

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

**12233**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001 - 12310**

(22) Přihlášeno: **29.08.2001**

(47) Zapsáno: **15.05.2002**

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**C 07 D 211/90**

(73) Majitel :

BIOORGANICS B.V., Nijmegen, NL;

(72) Původce :

Lemmens Jacobus Maria, Mook, NL;

Peters Theodorus Hendricus Antonius, Arnhem, NL;

Pícha František, Brno, CZ;

Bakker Petrus Franciscus Antonius, Veghel, NL;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha  
4, 14000;

(54) Název užitého vzoru:

**Vysoce čistý referenční standard pro testování  
čistoty a stability amlodipinmaleátu**

CZ 12233 U1

## Vysoce čistý referenční standard pro testování čistoty a stability amlodipinmaleátu

### Oblast techniky

Předkládané technické řešení se zabývá využitím dvou nových chemických sloučenin jako referenčních standardů pro určování čistoty nebo stability substancí a farmaceutických prostředků obsahujících amlodipinmaleát.

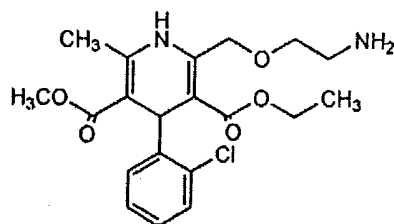
### Dosavadní stav techniky

Farmaceutické produkty jsou ve většině zemí kontrolovány prostřednictvím státních úřadů. Například U.S. Food & Drug Administration (FDA) obvykle vyžaduje, aby žadatelé prokázali v průběhu posuzovacího/schvalovacího procesu nezávadnost a účinnost farmaceutického prostředku a sledování nezávadnosti léku pokračuje i po jeho schválení. Podobné požadavky existují v mnoha evropských zemích a v celém světě. Aby bylo vyhověno podmínkám nezávadnosti, kontrolní úřady obvykle vyžadují výrobní specifikaci, která stanoví maximální množství každé identifikované nečistoty, tak jako maximální množství pro všechny neidentifikované nečistoty. Poté co je schválen, je každá vyrobená várka nebo sada farmaceutického produktu testována, aby bylo potvrzeno, že specifikace je splněna. Dále je prováděno testování stability farmaceutického produktu, aby bylo prokázáno, že se složení v průběhu času, to jest během doby udávané životnosti, výrazně nemění. Je důležité, aby se farmaceutický produkt před podáním pacientovi neodchýlil od své schválené specifikace způsobem, který by mohl zapříčinit snížení bezpečnosti nebo účinku. V praxi se osvědčilo uchovávání vzorků z každé komerční várky vydané na veřejnost, tak aby mohla být kontrolována stabilita a jakákoliv vada odhalena a odstraněna.

Čistota farmaceutik je tedy testována jak v průběhu výroby, tak následně během doby své životnosti. Produkt je obvykle testován porovnáváním analytických výsledků s příslušnými výsledky referenčních standardů. V případě zjišťování nečistot to normálně znamená stanovení farmaceutického produktu a porovnání výsledku s výsledkem získaným pro vysoce čistou formu zjišťované nečistoty ve stejném stanovení. Zdroje potenciálních nečistot ve farmaceuticky aktivní látce nebo prostředku zahrnují:

- zbytková množství syntetických perkurzorů
  - vedlejší produkt vzniklý při přípravě a zpracování aktivní substance
  - zbytková rozpouštědla
  - rozkladné produkty objevující se během skladování zahrnující produkty vzniklé z interakcí s pomocnými látkami ve farmaceutických prostředcích
  - izomery aktivní látky
  - stopové nečistoty pocházející například z přístrojů nebo prostředí.
- Bez identifikace potenciální nečistoty a bez syntetické cesty vedoucí k přípravě jejího referenčního standardu je obtížné nebo nemožné nečistotu úspěšně stanovit nebo jinak sledovat její obsah ve farmaceutickém produktu.

Amlodipinbesylat je velmi úspěšný lék prodáváný firmou Pfizer pod obchodním názvem NORVASC určený k léčení vysokého krevního tlaku a anginy. Samotný amlodipin byl poprvé patentován v patentu EP 089 167 a v odpovídajícím patentu US 4 572 909. Tyto patenty uvádějí jako jednu z nejvhodnějších sloučenin 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorofenyl)-3-ethoxykarbonyl-5-methoxykarbonyl-6-methyl-1,4-dihydropyridin. Tato sloučenina, v současnosti běžně známá jako amlodipin, má následující vzorec:



Příklady 8, 11, 12 a 22 v patentu EP 089 167 ilustrují přípravu amlodipinu ve formě maleátové soli. Přestože existuje široké spektrum vhodných směsných solí s kyselinami, jako nejvhodnější směsná sůl s kyselinou je uváděna maleátová sůl. Následující patent EP 244 944 a odpovídající patent US 4 879 303 byly zaměřeny na přípravu besylátové (neboli benzensulfonátové) soli amlodipinu. Je uváděno, že besylátová sůl má oproti jiným známým solím své výhody, například snadný způsob přípravy. Standardy pro určování kvality amlodipinbesylátu jsou popsány v časopise *Pharmeuropa* 10(2), 187 (1998).

Přehled dostupných částí NORVASC (amlodipinbesylát) New Drug Application (NDA) podané u U.S. Food & Drug Administration firmou Pfizer prozrazuje, že během vývoje došlo k odklonu od původního amlodipinmaleátu k amlodipinbesylátu. (Viz "Review of Original NDA" pro NDA# 19-787 ze dne 10.10.1990, přístupné u FDA pod Freedom of Information Act).

Důvodem k tomuto odklonu byly zřejmě problémy s přípravou tablet a stabilitou. Nicméně konkrétní příklady problémů se stabilitou nebo přípravou tablet nejsou veřejně zpřístupněny mezi informacemi poskytovanými FDA.

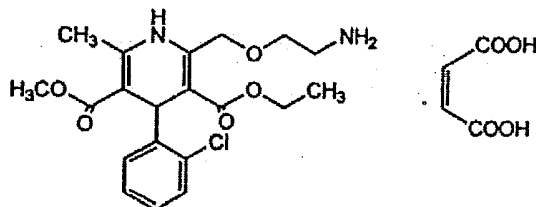
Amlodipinmaleát je přesto stále užitečnou solí amlodipinu. Bylo by tedy žádoucí identifikovat a vyřešit problémy spojené se stabilitou této chemické sloučeniny a vypracovat způsob kontrolování její výroby.

#### Podstata technického řešení

Předkládané řešení se zabývá objevem dvou nových nečistot spojených se substancemi amlodipinmaleátu a s farmaceutickými prostředky obsahujícími tuto sloučeninu. Jeden z aspektů předkládaného vynálezu se vztahuje k procesu, který zahrnuje stanovení vysoce čistého amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu za určitého souhrnu podmínek vedoucí k získání analytického výsledku pro referenční standard za zmíněného souhrnu podmínek. Další aspekt předkládaného vynálezu se vztahuje k procesu testování čistoty a stability vzorku amlodipinmaleátu nebo formy farmaceutické dávky obsahující amlodipinmaleát, které zahrnuje analýzu vzorku substance amlodipinmaleátu nebo prostředku obsahujícího amlodipinmaleát na přítomnost amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu. Například způsob kontrolování čistoty nebo stability substance amlodipinmaleátu nebo prostředku obsahujícího amlodipinmaleát, který zahrnuje analýzu substance amlodipinmaleátu nebo prostředku obsahujícího amlodipinmaleát poskytující analytický výsledek a porovnávání analytického výsledku s odpovídajícím analytickým výsledkem pro referenční standard amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu určující, zda je čistota nebo stabilita substance amlodipinmaleátu nebo prostředku obsahujícího amlodipinmaleát dostatečná. Jiný aspekt předkládaného vynálezu se vztahuje k postupu výroby farmaceuticky přijatelných dávek amlodipinmaleátu v pevné formě. Tento postup zahrnuje mísení amlodipinmaleátu s alespoň jednou farmaceuticky přijatelnou látkou vedoucí k tvorbě směsi, buď a) plnění této směsi do kapsulí nebo b) lisování této směsi do tablet, vedoucí k přípravě výrobních sad farmaceutických dávek amlodipinmaleátu v pevné formě, odebrání vzorku ze zmíněných farmaceutických dávek amlodipinmaleátu v pevné formě, analýzu vzorku vedoucí k získání analytického výsledku vzorku, porovnání analytického výsledku vzorku s odpovídajícím analytickým výsledkem pro referenční standard amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu určující relativní množství amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu vzhledem k uvedenému amlodipinmaleátu, a prodej nebo uvolnění výrobní sady, pokud

relativní množství amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu nepřevyšuje předem stanovený/schválený limit, například 1,0 hmotn. %, výhodně 0,1 hmotn. %, vztaženo na množství amlodipinmaleátu.

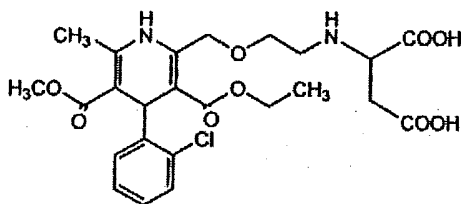
Amlodipinmaleát má následující chemický vzorec:



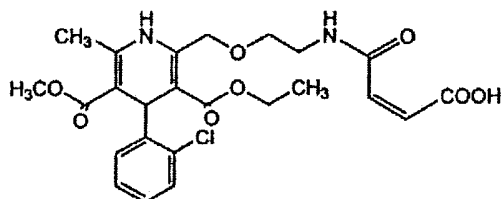
5

Bylo zjištěno, že při testování kvality amlodipinmaleátu by měly být vzaty v úvahu alespoň dvě dříve neidentifikované nečistoty. Obě nečistoty pocházejí z vedlejších reakcí během přípravy amlodipinmaleátu a/nebo se tvoří během skladování. Tyto nečistoty jsou pro amlodipinmaleát specifické, protože vznikají v přítomnosti kyseliny maleinové, a proto nejsou zjišťovány nebo sledovány ve spojení s amlodipinbesylatem. Tyto chemické sloučeniny jsou zde označovány jako amlodipinaspartát a amlodipinmaleinamid. Vzorec obou sloučenin je znázorněn níže.

“Amlodipinaspartát”



“Amlodipinmaleinamid”



15

Amlodipinaspartát i amlodipinmaleinamid jsou blokátory vápníkových kanálů a mohou tak být využívány jako farmaceuticky aktivní látky. Tyto nové chemické sloučeniny a jejich použití v léčivech jsou podrobněji popsáno v patentu US nazvaném “Chemická sloučenina amlodipinmaleinamid, farmaceutický prostředek, způsob jejich přípravy a použití k léčení anginy a vysokého krevního tlaku”, jejíž plný obsah je zde připojen odkazem.

20

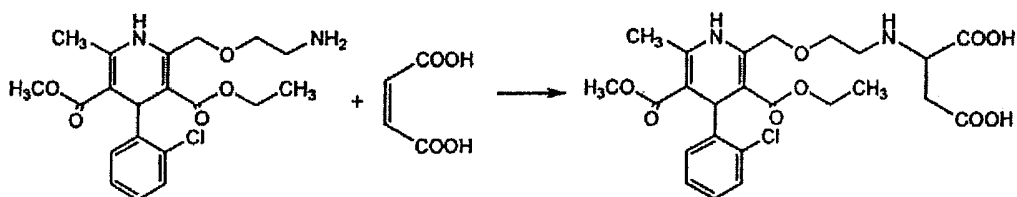
Tyto sloučeniny vznikají reakcí mezi amlodipinem a kyselinou maleinovou. Amlodipinaspartát vzniká adiční reakcí Michaelova typu mezi aminoskupinou amlodipinu a dvojnou vazbou kyseliny maleinové. Amlodipinmaleinamid vzniká amidační reakcí aminoskupiny amlodipinu s karboxylovou skupinou kyseliny maleinové.

25

Chemické reakce mezi amlodipinem a kyselinou maleinovou vedoucí k tvorbě nečistot amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu se mohou objevit jako vedlejší produkt během přípravy amlodipinmaleátové soli. Amlodipinmaleát může během zpracování do výsledné farmaceutické formy nebo během následného skladování dále podstoupit následnou přeměnu/rozklad výše zmíněnou adicí Michaelova typu nebo amidační reakcí, vedoucí k tvorbě nečistot amlodipinaspartátu, respektive amlodipinmaleinamidu. Z těchto dvou nečistot se

30

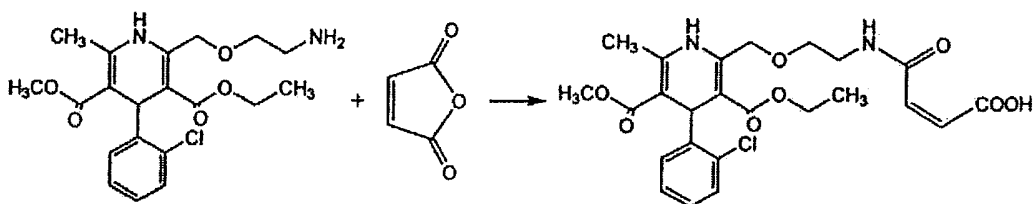
- snadněji tvoří amlodipinaspartát, především během skladování, a bývá tedy důležitější nečistotou vyžadující sledování. Přestože tyto sloučeniny nemusí být ve farmaceutickém prostředí na obtíž, sami o sobě působí jako blokátory vápníkových kanálů, vyžadují současné regulační praktiky obvykle důslednou kontrolu takových "nečistot". Nyní, poté co byly tyto nečistoty
- 5 identifikovány a připraveny v dostatečně čistém stavu, mohou být amlodipinaspartát a amlodipinmaleinamid využívány jako referenční ukazatele pro rutinní analýzu amlodipinmaleátu nebo farmaceutických dávek obsahujících tuto sloučeninu, jak během vývojových prací zaměřených na vyřešení výše zmíněných problémů se stabilitou nebo během průmyslové výroby amlodipinmaleátu a na něm založených farmaceutických forem.
- 10 Přípravy amlodipinaspartátu pro použití jako referenčního standardu nebo ukazatele může být dosaženo přivedením volné báze amlodipinu nebo jeho soli a kyseliny maleinové do vzájemného těsného kontaktu za podmínek vhodných pro adici Michaelova typu. Tato reakce je znázorněna níže.



- 15 Podmínky vyššího pH, vyšší teploty a delší reakční doby nebo doby kontaktu obvykle vedou k podpoře adiční reakce. Je preferováno pH prostředí vyšší než 7, raději vyšší než 7,5. Při nižších hodnotách pH je tendence inhibovat adici a bránit tak reakci. Dále, je preferováno provádění reakce ve fázi taveniny nebo v roztoku. "Fáze taveniny" označuje stav, kdy je amlodipin roztaven alespoň po dobu, kdy je přítomna kyselina maleinová. Pokud je reakce prováděna
- 20 v roztoku, je preferována teplota alespoň 60 °C, častěji alespoň 80 °C a nejčastěji v rozmezí 85 °C až 110 °C. Mezi rozpouštědla vhodná k adiční reakci patří polární aprotická rozpouštědla, například N,N-dimethylformamid, alkoholy jako je ethanol a isopropanol, estery jako je ethylacetat a uhlovodíky jako je toluen.

- Amlodipin a kyselina maleinová jsou obvykle smíseny v přibližně stechiometrických poměrech, jmenovitě 0,9 : 1 až 1 : 0,9. Běžný způsob provedení reakce je roztavení amlodipinmaleátu. Ačkoliv je kyselina maleinová v tomto případě předem zkombinována s amlodipinem, je toto považováno za zahrnuté v oblasti vynálezu. Alternativně může být reakce provedena přivedením
- 25 volné báze amlodipinu a kyseliny maleinové v kontakt v rozpouštědle nebo v tavenině po předcházejícím smísení za sucha.

- 30 Amlodipinmaleinamid může být připraven reakcí amlodipinu nebo jeho soli s kyselinou maleinovou s aktivovanou karbonylovou skupinou. Tato reakce je ve své podstatě amidační reakcí a je tedy podporována přítomností kyselého katalyzátoru, zvýšenou teplotou, atd., další podmínky amidace jsou dobře známé zkušeným odborným pracovníkům. Pojmem "kyselina maleinová s aktivovanou karbonylovou skupinou" je označována kyselina maleinová nebo její
- 35 derivát která má vhodně aktivovanou karbonylovou skupinu pro usnadnění amidační reakce s amlodipinem. V některých postupech je aktivace karbonylu dosaženo přítomností kyselého katalyzátoru, obvykle Lewisovy kyseliny jako je chlorid hlinitý nebo kyselina fosforečná. Ačkoliv preferován je postup, kde je používáno anhydridu kyseliny maleinové, který poskytuje aktivovanou karbonylovou skupinu bez nutnosti použití katalyzátoru. Kyselina maleinová sama
- 40 o sobě a v nepřítomnosti katalyzátoru nebo aktivátoru není kyselinou maleinovou s aktivovanou karbonylovou skupinou a nebude snadno tvořit amlodipinmaleinamid ani v případě přítomnosti amlodipinu. Reakce s anhydridem kyseliny maleinové je znázorněna níže.



Reakce vedoucí k tvorbě amlodipinmaleinamidu může být obecně provedena přivedením volné báze amlodipinu nebo jeho soli do přímého kontaktu s kyselinou maleinovou. Je preferováno provádění reakce ve vhodném rozpouštědle za zvýšené teploty v rozmezí 25 až 100 °C, častěji v rozmezí 35 až 50 °C. Mezi rozpouštědla vhodná k této adiční reakci patří polární aprotická rozpouštědla, například N,N-dimethylformamid, alkoholy jako je ethanol nebo isopropanol, estery jako je ethylacetat a uhlovodíky jako je toluen. Amlodipin a kyselina maleinová s aktivovanou karbonylovou skupinou jsou obvykle smíseny v přibližně stechiometrických poměrech, jmenovitě 0,9 : 1 až 1 : 0,9.

- 10 Amlodipinaspartát a amlodipinmaleinamid mohou být oba využity jako referenční standardy (nebo referenční ukazatele) při stanovení přítomnosti a/nebo obsahu nečistot ve vzorku substance amlodipinmaleátu nebo farmaceutického prostředku obsahujícího amlodipinmaleát. Jako referenční standard by měl být amlodipinaspartát nebo amlodipinmaleinamid v dostatečně čisté formě, obvykle více než 80 %, častěji více než 90 %. Vysoké stupně čistoty jsou dosažitelné, ale nejsou nezbytné. Amlodipinaspartát a amlodipinmaleinamid, připravené jak je uvedeno výše, 15 mohou, pokud je třeba, být dále přečištěny, tak aby bylo dosaženo požadovaného stupně čistoty. Čištění může být prováděno standardními metodami, například rekrytalizací z vhodného rozpouštědla nebo mícháním, případně za současného zahřívání, suspenze sloučeniny ve vhodné kapalině s následným odstraněním kapané fáze.
- 20 Stanovení využívané v předkládaném vynálezu není blíže omezeno a zahrnuje jakékoliv metody které mohou odhalit nebo jinak detegovat přítomnost cílové sloučeniny. Obecně mohou být stanovení rozdělena na metody založené na fyzikální separaci cílové sloučeniny (cílových sloučenin) ze vzorku a na neseparační metody nebo metody založené na pozorování, jako jsou IR a NMR, ačkoliv jsou možné i jiné metody. Je upřednostňováno stanovení založené na separaci.
- 25 Příklady tohoto typu stanovení zahrnují tenkovrstevnou chromatografii (TLC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

Amlodipinaspartát nebo amlodipinmaleinamid jsou stanoveny daných podmínek, což poskytuje analytický výsledek referenčního standardu. "Analytický výsledek referenčního standardu" může být kvantitativní nebo kvalitativní výsledek a může být ve formě číselné, grafické, obrazové, atd. 30 V některých případech může být výsledek elektronicky uchován pro pozdější srovnávání.

Amlodipinmaleátový materiál určený k analýze na přítomnost amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu zahrnuje substance amlodipinmaleátu a prostředky obsahující amlodipinmaleát. Termín "amlodipinmaleátová substance" je zde užíván k označení materiálu který obsahuje téměř pouze amlodipinmaleát. Příklady takových substancí zahrnují surový amlodipinmaleát 35 získaný během syntézy i přečištěný amlodipinmaleát. "Prostředky obsahující amlodipinmaleát" zahrnují směsi, roztoky, suspenze, atd., které obsahují amlodipinmaleát. Příklady prostředků zahrnují směsný práškový prostředek využívaný v tabletačních technikách k přípravě tablet i prekursorů a konečné formy dávek. Před provedením stanovení může být prostředek dále zpracováván, např. drcením tablet vedoucím k tvorbě prášku, takové modifikace jsou v rámci 40 prostředku také zahrnuty. Samotný amlodipinmaleát může být v jakékoliv vhodné formě, zahrnující krystalický stav nebo stav amorfní.

Preferovaným prostředkem obsahujícím amlodipinmaleát určeným k testování je farmaceutická dávka v pevné formě. Farmaceutická dávka v pevné formě zahrnuje tablety, kapsule, sáčky, atd.,

5 které obsahují amlodipinmaleát ve farmaceuticky účinném množství a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku jako je pojivo, plnivo, rozpouštědlo, lubrikant, rozkladač, atd. Takové prostředky jsou připravovány podle dobře známých metod, zahrnujících mokrou granulaci, suchou granulaci a přímé lisování do tablet a mísení a plnění pro přípravu kapsulí.

10 V obou případech je směs připravována smísením amlodipinmaleátu s alespoň jednou farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou. Směs je poté dále zpracovávána, což zahrnuje plnění této směsi do kapsulí, nebo lisování této směsi do tablet. Je třeba poznamenat, že metody mísení nebo granulace zahrnují mokré i suché metody zpracování. Jsou preferovány farmaceutické prostředky obsahující amlodipinmaleát vyznačující se hodnotou pH v rozmezí 5,5 až 7,

15 měřeno v 20 % hmotn. vodné suspenzi, a vykazují tak lepší stabilitu, jak je podrobněji popsáno v patentu US nazvaném "Farmaceutické prostředky obsahující amlodipinmaleát, způsob jejich přípravy a použití k léčení anginy a vysokého krevního tlaku", jejíž plný obsah je zde připojen odkazem.

15 Z důvodů kontroly kvality je preferováno, aby byl farmaceutický prostředek připraven z amlodipinmaleátu, který se vyznačuje nízkým obsahem amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu. Vhodný způsob přípravy amlodipinu a jeho přeměny na maleátovou sůl vyznačující se minimální tvorbou nečistot a dobrými výtěžky je podrobněji popsán v patentu US nazvaném "Chemická sloučenina amlodipinmaleát, farmaceutický prostředek, způsob jejich přípravy a použití k léčení anginy a vysokého krevního tlaku", jejíž plný obsah je zde připojen odkazem.

20 Farmaceutické prostředky jsou běžně vyráběny ve várkách nebo výrobních sadách. Výrobní sady obvykle zahrnují obvykle 100 000 až 1 000 000 nebo více tablet nebo kapsulí. Výrobní sada by měla být zkontrolována, aby bylo potvrzeno že obsah amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu je v rámci specifikace, tzv. kontrolní test kvality. Je odebrán vzorek z výrobní sady (např. 10 až 100 kapsulí nebo tablet) a je analyzována přítomnost amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu a je také stanoven obsah těchto sloučenin. Farmaceutické prostředky obsahující

25 amlodipinmaleát by měly obsahovat méně než 1 %, raději méně než 0,5 %, nejlépe méně než 0,2 % amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu, vztaženo na množství amlodipinmaleátu. Obecně bude celá výrobní sada, kromě všech odebraných vzorků, výrobcem prodána nebo jinak uvolněna, pokud nebude zjištěn nepřijatelný obsah amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu. V takovém případě nebude výrobní sada prodána nebo uvolněna, to znamená ani

30 komerčně využita ani využita v klinických studiích.

Stejná strategie může být aplikována i na výrobní sady substancí obsahujících amlodipinmaleát. Z výrobní sady je odebrán vzorek (např. 0,5 až 2 g materiálu) a je analyzována přítomnost amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu a také stanoven obsah těchto sloučenin. Substance

35 obsahující amlodipinmaleát by měly obsahovat méně než 1 %, raději méně než 0,5 %, nejlépe méně než 0,2 % amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu, vztaženo na množství amlodipinmaleátu. Obecně bude celá výrobní sada, kromě všech odebraných vzorků, výrobcem prodána nebo jinak uvolněna, pokud nebude zjištěn nepřijatelný obsah amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu. V takovém případě nebude výrobní sada prodána nebo uvolněna, to

40 znamená ani komerčně využita ani využita při výrobě farmaceutických produktů.

Analýza materiálů obsahujících amlodipinmaleát obecně poskytuje analytický výsledek vzorku. "Analytický výsledek vzorku" je obvykle nějakým způsobem porovnáván s analytickým výsledkem pro referenční standard amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu. Porovnání může být provedeno manuálně, například vizuálním pozorováním a/nebo automatizovaným

45 postupem. Analytický výsledek pro referenční standard může být získán současně s analytickým výsledkem vzorku, tedy bezprostředně před, během nebo bezprostředně po analýze vzorku amlodipinmaleátu, nebo mohou být získány dříve, dokonce o několik měsíců až let dříve. Při některých postupech je analytický výsledek pro referenční standard uchován elektronicky a využit s pomocí počítačového programu k určení přítomnosti amlodipinaspartátu nebo

50 amlodipinmaleinamidu a k stanovení obsahu těchto sloučenin. Tento novější postup zahrnuje kalibraci zařízení v závislosti na analytických výsledcích referenčních standardů nebo výsledcích od nich odvozených a/nebo pomocí takzvané vnitřní normalizace. Všechna taková porovnávání,

přímá, nepřímá, manuální nebo automatizovaná, jsou zahrnuta v jednotném označení "porovnávání".

5 Analytický postup využívaný pro určení analytických výsledků referenčních standardů je obvykle stejný analytický postup za stejných podmínek, který byl použit k testování materiálu obsahujícího amlodipinmaleát, přestože to není nezbytně vyžadováno.

Předkládané řešení bude dále popsáno s poukázáním na dvě preferované analytické techniky, jmenovitě TLC a HPLC. Při TLC jsou vzorky testovaného materiálu obsahujícího amlodipinmaleát a referenčního standardu(ů) obsahujícího známé množství amlodipinaspartátu a/nebo amlodipinmaleinamidu vyvíjeny na vhodné chromatografické plotně pomocí vhodné vyvíjecí kapaliny (mobilní fáze) za daných podmínek. Tyto podmínky zahrnují rozpouštědlo, koncentraci derivátu amlodipinu v tomto rozpouštědle a množství roztoku naneseného na plotnu. Volba vhodných rozpouštědel a koncentrací je v popisu technik dobře zaznamenána. Analytické výsledky obdržené za takových podmínek mohou zahrnovat hodnotu  $R_f$ , tedy poměr mezi vzdáleností kterou urazil příslušný materiál a vzdáleností kterou urazilo rozpouštědlo, a/nebo velikost skvrny vzniklé na chromatogramu.

Je preferováno aby byl na stejnou chromatografickou plotnu, na kterou byl nanesen testovaný vzorek, ve stejný čas nanesen i referenční standard, což umožní současné srovnávání. Při jiných postupech je již referenční standard definován a je jednoduše porovnán s vyvinutým chromatogramem vzorku.

20 Jeden z postupů testování čistoty a/nebo stability vůči rozkladu vzorku obsahujícího amlodipinmaleát tedy zahrnuje kroky:

a) rozpuštění vzorku obsahujícího amlodipinmaleát v rozpouštědle vedoucí k tvorbě roztoku vzorku

25 b) rozpuštění vzorku amlodipinaspartátu a/nebo amlodipinmaleinamidu v rozpouštědle vedoucí k tvorbě referenčního roztoku

c) analýzu roztoku vzorku a referenčního roztoku pomocí tenkovrstevné chromatografie vedoucí k získání TLC chromatogramu pro každý roztok

30 d) výpočet intenzity všech sekundárních skvrn získaných z roztoku vzorku jejichž hodnota  $R_f$  odpovídá hodnotě  $R_f$  referenčního ukazatele pomocí intenzity skvrn amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu v chromatogramu referenčního roztoku. Je třeba poznamenat, že referenční roztok může být "směsný" referenční roztok, který může obsahovat vedle amlodipinaspartátu také jiný referenční materiál o známé čistotě, tj. obsahovat známé množství amlodipinu a/nebo amlodipinmaleinamidu o známé čistotě, atd.

35 Podobně může být popsána analýza pomocí HPLC. Analytický výsledek pro referenční standard může zahrnovat faktor rozlišení, faktor odezvy, retenční čas a/nebo plochu píku odpovídajícího amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu. Postup testování čistoty a/nebo stability vůči rozkladu vzorku obsahujícího amlodipinmaleát zahrnuje například kroky:

a) rozpuštění vzorku obsahujícího amlodipinmaleát v rozpouštědle vedoucí k tvorbě jednoho nebo více roztoků vzorku

40 b) rozpuštění vzorku amlodipinaspartátu a/nebo amlodipinmaleinamidu v rozpouštědle vedoucí k tvorbě referenčního roztoku

c) nástřik roztoku vzorku a referenčních roztoků na HPLC kolonu a

d) určení plochy píku každého roztoku a výpočet obsahu amlodipinaspartátu a/nebo amlodipinmaleinamidu s pomocí těchto hodnot.

45 Při tomto postupu může být nezbytné nebo žádoucí před krokem c) nanést na HPLC kolonu roztok určujícího vhodnost systému, tak aby byl určen faktor rozlišení mezi amlodipinmaleátem a

jakoukoliv další sloučeninou přítomnou ve vzorku. V takovém případě zahrnuje metoda dodatečný krok

- b') rozpuštění amlodipinmaleátu a vhodného externího standardu(ů) vedoucí k tvorbě roztoku určujícího vhodnost systému a nástřik roztoku určujícího vhodnost systému na HPLC kolonu vedoucí k určení faktoru(ů) rozlišení. Tento způsob je užitečným ověřením, zda kolona stále pracuje podle svých specifikací. Roztok určující vhodnost systému může být roztok amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu, ale není omezen pouze na tyto sloučeniny a může obsahovat jakoukoliv látku, která určuje zda kolona stále pracuje tak, jak byla navržena.

Obr. 1 dokazuje, že HPLC může být využito k stanovení amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu vedle amlodipinu. Umělá směs amlodipinu, amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu byla analyzována pomocí HPLC. Výsledky jsou znázorněny jako HPLC chromatogram na obr. 1. Všimněte si, že píky odpovídající amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu jsou viditelné.

Jako alternativa k stanovení vzorku referenčního ukazatele při každé analýze může být využit parametr známý jako faktor odezvy (R). Faktor odezvy je předem určený poměr numerického výsledku (např. plocha píku v HPLC) získaného analýzou vzorku amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu pomocí dané analytické metody a odpovídajícího numerického výsledku získaného analýzou stejného množství čistého amlodipinmaleátu o shodné koncentraci. Známé faktory rozlišení pro amlodipinaspartát nebo amlodipinmaleinamid mohou být použity k výpočtu množství příslušného ukazatele ve zkoumaném vzorku. Tímto způsobem může, jak je dobře známo, být ve vzorku určeno relativní množství nečistoty vztažené na množství amlodipinmaleátu.

Ve výše uvedených postupech je třeba chápat rozpouštědlo požadované pro rozpuštění vzorku amlodipinmaleátu jako rozpouštědlo požadované pouze pro rozpuštění substance amlodipinmaleátu a nečistot, které jsou předmětem zájmu. Další složky, jako jsou inertní plniva ve farmaceutických prostředcích, nemusí být v rozpouštědlovém systému rozpustné a nemusí být "rozpuštěny" ve smyslu předcházejícího kroku "rozpuštění", jak je běžné pro metody analýzy farmaceutických prostředků.

Předkládané řešení také umožňuje využití sloučeniny vybrané z amlodipinaspartátu vzorce 1 nebo amlodipinmaleinamidu vzorce 2 jako referenčního ukazatele při analýze čistoty nebo stability vůči rozkladu várkového vzorku amlodipinmaleátu nebo várkového vzorku farmaceutické dávky obsahující amlodipinmaleát. Takové analytické testování léčivé substance nebo formy obsahující amlodipinmaleát slouží především k potvrzení, že sloučeniny 1 nebo 2 nejsou přítomny (tj. jsou obsaženy v množství nižším než je mez stanovení analytické metody) nebo jsou přítomny v množstvích nižších, než je nejvyšší povolená mez charakterizující farmaceutickou kvalitu výrobků obsahujících amlodipinmaleát, tj. kvalitu výrobků vydávaných nebo prodávaných jako léky.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje HPLC chromatogram umělé směsi amlodipinmaleátu, amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu.

Obr. 2 znázorňuje <sup>1</sup>H - NMR spektrum sloučeniny amlodipinaspartátu připravené v příkladu 1.

Obr. 3 znázorňuje <sup>13</sup>C - NMR spektrum sloučeniny amlodipinaspartátu připravené v příkladu 1.

Obr. 4 znázorňuje <sup>1</sup>H - NMR spektrum sloučeniny amlodipinmaleinamidu připravené v příkladu 2.

Obr. 5 znázorňuje HPLC chromatogram tablet amlodipinmaleátu, obsahujících méně než 0,2 % hmotn. amlodipinmaleátu nebo amlodipinaspartátu.

Obr. 6 znázorňuje HPLC chromatogram tablet amlodipinmaleátu, obsahujících více než 0,2 % hmotn. amlodipinmaleátu nebo amlodipinaspartátu.

Obr. 7 znázorňuje scanovaný TLC chromatogram amlodipinmaleátu znečištěného amlodipinaspartátem a amlodipinmaleinamidem.

### Příklady provedení

#### Příklad 1- Postup přípravy amlodipinaspartátu

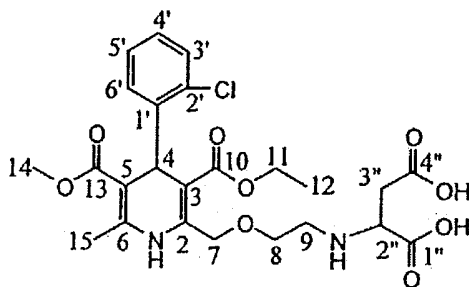
- 5 16 g Amlodipinu a 12 g amlodipinmaleátu bylo roztaveno v 300 ml baňce. Tavenina byla ochlazená na laboratorní teplotu a rozpuštěna v 300 ml dichlormethanu. Směs byla extrahována 300 ml 1M roztoku NaOH. Organická vrstva byla odstraněna a vodná vrstva byla okyselena 55 ml 6M roztoku HCl. Směs byla extrahována 300 ml dichlormethanu. Vrstvy byly odděleny a organická vrstva byla vysušena pomocí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Směs byla odpařena do sucha a pevný zbytek byl rekrystalizován z ethanolu. Získaná pevná látka byla vysušena ve vakuové sušárně při 40 °C, což poskytlo 4,7 g téměř bílého produktu.

Výtěžek: 4,7 g (39 %)

Teplota tání: 178 °C až 183 °C (rozklad)

Čistota: více než 90 %

- 15  $^1\text{H}$  - NMR spektrum:



$^1\text{H}$  - NMR spektrum bylo změřeno při teplotě 30,05 °C na přístroji Bruker Advance-400 v deuterovaném dimethylsulfoxidu při 400 MHz. Spektrum je znázorněno na obr. 2.

| $\delta$ | přirazení                                                                         |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 20 1,12  | (t, 3H, $J_{11,12}=7,0\text{ Hz}$ , 3xH-12);                                      |
| 2,36     | (s, 3H, 3xH-15);                                                                  |
| 2,87     | (m, ~2H, 2xH-3'');                                                                |
| 3,24     | (m, ~2H, 2xH-9);                                                                  |
| 3,52     | (s, ~3H, 3xH-14);                                                                 |
| 25 3,76  | (bs, 2H, 2xH-8);                                                                  |
| 4,00     | (m, 3H, 2xH-11 + H-2'');                                                          |
| 4,65     | (m, 2H, 2xH-7);                                                                   |
| 5,33     | (s, 1H, H-4);                                                                     |
| 7,13     | (dt, 1H, $J_{3',4'}=J_{4',5'}=7,6\text{ Hz}$ , $J_{4',6'}=1,8\text{ Hz}$ , H-4'); |
| 30 7,26  | (m, 2H, H-3' + H-5');                                                             |
| 7,37     | (d, 1H, $J_{5',6'}=7,8\text{ Hz}$ , H-6');                                        |
| 8,61     | (s, 1H, NH).                                                                      |

#### $^{13}\text{C}$ - NMR spektrum:

- 35  $^{13}\text{C}$  - NMR spektrum bylo změřeno při teplotě 30,05 °C na přístroji Bruker Advance-400 v deuterovaném dimethylsulfoxidu při 100,6 MHz. Spektrum je znázorněno na obr. 3.

|    | $\delta$    | přiřazení | $\delta$       | přiřazení       |
|----|-------------|-----------|----------------|-----------------|
|    | 14,18       | (C-12);   | 66,64, 66,69   | (C-7, C-8);     |
|    | 18,33       | (C-15);   | 101,92, 102,40 | (C-3, C-5);     |
|    | 35,77       | (C-3'');  | 127,54         | (C-5');         |
| 5  | 36,85       | (C-4);    | 127,88         | (C-4');         |
|    | 45,63,45,74 | (C-9);    | 129,07         | (C-2');         |
|    | 50,58       | (C-14);   | 131,11         | (C-6');         |
|    | 56,42       | (C-2'');  | 166,43         | (C-10);         |
|    | 59,50       | (C-11);   | 167,28         | (C-13);         |
| 10 |             |           | 170,55, 171,49 | (C-1'', C-4''). |

#### Příklad 2 - Příprava amlodipinmaleinamidu

5 g Amlodipinu bylo rozpuštěno v 50 ml ethylacetatu a zahřáto na 60 °C. K této směsi bylo přidáno 1,15 g anhydridu kyseliny maleinové a směs byla protřepávána dokud nebyl získán čirý roztok. Směs byla poté ochlazená na laboratorní teplotu a ponechána stát přes noc. Směs byla poté odpařena do sucha a následně sušena ve vakuové sušárně při 25 °C po dobu 3 hodin, což vedlo k získání žluté pevné látky.

Výtěžek: 6,1 g (99 %)

Teplota tání: 83 °C až 86 °C

Čistota: více než 95 % (HPLC)

#### 1H - NMR spektrum:

1H - NMR spektrum bylo změřeno při teplotě 29,85 °C na přístroji Bruker Advance-400 v deuterovaném dimethylsulfoxidu při 400 MHz. Spektrum je znázorněno na obr. 4.

|    | $\delta$ | přiřazení                                         |
|----|----------|---------------------------------------------------|
|    | 1,12     | (t, 3H, J11,12=7,0Hz, 12-H3)                      |
| 25 | 2,31     | (s, 3H, 15-H3)                                    |
|    | 3,44     | (bq, ~2H, 9-H2)                                   |
|    | 3,52     | (s, ~3H, 14-H3)                                   |
|    | 3,58     | (bt, ~2H, 8-H2)                                   |
|    | 3,99     | (m, ~2H, 11-H2)                                   |
| 30 | 4,62     | (AB q, 2H, 7-H2)                                  |
|    | 5,32     | (s, 1H, 4-H)                                      |
|    | 6,27     | (d, ~1H, J4'',5''=12,4Hz, 4''-H)                  |
|    | 6,43     | (d, ~1H, J4'',5''=12,4Hz, 5''-H)                  |
|    | 7,13     | (dt, 1H, J3',4'=J4',5'=7,7Hz, J4',6'=1,6Hz, 4'-H) |
| 35 | 7,23     | (dt, 1H, J4',5'=J5'6'=7,7Hz, J3',5'=1,0Hz, 5'-H)  |
|    | 7,28     | (dd, 1H, J3'4'=7,7Hz, J3',5'=1,0Hz, 3'-H)         |
|    | 7,34     | (dd, 1H, J4',6'=1,6Hz, J5'6'=7,7Hz, 6'-H)         |
|    | 8,49     | (s, ~1H, 1-H)                                     |
|    | 9,24     | (bt, ~1H, 9'-NH).                                 |

#### 40 Příklad 3 - Stanovení amlodipinmaleátu, amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu v amlodipinmaleátové substanci pomocí HPLC

1. Referenční roztok 1 byl připraven přenesením přibližně 32 mg referenčního standardu amlodipinmaleátu (o známé čistotě) do 50 ml odměrné baňky a rozpuštěním v směsi 0,02M acetatového pufru o hodnotě pH 5,0 a acetonitrilu (1 : 1 obj./obj.).

2. Referenční roztok 2 byl připraven přenesením přibližně 32 mg směsného standardu amlodipinmaleátu (směs 4 dílů amlodipinmaleátu, 1 dílu amlodipinaspartátu a 1 dílu amlodipinmaleinamidu, vyznačujících se vysokou a všeobecně známou čistotou) do 50 ml odměrné baňky a rozpuštěním ve směsi 0,02M acetatového pufru o hodnotě pH 5,0 a acetonitrilu (1 : 1 obj./obj.).

- 5 3. Roztok vzorku byl připraven přenesením přibližně 32 mg analyzovaného vzorku amlodipinmaleátu do 50 ml odměrné baňky a rozpuštěním ve směsi 0,01M acetatového pufru o hodnotě pH 5,0 a acetonitrilu (1 : 1 obj./obj.).

#### 4. Postup chromatografie

##### a) podmínky chromatografie:

- 10 Analytická kolona: Symmetry Shield C8 (Waters), 100 x 4,6 mm, dp = 3,5 mm  
 Ochranná kolona: Sentry Guard kolona, Symmetry C8 (Waters), 20 x 3,9 mm, dp = 5 mm  
 Mobilní fáze: A) 0,05M perchloratový pufr pH 2,75 a acetonitril 65 : 35 (obj./obj.)  
 B) 0,05M perchloratový pufr pH 2,75 a acetonitril 35 : 65 (obj./obj.)

- 15 Perchloratový pufr pH 2,75: Rozpusťte 7 g  $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,05 M) a 1,74 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,01 M) v 1,000 ml vody. Upravte hodnotu pH na 2,75 přidávkem kyseliny fosforečné.

Průtok: 1,0 ml/min, gradient

- | Gradientový program: | Čas (min) | % A | % B |
|----------------------|-----------|-----|-----|
|                      | 0,0       | 100 | 0   |
| 20                   | 4,0       | 100 | 0   |
|                      | 14,0      | 35  | 65  |
|                      | 21,0      | 0   | 100 |
|                      | 28,0      | 0   | 100 |
|                      | 29,0      | 100 | 0   |
| 25                   | 32,0      | 100 | 0   |

Detekce: UV, 237 nm

Teplota kolony: 45 °C

Automatický dávkovač: 4 °C, chráněný před světlem

Objem nástřiku: 10 µl

- 30 b) postup nástřiku:

Poté co bylo dosaženo trvalé základní čáry, byl nanesen referenční roztok 2 a byl vypočten faktor rozlišení mezi amlodipinem, amlodipinaspartátem a amlodipinmaleinamidem. Dále byl vypočten faktor symetrie a počet teoretických pater s využitím běžných metod podle European Pharmacopoeia pro vypočítávání parametrů vhodnosti systému.

- 35 Získané hodnoty:

Rozlišení: amlo-aspartát / amlodipin = 15,6, amlodipin / amlo-maleinamid = 20,1.

Faktor symetrie: amlodipinaspartát 1,2, amlodipin 1,3, amlodipinmaleinamid 1,2.

Počet teoretických pater: amlodipinaspartát 6387, amlodipin 22852, amlodipinmaleinamid 56676.

- 40 Referenční roztok 1 a roztok vzorku byly poté nanесeny na kolonu.

## 5. Výpočty

- Obsah amlodipinmaleátu a obsah příslušných nečistot v analyzovaném vzorku byly vypočteny srovnáním ploch píků sloučenin z chromatogramu roztoku vzorku s odpovídajícími plochami píků získanými z chromatogramů referenčních roztoků 1 a 2, uvažující hmotnost a čistotu referenčních vzorků a předem určené faktory relativní odezvy (RRF). Hodnoty RRF a limity stanovení pro jednotlivé nečistoty, vyjádřeny v procentech amlodipinu, jsou uvedeny v následující tabulce:

| Sloučenina | RRF  | Limit stanovení |
|------------|------|-----------------|
|            |      | (%)             |
| Aspartát   | 0,78 | 0,01            |
| Amid       | 1,01 | 0,02            |

- 10 Příklad 4 - Stanovení amlodipinmaleátu a amlodipinaspartátu v tabletách obsahujících amlodipinmaleát v množství odpovídajícím 2,5 mg volné báze amlodipinu pomocí HPLC

Stanovení je provedeno jak je uvedeno v příkladu 3 s následujícími změnami:

- 15 Roztok vzorku byl připraven přenesením 5 tablet amlodipinu do 25 ml odměrné baňky. Bylo přidáno 20 ml směsi 0,02M acetatového pufru o hodnotě pH 5,0 a acetonitrilu (1 : 1 obj./obj.) a směs byla míchána dokud se všechny tablety úplně nerozpadly. Poté byla směs na 5 minut vložena do ultrazvukové vodní lázně. Baňka byla doplněna po rysku směsí 0,02M acetatového pufru o hodnotě pH 5,0 a acetonitrilu (1 : 1 obj./obj.) a obsah promíchán. Přibližně 10 ml získaného roztoku bylo centrifugováno při 4000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl použit pro analýzu.
- 20 Téměř stejný postup lze využít i při analýze tablet obsahujících 5 nebo 10 mg amlodipinmaleátu, narozdíl od 2,5 mg jak je uvedeno výše, s tím rozdílem že je použita 50 ml nebo 100 ml odměrná baňka.

## Příklad 5

- 25 Ze sady 10 mg tablet amlodipinmaleátu byl odebrán vzorek a pomocí HPLC stanovena přítomnost amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu. Aby mohli být tyto tablety posouzené jako "přijatelné", je vyžadováno aby množství přítomného amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu nepřesahovalo 0,2 % hmotn. HPLC chromatogram je znázorněn na obr. 5. Stanovení prokázalo, že tablety obsahovaly 0,17 % hmotn. amlodipinaspartátu a 0,01 % amlodipinmaleinamidu, vztaženo relativně k ploše píku odpovídajícího amlodipinu, a sada tablet je tedy přijatelná a byla schválena.
- 30

## Srovnání

- Z jiné sady 10 mg tablet amlodipinmaleátu, než byla použita výše, byl odebrán vzorek a pomocí HPLC stanovena přítomnost amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu. Aby mohli být tyto tablety posouzené jako "přijatelné", je vyžadováno aby množství přítomného amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu nepřesahovalo 0,2 % hmotn.. HPLC chromatogram je znázorněn na obr. 6. Stanovení prokázalo, že tablety obsahovaly 0,42 % hmotn. amlodipinaspartátu a 0,02 % hmotn. amlodipinmaleinamidu, vztaženo relativně k ploše píku odpovídajícího amlodipinu, a sada tablet je tedy nepřijatelná a nebyla schválena pro výdej.
- 35

**Příklad 6 - Stanovení obsahu amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu v amlodipinmaleátové lékové substancii pomocí TLC**

**1. Popis metody**

Rozpouštědlo: Voda a methanol v objemovém poměru 50 : 50.

- 5 Roztok vzorku A: Přeneste přibližně 51 mg surové hmoty amlodipinmaleátu do hnědé lahvičky o objemu 10 ml. Rozpusťte ve 4 ml rozpouštědla a roztok dobře promíchejte (odpovídá obsahu 10 mg amlodipinu na ml).

Aml-o-aspartát, 0,3 % roztok B: Přeneste přibližně 6 mg amlodipinaspartátu do 25 ml odměrné baňky. Přidejte 20 ml rozpouštědla a pevnou fází rozpustíte s pomocí ultrazvukové vodní lázně.

- 10 Doplněte rozpouštědlo po rysku a roztok dobře promíchejte (zásobní roztok B). Odpipetujte 0,5 ml ze zásobního roztoku B do lahvičky o objemu 10 ml. Přidejte 3,5 ml rozpouštědla a roztok dobře promíchejte (odpovídá obsahu 0,03 mg amlodipinu na ml).

Aml-o-maleinamid, 0,3 % roztok C: Přeneste přibližně 6 mg amlodipinmaleinamidu do 25 ml odměrné baňky. Přidejte 20 ml rozpouštědla a rozpustíte s pomocí ultrazvukové vodní lázně.

- 15 Doplněte rozpouštědlo po rysku a roztok dobře promíchejte (zásobní roztok C). Odpipetujte 0,5 ml ze zásobního roztoku C do lahvičky. Přidejte 3,5 ml rozpouštědla a roztok dobře promíchejte (odpovídá 0,03 mg amlodipinu na ml).

Směsný standard D: Přeneste přibližně 51 mg surové hmoty amlodipinmaleátu do hnědé lahvičky. Rozpusťte ve 3 ml rozpouštědla. Přidejte 0,5 ml zásobního roztoku B a 0,5 ml zásobního roztoku C a roztok dobře promíchejte.

- 20
- |                                             |                                                                                    |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Plotny:                                     | HPTLC plotny pokryté silikagelem<br>60 F254, 20 x 10 cm (Merck)                    |
| Objem vzorku:                               | 1,0 µl                                                                             |
| Pásmo:                                      | 10 mm                                                                              |
| 25 Nanášecí rychlost:                       | 4 sek/µl                                                                           |
| Vzdálenost od spodního okraje HPTLC plotny: | 15 mm                                                                              |
| Vzdálenost mezi vzorky:                     | 10 mm                                                                              |
| Mobilní fáze:                               | Methylisobutylketon, methanol a kyselina octová<br>v objemovém poměru 70 : 20 : 10 |
| 30 Nasycení komory:                         | Vyvíjecí soustava naplněna 20 ml mobilní fáze a<br>sycena po dobu 5 minut          |
| Vyvíjení:                                   | Separční dráha 9 cm, horizontální uspořádání                                       |
| Sušení na vzduchu:                          | 15 min, za laboratorní teploty                                                     |
| Detekce:                                    | UV 366 nm                                                                          |

35 **2. Vyhodnocení chromatogramů**

a) Poté co byly všechny čtyři vzorky nanášeny na plotnu, byla TLC plotna vysušena na vzduchu a poté zkoumána pod UV světlem při 366 nm. Pokus nebyl platný, dokud chromatogram získaný ze směsného standardu D nevykazoval tři zřetelně oddělené skvrny.

- 40 b) Byla vypočtena intenzita jakékoliv sekundární skvrny na chromatogramu roztoku A, jejíž hodnota  $R_f$  odpovídala hodnotě získané pro hlavní skvrnu na chromatogramu roztoku B (odpovídajícího 0,3 % hmotn. amlodipinaspartátu).

c) Byla vypočtena intenzita jakékoliv sekundární skvrny na chromatogramu roztoku A, jejíž hodnota  $R_f$  odpovídala hodnotě získané pro hlavní skvrnu na chromatogramu roztoku C (odpovídajícího 0,3 % hmotn. amlodipinmaleinamidu).

### 3. Výsledky

- 5 Příklad chromatogramu směsi amlodipinmaleátu, amlodipinaspartátu a amlodipinmaleinamidu získaný scanováním na Camag TLC scanneru je znázorněný na obr. 7.

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Sloučenina             | $R_f$ |
| Amlodipinaspartát      | 0,06  |
| Amlodipinmaleát        | 0,19  |
| 10 Amlodipinmaleinamid | 0,76. |

V rámci zde popsaného předkládaného řešení bude zkušeným osobám jistě zřejmé, že při konkrétní realizaci jednotlivých konceptů a postupů zde popsaných mohou být praxí snadno odvozeny a provedeny jisté úpravy a změny, aniž by došlo k odchýlení se od původního smyslu a oblasti řešení, která je definovaná následujícími nároky.

15

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Vysoce čistý referenční standard pro testování čistoty nebo stability farmaceutických prostředků obsahujících amlodipinmaleát tj. obsahu nečistot amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu nižšího než 0,2 % hmotn., **vyznačující se tím**, že obsahuje více než 80 % výhodně více než 90 % hmotn. amlodipinaspartátu nebo amlodipinmaleinamidu.

20

7 výkresů

25

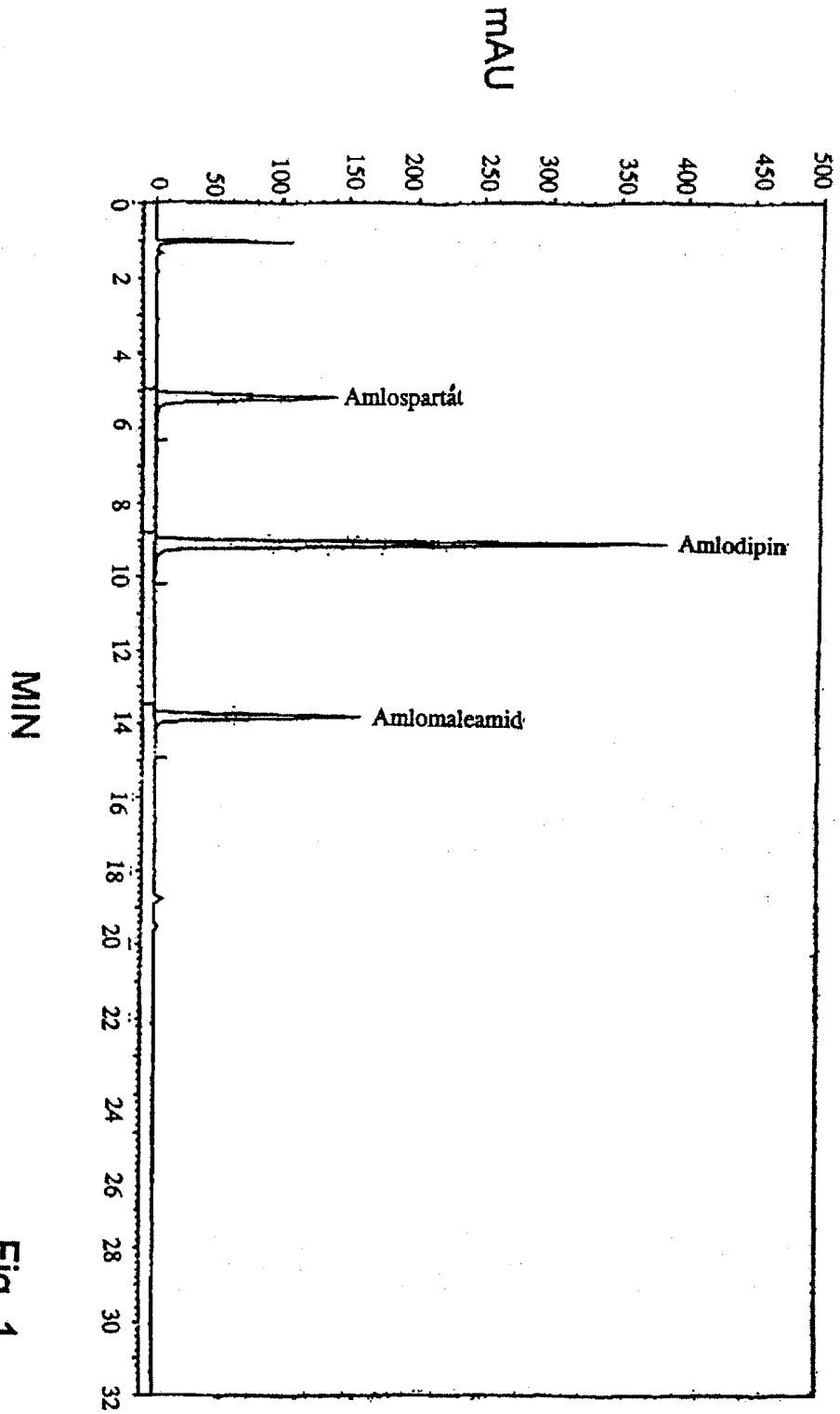


Fig. 1

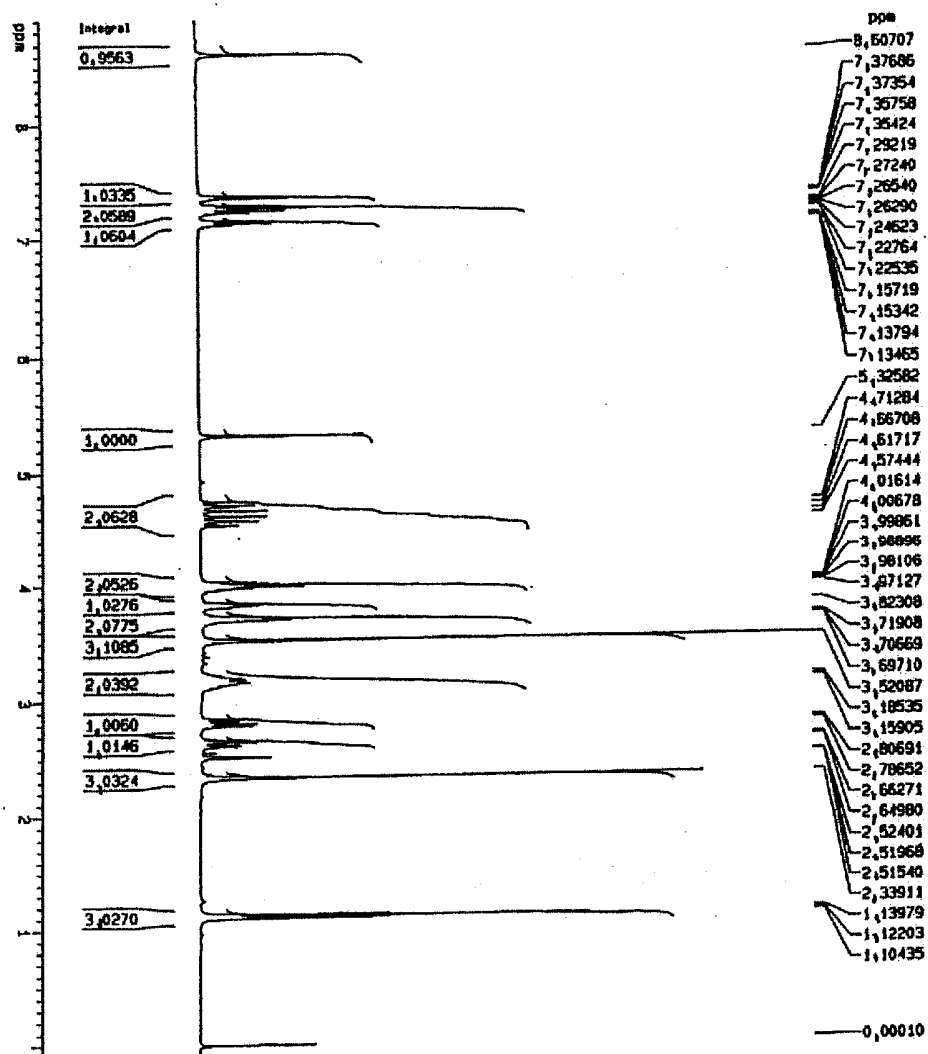


Fig. 2

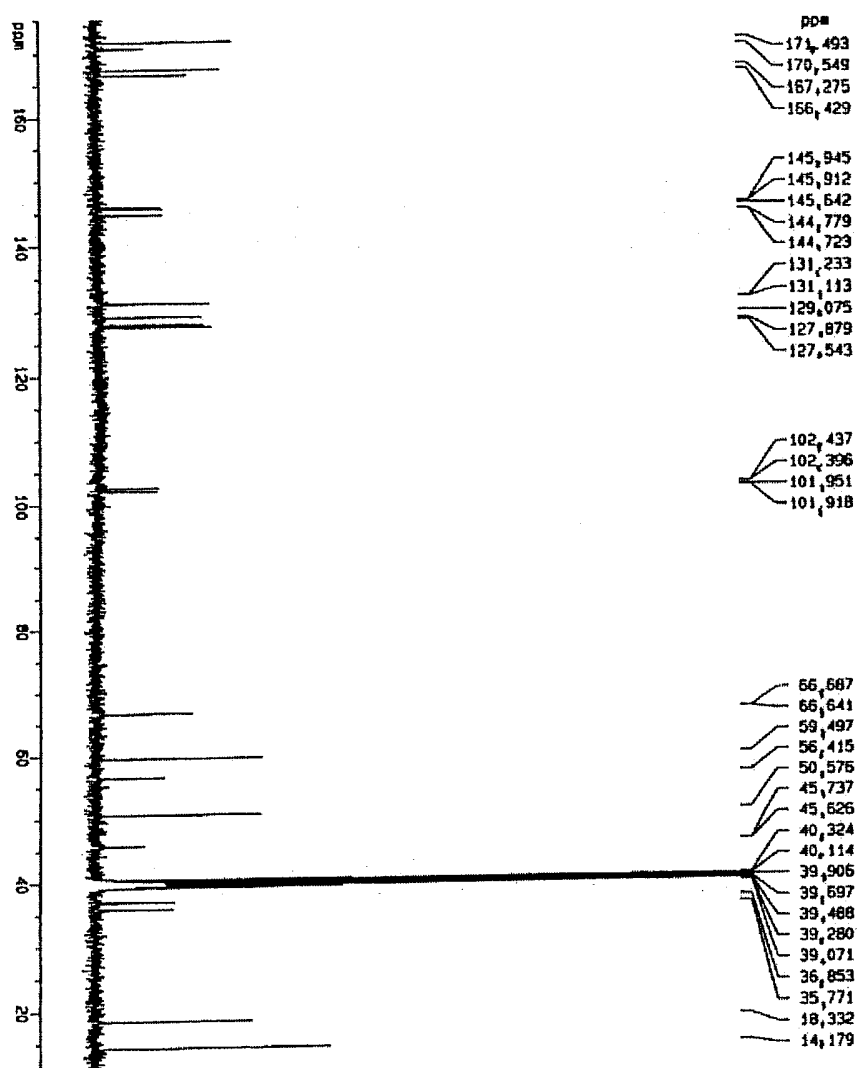


Fig. 3

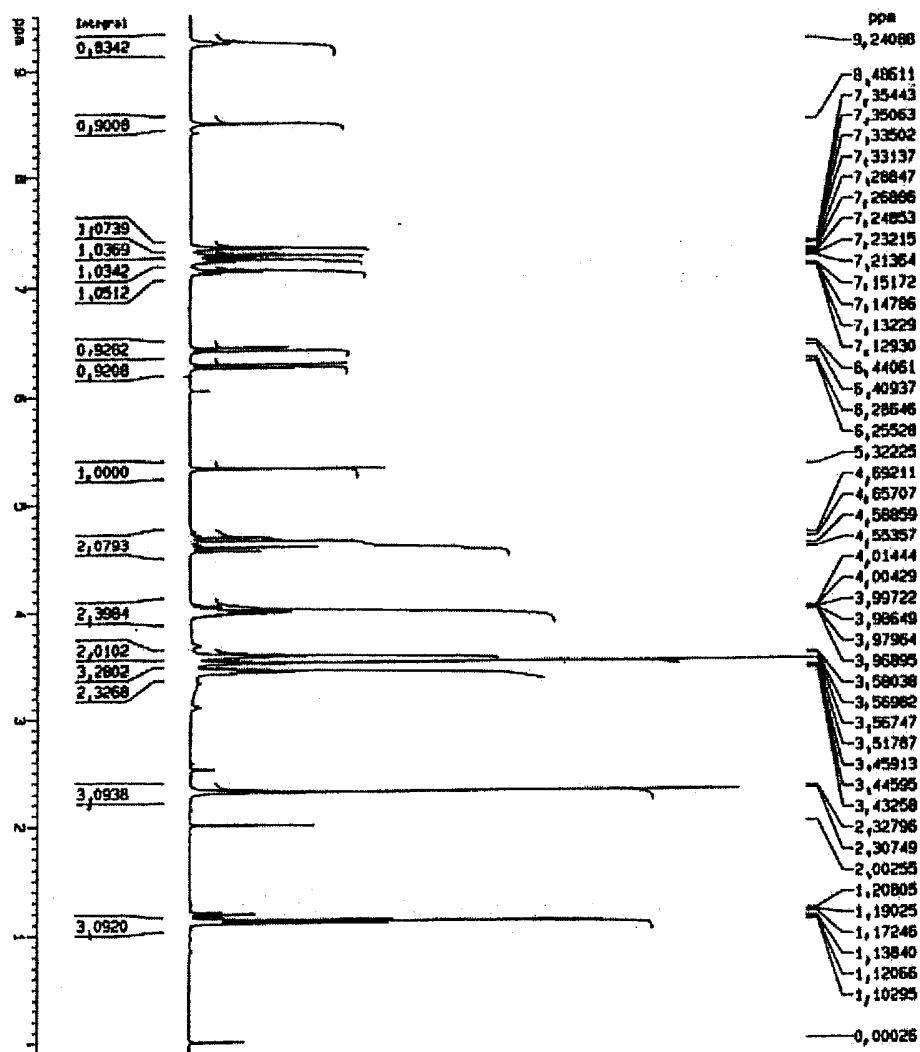


Fig. 4

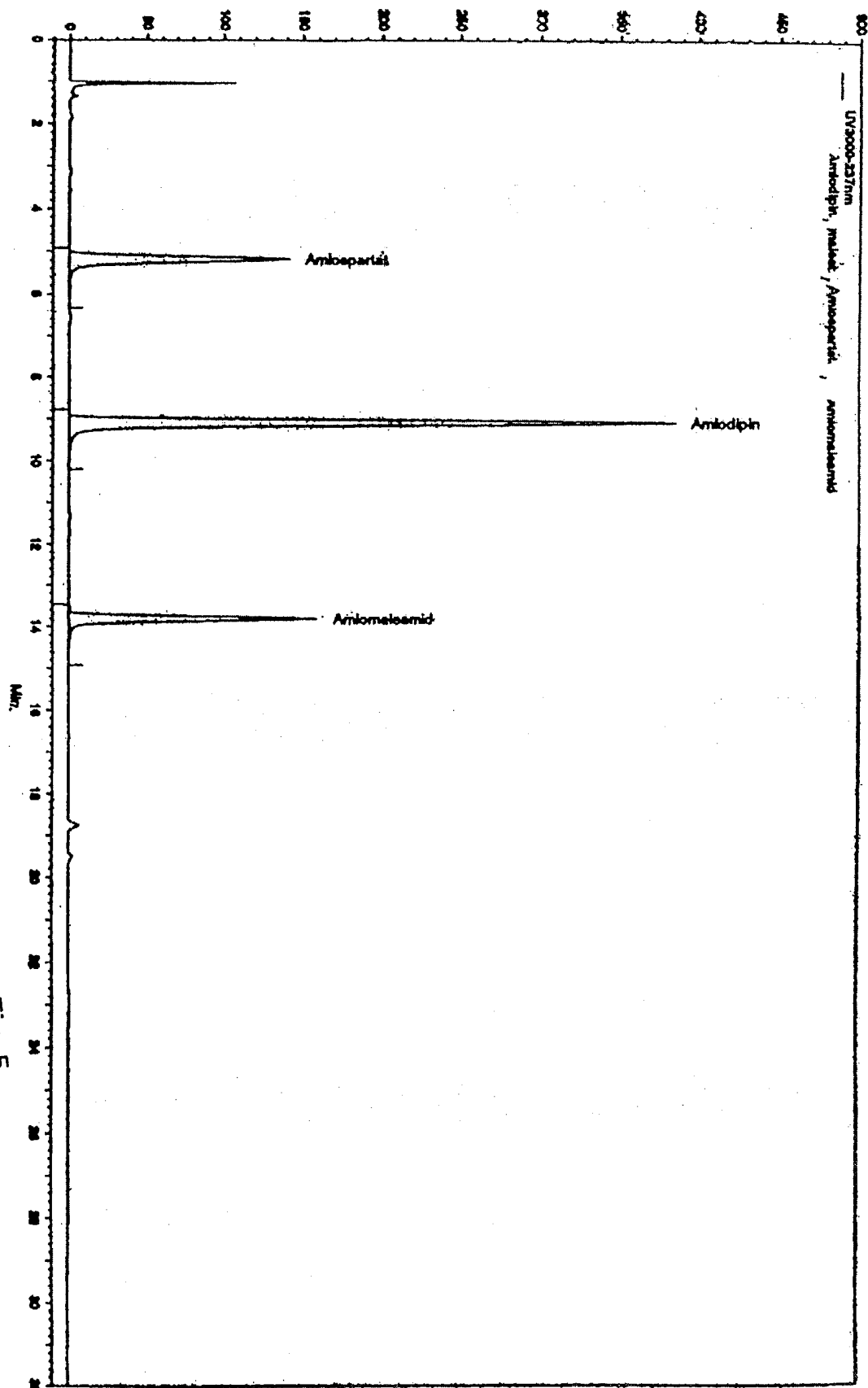


Fig. 5

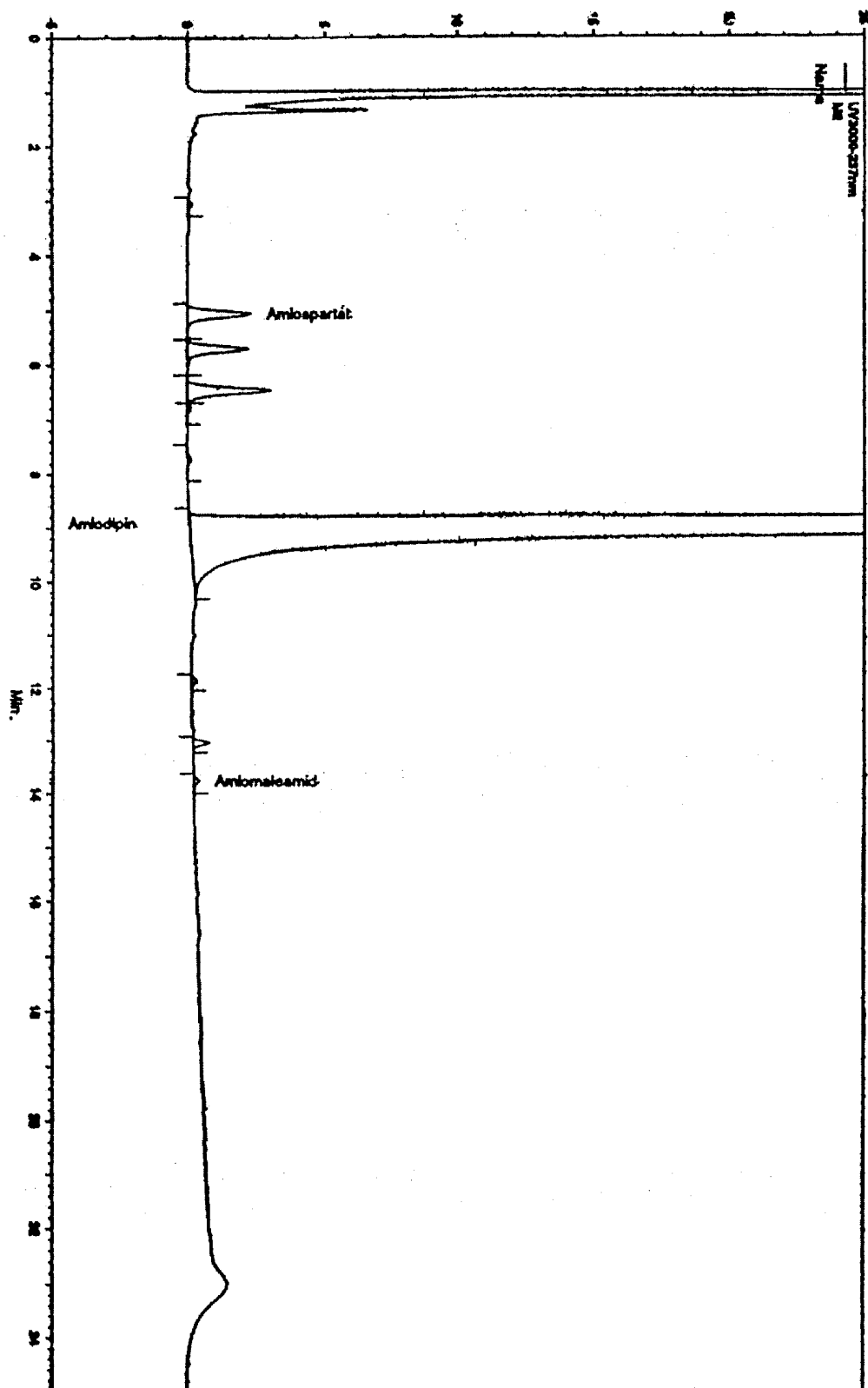


Fig. 6

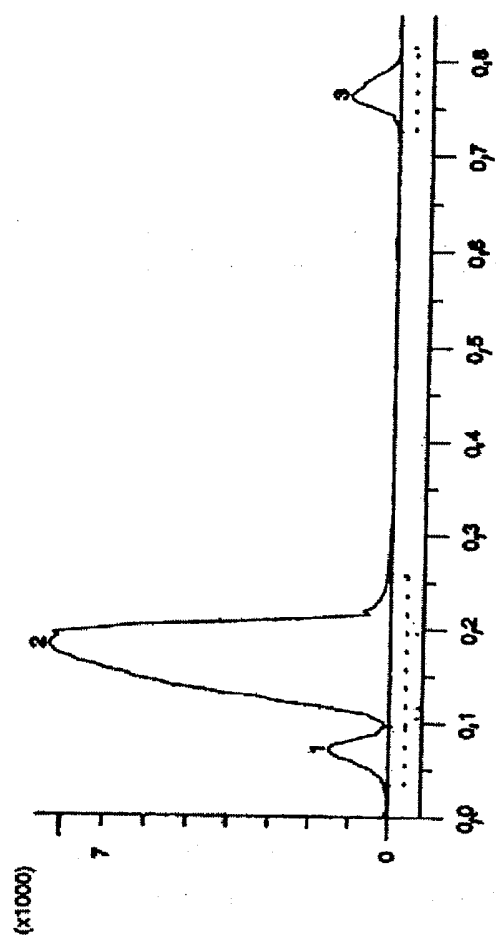


Fig. 7

---

Konec dokumentu

---