką buvo manoma, kad hipertenziją reikėtų pradėti gydyti vienu vaistu, ir tik po monoterapijos ciklo, esant reikalui, pridėti antrą ar trečią vaistą. Pastaraisiais metais šis požiūris pasikeitė: laikoma, kad beveik visais atvejais hipertenzijos gydymą galima ar netgi reikėtų pradėti nuo vaistų derinio. Tereikia parinkti tinkamus konkrečiam pacientui derinio komponentus ir jų dozes [4].

Fiksuoti deriniai – tai dviejų ar trijų vaistų deriniai vienoje tabletėje. Dažniausiai tai diuretiko hydrochlortiazido ar indapamido deriniai su vienu iš AKF inhibitorių ar angiotenzino receptorių blokatoriaus, kalcio kanalų blokatoriaus derinys su AKF inhibitoriumi (pvz., amlodipinas su perindopriliumi). Privalumas tas, kad vaistai derinyje sustiprina vienas kito veikimą, sumažina šalutinius poveikius, patogu pacientui. Perindoprilis/indapamidas yra dažniausiai Lietuvoje vartojamas sudėtinis vaistas [3].

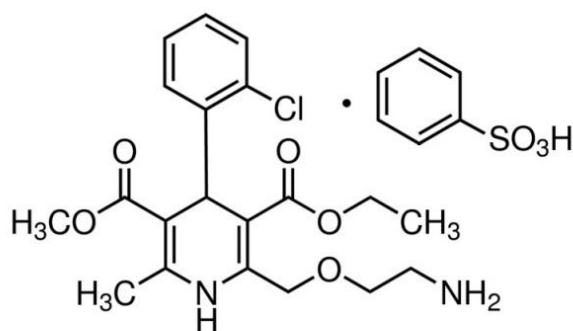
**Indapamidas** (1.2 pav.) – diuretikų grupės antihipertenzinis vaistas. Tai šlapimą varantis preparatas. Skatina vandens, natrio ir chloridų pašalinimą per inkstus. Sumažina cirkuliuojančio kraujo tūrį, o tuo pačiu ir kraujospūdį [3].



**1.2 pav.** Indapamido struktūra.

Galimi ir kiti fiksuoti vaistų deriniai. Pvz., trijų preparatų - perindoprilio, amlodipino ir indapamido – derinys, skirtas pacientams su labai dideliu kraujospūdžiu gydyti [5].

**Amlodipinas** – kalcio kanalų blokatorių grupės antihipertenzinis vaistas. Blokuoja arteriolių raumenų ląstelių lygiųjų raumenų kalcio kanalus, stabdo kalcio jonų patekimą į ląsteles. Kalcis reikalingas kraujagyslių lygiųjų raumenų susitraukimams. Sumažindami kalcio kiekį ląstelėse šie vaistai arterioles išplečia, taip sumažindami kraujospūdį. Pasižymi papildomais poveikiais: nefroprotekciniu, aterosklerozę stabdančiu, endotelio funkciją gerinančiu. Netrikdo medžiagų apykaitos [3]. Vaistuose naudojamas kaip amlodipino besilato druska (1.3 pav.).



Amlodipino besilatas

1.3 pav. Amlodipino besilato struktūra.

Tokiam trijų vaistų derinyje perindoprilis ir amlodipinas atpalaiduoja kraujagysles, kad kraujas galėtų lengviau jomis pratekėti. Tuo tarpu indapamidas didina inkstų išskiriamą šlapimo kiekį, sumažindamas cirkuliuojančio kraujo tūrį. Kiekviena iš veikliųjų medžiagų mažina kraujospūdį ir veikdamos kartu jos padeda žymiai efektyviau jį kontroliuoti.

## 1.2 Vaistų perindoprilio pagrindu analizės metodų apžvalga

Literatūroje (apžvelgta 1990-2019 m. mokslinė literatūra) aprašyta visa eilė skirtingų metodų, skirtų vaistų perindoprilio pagrindu analizei. Tai dujų chromatografija, spektrofotometrija, fluorescencinė analizė, efektyvioji skysčių chromatografija.

### 1.2.1 Dujų chromatografija

Perindoprilis, amlodipinas ir indapamidas yra ganėtinai poliniai ir todėl nepasižymintys lakumu junginiai, tad jų tiesioginis nustatymas dujų chromatografijos metodu yra komplikuotas. Siekiant padidinti tokių junginių lakumą būtina juos derivatizuoti, kas apsunkina dujų chromatografinę analizę. Todėl per apžvelgtus paskutinius 30 metų šia tema publikuotas tik vienas straipsnis, kuriame aprašomas kapiliarinės dujų chromatografijos metodas perindoprilui nustatyti antihipertenziniuose vaistuose. Metodas pagrįstas perindoprilio derivatizavimu pentafluorbenzilbromidu acetone, naudojant bazinį kalio karbonato katalizatorių. Esant švelnioms derivatizacijos sąlygoms labai polinis ir nestabilus perindoprilis pervedamas į lakesnį ir mažiau polinį junginį, tinkantį dujų chromatografinėi

analizei. Gautas derivatas buvo atskiriamas SE-54 kapiliarinėje kolonėlėje ir detektuojamas liepsnos jonizacijos detektoriumi. Ištirti parametrai, turintys įtakos perindoprilio derivatizacijai. Perindoprilio nustatymo tiesinis diapazonas buvo didesnis nei 20-300 nmol, o analizuojant 0,2 mL tūrio mėginius acetono tirpale perindoprilio aptikimo riba (signalas ir triukšmų santykis 5) buvo apie 3 nmol. Buvo parodyta, kad metodas tinka perindoprilio nustatymui tabletėse [6].

### 1.2.2 Fluorescencinė analizė

Pagrindinis fluorescencinės analizės privalumas – didelis nustatymo jautris. Tačiau veikliųjų medžiagų nustymui vaistiniuose preparatuose dažniausiai nereikia ypatingo jautrumo. Be to, šiame darbe aptariami junginiai nepasižymi fluorescencija, tad jų nustatymui šiuo metodu būtina juos derivatizuoti. Paminėtos priežastys riboja fluorescencinės analizės taikymą.

Buvo sukurtas ir patvirtintas naujas, paprastas, selektyvus ir jautrus spektrofluorimetrinis metodas perindoprilio erbuminui nustatyti naudojant 7-hidroksikumariną. Nustatyta, kad perindoprilio erbuminas reaguoja su 7-hidroksikumarinu acetonitrile, susidarant naujam fluorescuojančiam produktui. Komplexo fluorescencija buvo matuojama acetonitrilo tirpale esant 440 nm bangos ilgiui po sužadavimo 350 nm bangos ilgio spinduliuote. Optimaliomis sąlygomis fluorescencijos intensyvumas buvo tiesinis perindoprilio koncentracijų intervale 2,0-16,0 mg/L, o aptikimo riba buvo 0,054 mg/L [7].

Tie patys autoriai pasiūlė dar vieną naują, paprastą ir specifinį spektrofluorimetrinį metodą perindoprilio erbumino nustatymui, pagrįstą rodaminio B fluorescencijos slopinimu pridėdant perindoprilio erbumino. Fluorescencijos slopinimas buvo registruojamas esant 578 nm bangos ilgiui po sužadavimo 500 nm bangos ilgio spinduliuote. Buvo optimizuotos reakcijos sąlygos, tokios kaip tirpiklio prigimtis, reagento koncentracija ir reakcijos trukmė. Optimaliomis sąlygomis fluorescencijos slopinimas buvo tiesinis perindoprilio koncentracijų intervale 1,0-6,0 mg/L. Siūlomas metodas, kaip ir prieš tai aptartas buvo validuoti ir sėkmingai pritaikyti grynos formos ir tabletuoto perindoprilio erbumino nustatymui. Statistinis rezultatų, gautų naudojant sukurtus metodus, palyginimas parodė, kad metodai yra labai specifiniai. Perindoprilis gali būti nustatytas ir esant indapamidui, diuretikui, kuris įprastai derinamas su perindoprilio erbuminu [8].

### 1.2.3 Spektrofotometrija

Žymiai populiariesni yra spektrofotometrinės analizės metodai. Kadangi tiriami junginiai neabsorbuoja matomoje bangos ilgių srityje, dažniausiai cheminių reakcijų pagalba jie yra pervedami į absorbuojančius darinius.

Darbe [9] buvo ištirtos perindoprilio, kaip elektronų donoro, spalvinės reakcijos su 2,3-dichlor-5,6-diciano-p-benzochinono (DDQ), 7,7,8,8-tetracianokvinodimetano (TCNQ), tetracianietileno (TCNE), chloranilo (CL) ir *p*-chloranilo rūgšties (p-CA) elektronų akceptoriais. Su šiais reagentais perindoprilis sudaro junginius, stipriai absorbuojančius esant 588 nm (DDQ), 843 nm (TCNQ), 419 nm (TCNE), 550 nm (CL) ir 520 nm (p-CA) bangos ilgiui. Šių reakcijų pagrindu buvo optimizuoti spektrofotometriniai metodai perindopriliui nustatyti. Visoms reakcijoms Bero dėsnis galioja 20-200 mg/L perindoprilio koncentracijų



intervale. Reakcijos buvo atliekamos nevandeninėje terpėje, o spalvoti junginiai išliko stabilūs mažiausiai 1 valandą. Darbe aprašytas siūlomų metodų taikymas perindopriliui tabletėse nustatyti.

Kitas paprastas ir jautrus kinetinis spektrofotometrinis metodas perindopriliui nustatyti farmaciniuose preparatuose pagrįstas vaisto sąveika su 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) dimetilsulfoksido (DMSO) esant 40 °C temperatūrai. Reakcija buvo stebima spektrofotometriškai, matuojant absorbcijos pokyčio greitį esant 420 nm bangos ilgiui. Optimizuotomis eksperimentinėmis sąlygomis kalibravimo kreivė buvo tiesinė 20-140 mg/L perindoprilio koncentracijų srityje. Šis metodas buvo sėkmingai pritaikytas perindopriliui nustatyti komerciniuose farmaciniuose preparatuose [10].

Kitame darbe [11] perindoprilio nustatymui farmacinėse kompozicijose siūlomas spektrofotometrinis metodas, pagrįstas perindoprilio amino grupės reakcija su 2,4-dinitrofluorbenzenu dimetilsulfoksido. Reakcijos metu susidaro geltonos spalvos produktas, maksimaliai sugeriantis esant 410 nm. Bero dėsnis galioja koncentracijų intervale nuo 2,5 iki 25 mg/L, o molinė sugertis buvo  $6,71 \cdot 10^3$  L/mol/cm. Siūlomo metodo aptikimo ir nustatymo ribos buvo atitinkamai 1,7 ir 5,2 mg/L.

Pasiūlyti du spektrofotometriniai-matematiniai metodai (absorbcijos faktoriaus ir absorbcijos korekcijos) perindopriliui ir amlodipinui nustatyti esant jiems kartu mėginyje [12]. Abiejuose metoduose amlodipinas buvo tiesiogiai nustatomas 8-28 mg/L koncentracijų intervale esant 360 nm bangos ilgiui. Tuo tarpu perindoprilis buvo nustatomas koncentracijų intervale 10-70 mg/L absorbcijos faktoriaus metodu esant 222 nm, o absorbcijos korekcijos metodu esant 208 nm bangos ilgiui. Siūlomi metodai buvo panaudoti 19-oje sintetinių mėginių, kuriuose buvo 60-100 mg/L perindoprilio ir 20-40 mg/L amlodipino koncentracijos, analizei. Taip pat sukurtais metodais buvo sėkmingai išanalizuotos komercinėje prekyboje esančios tablečių kompozicijos.

Kaip matyti iš apžvelgtų literatūros šaltinių, spektrofotometriniai metodai nepasižymi dideliu jautriu – nustatymo ribos skirtinguose straipsniuose yra 5-20 mg/L koncentracijų srityje. Tačiau pagrindinis spektrofotometrijos metodų trūkumas - jie nėra atrankūs, todėl sunkiai pritaikomi vaistų, kurių sudėtyje yra kelios veikliosios medžiagos, analizei.

#### 1.2.4 Efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC)

Tai neabejotinai pats populiariausias farmacinių preparatų analizės metodas.

Lenkų mokslininkai [13] perindoprilio l-arginino cis/trans izomerų atskyrimui ir nustatymui farmaciniuose preparatuose optimizavo HPLC metodą su diodų matricos detektoriumi. Atskyrimas buvo atliekamas „Poroshell 120 Hilic“ (4,6×150 mm, 2,7 μm) kolonėlėje, naudojant judrią fazę susidedančią iš acetonitrilo ir 0,1% skruzdžių rūgšties vandeninio tirpalo (tūrių santykis 20:80). Injekcijos tūris buvo 5,0 μL, o detektavimo bangos - 230 nm. Metodo atrankumas buvo patvirtintas nustatant perindoprilio l-argininą esant mėginyje jo degradacijos produktams, susidariusiems veikiant junginio tirpalą rūgštimi, šarmu, oksidatoriumi bei skaidant kietą junginį padidintame santykiname oro drėgnume. Metodas pasižymėjo tiesiškumu 0,40-1,40 mg/L perindoprilio l-arginino koncentracijų intervale I-am izomerui ir 0,40-2,40 mg/L koncentracijų intervale II-am izomerui. HPLC metodas atitiko tikslumo kriterijus perindoprilio l-arginino izomerų nustatymui. Aptikimo ir

nustatymo ribos buvo atitinkamai 0,15 ir 0,46 mg/L I izomerui, ir 0,04 ir 0,11 mg/L II izomerui.

Perindoprilio erbumino ir jo priemaišų (L-norvalino, L-norvalino etilo esterio ir (S) - indolin-2-karboksirūgšties) nustatymui buvo sukurtas paprastas ir labai jautrus HPLC-masių spektrometrijos metodas. Chromatografinis atskyrimas buvo atliekamas Symmetry C-18 kolonėlėje (75 mm × 4,6 mm, 3,5 μm) gradientinės eliucijos režimu naudojant vandens/acetoni-trilo/metanolio judrią fazę su 5 mmol/L amonio formiato priedu, ir 0,6 mL/min judrios fazės srauto greitį. Siūlomas metodas buvo patvirtintas pagal ICH gaires ir gali būti naudojamas perindoprilio kokybės tyrimams ir jo priemaišų nustatymui farmacijoje [14].

Būtina pažymėti, kad buvo publikuota ir daugiau straipsnių, skirtų perindopriliumi nustatyti HPLC metodu. Tačiau, kadangi daugelio jų turinys yra labai panašus, jie nebus aptariami šioje apžvalgoje. Pilnai bus komentuojami tik straipsniai, skirti dviejų arba visų trijų šiame darbe aptariamų junginių atskyrimui ir nustatymui skysčių chromatografijos metodais.

Trijose publikacijose HPLC metodas buvo taikytas perindopriliumi ir indapamidui nustatyti. Darbe [15] pasiūlytas naujas paprastas, greitas ir tikslus atvirkščių fazių HPLC metodas perindoprilio ir indapamido atskyrimui ir nustatymui farmaciniuose preparatuose. Metodas pagrįstas HPLC atskyrimu atvirkščių fazių C18 kolonėlėje, naudojant judria faze fosfatinį buferį (pH 2,4) vandens/acetoni-trilo (tūrių santykiu 70:30) mišinyje. Perindoprilio ir indapamido kalibracinės kreivės buvo tiesinės atitinkamai 5,0-70,0 mg/L ir 8,0-35,0 mg/L koncentracijų intervaluose. Siūlomas metodas pasižymėjo geru tikslumu ir atkuriamumu. Metodas buvo sėkmingai pritaikytas farmaciniams preparatams, turintiems minėtą vaistų derinį.

Kitame straipsnyje [16] atvirkščių fazių HPLC metodas pritaikytas perindopriliumi ir indapamidui nustatyti esant mėginyje ir jų skilimo produktams. Metodas parodė patenkinamą perindoprilio ir indapamido atskyrimą nuo pagrindinių priemaišų ir skilimo produktų. Atskyrimai buvo atliekami XTerra RP18 (5 μm, 150 × 4,6 mm) kolonėlėje 55 °C temperatūroje, naudojant judria faze vandeninį NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferį (pH 2,0; 0,005 mol/L) ir acetoni-trilą (tūrių santykiu 75:25) ir UV detektavimą esant 215 nm bangos ilgiui. Išsamus perindoprilio ir indapamido testavimas streso sąlygomis buvo atliktas pagal Tarptautinės derinimo konferencijos (ICH) gaires Q1A. Metodo specifiškumas buvo nustatytas įvertinant placebo poveikį ir atliekant vaisto testavimą nepalankiausiomis sąlygomis (priverstinis skilimas): veikiant rūgštine hidrolize, bazine hidrolize, oksidacija, sausa šiluma ir fotolize. Veikiant stresui jokių priemaišų ar skilimo produktų ribojančių ar trukdančių analizių nustatymą nebuvo nustatyta, o metodas buvo specifiškas perindoprilio ir indapamido nustatymui esant skilimo produktams. Metodas buvo validuotas įvertinus jo tiesiškumą, tikslumą, specifiškumą, atsparumą ir tirpalų stabilumą. Siūlomo metodo tiesiškumas buvo 24-56 mg/L ( $r^2=0,9993$ ) koncentracijų intervale perindopriliumi ir 7,5-17,5 mg/L ( $r^2=0,9992$ ) koncentracijų intervale indapamidui. Metodas pripažintas tinkamu tiek stabilumo testams atlikti, tiek ir perindopriliumi bei indapamidui farmaciniuose preparatuose nustatyti.

Trečiajame darbe [17] perindoprilis ir indapamidas buvo atskirti atvirkščių fazių HPLC-UV metodu BEH C18 (1,7 μm, 2,1 × 50 mm) kolonėlėje su judria faze, sudarytą iš 0,01 tūrio% skruzdžių rūgšties vandenyje (pH=4) ir acetoni-trilo (tūrių santykiu 40:60). Abu junginiai atskiriami greičiau nei per 4,5 minutės. Coversyl Plus (R) farmaciniame preparate turinčiame 5000 μg perindoprilio arginino ir 1250 μg indapamido, buvo nustatyta atitinkamai

4991 µg ir 1247 µg šių junginių. Santykiniai standartiniai nuokrypiai - 0,63% perindopriliui ir 0,84% indapamidui. Be to, panaudojus masių spektrometrinį detektavimą buvo identifikuoti perindoprilio ir indapamido skilimo produktai, susidarantys paveikus rūgštimi, šarmu bei šiluma.

Perindoprilio arginino ir amlodipino besilato nustatymui jų mišiniuose ir esant jų skilimo produktams, buvo optimizuoti, validuoti ir palyginti du specifiniai skysčių chromatografijos metodai [18]. Pirmasis metodas – plonasluoksnė skysčių chromatografija su densitometriniu detektavimu. Tinkamas abiejų junginių atskyrimas buvo pasiektas ant kvarco silikagelio 60 F254 TLC plokštelės su etilo acetato, metanolio, tolueno ir 33% amoniako mišinio (tūrių santykiu 65:20:10:5) judria faze. Antrasis metodas – atvirkščių fazių HPLC su UV detektavimu esant 218 nm bangos ilgiui. Abu komponentai buvo atskirti C18 kolonėlėje, naudojant judrią fazę, sudarytą iš vandeninio fosfato buferio (pH=2,5; 0,01 mol/L) ir acetonitrilo (tūrių santykiu 60:40) su 0,1% tetrahidrofurano priedu. Siūlomi metodai buvo įteisinti laikantis ICH gairių ir buvo sėkmingai pritaikyti perindoprilio ir amlodipino kiekybiniam nustatymui komercinėse tabletėse. Abiem metodais gauti rezultatai buvo statistiškai palyginti, tačiau reikšmingų rezultatų skirtumų nebuvo nustatyta [18].

Kitame darbe [19] perindopriliui ir amlodipinui nustatyti mišiniuose esant jų skilimo produktams pasiūlytas panašus atvirkščių fazių HPLC metodas. Veikliųjų medžiagų ir jų skilimo produktų atskyrimas buvo atliktas RP Waters Spherisorb ODS1 kolonėlėje (250 × 4,6 mm, 5 µm) su acetonitrilo ir vandens (tūrių santykiu 30:70) judria faze, į kurią pridėta 15 mmol/L fosforo rūgšties. Judrios fazės pH - 5,0, judrios fazės srauto greitis - 1,2 mL/min, UV detektavimo bangos ilgis - 215 nm. Chromatografinis atskyrimas atliekamas 45 °C kolonėlės temperatūroje. Vidiniu standartu pasirinktas atenololis. Amlodipinas ir perindoprilis buvo veikiami rūgštimi, šarmu, šiluma, UV spinduliuote bei oksidatoriumi. Tyrimai parodė, kad paveikus išvardintomis stresinėms sąlygoms abu junginiai suskyla. Straipsnio autorių teigimu metodas gali būti naudojamas amlodipino ir perindoprilio nustatymui antihipertenzinių vaistų derinių tabletėse.

Pastaruoju metu literatūroje paskelbti keli straipsniai [20-22], skirti visų trijų aptariamų junginių atskyrimui ir nustatymui skysčių chromatografijos metodais.

Darbe [20] perindoprilio, indapamido ir amlodipino atskyrimas atvirkščių fazių HPLC metodu buvo atliekamas BDS Hypersil C-18 kolonėlėje (100 × 3 mm, 5 µm) su 0,05 mol/L vandeninio kalio dihidrofosfato buferio (pH=2,6) ir metanolio (tūrių santykiu 50:50) judria faze 50 °C kolonėlės temperatūroje. Naudota izokratinė eliucija 0,6 mL/min srauto greičiu ir UV detektavimas esant 215 nm bangos ilgiui. Nustatytas kalibracinių teisiškumas koncentracijų intervaluose 5-80 mg/L perindopriliui, 2,5-80 mg/L amlodipinui ir 0,5-20 mg/L indapamidui. Siūlomu HPLC metodu gauti rezultatai buvo palyginti su standartiniais metodais gautais rezultatais naudojant statistinę analizę. Rezultatai parodė, kad reikšmingo skirtumo tarp skirtingais metodais gautų rezultatų nebuvo. Sukurtas metodas yra tinkamas farmaciniuose preparatuose esančių veikliųjų medžiagų kokybės kontrolei užtikrinti.

Kitame darbe [21] chromatografiniam atskyrimui buvo išbandytos įvairios judrių fazių kompozicijos siekiant efektyvaus trijų junginių atskyrimo ant naujos kartos paviršiuje porėto atvirkščių fazių sorbento Kinetex C18. Optimalus atskyrimas buvo pasiektas kolonėlėje (150 × 4,6 mm I. D. 5 µm) su 0,025% fosforo rūgšties turinčia vandens/acetonitrilo (tūrių santykiu 60:40) judria faze. Naudota izokratinė eliucija 1,5 mL/min greičiu 30 °C kolonėlės temperatūroje, UV detektavimas esant 215 nm bangos ilgiui. Kalibracinių teisiškumo

intervalai:  $1,8 \cdot 10^{-6}$  -  $2,8 \cdot 10^{-4}$  mol/L perindopriiliui,  $1,8 \cdot 10^{-6}$  -  $2,1 \cdot 10^{-4}$  mol/L amlodipinui ir  $2,7 \cdot 10^{-6}$  -  $2,7 \cdot 10^{-4}$  mol/L indapamidui. Nustatymo ribos:  $1,0 \cdot 10^{-6}$  mol/L perindopriiliui,  $5,1 \cdot 10^{-7}$  mol/L amlodipinui ir  $5,5 \cdot 10^{-7}$  mol/L indapamidui. Siūlomas metodas buvo sėkmingai pritaikytas komercinių vaistų derinių tablečių analizei.

Visai neseniai publikuotas darbas [22], skirtas prindopriilio, indapamido ir amlodipino atskyrimui ir nustatymui efektyviosios plonasluoksnės chromatografijos metodu. Nejudria faze buvo naudota silikagelio sorbentu padengta aliuminio plokštelė 60 F-254, o dichlormetano, metanolio, tolueno ir ledinės acto rūgšties tirpalas (tūrių santykiu 70:10:20:0,1) buvo naudojamas judria faze. Detektuojama fotometriškai esant 215 nm bangos ilgiui. Metodas buvo validuotas pagal ICH normatyvus. Atlikus modelinio mėginio analizę nustatytos tokios išgavos: 99,4-101,8 % perindopriiliui, 100,6-102,7 % indapamidui ir 99,8-102,0 % amlodipinui.

### 1.3. Farmacinių preparatų analizės metodo validavimas

Cheminės analizės metodo validavimas - tai dokumentais pagrįstos eksperimentinės procedūros, patikimai įrodančios, kad konkrečiu metodu kartu su įtrauktomis į metodą pagalbinėmis priemonėmis bus gauti rezultatai, tiksliai atspindintys išbandyto produkto kokybės savybes [23].

Visos privalomos analizės metodų validavimo procedūros bei validavimo kriterijai yra detalai surašyti Tarptautinės Harmonizavimo Tarybos (*International Council for Harmonisation*, ICH), JAV Maisto ir Vaistų Administracijos (*US Food and Drug Administration*, FDA) bei Europos Farmakopėjos (*European Pharmacopeia*) dokumentuose [24]. Validavimas turi būti atliekamas visiškai naujam analizės metodui bei jau pripažintam analizės metodui, taikomam naujai analizei ir/arba naujam objektui tirti.

Analizės metodo validavimo charakteristikos gali skirtis priklausomai nuo analizės tikslų. Pagal šį kriterijų farmacinėje analizėje taikomi analizės metodai skiriami į 4 kategorijas [25]:

**I kategorija** – analizės metodai pagrindinių komponentų vaistuose nustatymui;

**II kategorija** – analizės metodai priemaišų vaistuose bei vaistų veikliųjų medžiagų degradacijos produktų nustatymui;

**III kategorija** – analizės metodai vaistų eksploatacinių savybių (pvz. tirpinimo) nustatymui;

**IV kategorija** – identifikavimo testai.

Kadangi šis magistro baigiamasis darbas skirtas pagrindinių komponentų vaistuose nustatymui (I kategorija), trumpai paminėsime tik šiai analizės metodų kategorijai privalomas pagrindines validavimo charakteristikas [26-27].

**Tikslumas** (*Accuracy*) – išmatuoto dydžio artimumas tikrajai jo vertei. Metodo tikslumas įprastai vertinamas atliekant etaloninių pavyzdžių analizę, analizuojant mėginius savo ir alternatyviu metodais arba standartinių priedų metodu.

**Glaudumas** (*Precision*) – to paties ėminio mėginių serijos matavimų rezultatų, gautų nurodytomis sąlygomis, artimumas vienas kitam. Metodo glaudumas vertinamas pakartojamumu ir atkuriamumu.

**Pakartojamumas** (*Repeatability*) - rezultatai yra gaunami toje pačioje laboratorijoje, tuo pačiu metodu, to paties operatoriaus, matuojant ta pačia įranga per trumpą laikotarpį.

**Atkuriamumas** (*Reproducibility*) - rezultatai yra gaunami tuo pačiu metodu tiriant tą patį ėminį skirtingose laboratorijose, dirbant skirtingiems operatoriams, naudojantiems skirtingą įrangą.

**Specifiškumas** (*Specificity*) – metodo sugebėjimas patikimai nustatyti tikslinę analizę esant pašalinėms tiriamo objekto komponentėms (priemaišoms, skilimo produktams ir kt.). Farmacinėje analizėje specifiškumas įprastai vertinamas atliekant tikslinės analizės atsparumo stresui tyrimus, t.y. įvertinama analizės nustatymo galimybė prieš tai paveikus ją rūgštimi, šarmu, oksidatoriumi, temperatūra, UV spinduliuote.

**Aptikimo riba** (*Limit of detection*) – mažiausia analizės koncentracija, kuri leidžia duotu metodu patikimai identifikuoti šią analizę. Chromatografijoje aptikimo riba dažniausiai laikoma tokia analizės koncentracija, kuriai signalo ir fono triukšmų santykis lygus 3.

**Nustatymo riba** (*Limit of quantification*) - mažiausia analizės koncentracija, kurią duotu metodu galima kiekybiškai nustatyti reikiamu tikslumu ir glaudumu. Chromatografijoje nustatymo riba dažniausiai laikoma tokia analizės koncentracija, kuriai signalo ir fono triukšmų santykis lygus 10.

**Tiesiškumas** (*Linearity*) – analizės koncentracijų intervalas, kuriame su reikiama koreliacija galioja tiesinė priklausomybė tarp signalo intensyvumo ir koncentracijos.

**Diapazonas** (*Range*) – analizės koncentracijų mėginyje intervalas, kuriame duotu metodu analizė gali būti nustatyta reikiamu tikslumu ir glaudumu.

**Atsparumas** (*Robutness*) – analizės metodo atsparumas nedideliems metodo sąlygų pokyčiams. Pvz. chromatografijoje tai gali būti nedideli judrios fazės greičio, judrios fazės sudėties ir pH, kolonėlės temperatūros ar kt. svyravimai.

Apibendrinant galima pasakyti, atliekant metodo validavimą būtina atsižvelgti į daugelį dalykų. Turi būti parengtas išsamus metodo validavimo protokolas, visa validavimo veikla ir rezultatai turėtų būti dokumentuojami metodo validavimo suvestinėje ataskaitoje ir patvirtinti kokybės kontrolės ir vadybos atstovų [28].

## II. EKSPERIMENTO METODIKA

### 2.1 Aparatūra

Tyrimai buvo atliekami ultraefektyviosios skysčių chromatografijos sistema Waters Acquity UPLC, sukomplektuota iš aukšto slėgio 2 kanalų gradientinio siurblio su judrios fazės nudauginimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos ir skenuojančio (200-500 nm) fotodiodinės matricos (PDA) detektoriaus.

Atskyrimai buvo atliekami Acquity UPLC BEH C8 (2,1×100 mm, 1,7 μm) kolonėlėje (Waters). Judria faze buvo naudojamas acetonitrilo ir vandens tirpalas (tūrių santykiu 55:45) su 10 mmol/L fosforo rūgšties priedu. Judrios fazės srauto greitis - 0,25 mL/min. Kolonėlės temperatūra - 25 °C, mėginio tūris - 5 μL, detektuojama 215 nm bangos ilgyje.

### 2.2 Reagentai ir tirpalai

Darbe naudoti šie reagentai:

Perindoprilio erbuminas (standartas vaistų analizei, LaboChema);

Amlodipino besilatas (standartas vaistų analizei, LaboChema);

Indapamidas (standartas vaistų analizei, LaboChema);

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%, Sigma-Aldrich);

Metanolis (MeOH) (gradientinės HPLC grynumo, ROTH, Vokietija);

Acetonitrilas (ACN) (LC-MS grynumo, ThermoFisher)

Du kartus distiliuotas ir per 0,2 μm membraninį filtrą filtruotas vanduo.

Darbiniai standartiniai tiriamų junginių tirpalai buvo ruošiami kiekvieną dieną skiedžiant pirminį standartinį tirpalą judria faze iki reikiamos koncentracijos.

### 2.3 Procedūros

Skirtingų gamintojų antihipertenziniai vaistai buvo įsigyti Eurovaistinėje. Mėginių paruošimo analizei procedūra aprašyta skyriuje „Rezultatai ir jų aptarimas“.

Tyrimų eigoje analitėms buvo matuojami šie parametrai: sulaikymo trukmė  $t_R$ , sulaikymo faktorius  $k$ , skiriamoji geba  $R_s$ , kolonėlės efektyvumas (teorinių lėkštelių skaičius  $N$ ) bei smailės simetriškumo faktorius  $T$ . Duomenys buvo apskaičiuoti naudojant kompiuterinę chromatografijos duomenų apdorojimo programą HyStar (Bruker).

Sulaikymo faktoriui  $k$  išmatuoti nesulaikomu junginiu buvo naudotas nitrato anijonas (į mėginį pridedama NaNO<sub>3</sub>). Sulaikymo faktorius apskaičiuojamas naudojantis formule (1):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

$t_R$  – tiriamo junginio sulaikymo trukmė, min;

$t_0$  – nesulaikomo junginio (nitrato anijono) sulaikymo trukmė, min.

Teorinių lėkštelių skaičius  $N$  buvo apskaičiuojamas naudojantis formule (2):

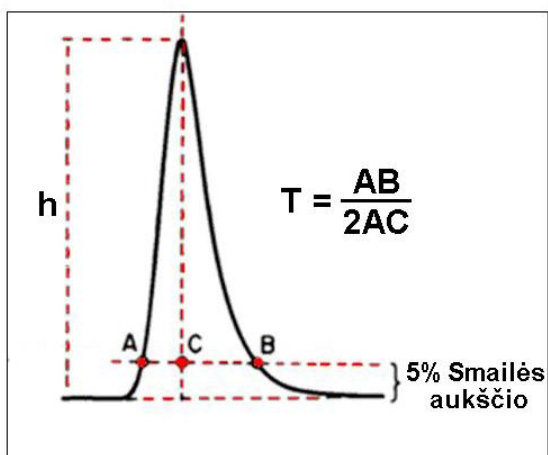
$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (2)$$

$N$  – kolonėlės teorinių lėkštelių skaičius (bedimensinis);

$t_R$  – analizės sulaikymo trukmė (min);

$w$  – smailės pagrindo plotis (min).

Smailės simetriškumo faktorius  $T$  buvo skaičiuojamas naudojantis 2.1 pav. pateikta formule:

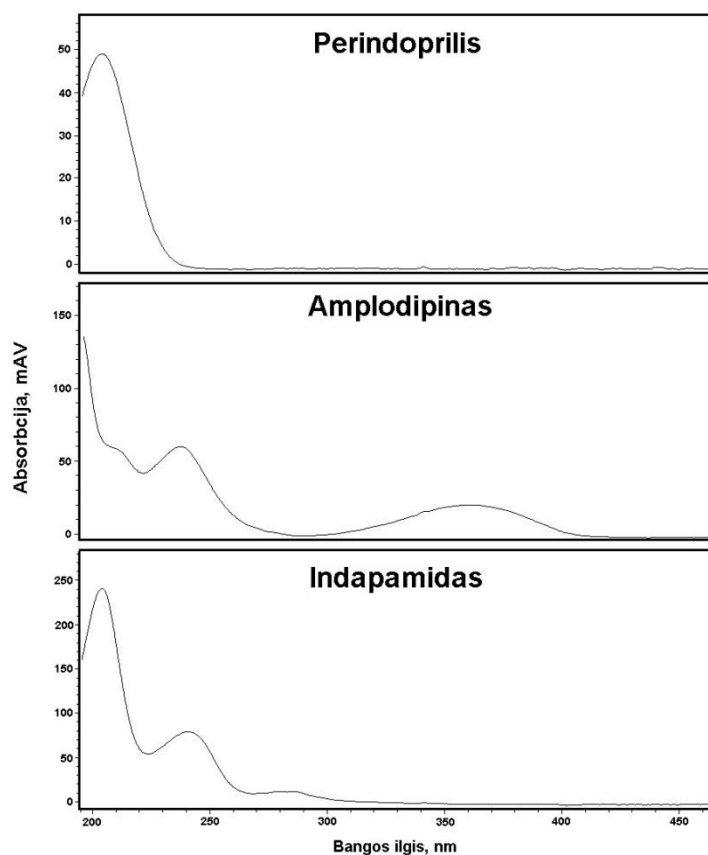


**2.1 pav.** Smailės simetriškumo įvertinimas.

### III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Chromatografinio atskyrimo ir UV detektavimo sąlygų parinkimas

Detektavimo sąlygų parinkimui PDA detektoriumi buvo išmatuoti analičių absorbcijos spektrai (**3.1 pav.**). Perindoprilis turi tik vieną absorbcijos maksimumą 205 nm bangos ilgyje. Tuo tarpu kitoms dviem analitėms registruojami keli absorbcijos maksimumai: amlodipinui – 210, 237 ir 360 nm; indapamidui – 204, 240 ir 285 nm. Nors skenuojantis PDA detektorius leidžia analizės eigoje registruoti skirtingame bangos ilgyje absorbuojančius junginius, paprastumo dėlei visų trijų analičių detektavimui pasirinkome vieną 215 nm bangos ilgį.



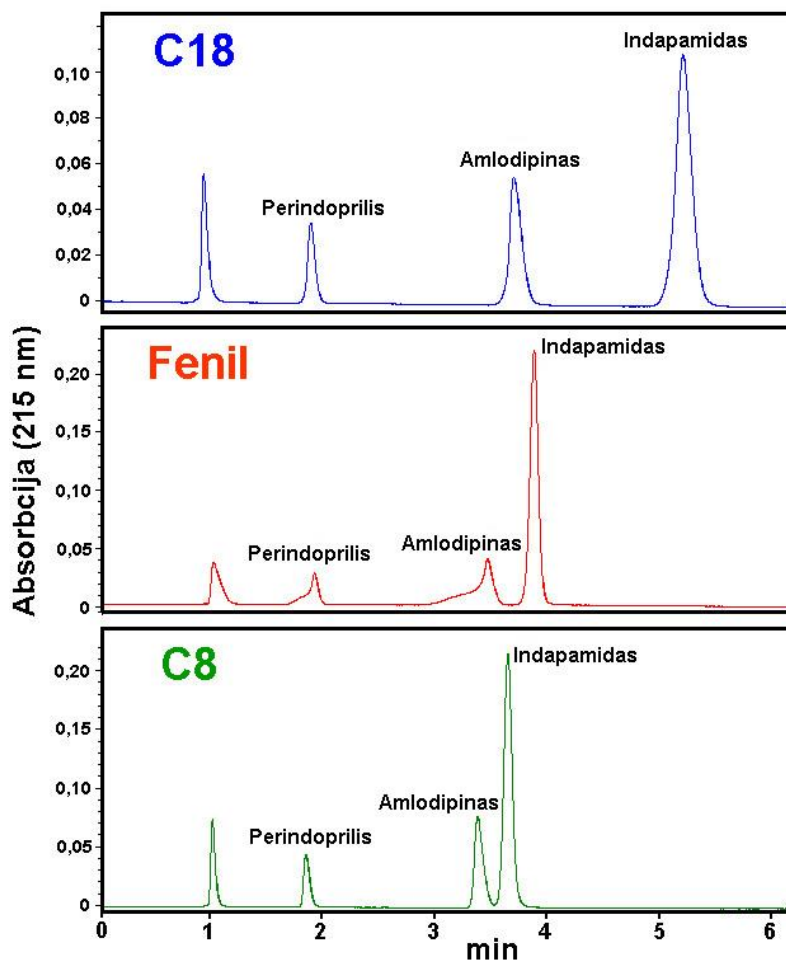
**3.1 pav.** Tiriamų junginių (koncentracija 10 mg/L) absorbcijos spektrai, išmatuoti PDA detektoriumi.

Tiriamų vaistų pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientų logaritminės ( $\log P$ ) vertės [30]: perindoprilis – 0,9; indapamidas – 2,9; amlodipinas – 3,0. Taigi, šie vaistai priskirtini vidutinio poliškumo junginiams, todėl jų atskyrimui tinkamiausias atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodas.

Pirmiausiai identiškose sąlygose palyginome analičių atskyrimą kolonėlėse su trimis atvirkščių fazių sorbentais. Tai hibridiniai (dalyje siloksaninių  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$  grupių deguonis pakeistas etileno tilteliais) sorbentai silikagelio pagrindu su paviršiuje imobilizuotais oktadecilo (C18), oktilo (C8) ir fenilo (Fenil) ligandais. Preliminaria judria faze pasirinkome 15 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  parūgštintą  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  tirpalą. **3.2 pav.** pavaizduotos tiriamų junginių mišinių chromatogramos. Kaip ir buvo galima tikėtis, visose kolonėlėse analitės yra

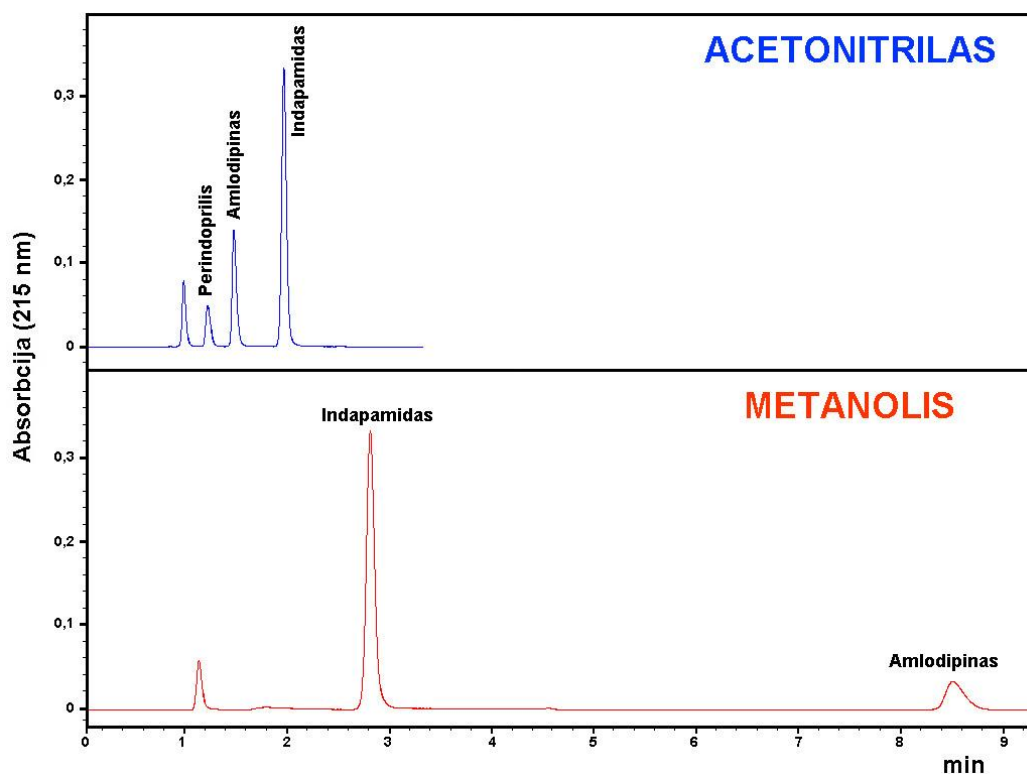


atskiriamos, tačiau Fenil kolonėlėje perindoprilui ir amlodipinui registruojamos smailės su labai išplitusiu frontu. Kadangi kitose kolonėlėse analičių smailės buvo simetriškos, smailių išplitimo priežasčių Fenil kolonėlėje nesiaiškinome. Chromatogramose registruojama ketvirta smailė (sulaikymo trukmė ~ 1 min.) priskirtina amlodipino priešjoniui benzensulfonatui (farmacijoje vadinamam besilatu), kuris duotose sąlygose yra nesulaikomas. Tolimesniems tyrimams pasirinkome didesniu efektyvumu analitėms pasižyminčią C8 kolonėlę.



**3.2 pav.** Tiriamų junginių mišinio (10 mg/L kiekvieno junginio) chromatogramos su skirtingomis kolonėlėmis. Judri fazė: H<sub>2</sub>O:ACN (tūrių santykiu 65:35) + 15 mmol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; judrios fazės greitis – 0,25 mL/min; UV detektavimas 215 nm.

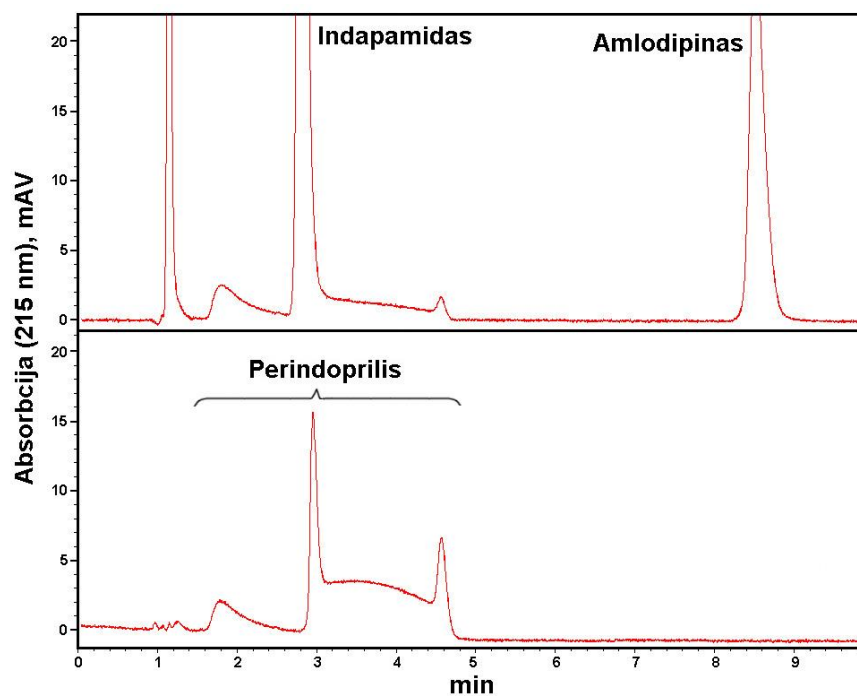
**3.3 pav.** palygintas tiriamų junginių atskyrimas organiniu judrios fazės tirpikliu naudojant acetonitrilą ir metanolį. Atvirkščių fazių chromatografijoje metanolis pasižymi truputį silpnesne eliucine geba už acetonitrilą. Todėl įprastai pakeitus judrioje fazėje acetonitrilą metanoliumi, analičių sulaikymo trukmės tik šiek tiek padidėja, tačiau drastiški sulaikymo/efektyvumo ar kt. pokyčiai, kaip taisyklė, neregistruojami. Nagrinėjamu atveju acetonitrilo pakeitimas metanoliumi sukėlė žymius pokyčius: perindoprilio smailė apskritai išnyko, o amlodipino sulaikymo trukmė metanolyje padidėjo beveik 6 kartus. Ir tik indapamido elgsena atitiko įprastinę tokiomis atvejais elgseną.



**3.3 pav.** Judrios fazės organinio tirpiklio prigimties įtaka atskyrimui. Kolonėlė – UPLC BEH C8. Judri fazė: H<sub>2</sub>O:org. tirpiklis (tūrių santykiu 55:45) + 15 mmol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; judrios fazės greitis – 0,25 mL/min; UV detektavimas 215 nm.

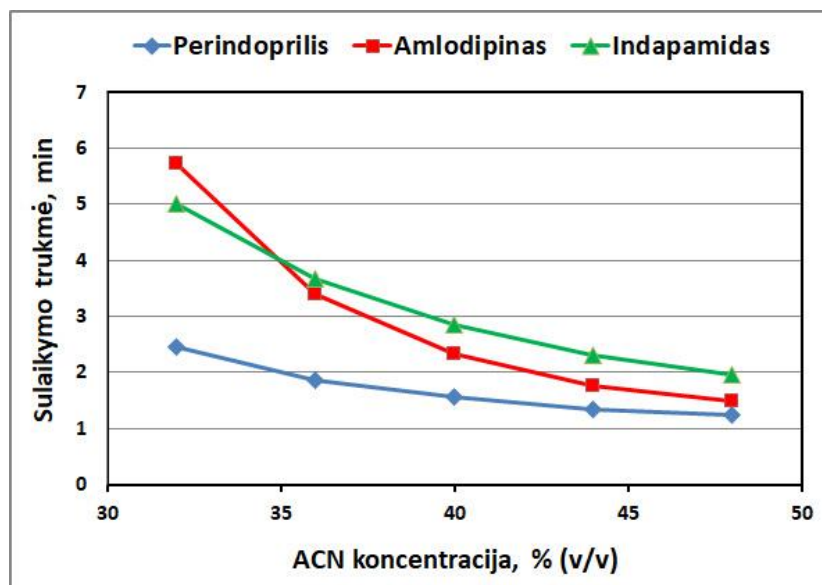
Metanolio judrioje fazėje drastiškai sustiprėjančio amlodipino sulaikymo priežastis neaiški. Detalesnė gautos chromatogramos analizė (**3.4 pav.** viršutinė chromatograma) parodė, kad perindoprilio smailė metanolio turinčioje judrioje fazėje neišnyko, o tiesiog labai išsiplėtė ir transformavosi į tris mažo intensyvumo stipriai išplaukusias smailes. Tai patvirtina ir identiškose sąlygose išmatuota vien tik perindoprilio standarto chromatograma (**3.4 pav.** apatinė chromatograma). Tos analitės zonos profilis įprastai reiškia, kad judrioje fazėje su analite vyksta kažkokie pakankamai lėti cheminiai pokyčiai. Pažvelgus į tiriamų junginių struktūras matyti, kad tik perindoprilis turi karboksi funkcinę grupę. Todėl tikimiausia perindoprilio degradacijos priežastis – lėta jo karboksi grupės esterifikacija rūgščioje terpėje vykdant atskyrimą metanolyje.

Visi tolimesni tyrimai buvo atliekami naudojant organiniu judrios fazės tirpikliu acetonitrilą.



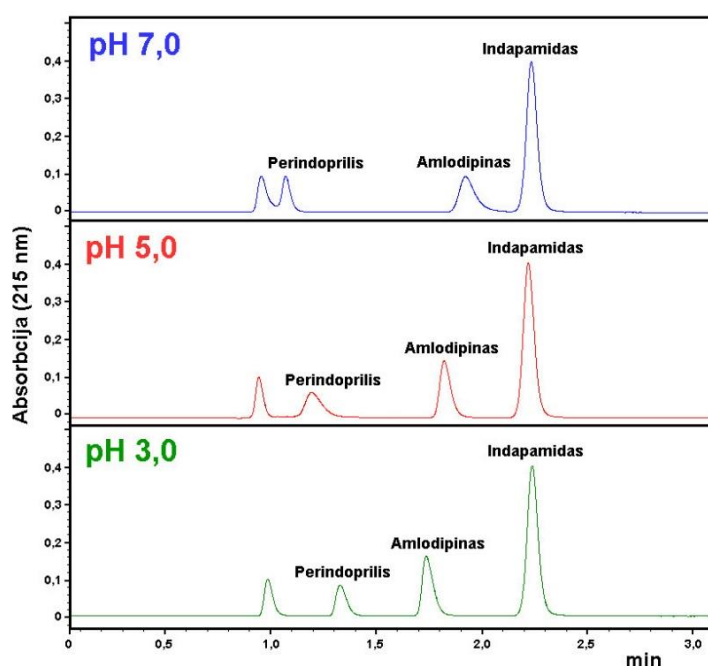
**3.4 pav.** Išdidinto vaizdo mišinio chromatograma išmatuota su MeOH judria faze (viršuje) ir identiškos sąlygose išmatuota perindoprilio standarto chromatograma (apačioje).

**3.5 pav.** demonstruoja ACN koncentracijos judrioje fazėje įtaką analičių sulaikymo trukmėms. Didinant ACN koncentraciją, judrios fazės poliškumas mažėja (t.y. jos eliucinė geba stiprėja), todėl analičių sulaikymo trukmės mažėja. ACN koncentracijos įtaka amlodipino sulaikymui yra stipresnė nei perindoprilio ir indapamido sulaikymui, todėl tirpiklio koncentracija reikšmingai įtakoja ir atskyrimo atrankumą. Optimali ACN koncentracija - 45% (tūrių santykiu).



**3.5 pav.** Acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka tiriamų junginių sulaikymui.

Tiriami junginiai pasižymi silpnomis rūgštinėmis/bazinėmis savybėmis. Tokio tipo junginių chromatografinę elgseną įprastai stipriai įtakoja judrios fazės pH. **3.6 pav.** pavaizduotos analičių mišinio chromatogramos, išmatuotos su trijų skirtingų pH verčių judriomis fazėmis. Kaip matyti iš pateiktų chromatogramų, pH įtaka analičių sulaikymui yra nevienoda: didėjant judrios fazės pH, indapamido sulaikymo trukmė beveik nekinta, perindoprilio sulaikymas silpnėja, o amlodipino, priešingai, - stiprėja. Atvirkščių fazių chromatografijoje pH įtakoja tik keičiančių savo krūvį (tuo pačiu ir poliškumą) junginių sulaikymą: didėjant krūviui sulaikymas silpnėja ir atvirkščiai. Todėl norint patikimai interpretuoti tyrimų rezultatus, būtina žinoti junginių rūgštinių/bazinių grupių  $pK_a$  vertes. Deja, literatūroje nepavyko rasti  $pK_a$  verčių visoms analičių amino grupėms [29].



**3.6 pav.** Judrios fazės pH įtaka atskyrimui. Judri fazė -  $H_2O:ACN$  (tūrių santykiu 55:45) su 10 mmol/L  $H_3PO_4/KH_2PO_4$  arba  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buferio priedu.

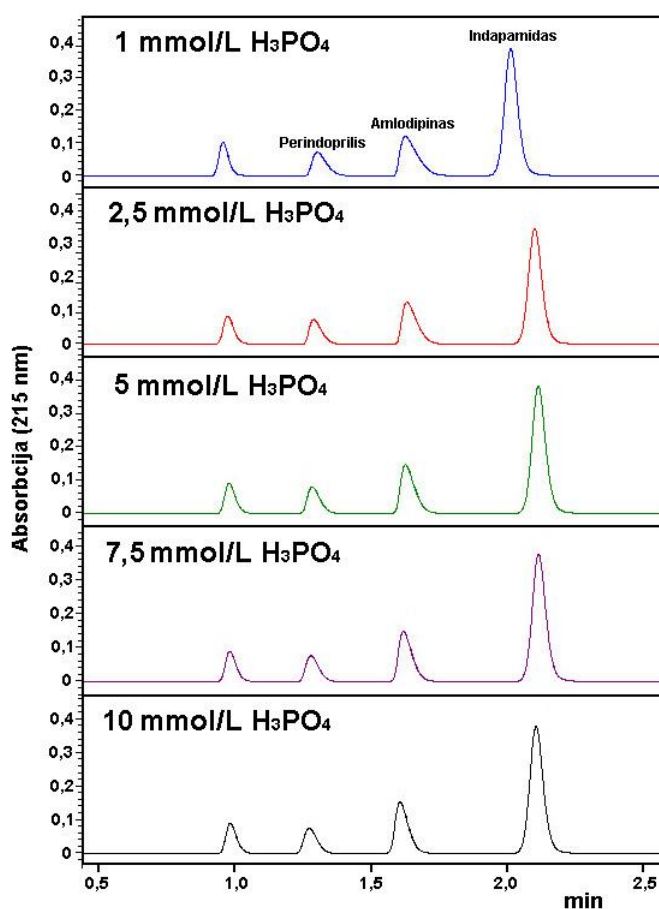
Gauti rezultatai rodo, kad tirtame pH intervale indapamidas nekeičia savo krūvio. Nors jis turi tris amino grupes, literatūroje pateikiama tik viena  $pK_a=8,9$  vertė. Tokia  $pK_a$  vertė rodo, kad visoje tirtoje pH srityje ši amino grupė yra pilnai protonizuota. Kadangi indapamido sulaikymo pH neįtakoja, tai turėtų reikšti, kad kitų dviejų amino grupių protonizacijos/deprotonizacijos pokyčiai nagrinėjamoje pH srityje nevyksta.

Amlodipinas turi dvi amino grupes, tačiau literatūroje pateikiama viena  $pK_a=8,6$  vertė, rodanti, kad  $pH \leq 6,6$  srityje ši amino grupė yra 100% protonizuota. Tačiau gautose chromatogramose matyti, jog amlodipino sulaikymo trukmė tolygiai mažėja mažėjant pH visame tirtame intervale. Tikėtina, kad mažinant pH pradeda protonizuotis ir antroji amino grupė.

Perindoprilio elgsenai greičiausiai lemiamą įtaką turi jo rūgštinė karboksi grupė ( $pK_a=3,8$ ). Neutralioje terpėje ( $pH=7,0$ ) ši grupė pilnai disocijavusi, kas lemia silpniausią analitės sulaikymą. Mažinant judrios fazės pH, dėl karboksi grupės protonizacijos neigiamas perindoprilio krūvis mažėja, todėl sulaikymas stiprėja.

Judrios fazės pH įtakoja ir analičių smailių efektyvumą. Didžiausias efektyvumas visiems junginiams registruojamas rūgščioje terpėje (pH=3,0). pH įtaka indapamido efektyvumui palyginti nežymi, tuo tarpu amlodipinui ir perindoprilui rūgštinant efektyvumas išauga iki ~1,5-2 kartų.

Galiausiai buvo įvertinta H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> koncentracijos judrioje fazėje įtaka tiriamų junginių chromatografini elgsenai. Iš **3.7 pav.** pateiktų rezultatų matyti, kad rūgšties įtaka tiek analičių sulaikymui, tiek ir jų smailių efektyvumui yra palyginti nežymi. Tik esant mažiausiai rūgšties koncentracijai (1 mmol/L) nustatytas truputį ryškesnis smailių efektyvumo sumažėjimas, kuris greičiausiai yra sukeliamas dėl nepakankamos judrios fazės buferinės talpos.



**3.7 pav.** Fosforo rūgšties koncentracijos judrioje fazėje įtaka. Judri fazė - H<sub>2</sub>O:ACN (tūrių santykiu 55:45) su atitinkamos koncentracijos H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> priedu.

### 3.2. Metodo validavimas

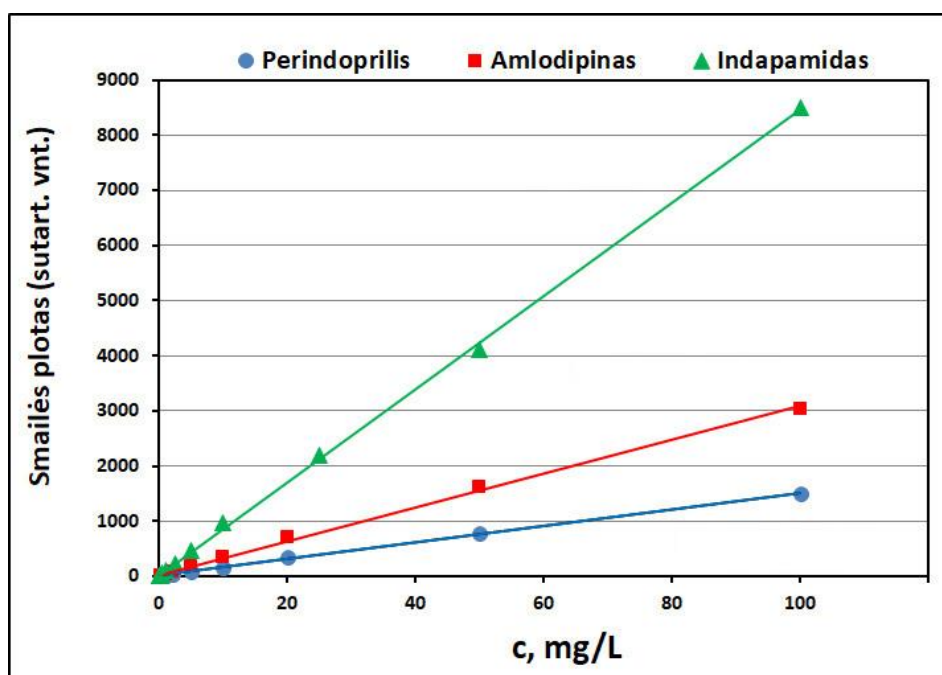
Optimizavus chromatografinio atskyrimo sąlygas buvo atliktas metodo validavimas. Pirmiausiai buvo išmatuoti chromatografinės sistemos tinkamumo parametrai (**3.1 lentelė**). Kaip matyti, nei vienas iš tinkamumo parametrų neviršija standartuose numatytų rekomenduojamų ribinių verčių.

**3.1. lentelė.** Sistemos tinkamumo parametrai.

Parametras	Išmatuota vertė			Rekomenduojama vertė
	Perindoprilis	Amlodipinas	Indapamidas	
Sulaikymo trukmė, min	1,34	1,75	2,29	-
Sulaikymo faktorius, <i>k</i>	0,68	1,19	1,86	-
Smailės pagrindo plotis <i>w</i> , min	0,08	0,09	0,11	-
Skiriamoji geba, <i>R<sub>s</sub></i>	-	4,8	5,4	≥2
Smailės simetriškumas, <i>T</i>	1,4	1,3	1,1	≤ 2
Efektyvumas, <i>N</i>	4480	6050	6900	≥2000
Sulaikymo trukmių RSD <sup>a</sup> , % (n=5)	0,18	0,28	0,25	≤ 1%

<sup>a</sup> RSD – santykinis standartinis nuokrypis.

**Tiesiškumo intervalai.** Tiesiškumo intervalams nustatyti buvo ruošiami 9-11 skirtingų koncentracijų analičių standartų tirpalai. Ruošiama po 3 kiekvienos koncentracijos tirpalus, tirpalai analizuojami ir gautose chromatogramose išmatuojami analičių smailių plotai. **3.8 pav.** pavaizduotos išmatuotos kalibravimo kreivės, o **3.2 lentelėje** surašyti gauti kalibravimo duomenys (trijų matavimų vidurkiai).



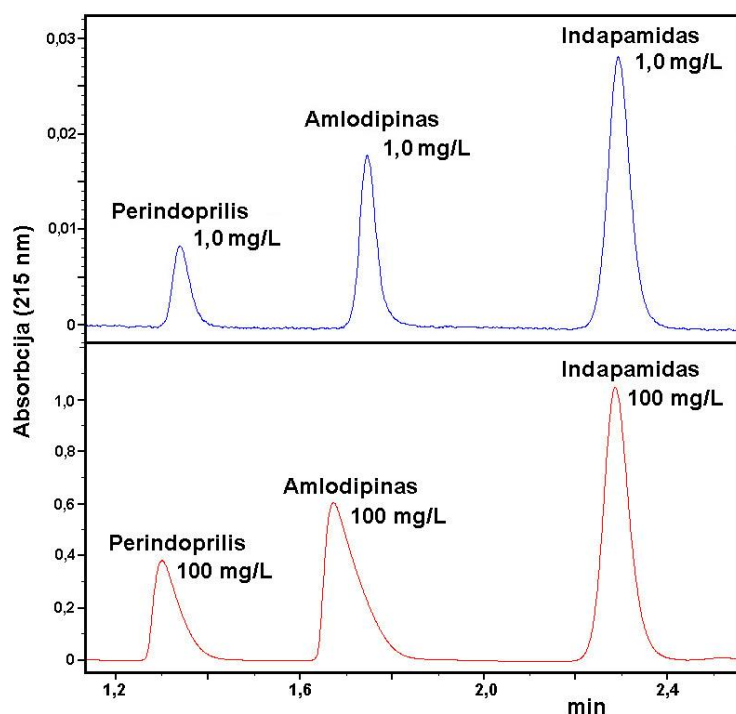
**3.8 pav.** Tiriamų junginių kalibracinės kreivės (n=3).

**3.2 lentelė.** Tiriamų junginių kalibravimo standartų rezultatai (n=3)

Koncentracija, mg/L	Smailės plotas		
	Perindoprilis	Amlodipinas	Indapamidas
0,05	-	-	5,1
0,10			10,0
0,20	3,5	7,7	-
0,25	-	-	24,1
0,50	8,2	17,6	55,1
1,00	19	41	100
2,00	36	74	-
2,50	-	-	238
5,00	85	173	473
10,0	169	344	981
20,0	346	715	-
25,0	-	-	2195
50,0	788	1610	4125
100	1500	3042	8490

Nustatyta, kad didesnių koncentracijų srityje ( $\geq 20$  mg/L) perindoprilio ir amlodipino smailės pradeda plėstis, o jų simetriškumas blogėja. Tai iliustruoja **3.9 pav.** palygintos skirtingų koncentracijų standartų chromatogramos. Tokį smailių išsiplėtimą sukelia masės perkrova, įprastai stipriau pasireiškianti silpniau sulaikomoms analitėms. Tačiau net ir esant perkrovoms yra išlaikomas kalibravimo kreivės tiesiškumas.

**3.3 lentelėje** surašytos kalibravimo charakteristikos: koncentracijų tiesiškumo intervalai, tiesės lygtys ir koreliacijos koeficientai. Visoms analitėms tiesiškumas galioja mažiausiai iki 100 mg/L koncentracijos. Didesnės koncentracijos nebuvo tiriamos, kadangi vaistų mėginių tirpaluose tokių koncentracijų negali būti.



**3.9 pav.** Vidutinės (1,0 mg/L) ir didžiausios (100 mg/L) koncentracijų tiriamų junginių mišinio chromatogramų palyginimas.

**3.3 lentelė.** Kalibravimo charakteristikos (n=3)

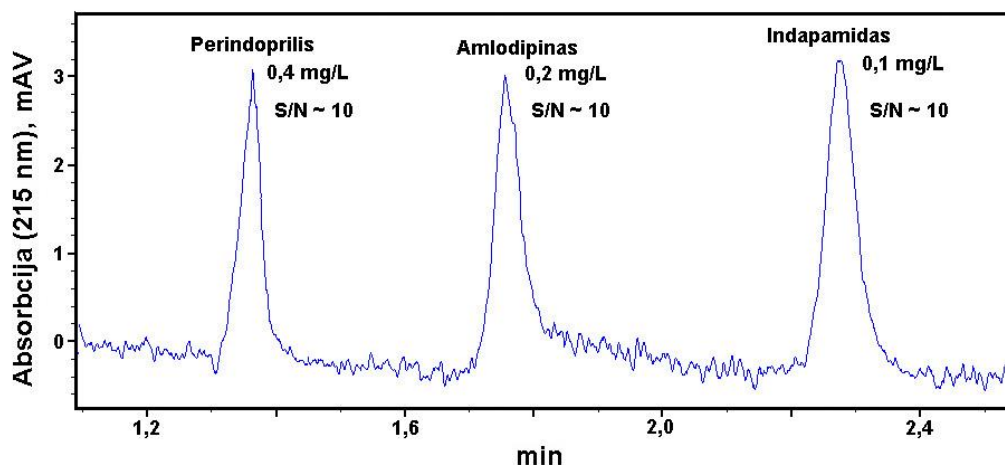
Analitė	Tiesiškumo intervalas, mg/L	Tiesės lygtis	$R^2$
Perindoprilis	0,40 - 100	$y = 15,052x + 12,708$	0,9989
Amlodipinas	0,20 - 100	$y = 30,549x + 28,863$	0,9985
Indapamidas	0,10 - 100	$y = 83,063x + 36,506$	0,9982

**Aptikimo ir nustatymo ribos.** Aptikimo riba buvo laikoma analitės koncentracija, kuriai signalo (smailės aukščio) ir fono triukšmų santykis lygus 3. Tuo tarpu nustatymo riba atitinka koncentraciją, kuriai šis santykis lygus 10. Tiriamų junginių aptikimo ir nustatymo ribos surašytos **3.4 lentelėje**, o **3.10 pav.** pavaizduota standartinio tirpalo, kuriame tiriamų junginių koncentracijos atitinka nustatymo ribas, chromatograma. Nustatymo ir aptikimo ribos gerai koreliuoja su tiriamų junginių UV absorbcija (215 nm) detektavimo bangos ilgyje.

**3.4 lentelė.** Tiriamų junginių aptikimo ir nustatymo ribos (n=3)

Analitė	Aptikimo riba, mg/L	Nustatymo riba, mg/L
Perindoprilis	0,12	0,40
Amlodipinas	0,06	0,20
Indapamidas	0,03	0,10





**3.10 pav.** Standarto, kuriame tiriamų junginių koncentracijos atitinka nustatymo ribas, chromatograma.

**Glaudumas ir tikslumas.** Metodo glaudumui įvertinti buvo ruošiami ir analizuojami šeši trijų skirtingų koncentracijų analičių tirpalai, išmatuojami jų smailių plotai ir apskaičiuojamas smailių plotų RSD. Rezultatai surašyti **3.5 lentelėje**.

**3.5 lentelė.** Metodo glaudumo įvertinimo rezultatai (n=6).

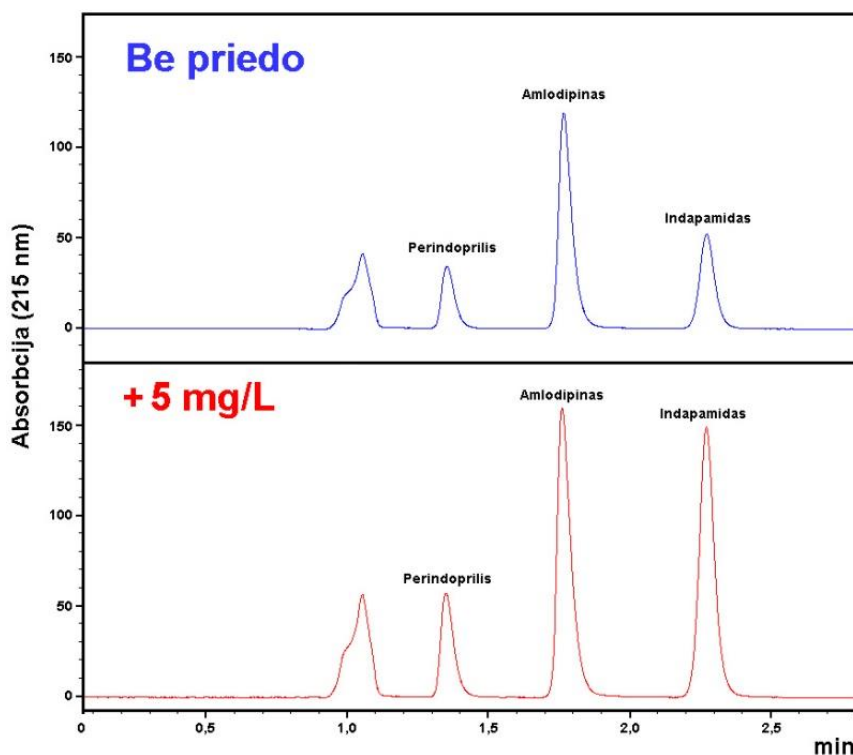
Koncentracija, mg/L	Analitė	Smailės plotas	RSD, %
1	Perindoprilis	20,2; 19,6; 20,0; 19,8; 19,7; 20,5	1,7
	Amlodipinas	40,4; 39,1; 41,0; 39,6; 39,6; 41,3	2,2
	Indapamidas	101; 103; 98; 101; 102; 99	1,8
10	Perindoprilis	165; 170; 172; 168; 175; 174	2,2
	Amlodipinas	351; 340; 358; 356; 344; 345	2,1
	Indapamidas	977; 994; 998; 980; 979; 975	1,0
50	Perindoprilis	782; 794; 781; 772; 796; 790	1,2
	Amlodipinas	1601; 1629; 1574; 1582; 1608; 1623	1,4
	Indapamidas	4100; 4142; 4093; 4155; 4120; 4056	0,9

Metodo tikslumas įprastai vertinamas atliekant etaloninių pavyzdžių analizę, analizuojant mėginius savo ir alternatyviu metodu arba standartinių priedų metodu [28]. Šiame darbe naudojome standartinių priedų metodą. Standartinių priedų metode imamos kelios realaus mėginio tirpalo porcijos: be priedo ir su skirtingų koncentracijų analičių priedais. Mėginiai analizuojami ir juose nustatomos analičių priedų koncentracijos bei apskaičiuojamos jų išgavos. Tikslumo įvertinimui mėginiu buvo pasirinktos tabletės Co-Amlessa (gamintojas – KRKA), kurių sudėtyje yra visos trys analitės. Buvo pridedamos trys skirtingos analičių koncentracijos - 5, 20 ir 50 mg/L. Tikslumo įvertinimo rezultatai pateikti **3.6 lentelėje**, o **3.11**

**pav.** pavaizduota Co-Amlessa preparato mėginio be priedo ir to paties mėginio su 5 mg/L koncentracijos tiriamų junginių standarto priedu chromatogramos. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad metodas pasižymi puikiu tikslumu – su viena išimtimi (20 mg/L indapamido priedas) priedų išgavos yra 98,8 iki 102,8 % intervale.

**3.6 lentelė.** Metodo tikslumo vertinimo rezultatai (n=3).

Analitė	Pridėta, mg/L	Nustatyta, mg/L	Vidurkis, mg/L	Išgava, %	RSD, %
Perindoprilis	5,00	5,10	5,02	100,4	1,9
		5,04			
		4,91			
20,0	20,0	20,6	19,9	99,3	5,5
		20,4			
		18,6			
50,0	50,0	50,6	49,4	98,8	2,4
		49,3			
		48,2			
Amlodipinas	5,00	5,23	5,09	101,8	2,8
		5,08			
		4,95			
20,0	20,0	21,2	20,6	102,8	2,9
		20,5			
		20,0			
50,0	50,0	50,8	50,3	100,6	1,6
		50,7			
		49,4			
Indapamidas	5,00	5,20	5,13	102,5	1,4
		5,12			
		5,06			
20,0	20,0	18,8	18,8	94,0	0,5
		18,7			
		18,9			
50,0	50,0	50,3	50,1	100,2	1,3
		50,6			
		49,4			



**3.11 pav.** Co-Amlessa (KRKA) preparato mėginio be priedo ir to paties mėginio su 5 mg/L koncentracijos tiriamų junginių standarto priedu chromatogramos.

### 3.3 Farmacinių preparatų analizė

Analizei buvo pasirinkti keturi dviejų skirtingų gamintojų (KRKA ir Les Laboratories Servier) antihipertenziniai vaistai komerciniais pavadinimais Co-Amlessa, Triplixam ir Prestarium.

**Mėginio paruošimo analizei procedūra.** Pasveriamos 5-ios atitinkamo vaisto tabletės ir apskaičiuojama vidutinė vienos tabletės masė (**3.7 lentelė**). Atsvertos tabletės kruopščiai susmulkinamos porceliano grūstuvėje. Analizei sveriamos 3 porcijos po 0,200 g susmulkintų tablečių, tirpinama ~ 60 - 70 mL H<sub>2</sub>O:ACN (tūrių santykiu 30:70) mišinio 10 min veikiant ultragarsu ir skiedžiama acetonitrilu iki 100 mL. Porcija (~ 1 mL) tirpalo filtruojama 0,2 μm švirkštiniu membraniniu filtru, 5 kartus praskiedžiama judria faze ir analizuojama.

Analizės rezultatai susisteminti **3.8 lentelėje**. Į vaistus perindoprilis gali būti pridedamas arba perindoprilio erbumino, arba perindoprilio arginino druskos pavidalu, o amlodipinas įprastai pridedamas amlodipino besilato druskos pavidalu. Gamintojai skirtingai deklaruoja veikliosios medžiagos masę tabletėse ir tai įneša sumaištis skaičiuojant analizės rezultatus. Pvz., Triplixam vaisto apraše teigiama: „Vienoje plėvele dengtoje Triplixam tabletėje yra 3,395 mg perindoprilio, atitinkančio 5 mg perindoprilio arginino, 1,25 mg indapamido ir 6,935 mg amlodipino besilato, atitinkančio 5 mg amlodipino“. Taigi, perindopriliiui ant Triplixam pakuotės pateikiama jo pridedamos druskos masė (5 mg), tuo tarpu amlodipinui, nors jis taip pat pridedamas kaip besilato druska, pateikiama tik paties amlodipino be priešjonio masė (5 mg). Tokiu pat būdu 3.8 lentelėje yra pateikiami analizės rezultatai.

**3.7 lentelė.** Vaistų tablečių svėrimo rezultatai (n=3).

Vaistas	Tabletės masė, g	Vidutinė tabletės masė, g
Co-Amlessa	0,2785	0,2808
	0,2839	
	0,2780	
	0,2775	
	0,2863	
Triplixam	0,1845	0,1835
	0,1822	
	0,1868	
	0,1807	
	0,1832	
Prestarium (10 mg)	0,1601	0,1610
	0,1596	
	0,1607	
	0,1606	
	0,1638	
Prestarium (5 mg)	0,0799	0,0799
	0,0806	
	0,0791	
	0,0789	
	0,0810	

**3.8 lentelė.** Antihipertenzinių vaistų analizės rezultatai (n=3)

Komercinis vaisto pavadinimas (gamintojas)	Veiklioji medžiaga	Deklaruojamas kiekis tabletėje, mg	Nustatyta tabletėje, mg	RSD, %
Co-Amlessa (KRKA)	Perindoprilio erbuminas	8	7,86	2,2
	Amlodipinas	10	9,59	1,9
	Indapamidas	2,5	2,4	1,5
Triplixam (Les Laboratoires Servier)	Perindoprilio erbuminas	5	5,09	1,6
	Amlodipinas	5	5,05	1,3
	Indapamidas	1,25	1,31	1,8
Prestarium (Les Laboratoires Servier)	Perindoprilio argininas	5	5,06	2,0
Prestarium (Les Laboratoires Servier)	Perindoprilio argininas	10	9,92	1,2

Atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad nustatyti veikliųjų medžiagų kiekiai pakankamai gerai atitinka gamintojų deklaruotus kiekius.

## IŠVADOS

1. Palyginus perindoprilio, amlodipino ir indapamido atskyrimą BEH C18, BEH C8 ir BEH Phenyl kolonėlėse nustatyta, kad efektyviausiai šie junginiai yra atskiriami C8 kolonėlėje.

2. Naudojant judrios fazės organiniu komponentu metanolį atskyrimo metu vyksta perindoprilio degradacija, todėl metanolis nėra tinkamas tirpiklis perindoprilio nustatymui skysčių chromatografijos metodu.

3. Didžiausias efektyvumas visiems junginiams registruojamas rūgščioje terpėje (pH=3,0). Judrios fazės pH įtaka indapamido efektyvumui palyginti nežymi, tuo tarpu amlodipinui ir perindoprilui parūgštinus judrią fazę nuo 7 iki 3 pH, efektyvumas padidėja iki ~ 1,5 - 2 kartų.

4. Išmatuotos metodo charakteristikos neviršija reglamentuose numatytų ribinių verčių. Dviejų skirtingų gamintojų antihipertenziniuose preparatuose nustatyti veikliųjų medžiagų kiekiai gerai atitinka gamintojų deklaruotus kiekius.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Zofenoprilis plus: dar didesnė nauda ir organų apsauga, Lietuvos gydytojo žurnalas Nr. 10, (2014). Interneto prieiga: [https://www.emedicina.lt/lt/gydytojui/lietuvos\\_naujienos/v-69.html](https://www.emedicina.lt/lt/gydytojui/lietuvos_naujienos/v-69.html)
2. 2018 metų vaistinių preparatų suvartojimo ataskaita, VVKT, (2020). Interneto prieiga: [www.vvkt.lt](http://www.vvkt.lt)
3. Ž. Petrulionienė, Koronarinė širdies liga. Rizikos veiksniai, klinikiniai simptomai ir gydymas, Vaistų žinios, (2010). Interneto prieiga: [http://www.heart.lt/rizikos\\_veiksniai/padidejes\\_kraujospudis/kraujospudi\\_mazinantys\\_vai\\_stai/3915/](http://www.heart.lt/rizikos_veiksniai/padidejes_kraujospudis/kraujospudi_mazinantys_vai_stai/3915/)
4. A. Laucevičius, Dar kartą apie arterinės hipertenzijos gydymą deriniais, Lietuvos gydytojo žurnalas Nr.3, (2016). Interneto prieiga: [http://www.emedicina.lt/lt/zurnalai/lietuvos\\_gydytojo\\_zurnalas/lietuvos\\_gydytojo\\_zurnalas\\_2016/3/dar\\_karta\\_apie\\_arterines\\_hipertenzijos\\_gydyma\\_deriniais.html](http://www.emedicina.lt/lt/zurnalai/lietuvos_gydytojo_zurnalas/lietuvos_gydytojo_zurnalas_2016/3/dar_karta_apie_arterines_hipertenzijos_gydyma_deriniais.html)
5. A.H. Gradman, Rationale for triple-combination therapy for management of high blood pressure, *J. Clin. Hypertens*, 12 (2010) 869-878.
6. S.J. Lin, H.L.Wu, S.H. Chen, Y.H. Wen, Derivatization gas chromatographic determination of perindopril, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1751-1762.
7. H. Fael, A.A.H. Sakur, Novel spectrofluorimetric method for the determination of perindopril erbumine based on charge transfer reaction with 7-hydroxycoumarin, *J. Fluoresc.*, 25 (2015) 811-818.
8. H. Fael, A.A. Sakur, Novel spectrofluorimetric method for the determination of perindopril erbumine based on fluorescence quenching of rhodamine B, *J. Fluoresc.*, 25 (2015) 1577-1584.
9. H.E. Abdellatef, Utility of certain pi-acceptors for the spectrophotometric determination of perindopril, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 17 (1998) 1267-1271.
10. N. Rahman, N. Anwar, M. Kashif, Optimized and validated initial-rate method for the determination of perindopril erbumine in tablets, *Chem. Pharm. Bull.*, 54 (2006) 33-36.
11. N. Rahman, H. Rahman, A. Khatoon, Development of spectrophotometric method for the determination of perindopril erbumine in pharmaceutical formulations using 2,4 dinitrofluorobenzene, *J. Chil. Chem. Soc.*, 57 (2012) 1069-1073.
12. M.A. Hegazy, S.S. Abbas, H.E. Zaazaa, H.M. Essam, Conventional univariate versus multivariate spectrophotometric assisted techniques for simultaneous determination of perindopril arginin and amlodipine besylate in presence of their degradation products, *Spectrochim. Acta. A.*, 150 (2015) 940-948.
13. M. Paczkowska, P. Zalewski, P. Garbacki, A. Talaczynska, A. Krause, J. Cielecka-Piontek, The Development and Validation of a Stability-Indicating UHPLC-DAD Method for Determination of Perindopril Arginine in Bulk Substance and Pharmaceutical Dosage Form, *Chromatographia*, 77 (2014) 1497-1501.
14. N.S. Kumar, V. Sreenivasulu, B. Ramachandra, M. Asif, A.A. Ibrahim, A Stability-Indicating LC-MS Method for Determination of Perindopril and Its Process Related Impurities, *Pharm. Chem. J.*, 52 (2018) 378-383.

15. N. Erk, *LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations*, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 26 (2001) 43-52.
16. H. Jogia, U. Khandelwal, T. Gandhi, S. Singh, D. Modi, *Development and Validation of a Stability-Indicating Assay Method for Simultaneous Determination of Perindopril and Indapamide in Combined Dosage Form by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, *J. AOAC. Int.*, 93 (2010) 108-115.
17. N.F. Al-Tannak, *UHPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Perindopril Arginine and Indapamide Hemihydrate in Combined Dosage Form: A Stability-Indicating Assay Method*, *Sci. Pharmaceutica*, 86 (2018) Article Number: UNSP 7.
18. H.E. Zaazaa, S.S. Abbas, H.A.M. Essam, M.G. El-Bardicy, *Validated Chromatographic Methods for Determination of Perindopril and Amlodipine in Pharmaceutical Formulation in the Presence of their Degradation Products*, *J. Chromatogr. Sci.*, 51 (2013) 533-543.
19. M. Gumustas, S.A. Ozkan, *A Validated Stability-Indicating RP-LC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine and Perindopril in Tablet Dosage Form and Their Stress Degradation Behavior Under ICH-Recommended Stress Conditions*, *J. AOAC. Int.*, 96 (2013) 751-757.
20. R.I. El-Bagary, E.E. Elkady, S. Mowaka, M.A. Attallah, *A Validated HPLC Method for Simultaneous Determination of Perindopril Arginine, Amlodipine, and Indapamide: Application in Bulk and in Different Pharmaceutical Dosage Forms*, *J. AOAC. Int.*, 100 (2017) 992-999.
21. L. Karadurmus, M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu, S.A. Ozkan, *A novel core-shell-based chromatographic method supported by ratio derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of perindopril, indapamide, and amlodipine ternary mixtures*, *Turk. J. Chem.*, 42 (2018) 1408-1419.
22. K. Patel, U. Chhalotiya, H. Kacchiya, J. Patel, D.M. Shah, D. Nagda, *Simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide and amlodipine besylate in newer combination of anti-hypertensive drugs in pharmaceutical dosage form by thin layer chromatography method*, *Separ. Sci. Plus*, (2020) DOI: 10.1002/sscp.202000010.
23. G. A. Shabir, *Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry*, Interneto prieiga: <http://www.demarcheiso17025.com/document/Step-by-Step%20Analytical%20Methods%20Validation%20and%20Protocol%20in%20the%20Quality%20System%20Compliance%20Industry.pdf>
24. M. Piepoli, *Analytical Method Validation: What is Expected?*, (2017) Interneto prieiga: [https://www.mastercontrol.com/gxp-lifeline/analytical\\_method\\_validation\\_0908/](https://www.mastercontrol.com/gxp-lifeline/analytical_method_validation_0908/)
25. *International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Text and Methodology on Validation of Analytical Procedures*, (2005). Interneto prieiga: [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF)
26. N. Toomula, A. Kumar, S. Kumar, V.S. Bheemidi, *Development and validation of analytical methods for pharmaceuticals*, *J. Anal. Bioanal. Techniques*, 2 (2011) 1000127.
27. G. Santhosh, G. Nagasowjanya, A. Ajitha, Y. Uma Maheswara Rao, *HPLC method development and validation: an overview*, *Int. J. Pharm. Research Anal.*, 4 (2014) 274-280.

28. J.P. Agalloco, F.J. Carleton, *Validation of Pharmaceutical Processes*, (2008) 403-405.

Interneto prieiga:

<https://books.google.lt/books?id=aKj2nJZdf8IC&printsec=frontcover&hl=lt#v=onepage&q&f=false>

29. Interneto prieiga: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



# SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

JOANA MILOŠ

## ANTIHIPERTENZINIŲ PREPARATŲ PERINDOPRILIO PAGRINDU TYRIMAS SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU

**Darbo vadovas:** prof. habil. dr. Audrius Padarauskas

Buvo sukurtas paprastas, greitas ir tikslus atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodas, skirtas perindopriui, amlodipinui ir indapamidui nustatyti antihipertenziniuose farmaciniuose preparatuose. Atskyrimas buvo atliktas naudojant Acquity BEH C8 kolonėlę, judriąją fazę, susidedančią iš acetonitrilo/vandens (tūrių santykiu 45:55) ir turinčią 10 mmol/L  $H_3PO_4$ , ir UV detektavimą esant 215 nm.

Siekiant įvertinti metodo kiekybinį potencialą, buvo išmatuoti bendrieji patvirtinimo parametrai, įskaitant: tiesiškumą, tikslumą, pakartojamumą, aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribas. Siūlomas metodas buvo tiesinis atitinkamai perindopriolio, amlodipino ir indapamido koncentracijų intervale 0,4 – 100 mg/L, 0,2 – 100 mg/L ir 0,1 – 100 mg/L. Pagal ICH gaires visi patvirtinimo parametrai atitiko tinkamumo ribas.

Galiausiai buvo atlikta keturių antihipertenzinių farmacinių preparatų analizė ir nustatyti prindopriolio, amlodipino ir indapamido kiekiai atitiko gamintojų deklaruojamus kiekius.

## **SUMMARY**

**VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES**

**JOANA MILOŠ**

### **INVESTIGATION OF PERINDOPRIL BASED ANTIHYPERTENSIVE DRUGS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY**

MASTER THESIS CARRIED OUT IN DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY OF VILNIUS UNIVERSITY

**Research adviser:** prof. A. Padarauskas

A simple, rapid, accurate and precise reversed phase liquid chromatographic method was developed for the determination of perindopril, amlodipine and indapamide in antihypertensive pharmaceutical formulations. The separation was accomplished using an Acquity BEH C8 column, mobile phase consisting of acetonitrile/water (45:55 v/v) containing 10 mmol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and UV detection at 215 nm.

Common validation parameters were evaluated to assess the method's quantitative potential including: linearity, accuracy, repeatability, detection and quantification limits. Proposed method was linear in the concentrations range of 0.4 - 100 mg/L, 0.2 - 100 mg/L and 0.1 - 100 mg/L for perindopril, amlodipine and indapamide, respectively. All validation parameters were lies within the acceptance limit according to ICH guidelines.

Finally, four antihypertensive pharmaceutical formulations were analysed and obtained amounts were in good agreement with declared ones.