

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Optimalizace chromatografické separace pro stanovení
4-aminofenolu a účinných látek v léčivém přípravku Valetol**

Vedoucí rigorózní práce: RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2008

Mgr. Jana Daňková

*Děkuji Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D.,
mému trpělivému školiteli.*

1 Obsah

1	Obsah	2
2	Použité zkratky	4
3	Úvod	5
4	Cíl práce	6
5	Teoretická část	7
5.1	Valetol	7
5.1.1	Kompletní složení přípravku	7
5.1.2	Paracetamol	8
5.1.3	Kofein	9
5.1.4	Propyfenazon	10
5.2	4-aminofenol – hlavní rozkladný produkt paracetamolu.....	12
5.3	Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu	13
5.4	Chromatografie	14
5.4.1	Základní principy chromatografických metod ^{/3,4,5/}	14
5.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC ^{/3,4/}	15
5.4.3	Schéma kapalinového chromatografu ^{/3/}	16
5.4.4	Chromatografické kolony ^{/2,3,4,5/}	17
5.4.5	Detektory v HPLC ^{/3,4/}	18
5.5	Metody současného stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu ^{/13/}	19
6	Experimentální část	21
6.1	Materiály a pomůcky	21
6.1.1	Chemikálie, standardy, vzorky	21
6.1.2	Přístroje.....	22
6.2	Příprava roztoku standardů	22
6.3	Příprava směsného roztoku standardů	22
7	Výsledky a diskuze	23
7.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	23
7.1.1	Volba vlnové délky detektoru.....	23
7.1.2	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek.....	24
7.1.2.1	ODS Hypersil (250 x 46mm, 5µm)	24
7.1.2.2	Zorbax TMS (4,6 x 250mm, 5µm)	26

7.1.2.3	Synergi 4 μ Fusion RP (75 x 3mm, 4 μ m).....	27
7.1.2.4	Discovery Cyano (100 x 4mm, 5 μ m)	28
7.1.2.5	Zorbax SB-CN 150 x 4,6mm, 5 μ m	29
7.1.2.6	Nucleosil 100 – 5 – CN (100 x 4mm, 5 μ m).....	30
7.1.2.7	Zorbax SB – Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5 μ m)	31
7.1.2.8	Synergi 4 μ m POLAR – RP (75 x 3mm, 4 μ m).....	34
7.1.2.9	Gemini 3 μ m C18 110A (50 x 3mm, 3 μ m).....	35
7.1.2.10	Phenomenex Luna NH ₂ (250 x 3mm, 10 μ m).....	36
7.1.2.11	ZIC – HILIC (50 x 4,6mm, 5 μ m).....	38
7.1.2.12	Chromolith TM Flash RP – 18C (250 x 4,6mm, 5 μ m)	40
7.1.2.13	Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5 μ m)	42
7.1.2.14	ZIR – CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5 μ m).....	51
7.1.2.15	Discovery HS F5 (150 x 4,6mm, 5 μ m).....	54
7.1.2.16	Discovery RP-AMIDE C16 (250 x 3,5 mm, 5 μ m)	57
7.1.2.17	Možnosti gradientové eluce na vybraných kolonách	58
7.1.2.17.1	ZIR-CHROM CARB (150x4,6mm, 5 μ m).....	58
7.1.2.17.2	Discovery RP-AMIDE C16 (250 x 3,5 mm, 5 μ m)	60
8	Závěr	62
9	Seznam použité literatury	63

2 Použité zkratky

ČL	Český lékopis
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PVC	polyvinylchlorid
GABA	kys. gamaaminomáselná
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
MF	mobilní fáze
UV	ultrafialová oblast spektra záření
MeOH	methanol
PAR	paracetamol
KOF	kofein
PRO	propyfenazon
AMF	4-aminofenol

3 Úvod

Valetol s obsahem paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu je přípravek určený ke krátkodobé léčbě bolesti hlavy, zubů, migrény, bolesti při nachlazení a chřipce, pooperační a revmatické bolesti, ischias, neuralgie, bolestivé menstruace.

Účinné látky přípravku – paracetamol, kofein a propyfenazon – se obvykle stanovují chemickou metodou. Dle ČL 2005 paracetamol cerimetrickou titrací ve vodném prostředí s vizuální indikací ekvivalenčního bodu na barevný indikátor – ferroin; kofein a propyfenazon acidimetrickou titrací v nevodném prostředí s potenciometrickou indikací ekvivalenčního bodu.

Nečistota paracetamolu - 4-aminofenol je hlavní příčinou jeho toxicity. V současné době je s ohledem na riziko spojené s jeho výskytem s léčivých přípravcích zaměřena pozornost na jeho stanovení ve velmi nízkých koncentracích

K analýze léčiv jsou dnes široce využívány metody separační, které umožňují analýzu směsí s možností jak kvalitativního, tak kvantitativního hodnocení separovaných složek směsí. Pro stanovení látek v tabletovině je vhodnou analytickou metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC, která umožňuje provést identifikaci, kontrolu čistoty a stanovení obsahu několika látek během jedné analýzy. Další výhodou této metody je vysoká rychlost měření, citlivost stanovení (v závislosti na použité detekci), selektivita, možnost automatizace a využití minimálního množství vzorku.

4 Cíl práce

Tato rigorózní práce se zabývá optimalizací separačních podmínek stanovení paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu v hromadně vyráběném léčivém přípravku Valetol. Jako analytická metoda byla zvolena HPLC s UV detekcí hlavně z těchto důvodů:

- tablety obsahují mnoho dalších pomocných látek, které jsou během analýzy ze vzorku separovány a neznemožňují stanovení samotných účinných látek
- možnost sledování stability léčivých látek

Práce byla pojata jako původní, nicméně musím klást důraz na co možná největší jednoduchost a časovou nenáročnost při zachování vysoké přesnosti a spolehlivosti dané metody.

5 Teoretická část

5.1 Valetol^{/1,2/}

Přípravek se používá ke krátkodobé léčbě bolesti (bolesti hlavy, zubů, migréna, bolesti při nachlazení a chřipce, postoperační a revmatické bolesti, ischias, neuralgie, bolestivá menstruace).

Při užívání se může občas vyskytnout kožní alergie, nauzea, tlak v epigastiu, nechutenství, průjem, vzácně poruchy krvetvorby, trombocytopenie, leukopenie, pancytopenie, neutropenie, agranulocytóza, hemolytická anémie a žloutenka, velmi zřídka palpitace, nespavost, neschopnost koncentrace, zvýšená dráždivost, hyperreflexie nebo závratě a malátnost.

Riziko výskytu nežádoucích účinků se zvyšuje při dlouhodobém podávání a při vyšších dávkách.

Přípravek je balen v blistru z PVC nebo hliníku po 10 tabletách.

Tablety jsou téměř bílé, nepotahované, 13 mm v průměru s půlicí rýhou uprostřed.

Přípravek patří k vícesložkovým kombinovaným analgetikům s účinnými látkami paracetamol v množství 150 mg, kofein v množství 50 mg a propyfenazon v množství 300 mg.^{/1/}

5.1.1 **Kompletní složení přípravku**^{/1/}

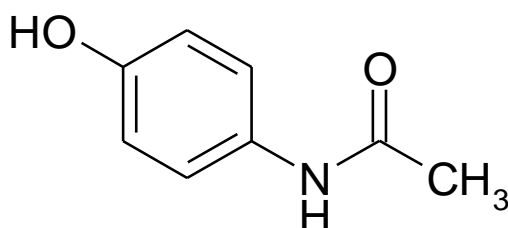
Paracetamol	150 mg
Kofein	50 mg
Propyfenazon	300 mg

Pomocné látky:	Maydis amyllum praegelatum
	Povidonum
	Croscarmellosum natricum
	Talcum
	Stearinum
	Magnesii stearas
	Maydis amyllum
	Carboxymethylamyllum natricum
	Cellulosum microcrystallinum

5.1.2 Paracetamol

Paracetamol je bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu. Chemicky je to N-(4-hydroxyfenyl)acetamid. ^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₈ H ₉ NO ₂
M_r:	151,16
Teplota tání:	168 °C až 172 °C. ^{/2/}

Paracetamol se svou chemickou strukturou řadí mezi deriváty anilínu. Je vůbec nejužívanější látkou v této skupině. Z hlediska fyzikálně chemických vlastností je paracetamol látkou spíše amfoterní a polární. Díky těmto vlastnostem se rychle a téměř úplně vstřebává z trávicího traktu po perorálním podání. ^{/7/}

Paracetamol patří do farmakoterapeutické skupiny neopioidních analgetik s antipyretickým účinkem. Antipyretický účinek spočívá v inhibici cyklooxygenázy v hypotalamu; centrální mechanismus se podílí rovněž na jeho analgetickém působení – nepřímé působení na serotoninové 5-HT₃-receptory v míše. Na periférii paracetamol urychluje přeměnu prostaglandinu G₂ na PGH₂, a tím snižuje protizánětlivé působení nestabilního endoperoxidu PGG₂.

Paracetamol má relativně dobrou gastrointestinální snášenlivost a neovlivňuje krevní srážlivost. Je proto vhodný i pro podání dětem a osobám se špatnou gastrointestinální tolerancí.

Paracetamol je doporučován v terapii horečky zejména při akutních bakteriálních a virových infekcích, bolesti zubů, hlavy, neuralgie, bolesti svalů nebo kloubů neznámé etiologie, bolesti vertebrogenního původu a bolestivá menstruace. Perorálně aplikovaný paracetamol se rychle a téměř úplně vstřebává z gastrointestinálního traktu. Rychle se distribuuje do všech tkání a tělesných tekutin. Maximální plazmatické hladiny je dosaženo za 10-60 minut po p.o.

podání. Prochází hematoencefalickou bariérou, do slin a do mateřského mléka. Intenzivně se biotransformuje, vedle konjugačních reakcí dochází k oxidativním pochodům, přičemž vznikají toxické metabolity. Při podání terapeutických dávek dochází k rychlé biotransformaci těchto hepatotoxických intermediálních metabolitů za spolupůsobení glutathionu a za vzniku merkapturových kyselin, které se vylučují močí převážně ve formě konjugátů, méně než 5% paracetamolu se vyloučí v nezměněné formě.

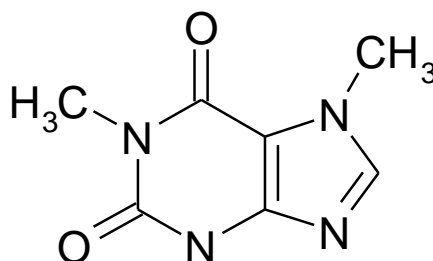
Biologický poločas se pohybuje mezi 1-3 hodinami, u závažné jaterní insuficience dochází k jeho prodloužení až na 5 hodin. U insuficience ledvin nedochází k jeho prodloužení, ale protože se převážně vylučuje ledvinami, je nutno dávku paracetamolu redukovat.

Nežádoucí účinky se při systémovém podání v terapeutických dávkách vyskytují jen zřídka a s mírným klinickým průběhem kožní alergie, jen zcela ojediněle bronchospasmus. Jen zcela vzácně se vyskytují poruchy krvetvorby.^{/1,6/}

5.1.3 Kofein

Kofein je bílý krystalický prášek nebo jemné bílé krystalky, snadno sublimující. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v etheru. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů. Chemicky je to 1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion.^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
M_r:	194,19
Teplota tání:	234 °C až 239 °C. ^{/2/}

Chemicky patří kofein k derivátům xantinu (2,6-dioxopurin), které lze odvodit náhradou vodíku v NH skupinách methyly. Kofein je dusíkatá base – purinový alkaloid. Vyskytuje se v semenech kávovníku, listech čajovníku a některých jiných rostlinných drogách.^{/6,7/}

Z hlediska fyzikálně chemických vlastností je kofein látkou slabě bazickou a lipofilní.

Kofein patří do farmakoterapeutické skupiny psychostimulancií, resp. deriváty methylxantinů. Tato skupina se vyznačuje vedle psychostimulačních účinků, také účinky bronchodilatačními, kardiostimulačními a nepříliš silnými účinky diuretickými, v žaludku stimuluje sekreci HCl. Při pravidelném užívání vzniká tolerance.

Methylxantiny se z trávicího traktu vstřebávají nepravidelně. Distribuují se do všech tkání, přecházejí do slin, placentární bariérou a do mléka. V organismu se demethylují a oxidují, poločas eliminace kofeinu je 3-5 hodin.

Účinky kofeinu spočívají v tom, že blokuje fosfodiesterázu, čímž snižuje inaktivaci cAMP a je také antagonistou adenosinových receptorů. Adenosin tlumí respiraci, psychomotoriku, má antikonvulzní, hypnotické, anxiolytické a analgetické účinky, dilatuje mozkové cévy, má antidiuretický účinek a inhibuje uvolňování reninu a žaludeční sekreci. Je tedy vedle GABA druhým hlavním inhibičním neurotransmiterem. Kofein má tedy naopak účinek stimulační – stimuluje CNS, má anxiogenní účinky, snižuje průtok krve mozkem, podporuje diurézu, v žaludku podporuje sekreci HCl, stimuluje respirační a vazomotorické centrum a má pozitivně ionotropní vliv na myokard.

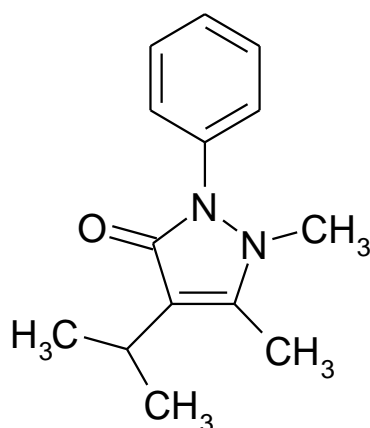
U nemocných s úzkostnou panickou poruchou může kofein vyvolat epizodu paniky.

Přerušeni pravidelného užívání vede k bolestem hlavy, únavě, ospalosti, depresi a převáží příznaky vysoké aktivity adenosinu – dilatace cerebrálních cév, útlum, snížení diurézy aj.^{/6/}

5.1.4 Propyfenazon

Propyfenazon je bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru. Chemicky je to 2-fenyl-4-isopropyl-1,5-dimethyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on.^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O
M_r:	230,31
Teplota tání:	102 °C až 106 °C. ^{/2/}

Propyfenazon se svou chemickou strukturou řadí mezi deriváty pyrazolonu. Pro nízkou toxicitu je nejpoužívanější látkou této skupiny. Z hlediska fyzikálně chemických vlastností se řadí ke slabým bazím a látkám spíše polárního charakteru.^{/7/}

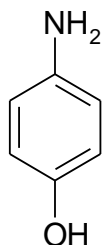
Propyfenazon patří do farmakoterapeutické skupiny neopioidních analgetik – antipyretik. Tato skupina látek vyniká výrazným protizánětlivým, analgetickým, antipyretickým a urikosurickým účinkem. Po jejich podání však často dochází ke vzniku gastroduodenálních vředů s krvácením nebo dokonce perforací. Další život ohrožující komplikací může být porucha hemopoezy.^{/1,6/}

Propyfenazon je po perorálním podání rychle resorbován (v průběhu 30 minut) a z převážné části rychle vylučován ledvinami. Prostupuje také placentární bariérou. Eliminační poločas je 1-1,5 hodiny, ostatní údaje nejsou bohužel známy.^{/1,6/}

5.2 4-aminofenol – hlavní rozkladný produkt paracetamolu

4-aminofenol je bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek, na vzduchu a na světle tmavnoucí. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v bezvodém ethanolu.^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₆ H ₇ NO
M_r:	109,1
Teplota tání:	asi 186°C ^{/2/}

Z hlediska fyzikálně chemických vlastností se 4-aminofenol řadí k látkám amfoterním a spíše polárního charakteru.

4-aminofenol je metabolit a zároveň hlavní rozkladný produkt paracetamolu. Je zároveň hlavní příčinou toxicity paracetamolu, která je běžnou příčinou akutního jaterního selhání a to vede k hlubokému nabeurání fyziologických funkcí a je charakterizováno vasoplegií, encefalopatií a koagulopatií. Běžně je komplikováno renálním selháním, mozkovým edémem a multiorgánovou dysfunkcí. Mortalita je vysoká a pacienti často vyžadují služby více oborových specialistů na jednotce intenzivní péče a nebo transplantaci jater.

S ohledem na riziko spojené s přítomností 4-aminofenolu v léčivých přípravcích byla zaměřena pozornost na jeho stanovení ve velmi nízkých koncentracích.^{/10/}

5.3 Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu

tabulka 1: Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností PAR, KOF, PRO a AMF ^{/11, 12/}

	průměr. logP	exp. logP	pKa (kys.)	pKa (baze)
Paracetamol	0,44 ± 0,19	0,46	10,2	-
Kofein	-0,25 ± 0,27	-0,07	-	-
Propyfenazon	2,27 ± 0,68	1,94	-	1,3
4-aminofenol	0,30 ± 0,19	0,04	10,4	5,4

Vzhledem k tomu, že všechny čtyři látky mají bazické či amfoterní vlastnosti a zároveň také rozdílné lipofilní vlastnosti, je tímto obtížná volba MF a vhodné analytické kolony, protože použití klasických kolon s reverzní fází je problematické (chvostování píků, příliš rozdílná retence, ionizace látek při různém pH)

5.4 Chromatografie

5.4.1 **Základní principy chromatografických metod** ^{/3,4,5/}

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, které slouží k oddělení analyzovaných látek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.

Principem chromatografického procesu je postupné, mnohokrát opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivá, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi; pohyblivá, mobilní fáze vymývá jednotlivé součásti směsi z fáze stacionární a odnáší je ve směru toku různou rychlostí na základě rozdílné afinity dělených látek ke stacionární fázi. Hybnou silou chromatografického systému je mobilní fáze, která může být buď kapalná (eluent) nebo plynná (inertní nosný plyn). Vlastní dělení látek závisí na retenci, brzdící síle stacionární fáze, kterou tvoří látka v tuhém skupenství (sorbent) nebo kapalina umístěna na inertním nosiči.

Chromatografických metod je v dnešní době značné množství a vzhledem k velké různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
 - Kapalinová (Liquid Chromatography – LC)
 - Plynná (Gas Chromatography – GC)
- **Podle uspořádání stacionární fáze**
 - Kolonová
 - Papírová (Paper Chromatography – PC)
 - Tenkovrstvá (Thin Layer Chromatography – TLC)
- **Podle podstaty separačního procesu**
 - Rozdělovací
 - Adsorpční
 - Iontově – výměnná
 - Gelová
 - Afinitní

Mezi nejpoužívanější separační metody ve všech oblastech analýzy léčiv patří plynová a kapalinová chromatografie.

Metoda plynové chromatografie se využívá především pro analýzu plynných látek a také pro analýzu těkavých látek, které za vyšší teploty přechází do plynného stavu, aniž by docházelo k jejich rozkladu. Je vysoce citlivá a umožňuje kvantitativní i kvalitativní hodnocení separovaných složek směsi, ovšem většina léčiv jsou látky termostabilní, proto je stále více využívána chromatografie kapalinová. Ta umožňuje dělení všech méně těkavých i tuhých látek rozpustných ve vodě, organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. Dnes je prováděna hlavně v kolonovém uspořádání.

5.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC ^{/3,4/}

V současné době je HPLC jednou z nejprogresivnějších analytických metod, která je široce uplatňována ve všech moderních lékopisných monografiích. Dělení látek probíhá mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku.

Zmenšením částic stacionární fáze je dosaženo větší účinné plochy a vysoké separační účinnosti. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí protlačit ji kolonou působením čerpadla pod vysokým tlakem (až 40 MPa). Pro oddělení látek jsou využívány všechny výše jmenované separační mechanismy, což umožňuje nalezení dostatečně selektivního chromatografického systému.

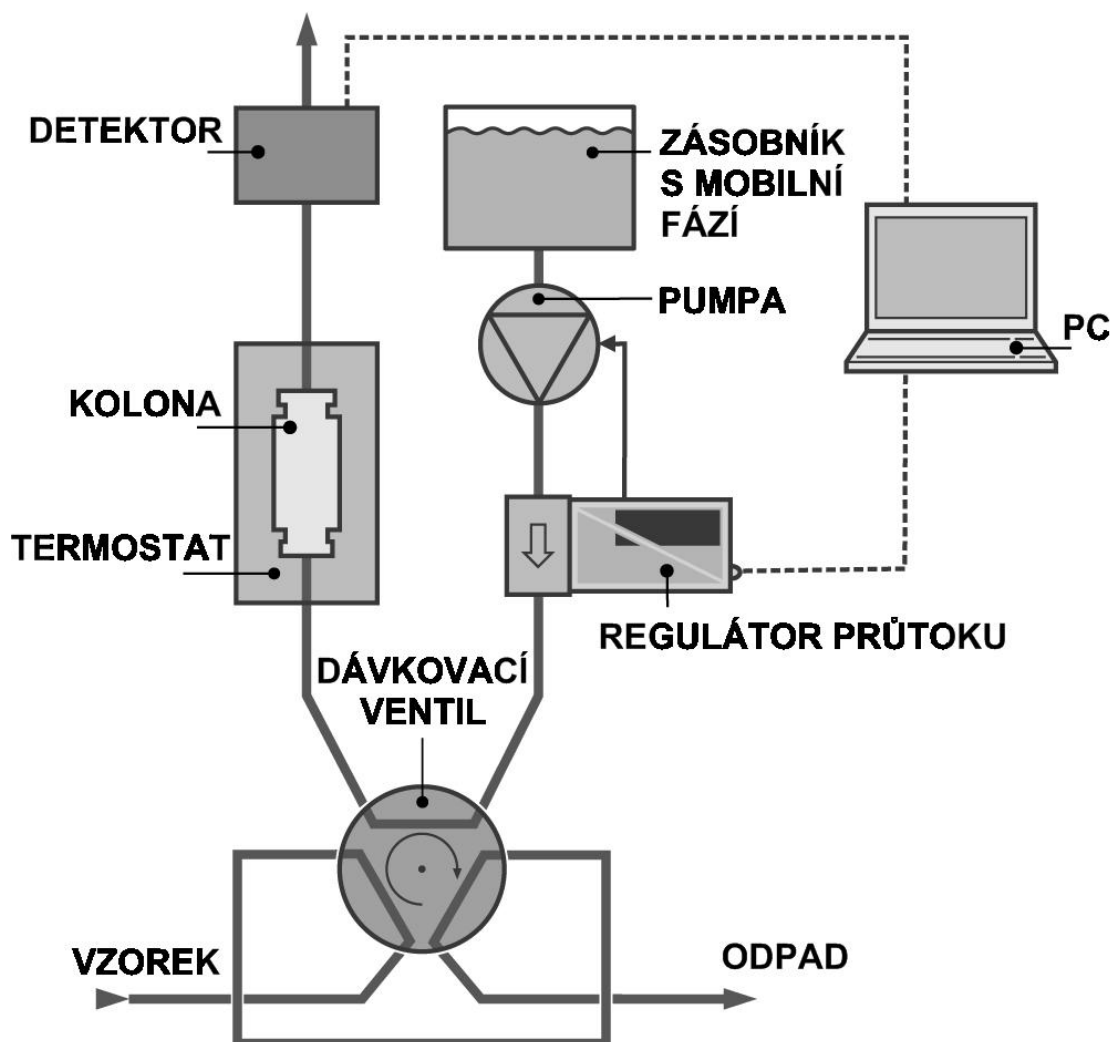
Jako mobilní fáze se volí běžná rozpouštědla nebo jejich směsi, které postupují kolonou. Vyvíjení se realizuje buď za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy – isokratická eluce; nebo se mění složení mobilní fáze s časem – gradientová eluce. Roztok vzorku obsahující dělené látky je dávkován na kolonu, kde je unášen proudem mobilní fáze. Poté dochází k mnohonásobné sorpci těchto látek na stacionární fázi a následně k desorpci fází mobilní. Látky vystupují postupně z kolony do detektoru, kde se registruje jejich přítomnost a jako odezva na tento signál je zakreslen pík na chromatografickém záznamu – chromatogramu. Separace je uskutečňována na základě různé afinity jednotlivých složek dělené směsi k oběma fázím v koloně.

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace podmínek chromatografie tak, aby separované látky poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky. Kvalitativní charakteristikou analýzy je retenční čas nebo retenční objem, kvantitativní údaj udává plocha píku stanovované látky s plochou píku standardu, který je analyzován za stejných podmínek.

Přesnější je metoda vnitřního standardu, kdy se analyzuje standard i sledovaná látka v jednom vzorku za zcela stejných podmínek.

5.4.3 Schéma kapalinového chromatografu ^{13/}

Kapalinový chromatograf je složen z jednotlivých komponent, které umožňují dávkování směsi látek, tok mobilní fáze, separaci látek a následnou detekci se záznamem píků a tzv. data-stanice (většinou PC), které provádějí sběr, zpracování a vyhodnocování dat. Pro účinnou separaci látek je rozhodující správný výběr kolony a složení mobilní fáze, citlivost a selektivita analýzy je závislá na použitém detektoru.



Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu

Některé novější chromatografy obsahují vakuový degasser, který je určený k odplynování mobilní fáze.

5.4.4 Chromatografické kolony ^{/2,3,4,5/}

Kolona má rozhodující vliv na kvalitu chromatografie a její volba významně ovlivňuje i dobu analýzy. Mnoho rozličných aplikací HPLC podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně.

Pro většinu rutinních analytických metod jsou kolony vyrobeny z nerezové oceli, nejčastěji délce 10, 15 nebo 25 cm a o vnitřním průměru 4,6 nebo 5 mm. Běžný průtok eluentu se pohybuje od 1 do 2 ml/min. Krátké kolony o délce 3 – 5 cm dovolují dosáhnout rychlých separací a snížit významně spotřebu mobilní fáze a současně zvýšit hmotnostní citlivost detekce, což má význam hlavně pro analýzu malých objemů vzorku. Materiál, který naplňuje analytické kolony má průměr v rozmezí 1,7 - 10 μ m. Kolony s velmi malým vnitřním průměrem – mikrokolony – mají délku 25 – 50 mm a vnitřní průměr 1 – 2 mm. Vynikají vysokou účinností a nízkou spotřebou rozpouštědla (100 - 1000 μ l). Jako ochrana hlavní kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály jsou často využívány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, častěji jsou však zabudovány přímo před kolonou.

HPLC kolony musí být mechanicky stabilní při pracovních tlacích do 30 – 40MPa, musí mít vysokou účinnost a poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolekulárních látek. Dále se vyžaduje stabilita a dostatečná permeabilita, malý odpor i při vysokých průtocích mobilní fáze. Pro účinné dělení látek je rozhodující nejen náplň kolony, zvláště velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura. Náplň musí být rovnoměrná a homogenní.

Nejvíce používaným sorbentem pro většinu HPLC aplikací jsou nemoifikované či chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikosti 3 - 10 μ m), vzácněji oxid hlinitý. Poslední dobou se objevují také stacionární fáze na podkladu oxidu zirkoničitého, případně také dalších makromolekulárních materiálů. Silikagel je polární adsorbent amorfní struktury. Jeho povrch je pokryt hydroxylovými skupinami, které jsou schopny tvořit vodíkové můstky a tak dochází k interakci se separovanými látkami. Jeho kyselé vlastnosti způsobují silné zadržování bazických látek.

Většina HPLC separací je založena na mechanismu rozdělování a využívá chemicky modifikované stacionární fáze, u nichž se na bázi silikagelu silylací připravují fáze s různými koncovými skupinami, které ovlivňují polaritu stacionární fáze. Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce C₁₈ a C₈, což jsou tzv. reverzní fáze – nepolární. Dále tříuhlíkaté řetězce zakončené skupinami -NH₂, -CN a další. Tyto silikagelové stacionární fáze je ale možné

využít pro analýzy prováděné jen v rozmezí pH 2 – 8, což částečně omezuje jejich využití. V poslední době nabývá na významu stabilita kolon i při vyšších pracovních teplotách, kdy lze zpravidla dosáhnout vyšší účinnosti a rychlejší analýzy. Doporučuje se však, aby nebyly kolony zahřívány na teplotu nad 60°C, kdy se zvyšuje nebezpečí degradace stacionární fáze.

5.4.5 Detektory v HPLC ^{/3,4/}

Základní funkcí detektoru je převádění výsledků separace v koloně na registrovatelnou formu. Detektor reaguje na přítomnost analyzované složky a vysílá signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase.

Detektory by měly být vysoce selektivní pro stanovované složky směsi, musí mít dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu sledované látky. Průtoková cela detektoru musí vydržet nápor mobilní fáze a udržet těsnost. Důležitá je také univerzálnost – možnost detekce všech oddělených složek vzorku a nezávislost odezvy detektoru na změně mobilní fáze při gradientové eluci.

Přehled nejběžnějších detektorů.^{/4/}

- spektrofotometrické (hlavně v UV/VIS oblasti)
- refraktometrické
- fluorimetrické
- elektrochemické
- hmotnostně spektrometrický

5.5 Metody současného stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu

V dostupné literatuře nebyla nalezena žádná metoda zabývající se současným stanovením paracetamolu, 4-aminofenolu, propyfenazonu a kofeinu, proto je uveden pouze přehled metod zabývající se současným stanovením paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu. Stanovení samotného 4-aminofenolu je podrobně rozepsáno v rozsáhlé rešeršní práci autorů: L. Hanyšová, P. Kastner, J. Klimeš: Studium stability p-aminofenolu jako dominantního rozkladného produktu paracetamolu^{/10/}.

Metoda 1: /9/

Kolona – Nucleosil 100-5 C₁₈, 5μm, 250 x 4,5 mm

Detekce – UV 254nm

Složení mobilní fáze – voda : methanol (20 : 80)

Vnitřní standard - cetrimid

Dávkovaný objem - 10μl

Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min.

Teplota – laboratorní

Izokratický režim

Metoda 2: /13/

Kolona – Spherisorb 5 ODS1, 250 x 4,6 mm

Detekce – UV 273 nm

Složení mobilní fáze – fosfátový pufr (1,3g (NH₄)₂HPO₄ v 1000ml vody) : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32 (v/v))

Dávkovaný objem – 5 μl

Rychlost průtoku mobilní fáze – 0,5 ml/min.

Teplota – 25°C

Izokratický režim

Metoda 3: CHYBÍ CITACE

Kolona – ODS Hypersil, 250x4,6mm, velikost částic 5µm

Detekce – UV 273 nm

Složení mobilní fáze – voda : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32)

upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5

Dávkovaný objem - 5µl

Rychlost průtoku mobilní fáze – 0,5 ml/min.

Teplota – laboratorní

Izokratický režim

6 Experimentální část

6.1 Materiály a pomůcky

6.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky

Paracetamol, š. 0440713, vz. 78496, Anqiu Pharmaceutical Co Ltd, Čína

Coffeinum anhydricum, š. 200411057, vz. 73854, Jilin Shulan Synt. Pharm. Factory, Čína

Propyphenazonum, š. PPE2391204, vz. 79387, Vani Chemicals, Hyderabad, Indie.

4-aminofenol, Riedel de Haën

Kyselina fosforečná 85% p.a., š.26-36/37/39-45, Merck, Darmstadt, SRN

Methanol 99.9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN

Ultračistá voda, čištěná systémem MILLI Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Ether R ČL 2002, č.š. 200705/564, Penta, divize Praha

Chloroform R, LACH-NER, s.r.o., Neratovice

Ledová kyselina octová 98%, LACH-NER, s.r.o., Neratovice

Acetonitril 99.9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN

Tetrahydrofuran 99.9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN

2-propanol p.a., Penta a.s., Chrudim

Dodecylsulfát sodná sůl 98%, Sigma Aldrich GmbH, SRN

TAPS 99,5%, Sigma Aldrich GmbH, SRN

Dodecylbenzensulfát sodná sůl, Sigma Aldrich GmbH, SRN

Hydroxid amonný, č.š. 061005, Penta a.s., Chrudim

Iodid sodný, Sigma Aldrich GmbH, SRN

6.1.2 Přístroje

Kapalinový chromatograf – 1. sestava:

HPLC Waters s autosamplerem Waters 717 plus, *UV detektor*: Waters 486

Čerpadlo: LCP 4100, ECOM Praha

Kapalinový chromatograf – 2. sestava

HPLC LC-20AD Shimadzu Prominence s DAD detektorem

Kapalinový chromatograf – 3. Sestava

HPLC Waters Breeze s autosamplerem Waters 717 plus

Analytické váhy: Sartorius GENIUS, SRN

6.2 Příprava roztoku standardů

Navážíme přesně 25,00 mg propyfenazonu, paracetamolu, kofeinu a 4-aminofenolu do 50 ml odměrné baňky a doplníme methanolem po rysku.

Musíme připravovat čerstvý roztok 4-aminofenolu každých 24 hodin z důvodu oxidace látky v roztoku.

6.3 Příprava směsného roztoku standardů

Odměříme 250 μ l z každého roztoku standardů do vialky, vzniklý roztok promísíme a přímo dávkujeme.

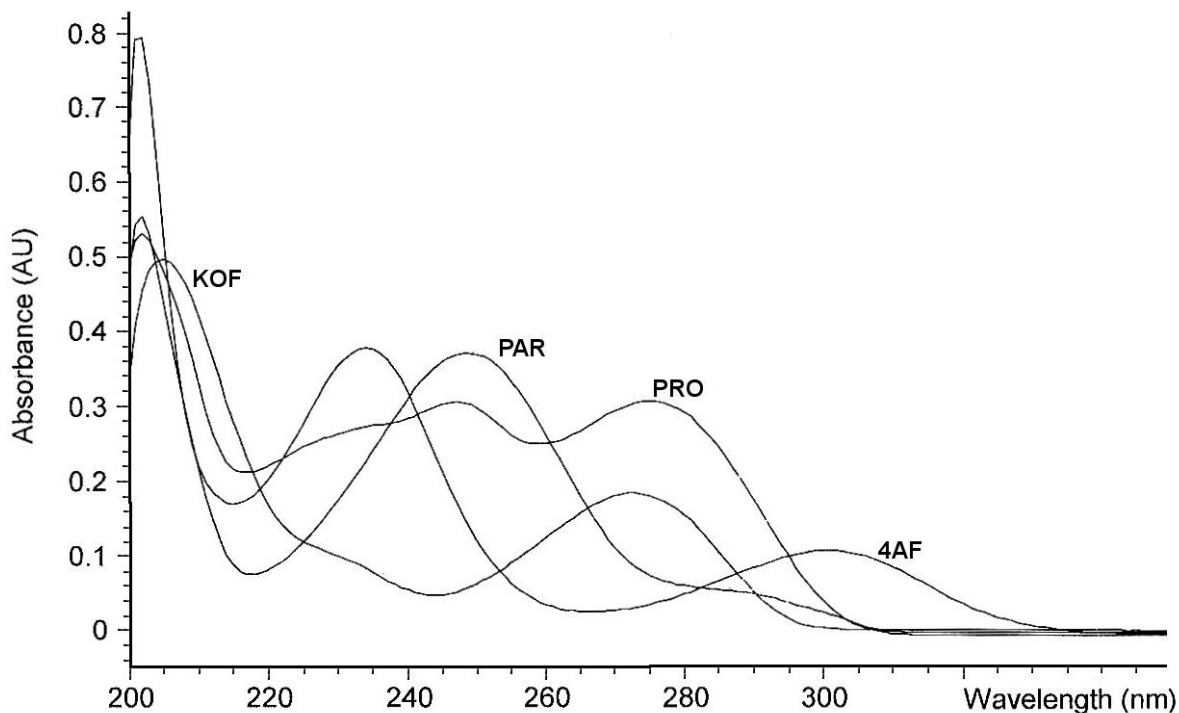
7 Výsledky a diskuze

7.1 Optimalizace chromatografických podmínek

7.1.1 Volba vlnové délky detektoru

Byly proměřeny UV spektra roztoků paracetamolu, propyfenazonu, 4-aminofenolu a kofeinu v methanolu, přičemž koncentrace roztoků nebyla přesně definována, jelikož se jednalo zejména o zjištění absorpčních maxim a minim všech látek.

Jako univerzální pro detekci byla používána vlnová délka 254 nm, ale pro některé speciální případy, např. identifikace jednotlivých látek, byla vlnová délka změněna na vlnovou délku absorpčního maxima dané látky.



Obrázek 2: UV spektrum paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu v MeOH, nedefinovaná koncentrace

7.1.2 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimální chromatografické podmínky je nutné najít vhodné složení mobilní fáze a analytickou kolonu s vhodným sorbentem.

Byly vyzkoušeny různé analytické kolony a u každé kolony bylo také testováno několik mobilních fází. Pro izokratický režim byla zvolena jako optimální průtoková rychlost 1 ml/min. V některých případech, kdy kolona obsahovala menší částice, byl průtok upraven tak, aby vyhovoval podmínkám, které stanovuje výrobce kolony. Dávkované množství vzorku se pohybovalo od 10 do 20 μ l.

Pro přehlednější orientaci jsou testované podmínky uvedeny v tabulkách. Jednotlivé zkratky v tabulkách: t_r – retenční čas látky v minutách, průtok je uváděn v ml/min, λ je vlnová délka detekce v nm, MF je zkratka pro mobilní fázi

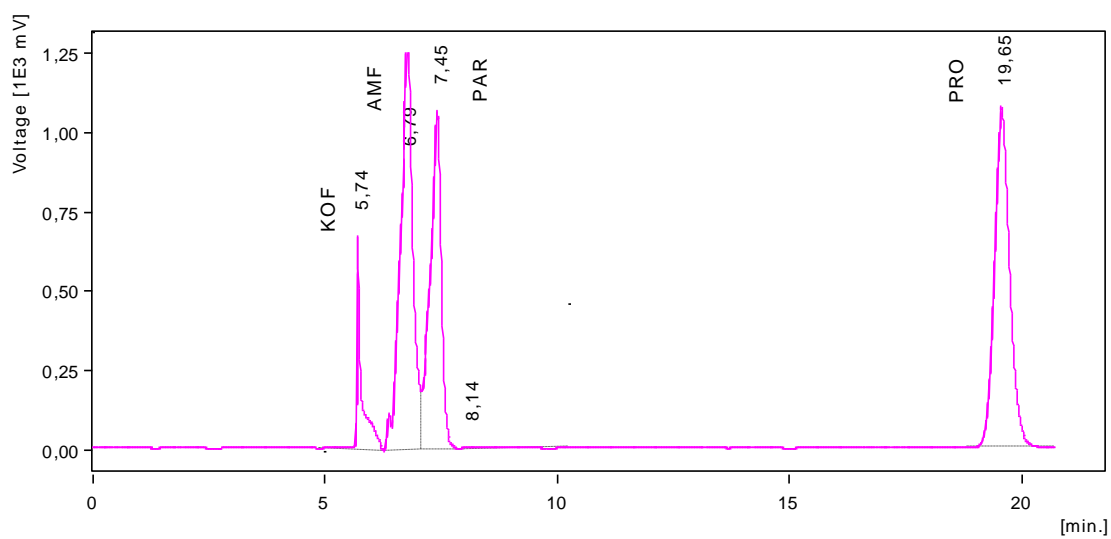
7.1.2.1 ODS Hypersil (250 x 46mm, 5 μ m)

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 2

MF	průtok	λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
<i>THF:voda – 20:80</i>	1,5	205					neseparuje se
<i>THF:ACN:voda - 20:10:70</i>	1	230					AMF s mrtvým obj., neseparuje se
<i>THF:ACN:puf^r – 25:5:70</i>	1	230	3,33	3,51	2,84	7,16	nedokonalá separace
<i>THF:ACN:puf^r – 20:5:70</i>	1	230	3,47	3,83	2,93	10,01	nedokonalá separace
<i>THF:ACN:puf^r – 20:5:70</i>	0,5	210	6,79	7,45	5,74	19,65	viz. obr. 3

Pozn.: puf^r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 3: MF - THF:ACN:puf - 20:5:70
kolona – ODS Hypersil (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. Důvodem je nedokonalá separace KOF, PAR a AMF a příliš silná retence PRO.

7.1.2.2 Zorbax TMS (4,6 x 250mm, 5µm)

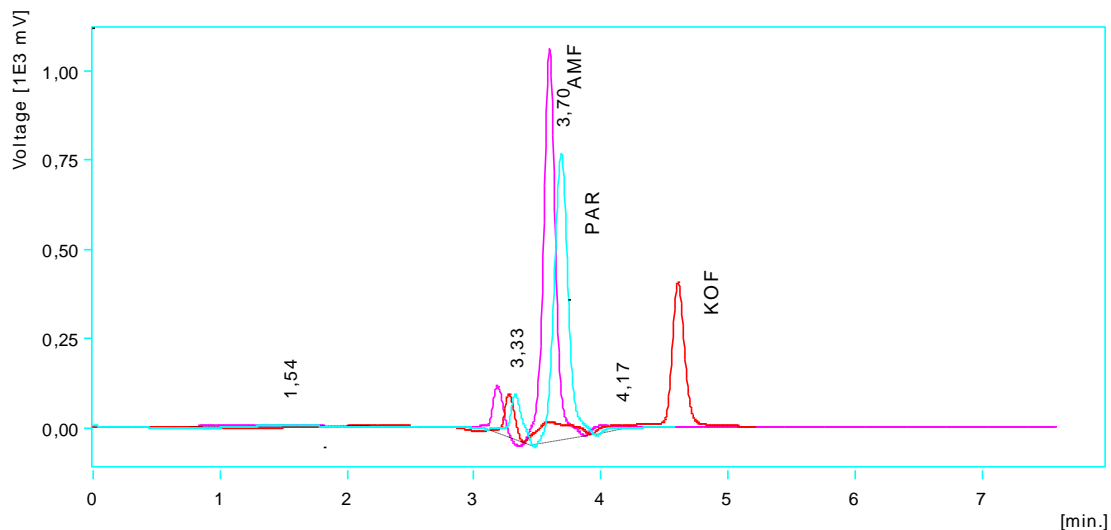
Zorbax TMS je kolona s methylovými skupinami. Jejími vlastnostmi je dobrá reprodukovatelnost, teplotní odolnost do 60°C, doporučené rozmezí pH je 2-6.^{/14/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 3

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
THF:puf _r - 15:85	1,0	230					neseparuje se
isopropanol:puf _r - 15:85	1,0	230					AMF s mrtvým obj., neseparuje se
ACN:puf _r - 15:85	1,0	230	3,61	3,70	4,62	-	viz. obr. 4

Pozn.: puf_r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 4: MF - ACN:puf_r - 15:85
kolona – Zorbax TMS (250 x 4,6mm, 5µm)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. Důvodem je nedokonalá separace KOF, PAR a AMF a příliš dlouhý retenční čas pro PRO.

7.1.2.3 Synergi 4 μ Fusion RP (75 x 3mm, 4 μ m)

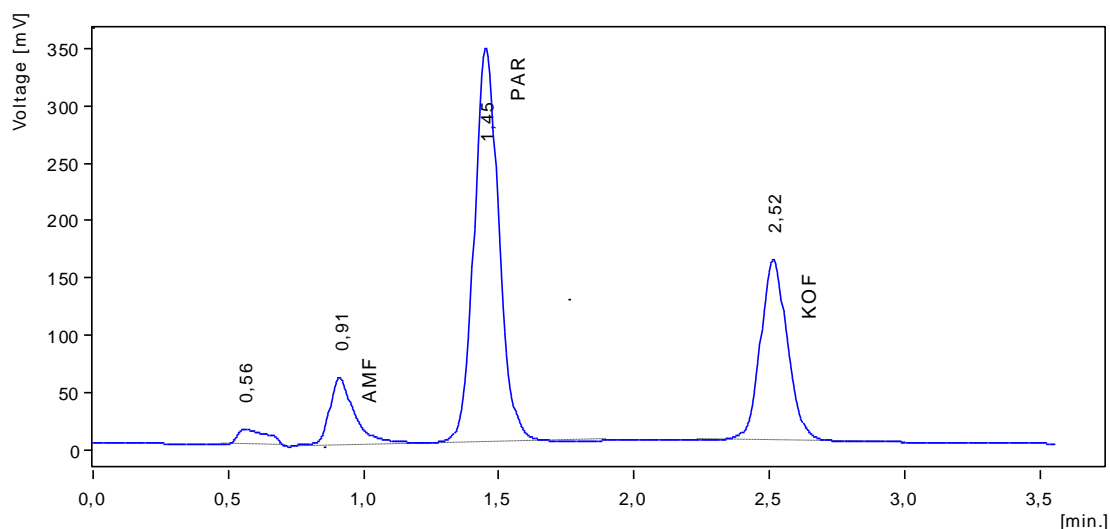
Synergi Fusion-RP je C18 kolona, která využívá polární a hydrofobní ligandy k dosažení lepší selektivity. Zvyšuje retenci polárních látek a snižuje retenci hydrofobních látek. ^{/13/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 4

MF	průtok	λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
ACN:puf ^r - 20:80	1	255	0,91	1,45	2,52	-	PRO žádný pík do 20.min., obr.5
THF:puf ^r - 20:80	1	255					neseparuje se
puf ^r :THF:MeOH - 80:10:10	1	255					neseparuje se
puf ^r :ACN:MeOH - 80:15:5	1	255					neseparuje se
isopropanol:THF:puf ^r - 15:5:80	1	255					neseparuje se

Pozn.: puf^r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 5: MF - ACN:puf^r - 20:80
kolona – Synergi 4 μ m Fusion RP (75 x 3mm, 4 μ m)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. Separace AMF, PAR a KOF byla dostatečná, avšak snížení retence pro PRO na tomto typu kolony nebylo dosaženo.

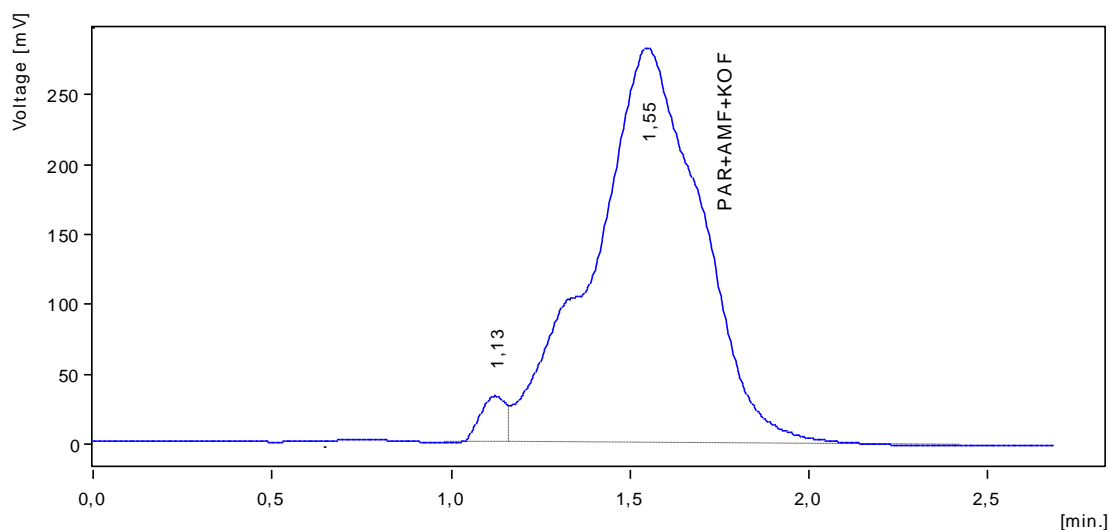
7.1.2.4 Discovery Cyano (100 x 4mm, 5µm)

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 5

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
THF:pufr - 10:90	1	255					Neseparuje se
ACN:pufr - 20:80	1	255					Neseparuje se
MeOH:pufr - 20:80	1	255					Neseparuje se, viz. obr. 6

Pozn.: pufr – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 6: MF – MeOH: pufr
kolona – Discovery Cyano (100 x 4mm, 5µm)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. Tato kolona byla celkově nevhodná pro daný typ separace, jelikož většina analyzovaných látek vykazovala slabou retenci na stacionární fázi.

7.1.2.5 Zorbax SB-CN 150 x 4,6mm, 5 μ m

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 6

MF	průtok	λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
<i>THF:puf</i> r - 10:90	1	255					náznak separace
<i>THF:puf</i> r - 8:92	1	255					Neseparuje se

Pozn.: puf

r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. Kolona vykazovala podobné chování jako kolona Discovery cyano.

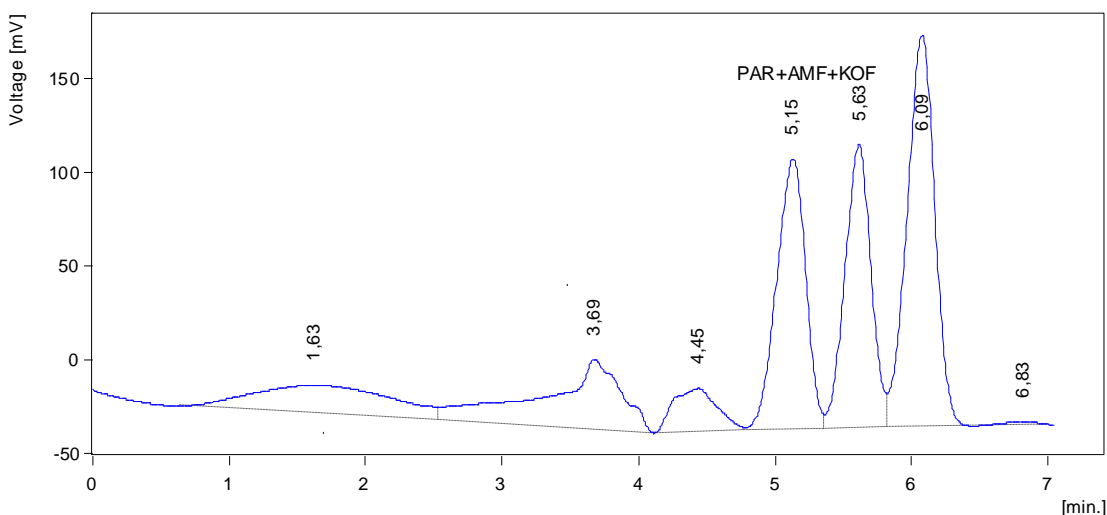
7.1.2.6 Nucleosil 100 – 5 – CN (100 x 4mm, 5µm)

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 7

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	Komentář
THF:pufr - 15:85	1	255					neseparuje se úplně, bez PRO, obr. 7
THF:pufr - 12:88	1	255					neseparuje se úplně, bez PRO

Pozn.: pufr – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 7: MF – THF: pufr – 15:85
kolona – Nucleosil 100-5-CN (100 x 4,6 mm, 5µm)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. V případě že byla dosažena dostatečná separace AMF, KOF a PAR, tak PRO vykazoval silnou retenci na koloně i přes použití THF jako silné eluční složky v MF.

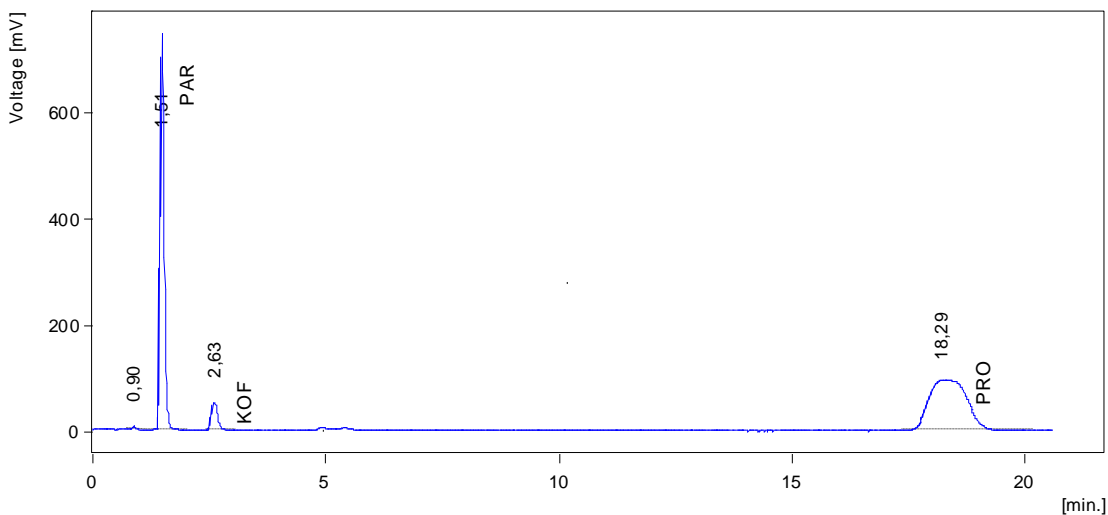
7.1.2.7 Zorbax SB – Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5µm)

Souhrn testovaných mobilních fází:

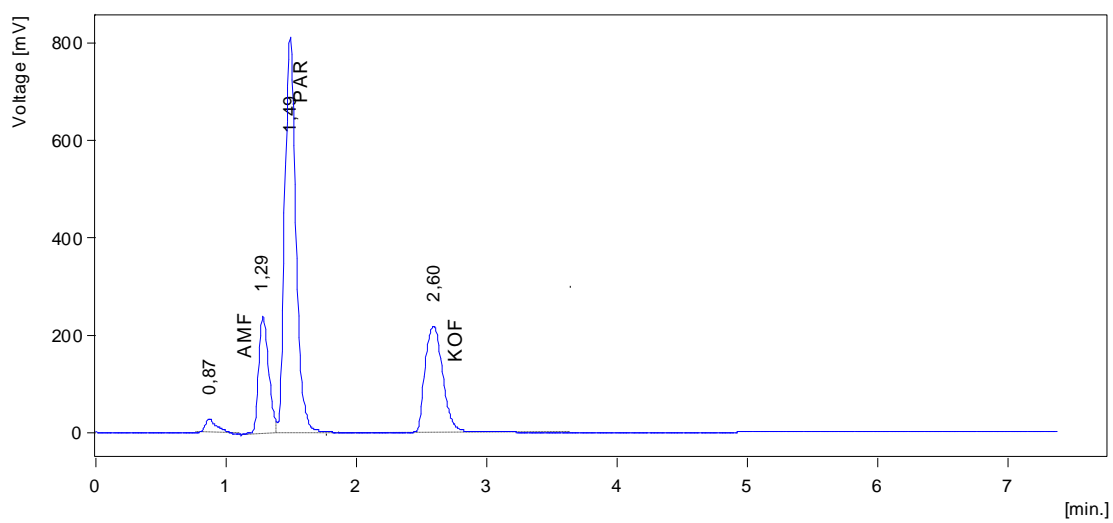
tabulka 8

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:pufr - 20:80	1	254	-	1,51	2,63	18,29	PP+PA+KOF, obr.8
ACN:pufr - 20:80	1	254	1,29	1,49	2,6	-	PA+KOF+AMF, obr.9
THF:pufr - 20:80	1	254					neseparuje se
THF:pufr - 12,5:87,5	1	254					neseparuje se
MeOH:pufr - 25:75	1	254					neúplná separace
3:2 MeOH:ACN/pufr – 22:78	1	254	1,39	1,84	6,04	43,65	viz. obr.10
ACN:pufr A pH 4 - 15:85	1	254					neúplná separace
ACN:pufr A pH 6,5 - 10:90	1	254	1,659	2,541	12,823	-	Bez PRO
ACN:pufr A pH 6,5 - 15:85	1	254	1,419	1,826	4,296	?	PRO Rt nad 30min.
ACN:pufr A pH 6,5 – 20:80	1	254	1,263	1,453	2,443	-	bez PRO, neúplná separace AMF a PAR
3:1 ACN:THF/pufr pH 6,5 – 15:85	1	254	1,39	1,84	6,04	43,65	viz. obr. 11

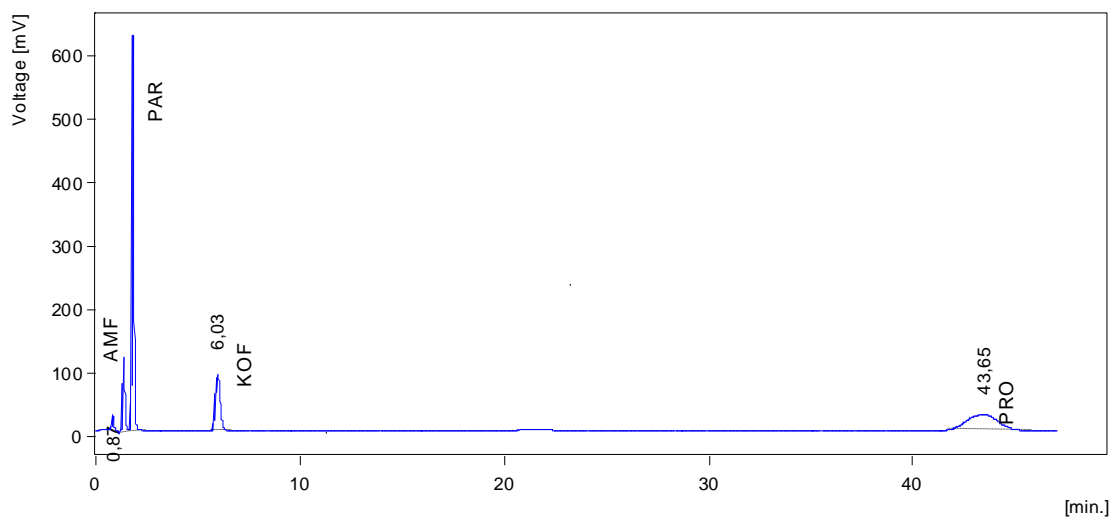
Pozn.: pufr – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné
pufrA – 0,05M octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem



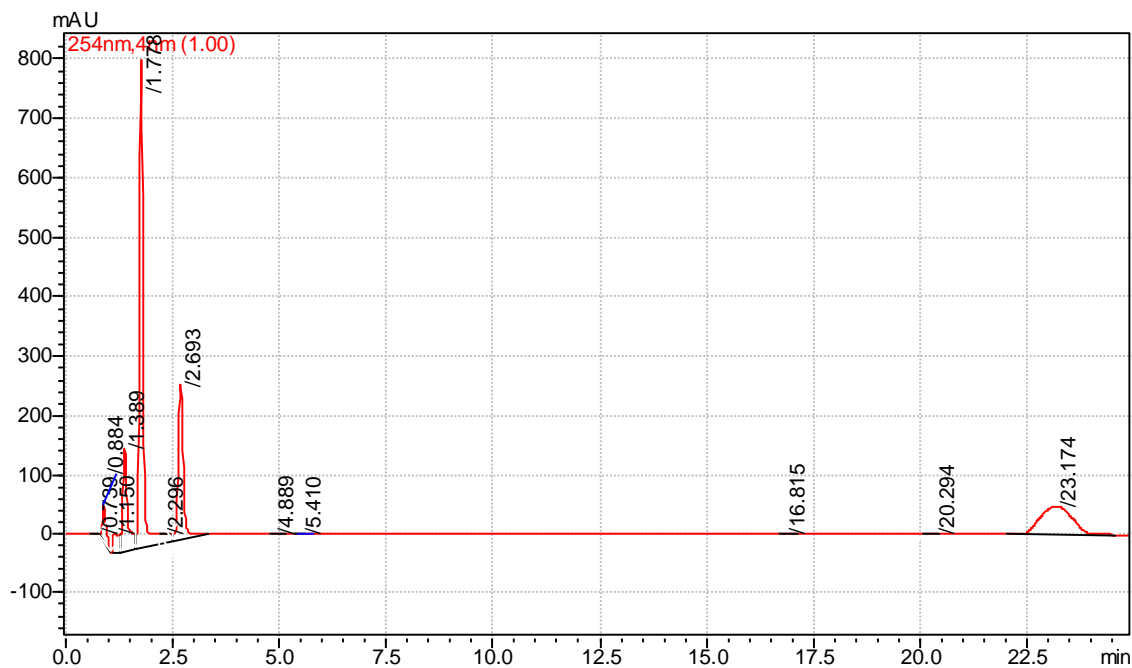
Obrázek 8: MF – ACN:pufr – 20:80
kolona – Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5µm)



Obrázek 9: MF – ACN:puf – 20:80
kolona – Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5µm)



Obrázek 10: MF - 3:2 MeOH:ACN/puf – 22:78
kolona – Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5µm)



Pozn.: t_r 1,389 – AMF; t_r 1,778 – PAR; t_r 2,693 – KOF; t_r 23,174 - PRO

**Obrázek 11: MF – 3:1 ACN:THF/pufr pH 6,5 – 15:85
kolona – Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6mm, 3,5 μ m)**

Z vyzkoušených podmínek by bylo možné použít jako podklad pro gradientovou eluci:

- a) 3:2 MeOH : ACN/pufr 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné - 22% org.fáze v MF; detekce UV 254 nm
- b) 3:1 ACN:THF/pufr pH 6,5 (octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem) - 15% org.fáze v MF; detekce UV 254nm

Obě při průtoku 1 ml/min. Na druhou stranu vzhledem k silné retenci PRO na koloně by bylo nutné použít poměrně strmý gradient mobilní fáze.

7.1.2.8 Synergi 4 μ m POLAR – RP (75 x 3mm, 4 μ m)

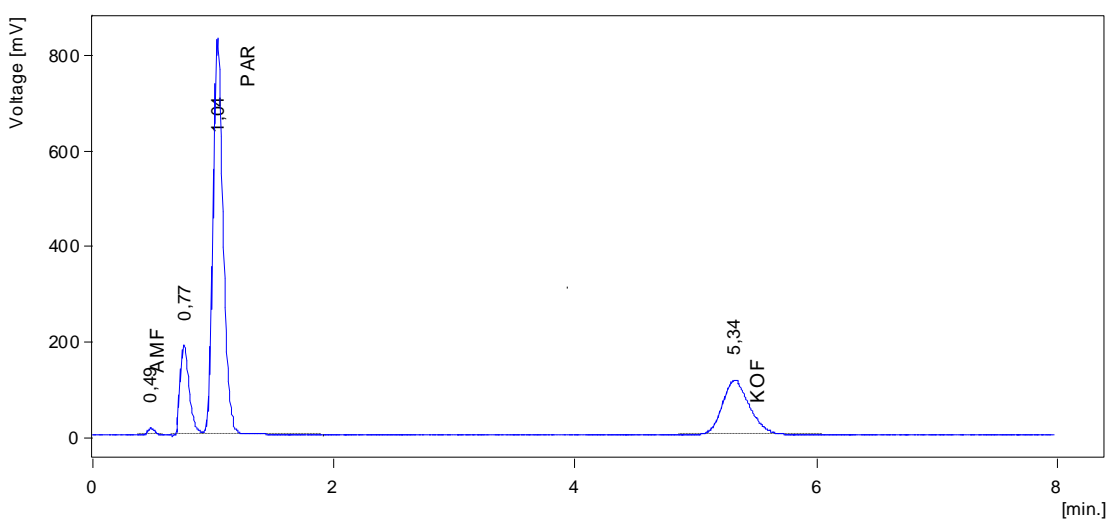
Stacionární fáze kolony využívá fenylových zakončení připojených přes etherovou vazbu v kombinaci s hydrofilními skupinami, což dává koloně schopnost lepší selektivity a delšího retenčního času pro aromatické a polární látky. Mezi hlavní výhody patří symetričtější tvar píků i pro kyselé a zásadité anolyty a lepší selektivita pro aromatické látky s použitím mobilní fáze obsahující methanol. Rozsah použitelného pH je od 1,5 – 7,0. ^{/16/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 9

MF	průtok	λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
ACN:puf r - 20:80	1	254					Neseparuje se
THF:puf r - 20:80	1	254					Neseparuje se
MeOH:puf r - 25:75	1	254	0,77	1,04	5,34	-	bez PP, viz. obr.12
THF:puf r - 12,5:87,5	1	254					Neseparuje se

Pozn.: puf r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 12: MF – MeOH:puf r – 25:75
kolona – Synergi 4 μ m Polar – RP (75 x 3mm, 4 μ m)

Pozn.: propyfenazon – dlouhý retenční čas

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu z důvodů zejména příliš silné retence propyfenazonu

7.1.2.9 Gemini 3 μ m C18 110A (50 x 3mm, 3 μ m)

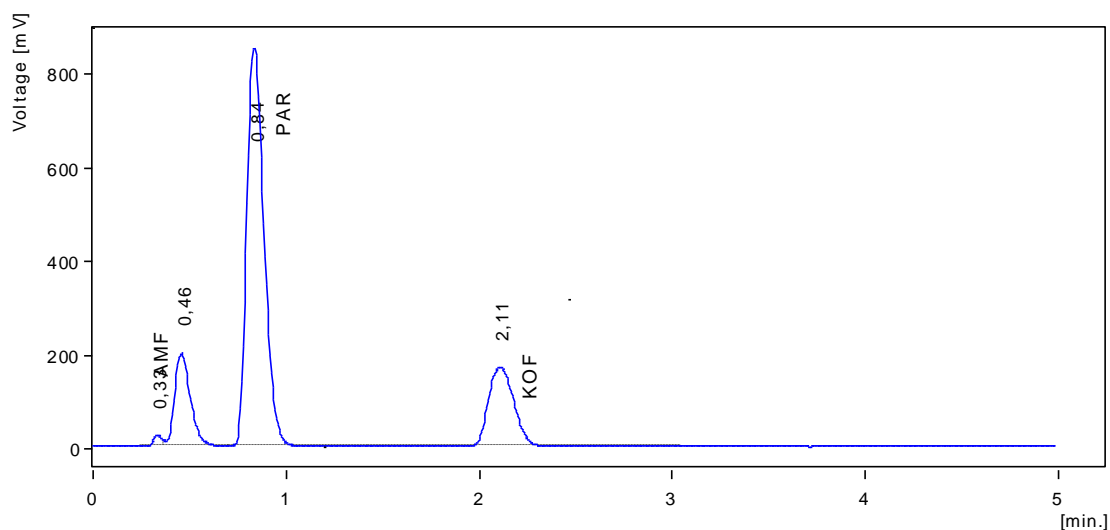
Kolona využívá jako stacionární fáze silikagel povrchově upravený organickou vrstvou, která je navíc zdrsňena pro dosažení většího povrchu. Mezi hlavní výhody patří široký rozsah použitelného pH (1,0 – 12,0), vysoká efektivita a mechanická i chemická odolnost.^{117/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 10

MF	průtok	λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
MeOH:puf _r - 25:75	1	254	0,46	0,84	2,11	-	PRO dlouhý ret.čas, obr. 13
ACN:puf _r - 20:80	1	254					Neseparuje se

Pozn.: puf_r – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 13: MF – MeOH:puf_r – 25:75
kolona – Gemini 3 μ m C 18 110A (50 x 3mm, 3 μ m)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu z důvodů zejména příliš silné retence propyfenazonu.

7.1.2.10 Phenomenex Luna NH₂ (250 x 3mm, 10µm)

Kolona je vhodná pro separaci látek tvořících vodíkové můstky (sloučeniny obsahující skupiny: -COOH, -CO-, -NH₂, -NHR, -NR₂). Může být použita ve třech režimech – normální, s reverzní fází a iontově výměnný.

Stacionární fáze obsahuje aminoskupinové zakončení schopné tvorby vodíkových můstků. Dále je mechanicky odolná a poskytuje zlepšenou reprodukovatelnost výsledků a delší životnost kolony.^{/18/}

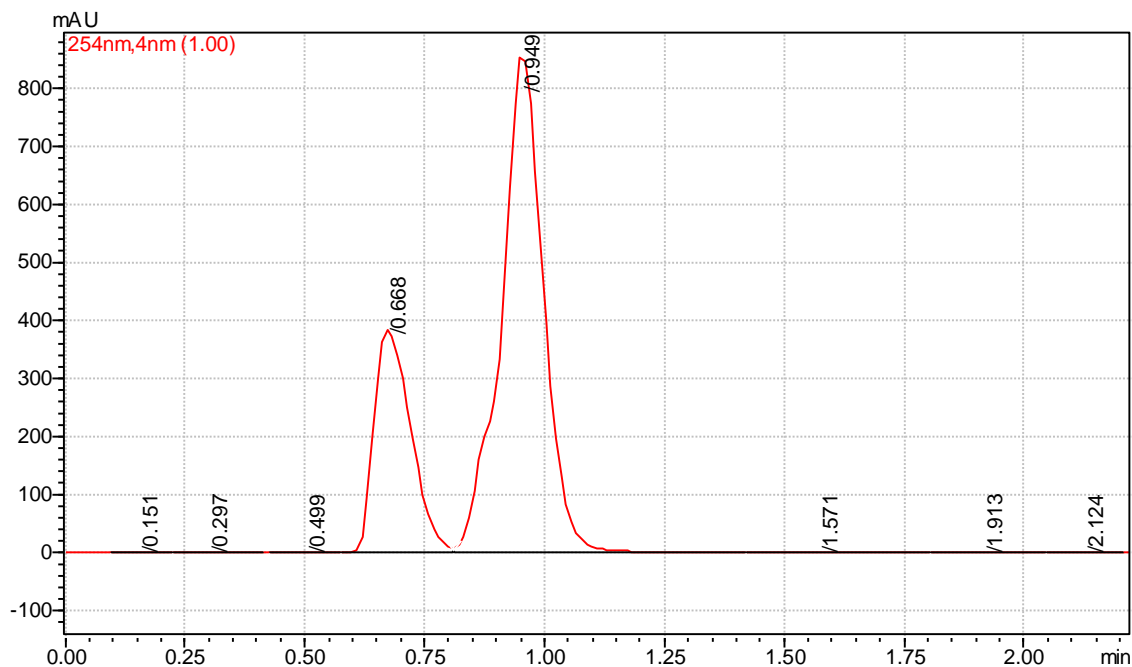
Rozsah použitelného pH je od 1,5 do 11,0.

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 11

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:pufr - 15:85	1	254					neseparuje se
ACN:pufr - 5:95	1	254					neseparuje se, bez PRO, obr.14
MeOH:pufr - 5:95	1	254					neseparuje se
MeOH:rozt.NH ₃ , pH 11 - 5:95	1	254					neseparuje se

Pozn.: pufr – 0,1% vodný roztok diethylaminu pH upraveno na 7,5 pomocí kys. fosforečné



Obrázek 14: MF – ACN:pufr – 5:95

kolona - Phenomenex Luna NH₂ (250 x 3mm, 10µm)

Pozn.: nebyla prováděna identifikace jednotlivých látek z důvodu dlouhého retenčního času PRO.

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu.

7.1.2.11 ZIC – HILIC (50 x 4,6mm, 5µm)

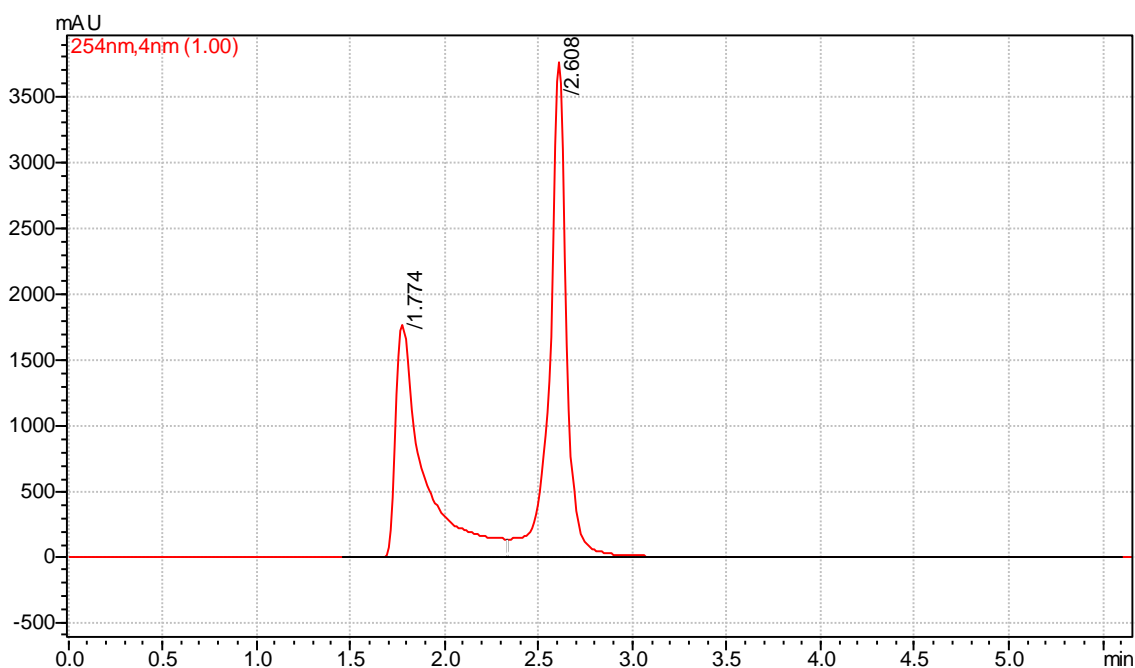
Kolona je určena pro separaci polárních a hydrofilních látek. Stacionární fáze je tvořena porézním silikagelem, na který jsou navázány amfionické výběžky, tvořené kladně nabitým kvartérním dusíkem a záporně nabitou sulfonylovou skupinou.

Separace je založena na slabých elektrostatických interakcích. Typické je použití mobilní fáze obsahující vysoký podíl organické složky.^{/19/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 12

MF	průtok	Λ	t_r AMF	t_r PAR	t_r KOF	t_r PRO	komentář
octan amonný pH 6,6:ACN - 15:85	0,3	254					neseparuje se
octan amonný pH 6,6:ACN - 5:95	0,3	254					neseparuje se, obr.15
0,1M kys.oct. pH 2,8:ACN - 5:95	0,3	254					neseparuje se
octan amonný pH 3,5:ACN - 5:95	0,3	254					neseparuje se



Obrázek 15: MF – octan amonný pH 6,6 : ACN – 5:95
kolona – ZIC-HILIC (50 x 4,6mm, 5µm)

Pozn.: t_r -1,774 PRO+KOF; t_r – 2,608 PAR+AMF

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu. I přes různé změny pH a obsahu organické složky v MF píky látek vykazovaly stále značné chvostování a nedostatečnou separaci.

7.1.2.12 Chromolith TM Flash RP – 18C (250 x 4,6mm, 5µm)

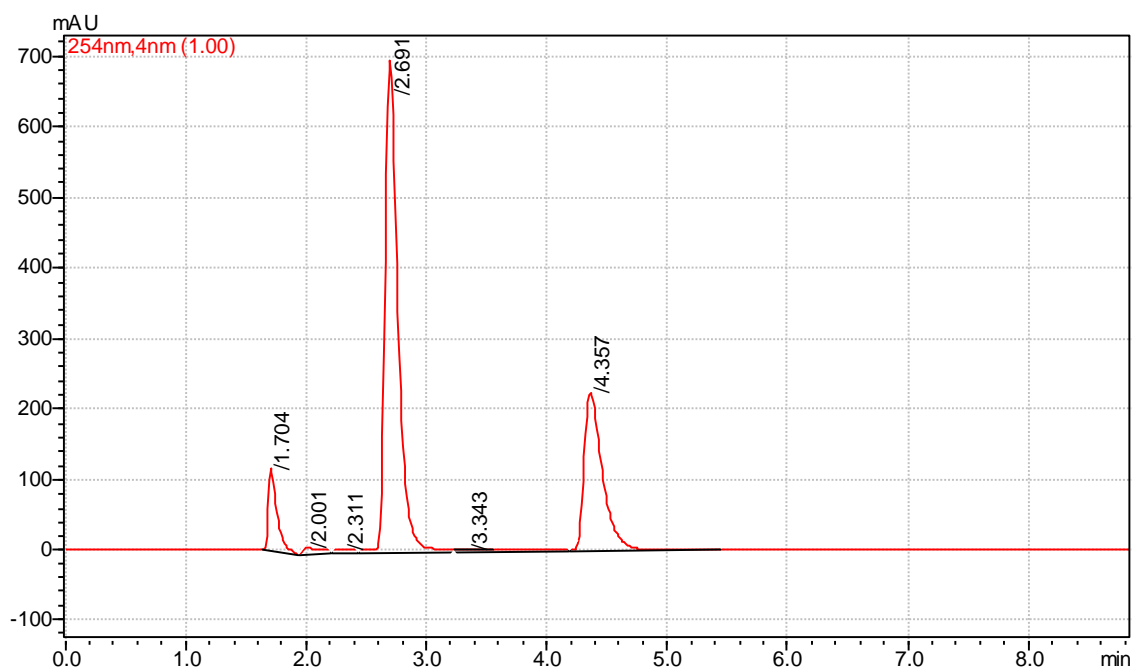
Stacionární fáze je tvořena velmi čistým porézním silikagelem, který obsahuje 18% uhlíku. Povrch obsahuje dva druhy pórů, jeden v řádech nm a druhý v řádech jednotek µm. Rozsah použitelného pH je 2 – 7,5. K hlavním výhodám patří zachování tvaru a rozlišení píků i při vyšších průtocích. ^{/20/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 13

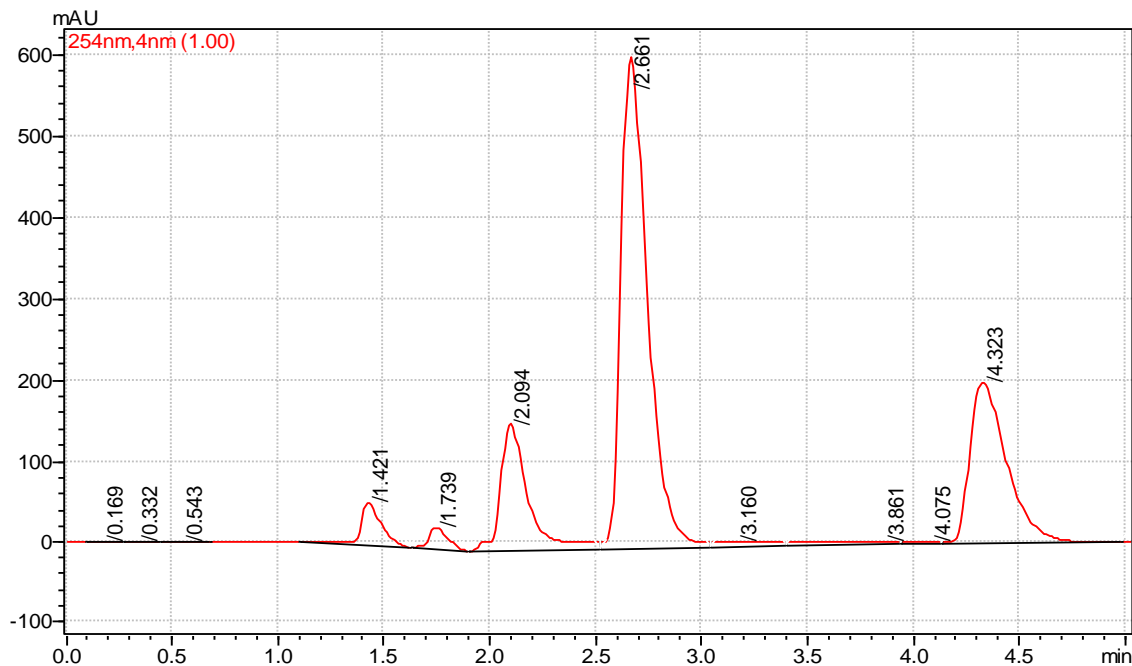
MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
pufr pH 4:ACN -90:10	1	254					PRO dlouhý Rt, viz.obr.16,
pufr pH 5:ACN - 90:10	1	254					PRO dlouhý Rt
pufr pH 6,5:ACN - 90:10	1	254					viz.obr.17; PRO dlouhý Rt
pufr pH 6,5:THF - 90:10	1	254					neseparuje se, viz.obr.18
pufr pH 6,5:THF - 95:5	1	254					neseparuje se
pufr pH 6,5:isopropanol - 90:10	1	254					neseparuje se
pufr pH 6,5:isopropanol - 95:5	1	254					neseparuje se
octan amonný pH 3,5:ACN - 5:95	1	254					neseparuje se

Pozn.: pufr – octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem; nebyla prováděna identifikace jednotlivých látek z důvodu dlouhého retenčního času PRO

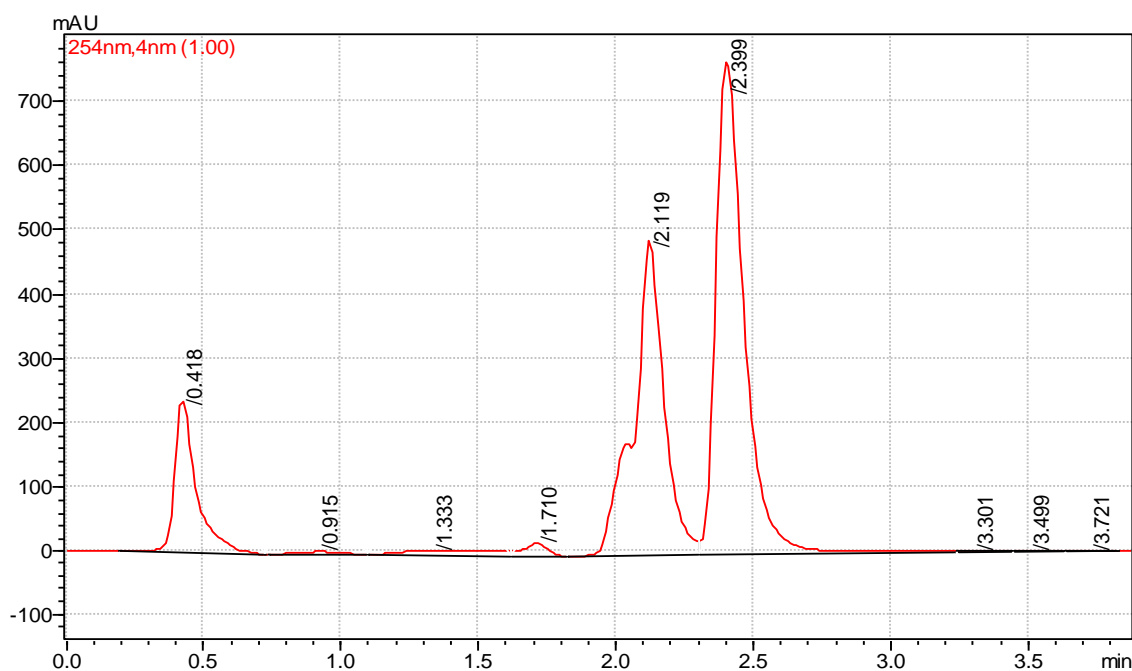


Obrázek 16: MF – pufr pH 4 : ACN – 90:10 (pufr – octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem)

kolona – Chromolith TM Flash RP-18C (250 x 4,6mm, 5µm)



Obrázek 17: MF – pufr pH 6,5:ACN – 90:10 (pufr – octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem)
kolona – Chromolith TM Flash RP – 18C (250 x 4,6mm, 5µm)



Obrázek 18: MF – pufr pH 6,5 : THF – 90:10 (pufr – octan amonný pH upravováno kys. octovou a/nebo dimethylaminem)
kolona – Chromolith Tm Flash RP-18C (250 x 4,6mm, 5µm)

Žádná z vyzkoušených podmínek nebyla vhodná pro separaci 4-aminofenolu, kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu.

7.1.2.13 Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5µm)

Stacionární fáze je tvořena ZrO₂, který je oproti běžnému silikagelu odolný při pH 1 – 14 a při teplotách až do 200°C. Atom Zr v Zr-O-Zr vazbě má volné d-orbitály, čímž vystupuje jako Lewisovská kyselina a acidobazickou reakcí se v koloně zadržují Lewisovské báze (fosforečnany, fluoridy, acetáty, citráty, karboxyláty, hydroxidy...).^{/21/}

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 14

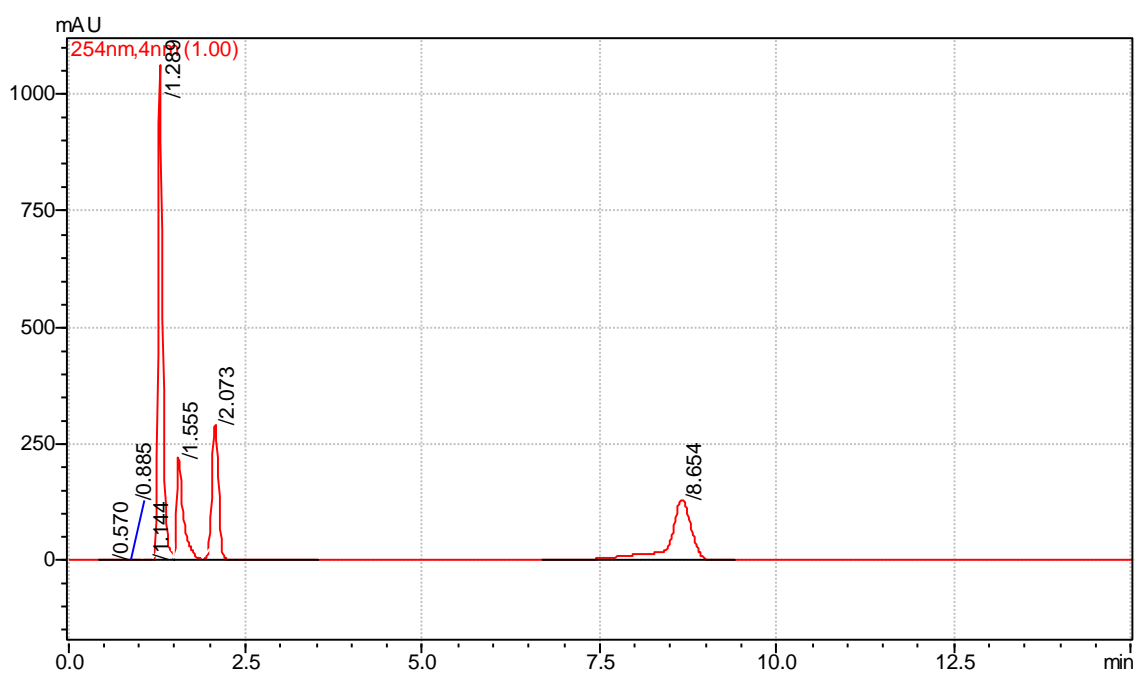
MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:rozt.NH ₃ pH 11 - 15:85	1	254	2,07	1,29	1,56	8,65	PRO fronting, viz.obr.19
ACN:pufra pH 7,5 - 7:93	1	254					Neúplná separace
MeOH:rozt.NH ₃ pH 11 - 15:85	1	254	2,32	1,41	1,65	8,50	PRO fronting, viz.obr.20
THF:rozt.NH ₃ pH 11 - 10:90	1	254	2,35	1,34	1,59	6,68	PRO fronting, viz.obr.21
ACN:pufraB pH 4 - 15:85	1	254	3,91	1,67	1,80	4,83	PRO fronting, viz.obr.22
ACN:rozt.H ₃ PO ₄ pH 2 - 10:90	1	254	3,46	1,89	2,09	7,04	PRO fronting, viz.obr.23
ACN:pufraB pH 6,5 - 15:85	1	254	8,25	1,78		4,42	prohození PRO a AMF, obr.24
ACN:pufraC pH 8,5 - 15:85	1	254					neúplná separace KOF a PAR, obr.25
ACN:pufraC pH 5 - 15:85	1	254	2,69	1,72		4,47	viz.obr.26
ACN:0,02M NaF pH 4,2 (upraveno HF) - 15:85	1	254					Neúplná separace
ACN:0,02M NaF pH 4,2 (upraveno HF) - 7:93	1	254	3,13	1,90	2,21	9,99	viz.obr.27
ACN:0:0,02M kys.citronová pH 2,5 - 15:85	1	254					Neúplná separace KOF a PAR
ACN:0,02M kys.citronová pH 3,6 (upraveno NH ₄ OH) - 15:85	1	254	5,13	1,87	2,07	7,21	Nestabilní nulová linie
ACN:0,05M chelaton 3 pH 4,7 - 15:85	1	254	3,27	1,93	2,25	10,01	PRO fronting, AMF chvostuje, téměř úplná separace KOF a PAR
ACN:0,05M chelaton 3 pH 3,6 (upr.konc.kys.oct.) - 15:85	1	254					Neúplná separace KOF a PAR
ACN:0,02M HCOOH pH 3 - 15:85	1	254					Neúplná separace KOF a PAR
ACN:0,02M HCOOH pH 4 (upraveno NH ₄ OH) - 15:85	1	254					neúplná separace KOF a PAR, PRO fronting, AMF chvostuje
ACN:0,02M HCOOH pH 4 (upraveno NH ₄ OH) - 8:92	1	254	3,50	1,95	2,27	10,37	separuje se, ale špatný tvar píků, obr.28
ACN:0,02M HCOOH pH 4 (upraveno NH ₄ OH) - 5:95	1	254	3,45	2,02	2,52	12,99	separuje se, ale špatný tvar píků, obr.29
THF:pufraC pH 5 - 5:95	1	254					lepší tvar píků, ale horší separace KOF a PAR
MeOH:pufra C pH 5 - 15:85	1	254	3,01	1,77	1,95	5,34	neúplná separace KOF a PAR, PRO fronting, obr.30
ACN:voda(bez úpravy) - 15:85	1	254					KOF a PAR se neseperují

ACN:0,02M KH_2PO_4 pH 4,6 - 15:85	1	254	5,87	1,77	1,90	6,21	špatný tvar píků, neúplná separace KOF a PAR, obr. 31
ACN:0,02M NaF pH 5,8 - 15:85	1	254					neseparuje se
ACN:0,02M NaF pH 5,8 - 5:96	1	254					neseparuje se
ACN:0,02M citrát.pufř pH 2,5 - 15:85	1	254					Neúplná separace
ACN:rozt.kys.citronová pH 2,01 - 10:90	1	254	3,173	1,920	2,205	6,441	PRO fronting, viz.obr.32

Pozn.: pufř A – rozt. kys. octové a NH_3

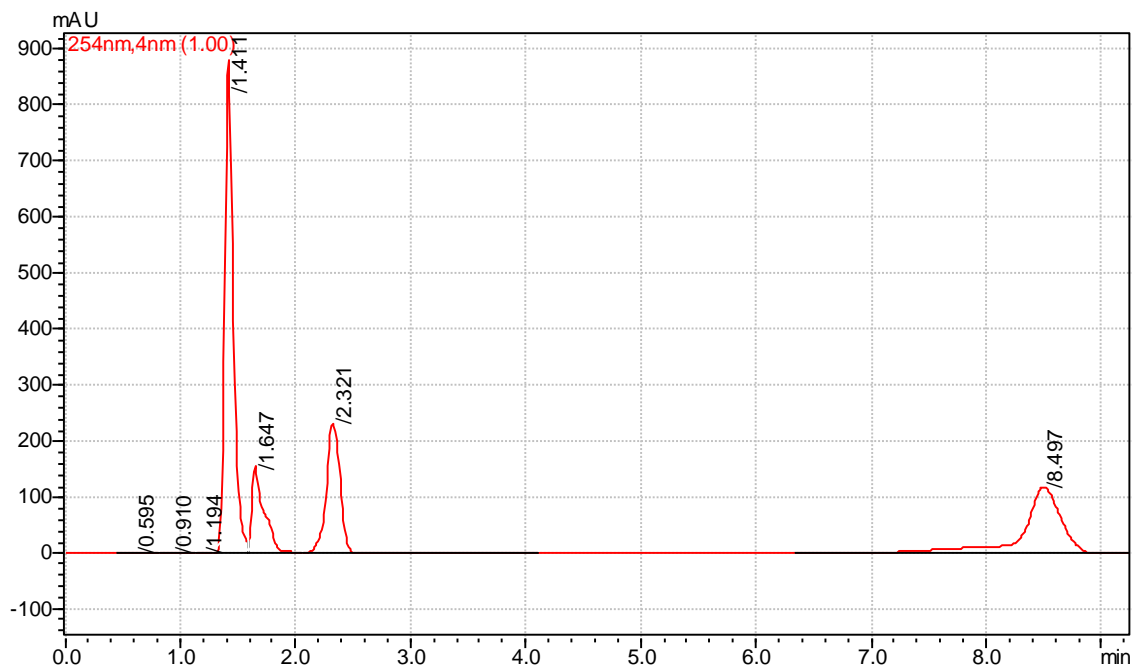
Pufř B – roztok NH_4OH a H_3PO_4

Pufř C – 1,25% NH_4OH , pH upravováno H_3PO_4

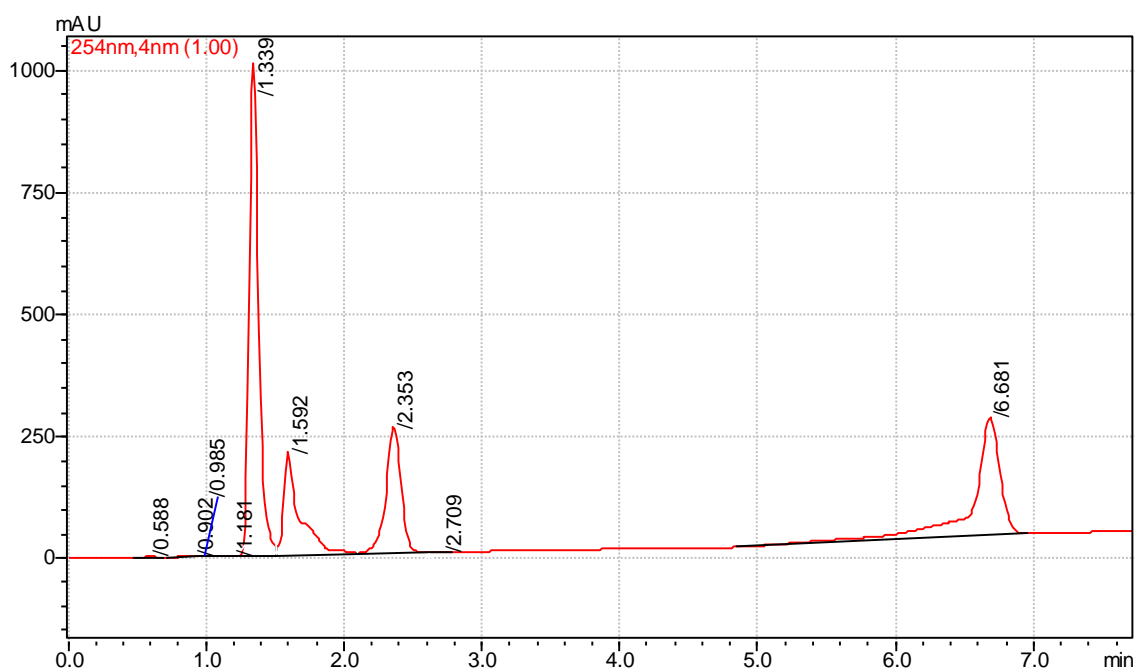


Obrázek 19: MF – ACN:rozt. NH_3 pH 11 – 15:85

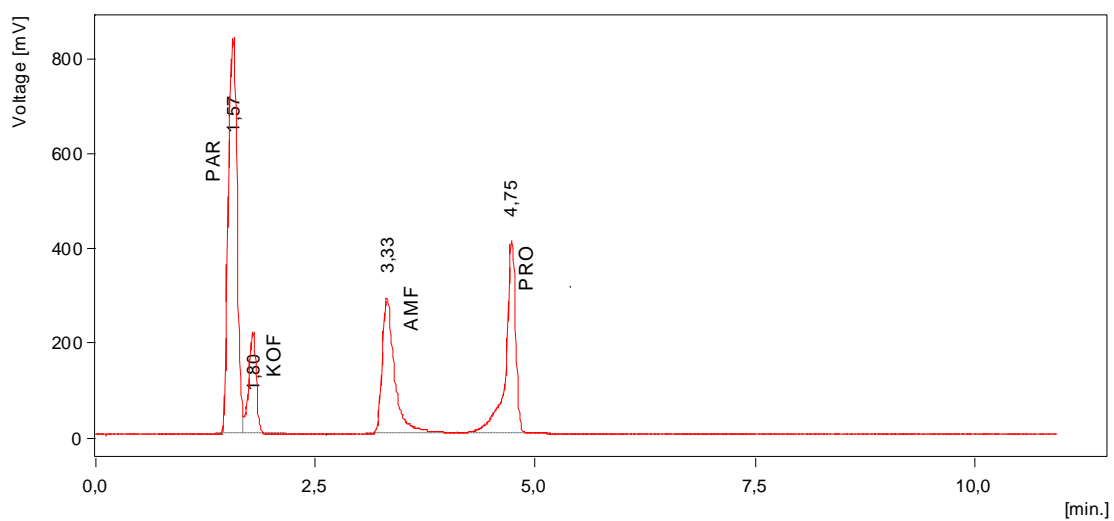
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5 μ m)



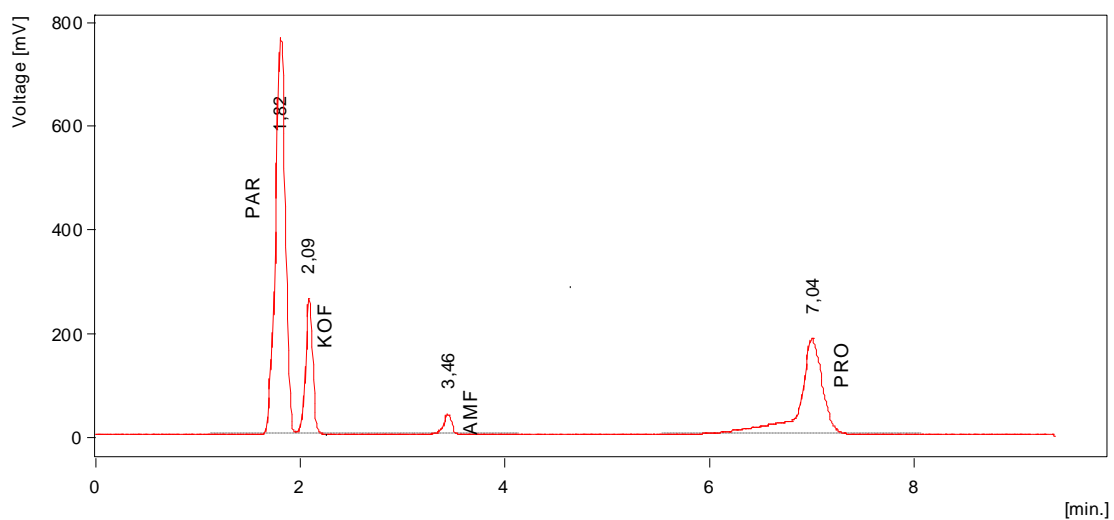
Obrázek 20: MF - MeOH : rozt. NH₃ pH 11 – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)



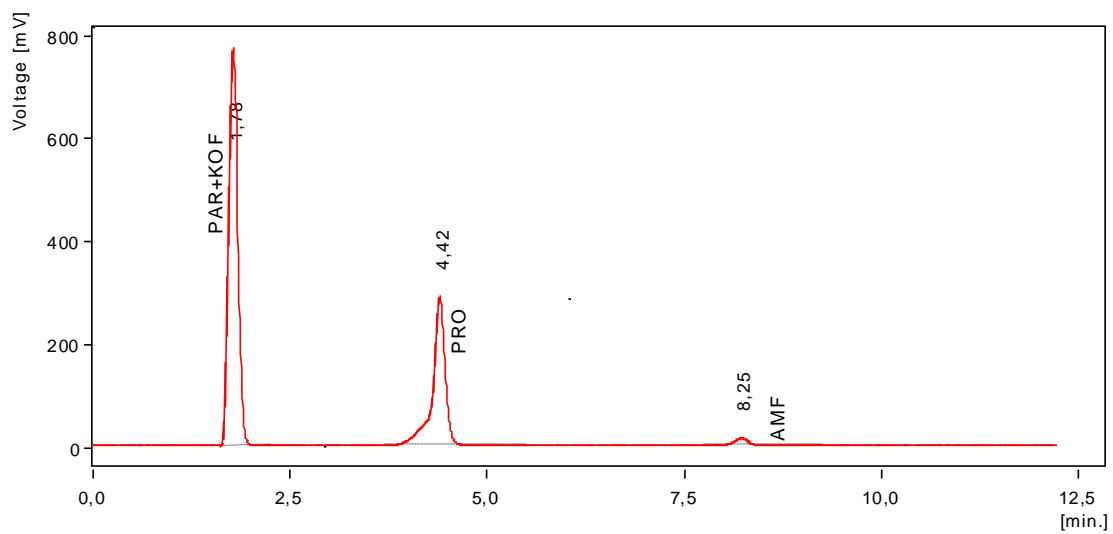
Obrázek 21: MF - THF:rozt. NH₃ pH 11 – 10:90
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)



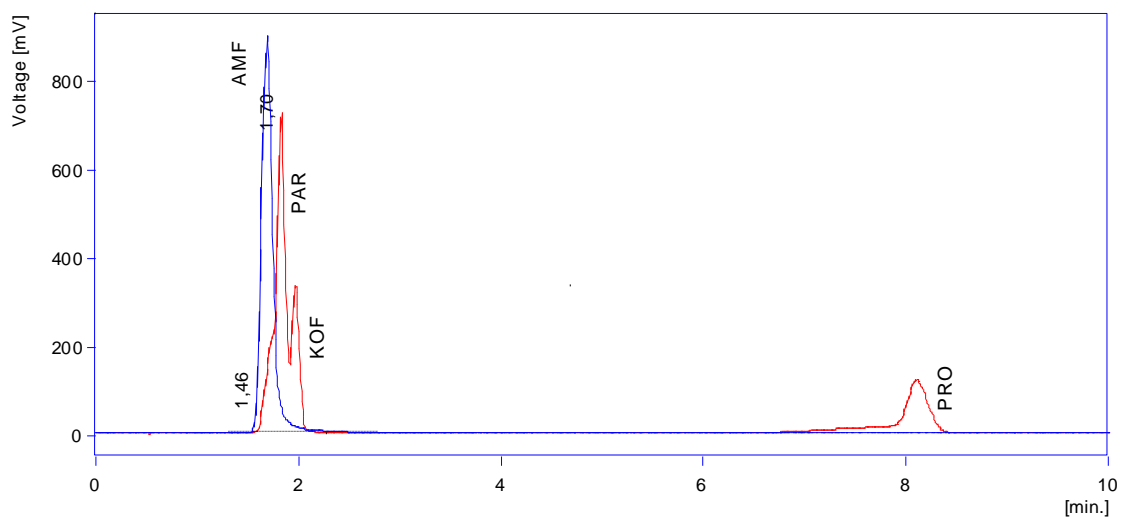
Obrázek 22: MF – ACN:rozt. NH₃ a H₃PO₄ pH 4 – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)



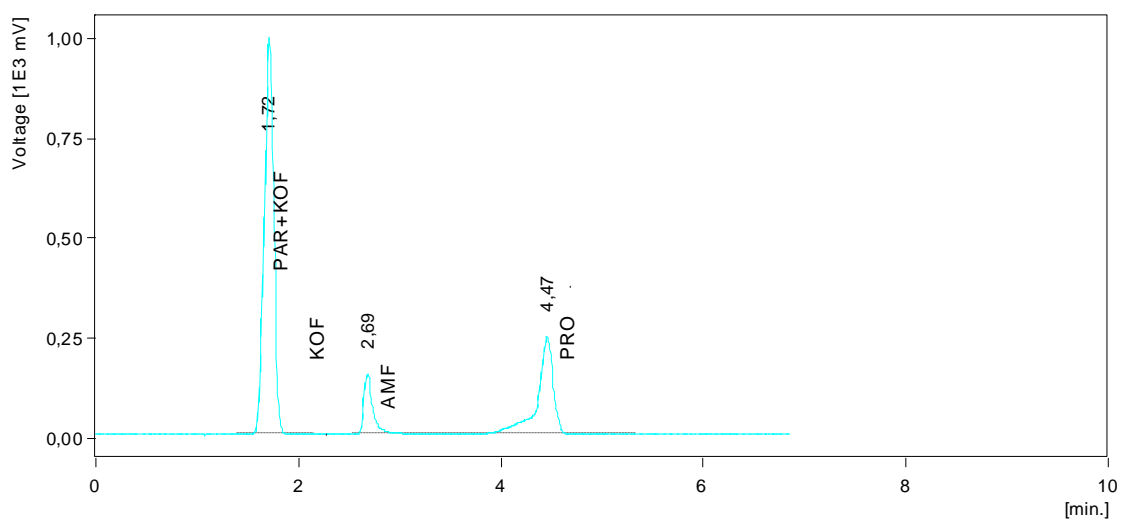
Obrázek 23: MF – ACN:rozt. H₃PO₄ pH 2 – 10:90
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)



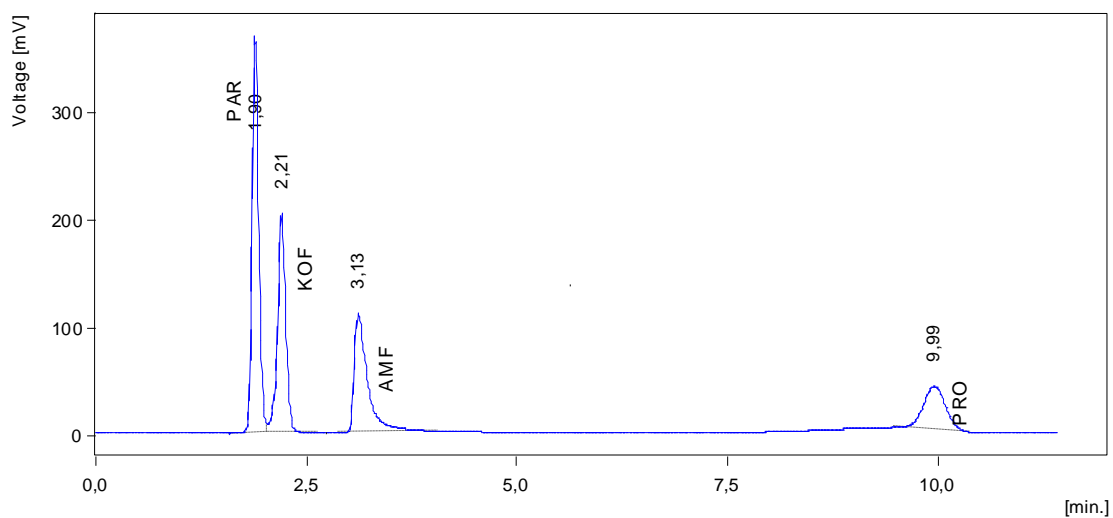
**Obrázek 24: MF – ACN:rozt. NH_3 a H_3PO_4 pH 6,5 – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5 μm)**



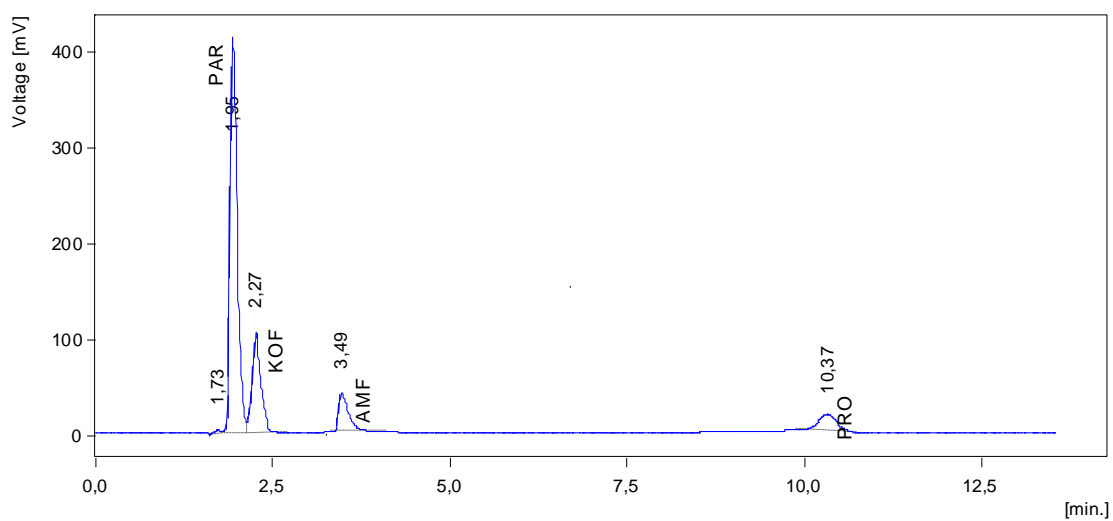
**Obrázek 25: MF - ACN:1,25% rozt. NH_4OH pH 8,5 (pH upraveno H_3PO_4) – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5 μm)**



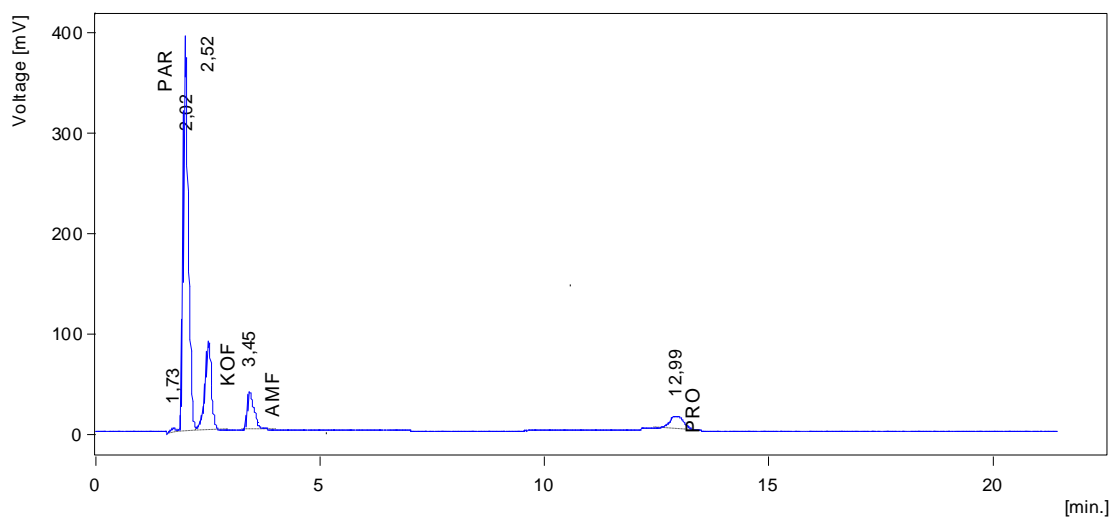
**Obrázek 26: MF - ACN:1,25% rozt. NH₄OH pH 5 (pH upraveno H₃PO₄) – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



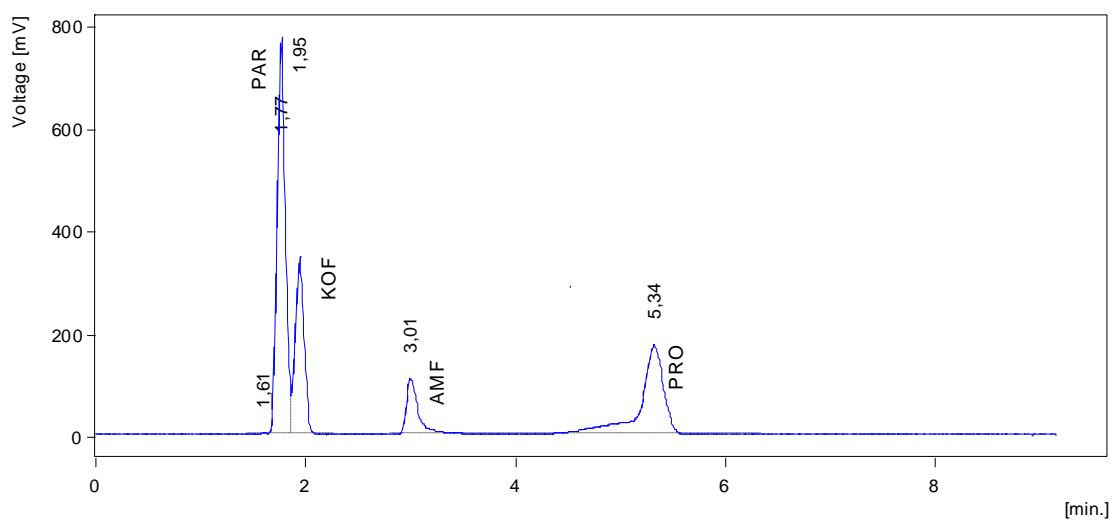
**Obrázek 27: MF – ACN: 0,02M NaF pH 4,2 (upr. HF) – 7:93
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



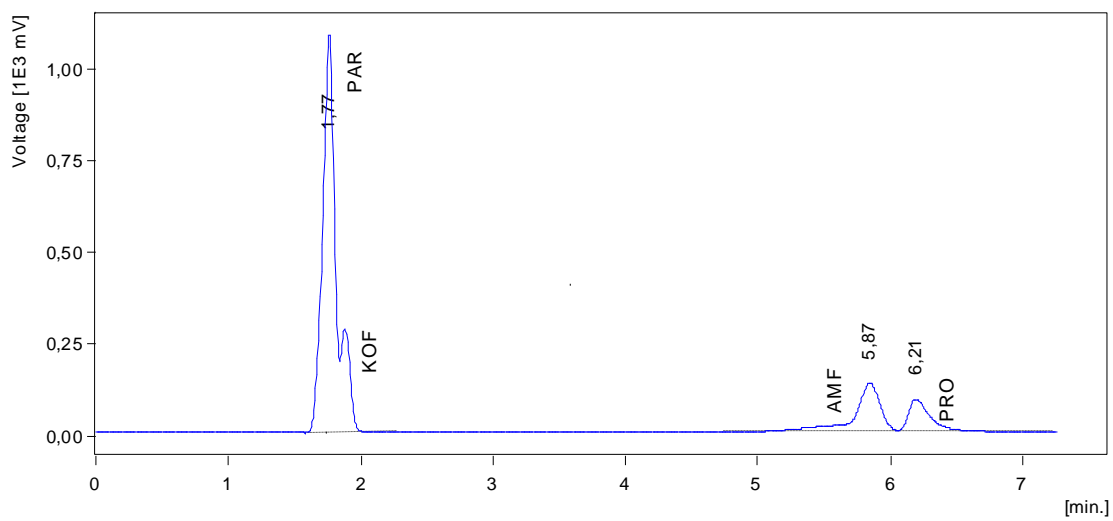
**Obrázek 28: MF – ACN: 0,02M HCOOH pH 4 (pH upraveno NH₄OH) – 8:92
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



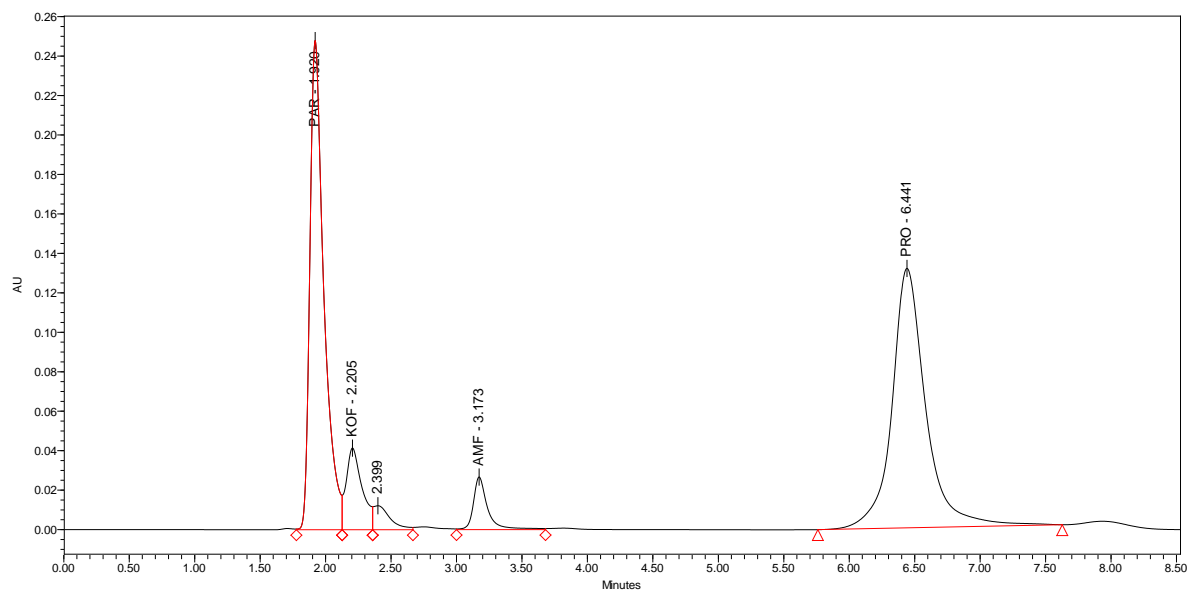
**Obrázek 29: ACN: 0,02M HCOOH pH 4 (pH upraveno NH₄OH) – 5:95
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



**Obrázek 30: MF – MeOH: 1,25% NH₄OH pH 5 (pH upraveno H₃PO₄) – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



**Obrázek 31: MF – ACN: 0,02M KH₂PO₄ pH 4,6 – 15:85
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5μm)**



**Obrázek 32: MF – ACN: rozt. kys. citronová pH 2,01 – 10:90
kolona - Discovery ZR-PBD (150 x 4,6mm, 5 μ m)**

Z vyzkoušených podmínek by bylo možné použít tyto mobilní fáze jako podklad pro gradientovou eluci za předpokladu zlepšení tvaru píku propyfenazonu a případně také 4-aminofenolu:

- a) MeOH : NH₃ pH 11 – 10:90
- b) THF : NH₃ pH 11 – 10:90
- c) ACN : roztok NH₄OH a H₃PO₄ pH 4 – 15:85
- d) ACN : H₃PO₄ pH 2 – 10:90
- e) ACN : 0,02M HCOOH pH 4 (upraveno NH₄OH)

Vše při průtoku 1 ml/min., detekce UV 254nm.

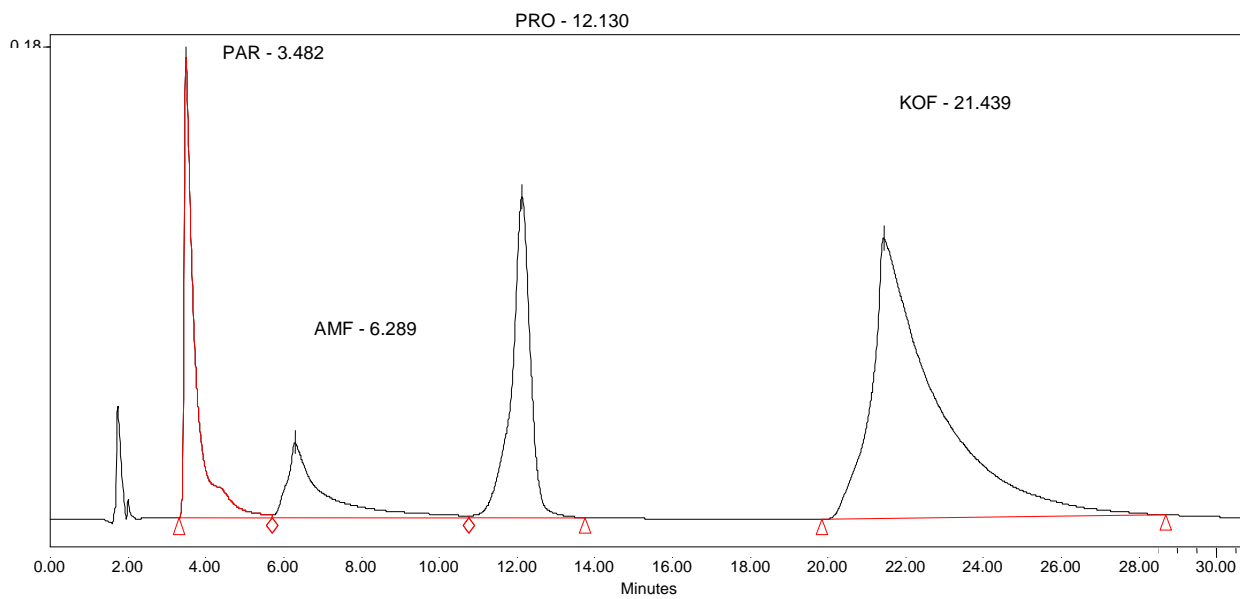
7.1.2.14 ZIR – CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5µm)

Stacionární fáze této kolony je tvořena částicemi ZrO₂ pokrytými tenkou vrstvou elementárního uhlíku, díky čemuž má kolona velmi odlišnou selektivitu oproti kolonám s reverzní fází a kolonám se silikagelovým základem. Minimální teplota pro analýzu je 50°C, pro lepší tvar píků se doporučují teploty od 100 do 200°C. ^{/21/}

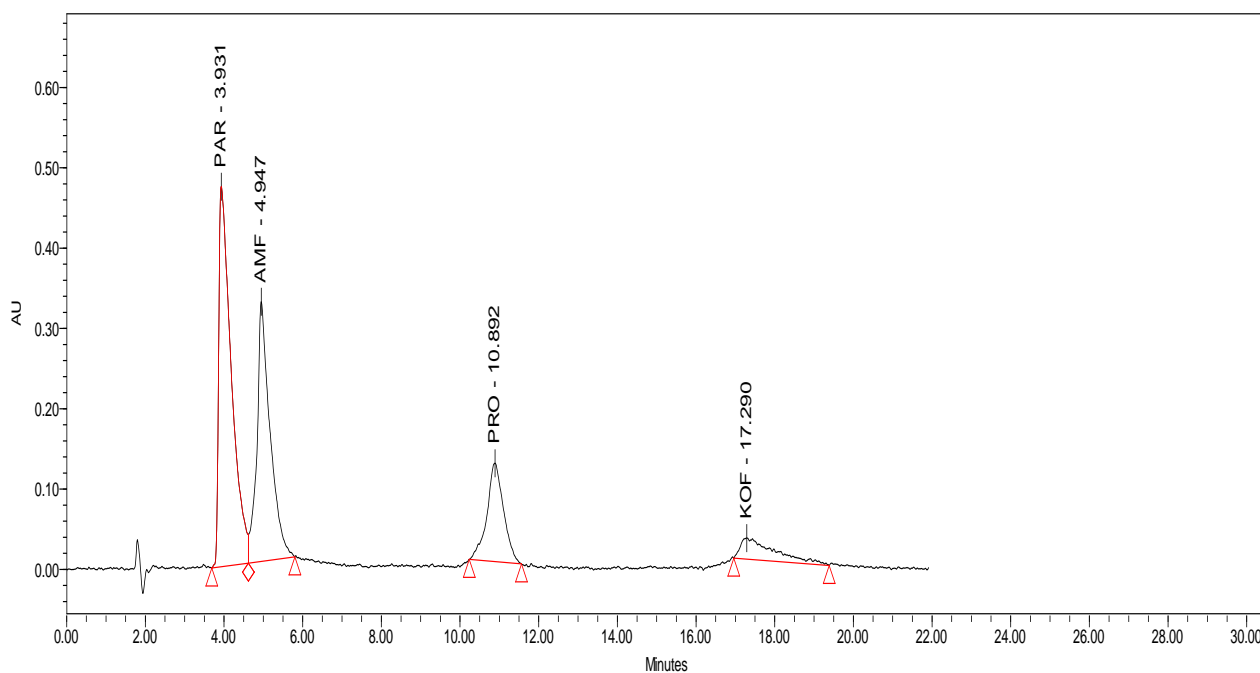
Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 15

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:rozt.kys.citronové pH 2,01 - 50:50	1	254	9,95	3,20	20,31	4,51	separuje se, nevhodný tvar píků
ACN:voda (bez úpravy) - 50:50	1	210	16,58	3,26	18,58	4,02	neúplné oddělení PAR a PRO
ACN:vodný roztok NH ₄ OH pH 11,9 - 50:50	1	210					PRO dlouhý t _r
THF:0,1M rozt.H ₃ PO ₄ - 40:60	1	210					prohození pořadí PRO, AMF a KOF
THF:0,1M rozt.H ₃ PO ₄ - 30:70	1	210	2,99	2,60	5,55	3,51	prohození pořadí PRO, AMF a KOF
THF:rozt.kys.oct.pH 2,5 - 10:90	1	210	4,95	3,93	17,29	10,89	50°C; obr.34
THF:rozt.kys.oct.pH 4 - 10:90	1	210					pH nemá téměř žádný vliv
THF:rozt.kys.oct.pH 6 - 10:90	1	210					pH nemá téměř žádný vliv
THF:0,1M rozt.NaF pH 6 (upraveno H ₃ PO ₄) - 10:90	1	270	6,29	3,48	21,49	12,13	separuje se, nevhodný tvar píků, podklad pro gradientovou eluci, obr.33



**Obrázek 33: MF – THF:rozt. kys. octové pH 2,5 – 10:90
kolona – ZIR-CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5µm)**



**Obrázek 34: THF: 0,1M rozt. NaF pH 6 (upraveno H₃PO₄) – 10:90
kolona – ZIR-CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5µm)**

Z vyzkoušených podmínek by bylo možné použít tyto jako podklad pro gradientovou eluci:

- a) THF:rozt. kys. oct. pH 2,5 - 10:90, při teplotě 50°C, detekce UV 210nm
- b) THF:0,1M rozt. NaF pH 6 (upraveno H₃PO₄) - 10:90, detekce UV 270 nm

Při průtoku 1 ml/min.

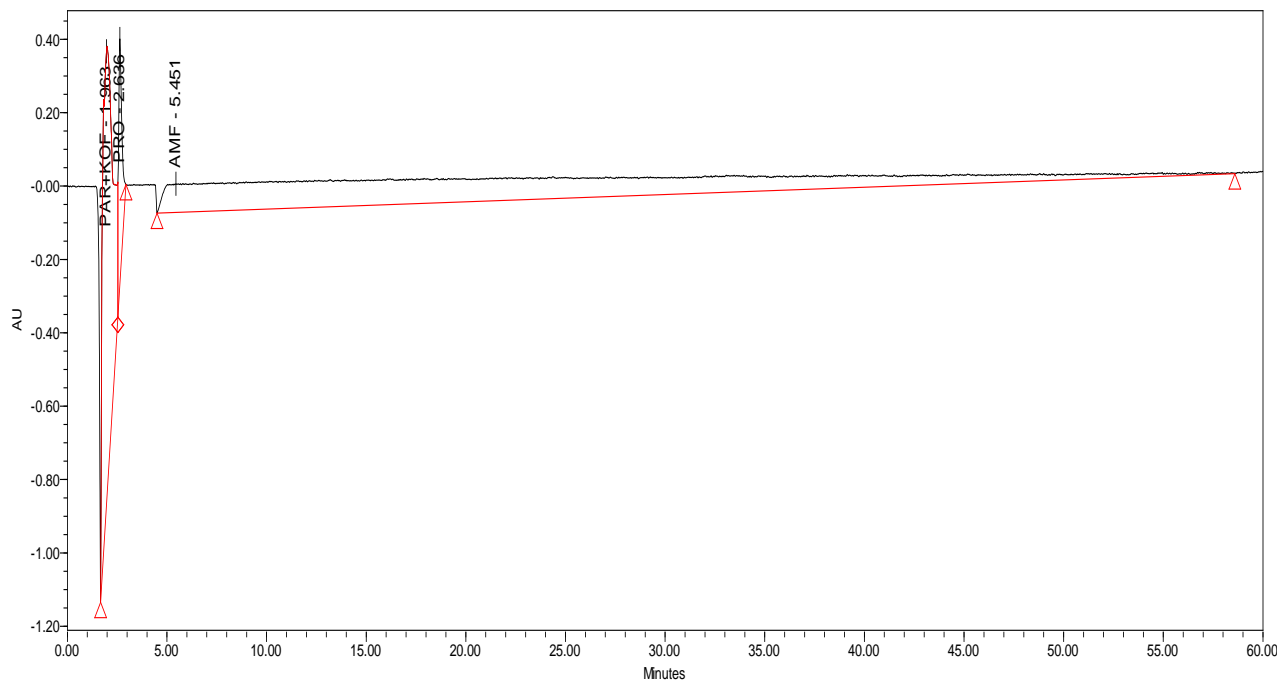
7.1.2.15 Discovery HS F5 (150 x 4,6mm, 5µm)

Pentafluorofenylpropyl fáze je fáze s mnohostranným využitím, s retenčním profilem ve tvaru písmene „U“ a charakteristickou selektivitou. Má podobné retenční vlastnosti jako C18 kolona (při analýze lipofilních látek je v některých případech potřeba použití mobilní fáze s větším podílem organické složky).^{/22/}

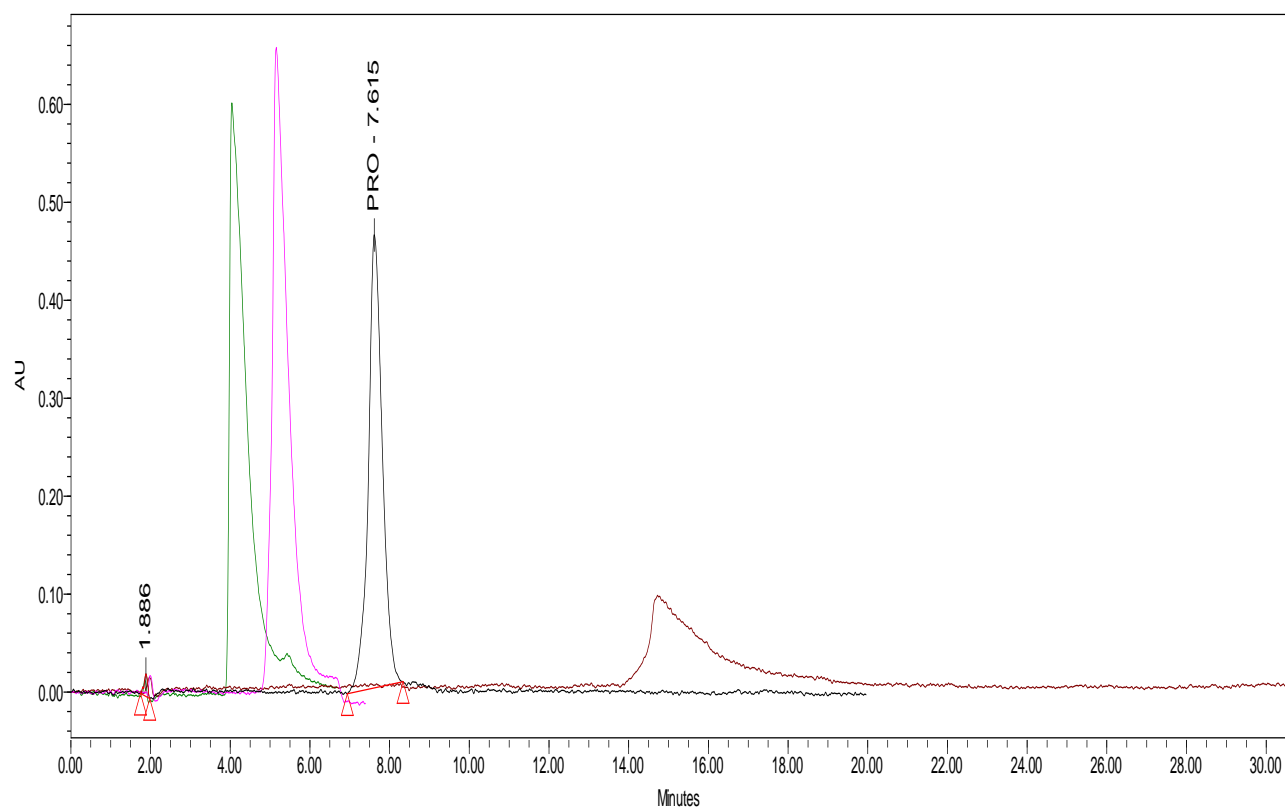
Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 16

MF	průtok	Λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:0,1M rozt.H ₃ PO ₄ - 50:50	1	210					neoddělily se 2 x 2 látky
ACN:0,1M rozt.H ₃ PO ₄ - 20:80	1	210					neoddělily se 2 x 2 látky
ACN:0,1M kys.citr. - 10:90	1	210					neseperuje se, 1 látka shodná s mrt. t _r .
ACN:voda pH 4,5 – 20:80	1	210					separuje se, nevhodný tvar píků
MeOH:0,1M rozt.kys.citr. - 30:70	1	210					2 látky zároveň, dlouhý t _r PRO
THF:0,1M rozt.kys.citr. - 30:70	1	210					dlouhý t _r AMF
ACN:0,1M rozt.kys.citr. - 20:80	1	210	5,451	1,903	1,903	2,636	obr. 35, AMF negat. pík
ACN:voda(bez úpravy) - 70:30	1	210					AMF chvostuje, PAR+KOF s mrt.obj.
Isopropanol:voda(bez úpravy) - 70:30	1	210					nevhodné
THF:rozt. kys. citr. pH 2,5 – 15:85	1	210	4,02	5,165	14,08	7,59	viz.obr. 36



**Obrázek 35: MF – ACN: 0,1M rozt. kys. citronové – 20:80
kolona – Discovery HS F5 (150 x 4,6mm, 5 μ m)**



**Obrázek 36: MF – THF: rozt. kys. citronové pH 2,5 – 15:85
kolona – Discovery HS F5 (150 x 4,6mm, 5 μ m)**

Pozn: t_r (AMF) - 4,02; t_r (PAR) – 5,165; t_r (PRO) – 7,59; t_r (KOF) – 14,08

Z vyzkoušených podmínek by bylo možné použít jako podklad pro gradientovou eluci tuto:
THF:rozt.kys.citronové pH 2,5 - 10:90, detekce UV 210nm, při průtoku 1 ml/min

7.1.2.16 Discovery RP-AMIDE C16 (250 x 3,5 mm, 5 µm)

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 17

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
ACN:voda (bez úpravy) - 30:70	1	270	1,58	1,70	1,80	6,50	40°C

Tyto podmínky by mohly být využity jako podklad pro gradientovou eluci.

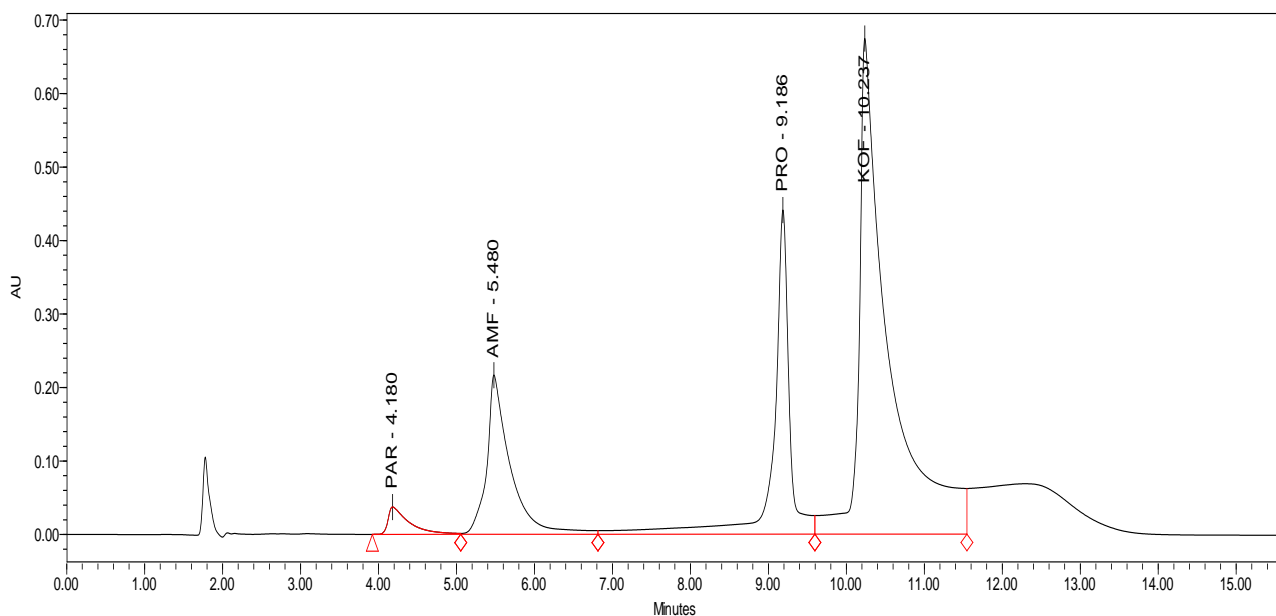
7.1.2.17 Možnosti gradientové eluce na vybraných kolonách

7.1.2.17.1 ZIR-CHROM CARB (150x4,6mm, 5µm)

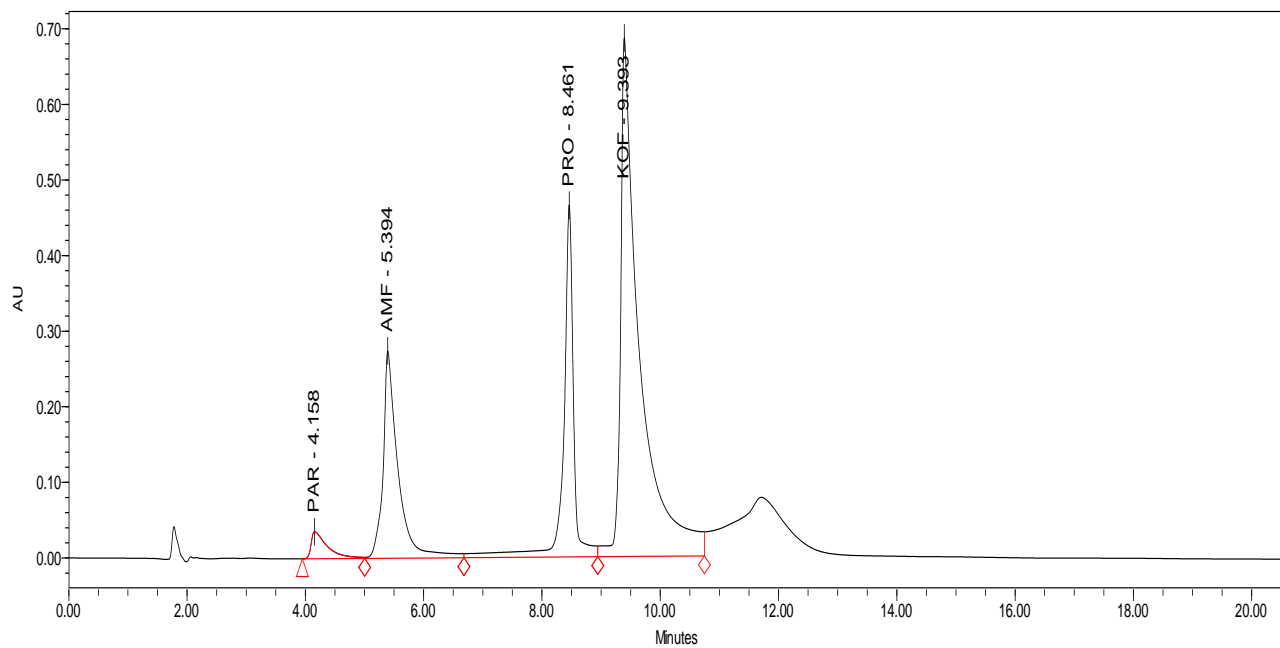
Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 18

MF	průtok	λ	t _r AMF	t _r PAR	t _r KOF	t _r PRO	komentář
							ODSTRANIT
THF:0,1M NaF pH 4 (upr.H ₃ PO ₄) 0.-3.min. 10:90 3.-10.min. 30:70 10.-11.min. 10:90 11.-16.min. 10:90	1	270	5,48	4,18	10,24	9,19	50°C, viz.obr.37
THF:0,1M NaF pH 4 (upr.H ₃ PO ₄) 0.-2.min. 10:90 2.-9.min. 30:70 9-10.min. 10:90 10.-15.min. 10:90	1	270	5,39	4,16	9,09	8,46	50°C, viz.obr.38



Obrázek 37: MF – THF: 0,1M NaF pH 4 (pH upraveno H₃PO₄) – gradient viz. tab. č.20
kolona – ZIR-CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5µm)



**Obrázek 38: MF – THF: 0,1M NaF pH 4 (pH upraveno H₃PO₄) – gradient viz. tab. 20
kolona – ZIR CHROM CARB (150 x 4,6mm, 5µm)**

Tyto podmínky by bylo možné dále validovat:

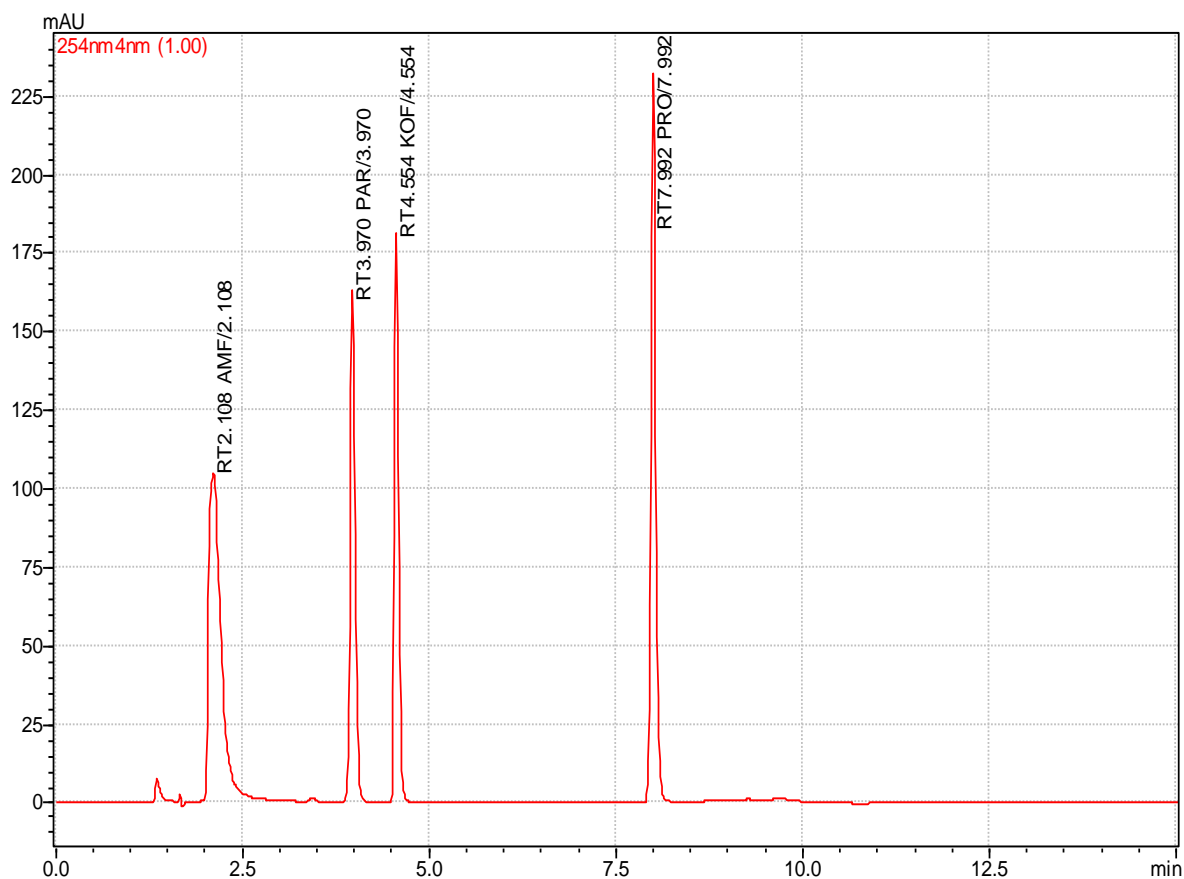
THF:0,1M NaF pH 4 (upr.H₃PO₄) - 0.-2.min. 10:90; 2.-9.min. 30:70; 9-10.min. 10:90;
10.-15.min. 10:90; průtok 1 ml/min., detekce UV 270 nm, při 50°C.

7.1.2.17.2 Discovery RP-AMIDE C16 (250 x 3,5 mm, 5 μ m)

Souhrn testovaných mobilních fází:

tabulka 19

MF	průtok	λ	RTamf	RTpar	RTkof	RTpro	komentář
ACN : voda (bez úpravy pH) 0.-1.min. 5:95 1.-8.min. 40:60 8.-9.min. 5:95 9.-13.min. 5:95	1	270	2,10	3,97	4,55	7,99	40°C, viz.obr.39



Obrázek 39: ACN: voda (bez úpravy) – gradient viz. tab. č.21
kolona – Discovery RP-AMIDE C 16 (250 x 3,5mm, 5 μ m)

Tato metoda by byla vhodná pro finální validaci. Celkový čas analýzy nepřesahuje 13 minut i s ekvilibrací kolony po gradientové eluci na původní podmínky. Všechny látky jsou rozdělené s rozlišením větším než 1,5. Píky látek jsou díky gradientu symetrické a nevykazují kromě píku AMF výrazné chvostování. Nulová linie je i přes gradientovou eluci stabilní.

8 Závěr

Z této rigorózní práce lze formulovat následující závěry:

- Byly nalezeny chromatografické podmínky pro současné stanovení paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a nečistoty paracetamolu – 4-aminofenolu.
- Byl vyzkoušen široký výběr HPLC kolon v kombinaci různých mobilních fází
- Bylo vyzkoušeno velmi široké rozmezí pH (2-12)
- V isokratickém režimu byla separace obtížná z důvodu velmi rozdílné retence daných látek
- Z důvodu problematického chování látek v isokratickém režimu bylo přistoupeno ke gradientové eluci
- jako nejvhodnější se jeví volba následujících podmínek:
 - Mobilní fáze: ACN : voda (bez úpravy pH)
 - Stacionární fáze: kolona Discovery RP-AMIDE C-16 (250 x 4,6mm, 5 μ m)
 - Průtok: 1 ml/min.
 - Teplota měření: 40°C
 - detekce UV 270nm
 - Gradientový režim: 0. – 1.min. – 5:95
1. – 8.min. – 40:60
8. – 9.min. – 5:95
9. – 13. min. – 5:95

Validace metody nebyla provedena, protože cílem práce bylo pouze nalézt metodu vhodnou pro separaci paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu.

9 Seznam použité literatury

- 1 Databáze AISLP, mikroverze 2004.3
- 2 Kol. autorů: Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2003
- 3 Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001
- 4 Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
- 5 Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- 6 Lincová D., Farghali H. a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha, 2002
- 7 Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie II., Karolinum, Praha, 1994
- 8 Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie III., Karolinum, Praha, 2004
- 9 Dinç E., Kökdil G., Onur F.: Derivative ratio spectra–zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; . 26, , , 769-778 (2001)
- 10 L. Hanyšová, P.Kastner, J. Klimeš: Studium stability p-aminofenolu jako dominantního rozkladného produktu paracetamolu, Chemické listy 98, 152-156 (2004)
- 11 Pharmazeutische Stoffliste, 8. edition, Arzneibüro der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände, Frankfurt am Main
- 12 internetové stránky: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html> (navštíveno 1.10.2008)
- 13 interní materiály firmy Léčiva: Assay of propyphenazone, caffeine and paracetamol by HPLC, version 1.0 – approved by Leciva, p. 358-359
- 14 internetové stránky: <http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820633-001e.pdf> (navštíveno 25.10.2008)
- 15 internetové stránky:
http://www.phenomenex.com/products/brands/view2.aspx?id=8953&ekmense1=10_submenu_75_link_22 (navštíveno 25.10.2008)
- 16 internetové stránky:
http://www.phenomenex.com/products/brands/view2.aspx?id=8957&ekmense1=10_submenu_75_link_22 (navštíveno 25.10.2008)
- 17 internetové stránky:
http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=206&ekmense1=10_submenu_75_link_7 (navštíveno 25.10.2008)

- 18 internetové stránky:
http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=162&ekmense1=10_submenu_75_link_11 (navštíveno 25.10.2008)
- 19 internetové stránky: <http://www.sequant.com/default.asp?ml=11528> (navštíveno 25.10.2008)
- 20 internetové stránky:
http://chrombook.merck.de/chrombook/ip_internet_v5-documents/out-chrombook/pdf/w288101.pdf (navštíveno 25.10.2008)
- 21 Supelco: Bulletin 932: Discovery Zr: Method Development Guidelines (sigma-aldrich.com/supelco)
- 22 www.sigma-aldrich.com – Discovery HS F5 fluorovaná fáze, str. 25-28