

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Analytické hodnocení vybraných nečistot ibuprofenu  
kapalinovou chromatografií**

**(rigorózní práce)**

**Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDR. Jaroslav Sochor, CSc.**

**Hradec Králové 2005**

**Mgr. Ondřej Skupien**

Chtěl bych poděkovat Doc. RNDR. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za odborné rady, připomínky a trpělivost. Dále děkuji ostatním členům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za ochotu a věnovaný čas.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 VÝZNAM A HISTORIE CHROMATOGRRAFIE.....	8
2.2 CHROMATOGRRAFICKÉ METODY.....	9
2.3 HPLC.....	14
2.3.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY A POJMY HPLC.....	14
2.3.1.1 TEORIE CHROMATOGRRAFICKÉHO PROCESU.....	14
2.3.1.2 DEFINICE ZÁKLADNÍCH VELIČIN.....	15
2.3.2 INSTRUMENTACE HPLC.....	18
2.3.3 HODNOCENÍ LÁTEK POMOCÍ HPLC.....	26
2.4 NSAID A IBUPROFEN.....	28
2.5 NEČISTOTY IBUPROFENU.....	31
2.5.1 ČL 2002.....	31
2.5.2 ČL 1997.....	36
2.5.3 USP.....	36
2.5.4 BP.....	37
2.5.5 REŠERŠE.....	38
2.6 IZOLACE IBUPROFENU A NEČISTOT Z KRÉMŮ A GELŮ.....	40
3. CÍL PRÁCE.....	41
4. PRAKTICKÉ PROVEDENÍ.....	43
4.1 MATERIÁL A POMŮCKY.....	44
4.2 CHROMATOGRRAFICKÉ PODMÍNKY ANALÝZY.....	46
4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKU VZORKU A VNĚJŠÍHO STANDARDU.....	48
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	49
5.1 ANALÝZA VYBRANÝCH NEČISTOT V SUBSTANCI IBUPROFENU.....	50
5.1.1 HODNOCENÍ VYBRANÝCH NEČISTOT V SUBSTANCI.....	50
5.1.2 STUDIE VLIVU ZMĚN CHROMATOGRRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	53
5.1.2.1 GRADIENT.....	54
5.1.2.2 ZRNITOST NÁPLNĚ KOLONY (7 $\mu$ M A 5 $\mu$ M) A DÉLKA KOLON.....	57
5.1.2.3 ZMĚNA PRŮTOKU MOBILNÍ FÁZE.....	62
5.1.2.4 ZMĚNA PŘÍSTROJE.....	63

5.1.2.5 UV SPEKTRA.....	64
5.2 STANOVENÍ NEČISTOT IBUPROFENU VE VZORKU KRÉMU.....	67
6. ZÁVĚR.....	75
7. LITERATURA.....	77

# **1. ÚVOD**

Tato rigózní práce si klade za cíl odpovědět na otázku, zda lze současně analyzovat vzorky krému ibuprofenu a jeho nečistot metodami vysokoučinné kapalinové chromatografie. Ibuprofen je široce používané nesteroidní antiflogistikum (NSA) s krátkým biologickým poločasem, s dobrým analgetickým a antipyretickým účinkem, s relativně slabým protizánětlivým účinkem a s výbornou gastrointestinální tolerancí.<sup>1)</sup> Některé nečistoty této látky mohou mít negativní vliv na lidské zdraví a proto je žádoucí znát rychlou a efektivní (finančně i časově) analytickou metodu k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Význam a historie chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších moderních analytických metod, která umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Chromatografii objevil botanik Cvet v roce 1903. Zveřejnil práci o separaci listových barviv na sloupci sorbentu. Klasická kolonová (sloupcová) chromatografie byla mnoho let na pokraji zájmu za chromatografií papírovou a tenkovrstvou, ale po zavedení vysokoúčinných kolon a s rozvojem chromatografické instrumentace se stala HPLC jednou z klíčových moderních analytických metod. V současné době se rozvoj chromatografických metod odehrává zejména v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie ve farmaceutickém průmyslu, klinické praxi, biochemii apod..<sup>2,3)</sup>



## 2.2 Chromatografické metody<sup>2,4)</sup>

Chromatografie patří do skupiny separačních metod. Při separaci dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma (někdy i více) vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna z fází je stacionární ( fáze nepohyblivá) a druhá je fáze mobilní ( fáze pohyblivá).<sup>2)</sup>

### Rozdělení chromatografických metod- 1- Podle fází

#### 2- Podle separačního procesu

#### 3- Podle techniky vyvíjení chromatogramu

#### 4- Podle uspořádání aparatury

#### 1- Podle fází

Chromatografické metody můžeme rozdělit podle fází, mezi kterými dochází k separaci analyzovaných látek na kapalinovou či plynovou.

Chromatografie kapalinová- mobilní fází je kapalina a fází stacionární může být látka pevná či látka kapalná (nemísitelná až omezeně mísitelná s mobilní fází, přičemž je zakotvena na vhodném pevném nosiči).<sup>2)</sup>

Chromatografie plynová- mobilní fází je plyn, fáze stacionární je pevná látka nebo netěkavá kapalina, která je zakotvena na vhodném pevném nosiči.<sup>2)</sup>

## 2- Podle separačního procesu

- a) adsorpční chromatografie
- b) iontově výměnná chromatografie
- c) gelová permeační chromatografie
- d) rozdělovací chromatografie
- e) afinitní chromatografie

### a) adsorpční chromatografie

U této metody dochází ke specifickým interakcím na povrchu stacionární fáze (adsorbentu). Při adsorpci je důležitá velikost a jakost povrchu látek, na kterých jsou aktivní centra (adsorpční centra na které se vážou částice, které k nim mají určitou afinitu).<sup>2)</sup>

### b) iontově výměnná chromatografie

Pokud látka tvoří v roztoku ionty, tak dochází k elektrostatické interakci iontů s ionogenními funkčními skupinami měniče (dochází k výměně iontů). Tento děj je ovlivněn nábojem, velikostí iontů a disociační konstantou.<sup>2)</sup>

### c) gelová permeační chromatografie

Při gelové chromatografii dochází k dělení látek na základě velikosti jejich molekul. Stacionární fáze má pórovitou strukturu (póry o určité velikosti) a tak menší molekuly mohou hlouběji proniknout do pórů. Tím je jejich pohyb pomalejší než u větších molekul.<sup>2)</sup>

#### d) rozdělovací chromatografie

K oddělení složek směsi dochází díky odlišným rozdělovacím koeficientům mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Každá složka difunduje z jedné fáze do druhé tak, aby byl zachován určitý poměr, který je pro daný systém při konstantní teplotě charakteristický.<sup>2)</sup>

#### e) afinitní chromatografie

Tato metoda je založena na vysoce selektivních interakcích mezi dvojicemi látek. Tyto interakce jsou typické např. pro některé biochemické a biologické procesy.<sup>2)</sup>

### 3- Podle techniky vyvíjení chromatogramu

a) frontální vyvíjení

b) vytěšňovací vyvíjení

c) eluční vyvíjení

a) frontální vyvíjení

Na kolonu se zavádí vzorek kontinuálně a je rozpuštěn v mobilní fázi. V čistém stavu lze získat pouze nejslaběji vázanou složku (tzn. tu složku, která má nejmenší afinitu k stacionární fázi).<sup>4)</sup>

b) vytěšňovací vyvíjení

V tomto případě se vzorek na kolonu zavádí diskontinuálně (jednorázově). Používá se mobilní fáze, jež se na stacionární fázi váže silněji než složky vzorku. Složky vzorku jsou

úplně vytěšňovány ze stacionární fáze a vycházejí z kolony před čelem silně se sorbující složky mobilní fáze. <sup>4)</sup>

### c) eluční vyvíjení

Vzorek se zavádí na kolonu diskontinuálně. Složky vzorku jsou na koloně vázány silněji než složky mobilní fáze a komponenty vzorku jsou eluovány v pořadí podle intenzity interakce se stacionární fází a jsou vzájemně odděleny čistou mobilní fází. Eluční vyvíjení umožňuje dosáhnout nejlepšího rozdělení složek vzorku a využívá se v praxi nejčastěji. <sup>4)</sup>

Varianty elučního způsobu vyvíjení:

jednoduchá (izokratická) eluce- používá se mobilní fáze o stejném složení a stejné polaritě.

vícestupňová eluce- kolona se promývá několika mobilními fázemi o vzrůstající eluční síle.

gradientová eluce- složení a polarita mobilní fáze se mění. <sup>4)</sup>

## 4- Podle uspořádání aparatury

a) techniky planární (plošné uspořádání)

b) techniky kolonové

a) techniky planární (plošné uspořádání)

- chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

- papírová chromatografie (PC) <sup>4)</sup>

b) techniky kolonové

-kapalinová chromatografie

- a) kapalinová adsorpční chromatografie
- b) kapalinová chromatografie na chemicky vázaných fázích
- c) iontově výměnná chromatografie
- d) gelová permeační chromatografie - vylučovací chromatografie
- e) bioafinitní chromatografie

-plynová chromatografie

- a) plynová adsorpční chromatografie
- b) plynová chromatografie na molekulových sítích
- c) plynová rozdělovací chromatografie <sup>4,5)</sup>

## **2.3 HPLC**

Význam HPLC (High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie) v současné době stále vzrůstá, protože umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek v množstvích od desítek procent do stotisečtin procenta. Mezi výhody vysokoúčinné kapalinové chromatografie můžeme počítat- citlivost, malý objem vzorku potřebný k analýze, vysoká rychlost separace, možnost analyzovat nízkomolekulární, ale hlavně látky s relativně vysokou molekulovou hmotností.<sup>2)</sup>

### **2.3.1 Základní principy a pojmy HPLC**<sup>2,6,7)</sup>

#### **2.3.1.1 Teorie chromatografického procesu**<sup>2,6,7)</sup>

Při nástřiku vzorku směsi do kolony se nejprve utvoří směsný eluční pás, poté následovně dochází k separaci složek směsi. Po výstupu látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu. Při průchodu separované složky kolonou přejde každá její molekula mnohokrát z mobilní fáze do fáze stacionární a zpět. Doba, po kterou separovaná látka setrvá v koloně, závisí na intenzitě interakcí. Čím intenzivnější jsou interakce ve stacionární fázi, tím vyšší je hodnota elučního času. Látky lze chromatograficky dělit, liší-li se alespoň v některé fyzikálně chemické veličině, jež určuje míru jejich interakce ve stacionární a v mobilní fázi.<sup>2,6,7)</sup>

### 2.3.1.2 Definice základních veličin<sup>2,6,7)</sup>

Charakteristickou veličinou pro každou látku v daném chromatografickém systému je retenční (eluční) čas  $t_R$  a eluční objem  $V_R$ . Eluční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky. Eluční objem je objem mobilní fáze, který proteče soustavou za čas  $t_R$ .  $V_R$  je úzkým vztahem s retenčním časem:

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

, kde  $F_M$  je objemový průtok (průtoková rychlost) mobilní fáze.

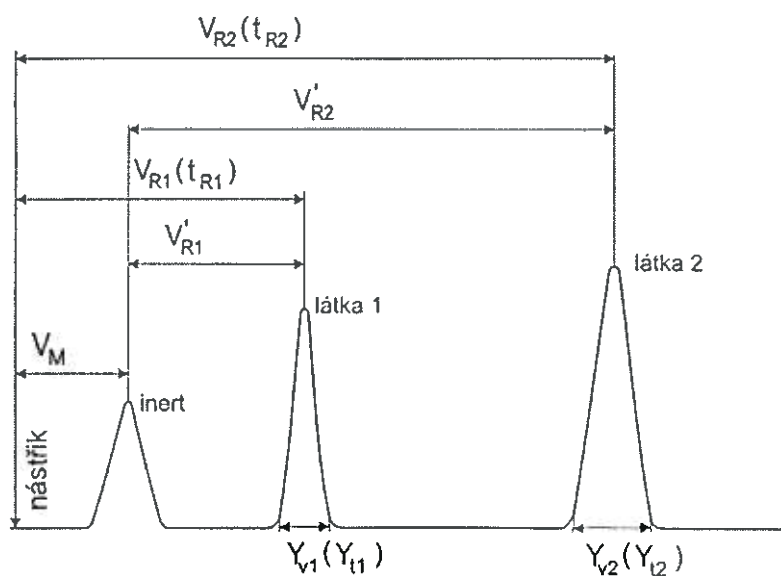
Redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ) charakterizuje dobu, po kterou se analyt zdrží interakcemi se stacionární fází:

$$t'_R = t_R - t_M$$

, kde  $t_M$  je mrtvý čas.

Analogicky můžeme tento vztah vyjádřit pro příslušné eluční objemy:

$$V_R = V_R' + V_M$$



**Obrázek č.1:** Chromatografický záznam dvou látek a nesorbujícího se inertu

Další důležitou veličinou je faktor symetrie píku  $A_s$ . Je totiž žádoucí, aby analyzovaná směs poskytovala ostré a symetrické píky, rozdělené pokud možno až k základní linii.

$$A_s = \frac{b_{0,05}}{2d}$$

, kde  $b_{0,05}$  je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

$A_s$  by měl být v rozsahu 0,80 až 1,50 (ideálně 1,0).

K hodnocení účinnosti kolony se používá tzv. počet teoretických pater  $n$  a výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ .

$$n = 5,545 \left( \frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

, kde  $b_{0,5}$  je šířka píku v polovině jeho výšky (experimentálně naměřená hodnota).

Výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ :

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

, kde  $L$  je délka kolony.

Účinnost dělení je vyjádřena veličinou rozlišení  $R_s$ . Tato veličina odpovídá rozdílu retenčních časů separovaných látek 1,2 dělený průměrnou hodnotou šířky píky v základně ( $Y_v$ ).



$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{Y_{v1} + Y_{v2}}$$

Použijeme-li šířku píku v polovině jeho výšky ( $b_{0,5}$ ), platí následující:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{b_{0,5(1)} + b_{0,5(2)}}$$

Poměr signálu k šumu ( $S/N$ ) udává poměr výšky píku k absolutní hodnotě nejvyšší výchylky signálu šumu od základní linie ( $h$ ).

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

### 2.3.2 Instrumentace HPLC<sup>2,3,4,8)</sup>

Kapalinový chromatograf se v základní sestavě skládá z částí, které zajišťují transport mobilní fáze- zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, systémy pro tvorbu gradientu v mobilní fázi; dávkování vzorku- manuální či automatické; separaci látek- chromatografická kolona; detekci látek; registraci signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu. Může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno řazení základních elementů za sebou, i když lze mnohé při speciálních měřeních buď vynechat, nebo naopak přidat (viz. obr. č.2).

V zásadě se vyskytují dvě možné varianty v řešení koncepce kapalinového přístroje:

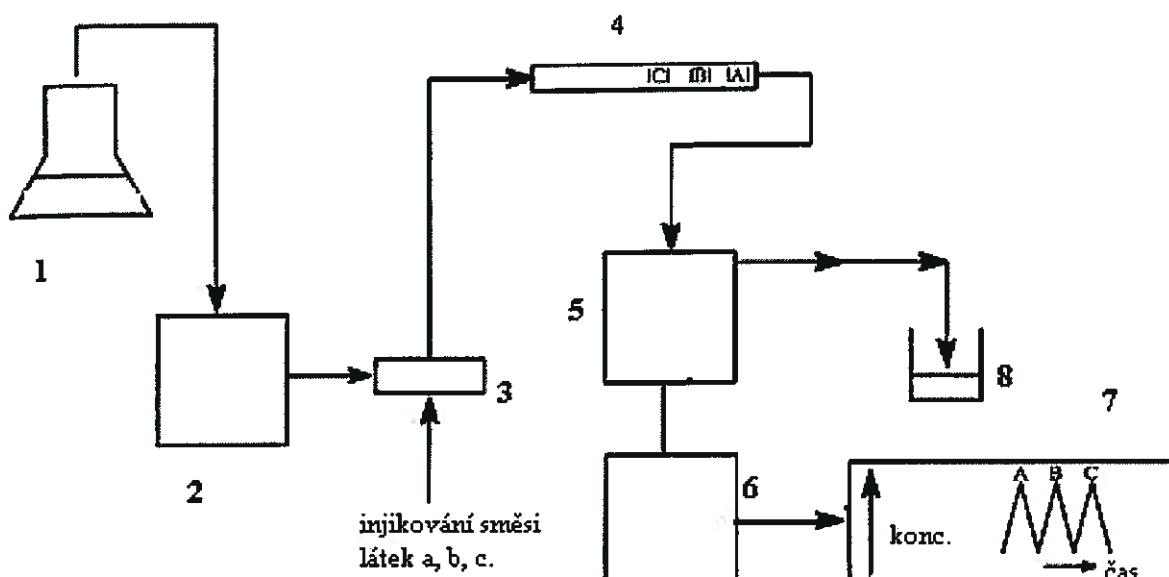
#### 1) stavebnicový systém

Tato koncepce je finančně méně náročná a je flexibilnější k nárokům uživatele.

#### 2) kompletní skříňová sestava

Nákladnější možnost, která také znamená omezení přístupnosti jednotlivých částí kapalinového chromatografu. Pro tento typ přístroje je nepochybným a velkým plus, že redukuje mrtvý objem na minimum (tímto je omezeno nepříznivé ovlivnění separačního přístroje).

## Blokové schéma kapalinového chromatografu



**Obrázek č.2:** Blokové schéma kapalinového chromatografu

1-zásobníky mobilní fáze

2-vysokotlaké čerpadlo

3-dávkovací zařízení (injektor)

4- kolona

5-detektor

6-integrátor

7-zapisovač

8-jímač frakcí

### Zásobníky mobilní fáze<sup>3)</sup>

Jako zásobník mobilní fáze lze použít libovolnou uzavřenou nádobu chemicky odolnou vůči použitým rozpouštědlům. Ze zásobníku se mobilní fáze čerpá přes filtr, aby se zabránilo pronikání částic pevných nečistot do čerpadla. Některé přístroje umožňují přímo v zásobníku odplynění mobilní fáze. Odplynění je nezbytné, aby se předešlo tvorbě vzduchových bublinek při poklesu tlaku na výstupu z kolony, což by rušilo jak detekci, tak funkci čerpadla.

Odplynění mobilní fáze provádíme většinou třemi způsoby-

- 1) ultrazvukem.
- 2) vakuem při současném míchaní- nebezpečí změny složení mobilní fáze u těkavých rozpouštědel.
- 3) probublávání inertním plynem- nejčastěji heliem (malá rozpustnost ve většině organických rozpouštědlech).

### Tlumiče pulsů a vysokotlaké čerpadla<sup>2,3)</sup>

Čerpadlo je jednou z nejdůležitějších a nejdražších částí kapalinového chromatografu, protože musí zajistit definovaný a konstantní průtok mobilní fáze pro umožnění kvalitativní a kvantitativní analýzy. Výstupní tlaky na čerpadlech se pohybují v rozmezí jednotek až desítek MPa. Je třeba předejít tlakovým pulsům, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru.

Principiálně se vysokotlaká čerpadla dělí do dvou hlavních skupin podle toho, zda pracují při konstantním tlaku nebo při konstantním objemovém průtoku. U čerpadel s konstantním tlakem se využívá tlak plynu přiváděného z tlakové nádoby přes redukční ventil. Druhý typ čerpadel využívá k pohybu pístu nebo membrány mechanický pohon, čímž se dosahuje konstantního průtoku čerpané mobilní fáze.

Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělena na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý a potřebného průtoku se dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory. Bezpulsni čerpadla pracují s daleko větším objemem pracovní komory (100 -500 ml) , což umožňuje provést bez opětovného plnění čerpadla řadu analýz. Tento typ také poskytuje hladší průtok mobilní fáze a nevyžaduje speciální přídavné zařízení pro tlumení tlakových pulsů. Bezpulsni čerpadla jsou však dražší a mají podstatně horší přesnost tvorby gradientu mobilní fáze.

U čerpadel se sinusovou časovou závislostí polohy pístů je třeba tlumení tlakových pulsů. To lze uskutečnit dvěma způsoby:

- Můžeme použít současně dvou i více čerpadel, jejichž činnost je fázově posunuta. Nejjednodušší je kombinace dvou pump, které pracují v opačné fázi. V okamžiku, kdy je jedno čerpadlo ve fázi sání, druhé musí být ve fázi výtlaku. Tím získáme téměř hladký průtokový profil.
- Podstatně levnější způsob je potlačení pulsace pomocí tlumičů pulsů, které využívají pružného odporu. Nevýhodou je nižší účinnost než u duálového čerpadla, dále pak vnesení dalších mrtvých prostorů do chromatografického systému.

### Dávkovací systémy <sup>2,3)</sup>

Dávkovací zařízení musí dovolovat co nejpřesnější dávkování definovaných objemů vzorku a co nejméně přispívat k rozšiřování eluční křivky. Dávkuje se pouze vzorek dokonale rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi.

Dávkování vzorku se provádí dvojím způsobem:

- mikrostříkačkou při zastaveném toku mobilní fáze
- ventilem s dávkovací smyčkou

Dávkování mikrostříkačkou má však značné nedostatky a přesnost tohoto zařízení nebývá lepší než 2%. Proto se v současné době převážně používá dávkování pomocí dávkovacích ventilů, které je podstatně přesnější (směrodatná odchylka 0,2 %).

Objem vzorku je dán objemem vnitřního prostoru ventilu nebo objemem kapiláry ve tvaru smyčky připojené k ventilu. Změna dávkovacího objemu je v převážné většině nástřikových systémů zajišťována výměnou dávkovací kapiláry s volitelným objemem. Principem dávkovacího ventilu je systém pevného pouzdra s otočným jádrem. Mikrostříkačkou nebo pomocným čerpadlem či tlakem plynu se naplní dávkovací kapilára, přičemž není přerušen průtok mobilní fáze kolonou. Otočením jádra se dávkovací kapilára zařadí do průtoku a vzorek je vytlačen proudící mobilní fází do kolony.

## Chromatografické kolony<sup>2,8)</sup>

Účinnost kolon závisí nejen na použité stacionární fázi, ale i na délce kolony, na jejím tvaru, na materiálu, z něhož je vyrobena a na jejím vnitřním povrchu. Analytické kolony jsou nejčastěji dlouhé 10-30 cm při velikosti částic sorbentu 3-10  $\mu\text{m}$ , jejich vnitřní průměr je 3-6 mm. Vnitřní průměr kolon a tloušťka stěny závisí na tom, z jakého materiálu jsou kolony zhotoveny.

Dle materiálu použitého na výrobu můžeme kolony rozdělit na skleněné a nerezové. Skleněné kolony se hodí pro pracovní tlaky do 10 Mpa. Nejvhodnější jsou tlustostěnné trubice z borosilikátového skla, které odolá i silným kyselinám. Skleněné kolony musí být při měření umístěny do ocelového pláště. Pro vyšší pracovní tlaky je třeba použít kolony z nerezové oceli.

Zásadní vlastností kolon je kvalita sorbentu. Velikost, stejnoměrnost, tvar, porozita i struktura částic sorbentu rozhoduje o účinném dělení analyzovaných látek. V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrnek jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály:

- uhlovodíkové řetězce  $\text{C}_{18}$ , případně  $\text{C}_8$ . Jsou používány nejčastěji. Jedná se o nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze).
- uhlovodíkové řetězce  $\text{C}_3$  zakončené skupinami  $-\text{NH}_2$ ,  $\text{CN}$  aj. Jedná se o středně polární fáze.

Jako sorbenty se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), ale v daleko menší míře. V iontové výměnné chromatografii se jako sorbenty používají vhodné ionexy.

## Detektory<sup>2)</sup>

K hodnocení látek vycházejících z chromatografické kolony slouží detektory. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do vyhodnocovacího zařízení. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich určitých vlastností, kterými se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Na detektor jsou kladeny následující požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším koncentračním rozmezí
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- nízká citlivost ke změnám tlaku a průtoku
- možnost použít gradientovou eluci
- malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón

Nejčastějším kritériem, podle něhož se detektory rozdělují do skupin, jsou měřené veličiny. Některé důležité údaje o nejvíce používaných detektorech shrnuje tabulka č.1.

Detektor	Selektivita	Citlivost (g/ml)	Gradientová eluce	Snímaná veličina
fluorimetrický	selektivní	$10^{-10}$	ano	fluorescence
ultrafialový	selektivní	$5 \cdot 10^{-10}$	ano	absorpce záření
refraktometrický	neselektivní	$5 \cdot 10^{-8}$	ne	index lomu
konduktometrický	selektivní	$10^{-8}$	ne	vodivost roztoku
infračervený	selektivní	$10^{-6}$	ano	absorpce záření
amperometrický	selektivní	$10^{-10}$		proud
hmotnostní	selektivní	$10^{-10}$		četnost iontů na poměru jejich hmotnosti a náboje

Tabulka č. 1- přehled detektorů používaných v HPLC

#### a) Spektrofotometrický detektor<sup>3,8)</sup>

Tento detektor se užívá v HPLC vůbec nejčastěji, neboť je poměrně jednoduchý, nepříliš drahý a lze jím detekovat velký počet látek v rozmanitých rozpouštědlech. Proměřuje absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. Je to detektor selektivní, základním požadavkem je, aby při dané vlnové

délce látka absorbovala co nejvíce, zatímco ostatní složky mobilní fáze musí absorbovat co nejméně. Při vhodné volbě vlnové délky dosahuje tento detektor značné citlivosti ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  g/ml) a lze jej použít i pro gradientovou eluci.

Vůbec nejběžnější je měření v ultrafialové oblasti. UV detektor může být konstruován s fixní vlnovou délkou (což je nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, protože v této oblasti absorbuje většina léčiv), a nebo s proměnnou vlnovou délkou. Dalším typem je scanning UV detektor, který snímá absorpční spektrum v maximu píku hodnocené látky. Diode array detektor je řízený počítačem a snímá celé absorpční spektrum eluátu; hodnotí látku při několika vlnových délkách současně. Poskytuje trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase.

### **b) Fluorimetrický detektor <sup>3)</sup>**

Fluorimetrický detektor má daleko užší obor použití, protože je vysoce selektivní. Je vysoce citlivý ( $10^{-9}$ -  $10^{-12}$  g/ml) pro fluoreskující látky, případně pro látky, které lze převést na fluoreskující deriváty. Omezením je však požadavek, že ostatní složky mobilní fáze samy nesmí fluoreskovat, nebo naopak zhaset fluorescenci. Při splnění těchto požadavků je fluorescenční detektor snadno použitelný při gradientové eluci.

### **c) Elektrochemický detektor <sup>3)</sup>**

Tento typ detektoru se uplatňuje při hodnocení látek, u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda-eluent. Proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzované látky. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti látek využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor.

Elektrochemické detektory jsou značně citlivé ( $10^{-9}$ -  $10^{-12}$  g/ml), ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci.



#### **d) Refraktometrický detektor <sup>3)</sup>**

Detekce je založena na rozdílném indexu lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vycházejícím z kolony. Protože jakákoliv změna složení kapaliny vede ke změně indexu lomu, jsou refraktometrické detektory univerzální. Přesto se však nepoužívají příliš často, protože mají několik nevýhod. Jsou podstatně méně citlivé ( $10^{-6}$  g/ml), jejich odezva značně závisí na teplotě, takže je nutné systém termostatovat a nelze použít gradientové eluce.

#### **e) Hmotnostní spektrometr (MS) <sup>8)</sup>**

V poslední době se pro detekci látek využívá též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Po výstupu eluátu z kolony je nutno z něj odstranit mobilní fázi a molekuly látky v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací a elektroionizací. Nabitě částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamená se jejich hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost/počet iontů). Tyto detektory jsou značně citlivé, ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci.

Z detektoru vychází signál, který je veden k zapisovači. Grafický záznam průchodu jednotlivých komponent detektorem v závislosti na čase je reprodukován ve tvaru píku na chromatogramu. Jejich tvar se v ideálním případě blíží Gaussově křivce, přičemž plocha píku je úměrná koncentraci látky prošlé detektorem.

K hodnocení chromatogramů se používají zařízení, která jsou schopná automaticky vyhodnotit a zaznamenat veškerá eluční data a poskytnout i kvantitativní údaje ze zabudovaného integrátoru. V dnešní době se využívá především počítačové techniky vybavené vhodným chromatografickým programem.

### **2.3.3 Hodnocení látek pomocí HPLC**<sup>8)</sup>

Vysokoučinná kapalinová chromatografie se neuplatňuje pouze jako metoda separační, ale lze ji především využít pro kvalitativní a kvantitativní hodnocení látek.

#### **Kvalitativní hodnocení**<sup>8)</sup>

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas  $t_R$ . Identifikace složek ve vzorku je založena na faktu, že stejné látky mají za stejných chromatografických podmínek shodné retenční časy. Proto je důkazem totožnosti shoda retenčních časů zkoumané látky a standardu analyzovaných za stejných podmínek. Nezbytné je dokonalé oddělení píku dané látky od ostatních píků nalezených v chromatogramu.

Některé moderní UV detektory umožňují v maximu píku sejmout UV spektrum. Shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou. Další průkaznou identifikaci jednotlivých složek směsi je možné provést ve spojení HPLC- MS.

## Kvantitativní hodnocení <sup>8)</sup>

Množství látky ve vzorku je dáno plochou pod píkem dané látky, popřípadě výškou jejího píku od základní linie. Nejpřesněji lze plochy píků vyhodnotit pomocí počítačové techniky. Kvantitativní zastoupení látky ve směsi se zjišťuje s použitím standardů.

Při metodě vnitřního standardu se přidá přesně známé množství vnitřního standardu přímo do analyzovaného vzorku a chromatografuje se. Koncentrace stanovované látky se vypočítá z poměru plochy (výšky) píku stanovované složky a plochy píku vnitřního standardu. Protože tato metoda není zatížena chybou dvojího nástřiku, je přesnější než metoda vnějšího standardu. Vnitřní standard je látka, na kterou jsou kladeny přísné požadavky: jedná se o sloučeninu strukturně podobnou stanovované látce, která se musí eluovat v blízkosti jejího píku a musí být chemicky inertní. Roztok vnitřního standardu by měl být koncentrací blízký roztoku analyzované látky.

Metoda vnějšího standardu se používá většinou tehdy, není-li možné vybrat vhodný vnitřní standard. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu (obvykle standard analyzované látky) a opět se registruje jeho chromatogram. Koncentrace stanovované látky se pak zjistí porovnáním plochy (výšky) píku analyzované látky a plochy (výšky) píku vnějšího standardu, jehož koncentraci známe.

## 2.4 NSAID a ibuprofen<sup>6,9,10,11)</sup>

Ibuprofen patří mezi nesteroidní protizánětlivé látky (nesteroidní antiflogistika-NSAIDs). Do této skupiny léčiv patří převážně syntetické sloučeniny kyselého povahy. Ve své molekule obsahují volnou karboxylovou funkční skupinu, případně se jedná o látky enolického charakteru. Jejich mechanismus účinku spočívá především v inhibici syntézy prostaglandinů. Pro schopnost tlumit bolest se některá z nich používají jako analgetika běžné praxe (ibuprofen). Těžištěm jejich použití je tlumení projevů zánětlivých onemocnění (bolest, otok, zarudnutí, zvýšená teplota) zejména pohybového aparátu.<sup>9)</sup>

**Mechanismus účinku-** v patogenezi zánětu hrají významnou roli metabolity dvacetihlíkatých nenasycených mastných kyselin, především arachidonové kyseliny, tj. ikosanoidy. Metabolická přeměna arachidonové kyseliny probíhá dvěma cestami označovanými podle enzymů, které je katalyzují. Působením cyklooxygenasy (prostaglandin-syntetasy) vznikají cyklické endoperoxidy, které se dále přeměňují na prostacyklin, prostaglandiny a tromboxan, všechny tyto působky jsou silnými mediátory bolesti a zánětu. Druhá cesta je katalyzovaná lipooxygenázou, přičemž z arachidonové kyseliny vznikají leukotrieny. Jsou rovněž mediátory zánětu, protože zvyšují cévní permeabilitu.<sup>9,11)</sup>

**Úrovně působení antiflogistik-** a) inhibitory cyklooxygenasy

b) inhibitory lipooxygenasy

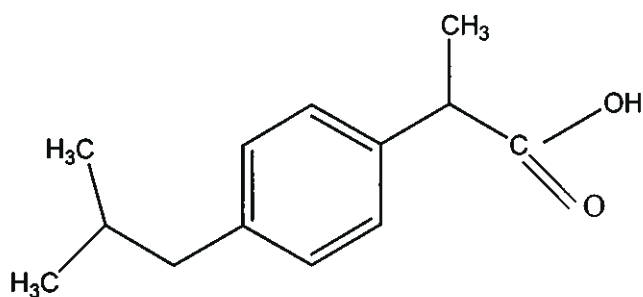
c) inhibitory obou typů enzymů

d) inhibitory uvolňování bradykininu

e) inhibitory uvolňování lysozomálních enzymů

d) inhibitory vzniku volných kyslíkových radikálů

## Ibuprofen



$C_{13}H_{18}O_2$

Mr = 206,28

CAS 15687-27-1

**Obrázek č.3:** (RS)-2-(4-isobutylphenyl) propionová kyselina<sup>6)</sup>

Charakteristika: Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, ethanolu, methanolu a dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů. Taje při teplotě 75-78 °C.<sup>6)</sup>

Ibuprofen je nesteroidní antiflogistikum patřící do skupiny profenů. Jakožto derivát kyseliny fenylpropionové má ibuprofen v dávce 2400 mg denně srovnatelný protizánětlivý účinek jako kyselina acetylsalicylová. Antiflogistické působení ibuprofenu je tedy dáno sníženým uvolňováním mediátorů zánětu z granulocytů, bazofilů a žírných buněk.<sup>9)</sup>

### Indikace:

Ibuprofen je indikován k léčbě zánětlivých a degenerativních chorob kloubů, páteře a mimokloubního revmatizmu. Jako analgetikum-antipyretikum se používá při horečnatých stavech a nemocech z nachlazení, dále při migréně, bolestech po operacích, bolestech zubů a bolestivé menstruaci. Doba nástupu analgetického účinku je půl hodiny, maximální účinek je dosažen po 2-4 hodinách. Antipyretický účinek trvá 4-8 hodin po aplikaci.<sup>10)</sup>

#### Nežádoucí účinky:

Ibuprofen vyvolává dráždění a krvácení gastrointestinálního traktu. Tento účinek lze snížit současným podáním ibuprofenu s jídlem. Dále byly popsány vyrážky, pruritus, závratě, tinnitus a pocit úzkosti. K závažným hematologickým účinkům patří agranulocytóza a aplastická anémie. Ibuprofen působí nefrotoxicky a může vyvolat akutní selhání ledvin. <sup>10)</sup>

#### Kontraindikace:

Ibuprofen je absolutně kontraindikován u nemocných s peptickým vředem, opatrnost je nutná u pacientů s jakýmkoliv gastrointestinálním onemocněním a u nemocných s porušenou funkcí ledvin a poruchou hemopoézy. <sup>10)</sup>

#### Topická aplikace ibuprofenu

Po aplikaci na kůži se ibuprofen dobře vstřebává do podkožních tkání. Pouze malá část léčiva proniká do systémové cirkulace. Maximální hladina ibuprofenu po topické dávce 250 mg v 5 g krému se pohybovala kolem hodnoty 100 ng/ml. <sup>10)</sup>

#### Indikace:

Ibuprofen v topické lékové formě se používá u místních projevů revmatického onemocnění zánětlivého původu, u bolestivých stavů při osteoartróze, při zánětech šlach a úponů, povrchových zánětech žil. Často se aplikuje na následky sportovních úrazů, jako jsou otoky a podvrtnutí kloubů, pohmožděniny a poranění měkkých částí kloubů. <sup>16)</sup>

#### Nežádoucí účinky:

Může se objevit svědění, pálení, zarudnutí kůže a kožní erupce. Při dlouhodobé aplikaci na větší povrch těla nelze vyloučit ani systémové nežádoucí účinky. <sup>10)</sup>

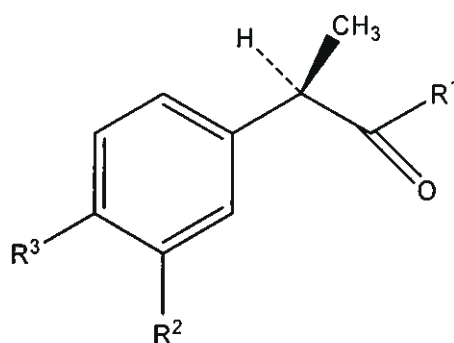
## 2.5 Nečistoty ibuprofenu<sup>6,12)</sup>

### 2.5.1 ČL 2002

Český lékopis 2002 udává tyto **nečistoty** substance ibuprofenu:

kvalifikované nečistoty: A, B, C, D, E

jiné detekovatelné nečistoty: F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R



**Obrázek č.4:** Obecný vzorec nečistot

**A:** R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup>=H

kyselina (2RS)-2-(3-isobutylfenyl)propanová

**B:** R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=[CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>

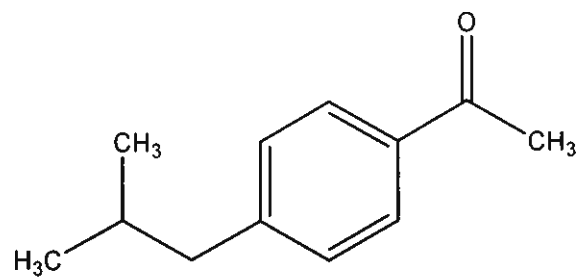
kyselina (2RS)-2-(4-butylfenyl)propanová

**C:** R<sup>1</sup>=NH<sub>2</sub>, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propanamid

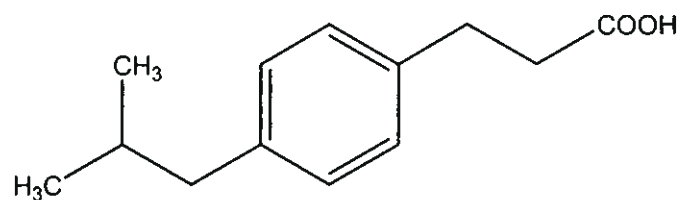
**D:** R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>

kyselina (2RS)-2-tolylpropanová



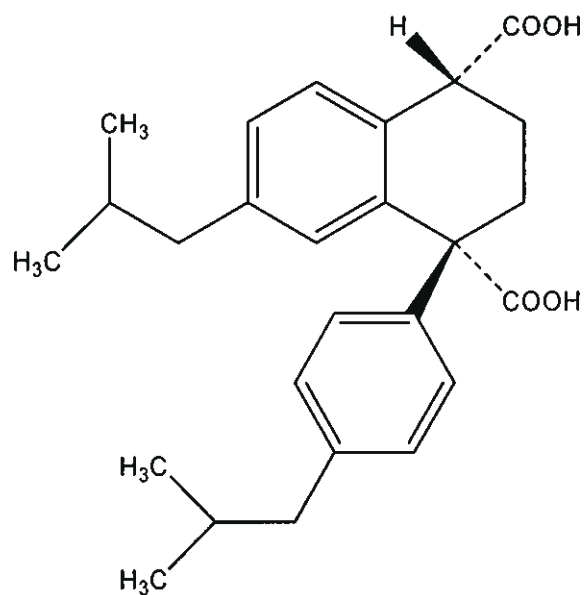
**Obrázek č.5:** nečistota **E**

**E:** 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on



**Obrázek č.6:** - nečistota **F**

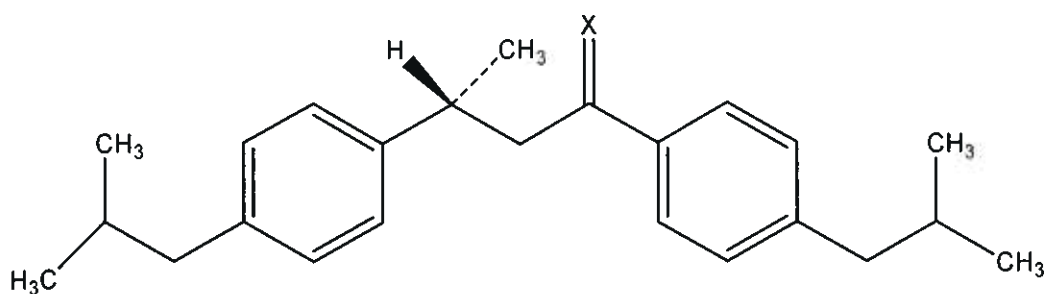
**F:** kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová



**Obrázek č.7:** nečistota **G**

**G:** kyselina cis-7-isobutyl-1-(4-isobutylfenyl)-1,2,3,4-tetrahydronaftalen-1,4-dikarboxylová

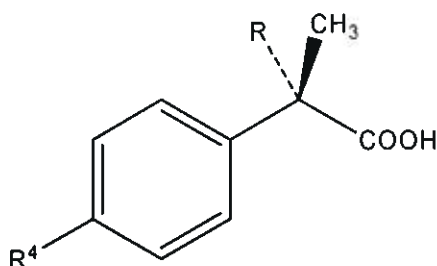




**Obrázek č.8:** nečistota **H**

**H:** X=O: (3RS)-1,3-bis(4-isobutylfenyl)butan-1-on

**I:** X=H<sub>2</sub>: (3RS)-1,3-bis(4-isobutylfenyl)butan



**Obrázek č.9:** nečistota **J**

**J:** R=H, R<sup>4</sup>=CO-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:

kyselina(2RS)-2-[4-(2-metylpropanoyl)fenyl]propanová

**K:** R=H, R<sup>4</sup>=CHO: kyselina(2RS)-2-(4-formylfenyl)propanová

**L:** R=H, R<sup>4</sup>=CHOH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:

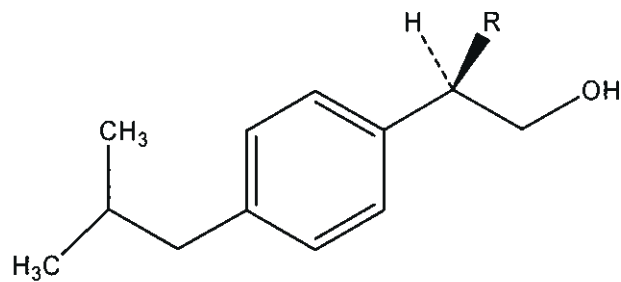
kyselina 2-[4-(1-hydroxy-2-methylpropyl)fenyl]propanová

**M:** R=OH, R<sup>4</sup>=CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:

kyselina(2RS)-2-hydroxy-2-(4-isobutylfenyl)propanová

**N:** R=H, R<sup>4</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>: kyselina(2RS)-2-(4-ethylfenyl)propanová

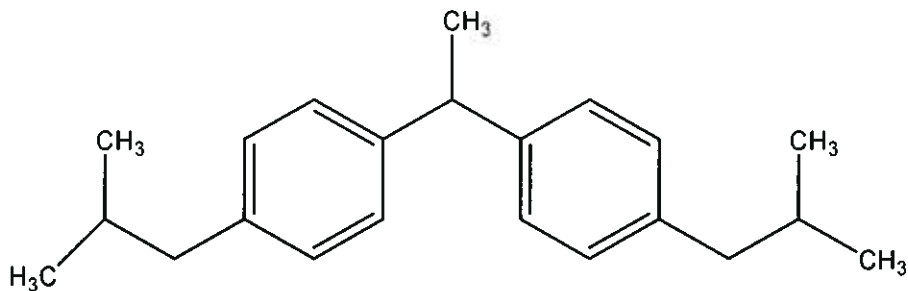
**O:** R=H, R<sup>4</sup>=CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>: kyselina 2-[4-(methylpropyl)fenyl]propanová



**Obrázek č.10:** nečistota P

**P:** R=CH<sub>3</sub>: (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propan-1-ol

**Q:** R=H: 2-(4-isobutylfenyl)ethan-1-ol



**Obrázek č.11:** nečistota R

**R:** 1,1-bis(4-isobutylfenyl)ethan

Jedna ze **Zkoušek na čistotu** je zkouška na **Příbuzné látky**:

**Příbuzné látky**- provádí se pomocí kapalinové chromatografie (jedná se o gradientní eluci):

**KOLONA**- rozměry- délka 0,15 m, vnitřní průměr 4,6 mm

-stacionární fáze- silikagel oktadecylsilanizovaný pro chromatografii R (5 μm)

**MOBILNÍ FÁZE**- mobilní fáze A-směs objemových dílů kyseliny fosforečné R, acetonitrilu R a vody R (0,5+340+600), nechá se ustálit a zředí se vodou R na 1000 objemových dílů.

Mobilní fáze B- acetonitril R.

**PRŮTOKOVÁ RYCHLOST**- 2 ml/min.

**DETEKCE**- spektrofotometrický detektor při 214 nm.

USTANOVENÍ ROVNOVÁHY-mobilní fázi A po dobu asi 45 min.

NÁSTRÍK- 20  $\mu$ l.

TEST ZPŮSOBILOSTI- poměr výšky píku k sedlu- nejméně 1,5 na chromatogramu porovnávacího roztoku *B* (standarty ibuprofenu a nečistoty **B**). kde  $h_p$  je výška píku odpovídající nečistotě **B** nad základní linií a  $h_v$  je výška nejnižšího bodu křivky píku nad základní linií oddělující tento pík od píku ibuprofenu.

LIMITY- nečistota **B**- nejvýše plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku *B* (0,3 %).

- jakákoliv další nečistota - nejvýše 0,3 násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku *A* (zkoušený roztok).

- celkový obsah všech nečistot kromě nečistoty **B**- nejvýše 0,7 násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku *A*. (0,7 %)

- zanedbatelnost píků- 0,05 násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku *A* (0,05 %).<sup>6)</sup>

**Nečistota F**- provede se chromatografie metodou normalizace. Součástí úpravy vzorků je jejich methylace pomocí methylačního roztoku.

KOLONA- materiál- tavený křemen.

- rozměry délka 25 m, vnitřní průměr 0,53 mm.

- stacionární fáze: makrogol 20000 R (tloušťka vrstvy 2  $\mu$ m).

NOSNÝ PLYN- helium pro chromatografii R.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 5,0 ml/min.

TEPLOTA- kolony- 150 °C.

- nástřikový prostor- 200 °C.

DETEKCE- plamenoionizační detektor.

LIMITY- nečistota **F**-nejvýše 0,1 %.<sup>6)</sup>

## 2.5.2 ČL 1997<sup>13)</sup>

V Českém lékopise 1997 můžeme nalézt pouze výčet chemických názvů nečistot **A**, **B**, **C**, **D** a **E**. O zbylých nečistotách se tento lékopis nezmiňuje.

**Porovnání Českého lékopisu 2002 a Českého lékopisu 1997-** Oba dva vycházejí z Evropského lékopisu (5. edice). Zkouška na čistotu na příbuzné látky u substance ibuprofenu se vyskytuje v obou monografiích (rozdíl je mezi gradientní elucí v ČL 2002 a elucí isokratickou v ČL 1997). Drobný rozdíl je v udání hodnoty zanedbatelnosti píků (0,05 v ČL 2002- 0,1 v ČL 1997) a v nastavení citlivosti systému (ČL 1997- po nástřiku stokrát naředěného porovnávacího roztoku *A* by výška hlavního píku měla být 70-90 % celého rozsahu stupnice zapisovače). V ČL 1997 se nenalézá stat' o analýze nečistoty **F**.

## 2.5.3 USP<sup>14)</sup>

V americkém lékopise se nachází zkouška na chromatografickou čistotu substance ibuprofenu (stanovení všech nečistot dohromady a samostatně nečistoty **E**) a dále na nečistotu **E** obsaženou v lékových formách- perorální suspenze a tablety. O nečistotě **F** se tento lékopis nezmiňuje.

Zkouška na chromatografickou čistotu u substance ibuprofenu- zkouška na nespecifikované nečistoty

KOLONA- 0,15m délka×4 mm šířka, náplň L<sub>1</sub> (C 18) o zrnitosti 5 μm, temperována na 30°C ±0,2 °C.

MOBILNÍ FÁZE- voda (upravena na pH 2,5 kyselinou fosforečnou):  
acetonitril 1340:680.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 2 ml/min.

DETEKCE- spektrofotometrický detektor při 214 nm.

VNITŘNÍ STANDARD- valerofenon.

LIMITY- ne více než 0,3% pro jednotlivou nečistotu a součet všech nečistot nesmí být větší než 1,0%.

Zkouška na množství 4-isobutylacetofenonu (**E**)-

MOBILNÍ FÁZE- 4,0 g chloroctové kyseliny v 400 ml vody, upravené hydroxidem amonným na pH 3,0. Pak se tento roztok smíchá s 600 ml acetonitrilu.

KOLONA- 0,25m×4,6mm, náplň L<sub>1</sub> (C 18)

DETEKCE- spektrofotometrický detektor při 254 nm.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 2 ml/min.

VNITŘNÍ STANDARD- valerofenon.

LIMITY- ne více než 0,1 % 4-isobutylacetofenonu (**E**).

### 2.5.4 BP 93<sup>15)</sup>

BP (British Pharmacopoeia) je velmi podobný Českému lékopisu 2002 a Evropskému lékopisu (5. edice). V článku o substanci ibuprofenu zmiňuje o určení nečistoty **B** (kyselina (2RS)-2-(4-butylfenyl)propanová). Doplněk britského lékopisu je doplněn o analýzu nečistot ibuprofenu v nejčastějších lékových formách- krému, gelu, perorální suspenzi a tabletách. Metoda na stanovení povoleného obsahu nečistoty **E** (4-isobutylacetofenon) je popsána pouze u perorálních suspenzí. V dalším díle doplňku je výčet nečistot doplněn o látky **A**, **C**, **D**. O nečistotě **F** se tento lékopis nezmiňuje.

Zkouška na příbuzné látky u substance ibuprofenu:

KOLONA- 0,15 m×4,6 mm, náplň (C18) o zrnitosti 5 μm.

MOBILNÍ FÁZE- směs objemových dílů kyseliny fosforečné, acetonitrilu a vody (0,5+340+600), nechá se ustálit a zředí se vodou R na 1000 objemových dílů.

DETEKCE- spektrofotometrický detektor při 214 nm.

LIMITY- ne více než 0,3% pro jednotlivou nečistotu a součet všech nečistot nesmí být větší než 0,7%.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 2 ml/min.

INJIKOVANÉ MNOŽSTVÍ VZORKU- 20 μl.

Zkouška na množství neč. **E** u perorálních suspenzí:

KOLONA- 30 cm×3,9 mm, náplň (C18) o zrnitosti 10 μm.

MOBILNÍ FÁZE- směs objemových dílů kyseliny fosforečné, acetonitrilu a vody (0,5+340+600), nechá se ustálit a zředí se vodou R na 1000 objemových dílů.

DETEKCE- spektrofotometrický detektor při 220 nm.

LIMITY- ne více než 0,3 % 4-isobutylacetofenonu (**E**).

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 2 ml/min

INJIKOVANÉ MNOŽSTVÍ VZORKU- 10  $\mu$ l

### 2.5.5 Rešerše

V práci Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments od kolektivu Gabriele Caviglioli, nalezneme popis stanovení současně nečistoty **B** i **E** pomocí dvou RP-HPLC (A a B) a GC-MS metod. Tyto metody byly odvozeny z monografií USP a Evropského lékopisu. O nečistotě **F** se nezmiňují.<sup>16)</sup>

V této studii bylo detekováno třináct degradačních produktů ibuprofenu z nichž sedm nebylo popsáno a nejsou samozřejmě ani v lékopise.

Jsou to: 1) kyselina hydratropová

2) 4-ethylbenzaldehyd

3) 4-(1-karboxyethyl)benzoová kyselina

4) 1-(4-isobutylfenyl)-1-ethanol

5) 1-isobutyl-4-vinylbenzen

6) 2-[4-(1-hydroxy-2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina

7) 4-isobutylfenol

#### RP-HPLC A

KOLONA-2 $\times$ 125 mm, náplň RP18.

DETEKCE- DAD při 214,240, 257 nm.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 0,25 ml/min.

MOBILNÍ FÁZE- mobilní fáze A- voda o pH 2,5 (upravena orthofosforečnou kyselinou).

mobilní fáze B- acetonitril.

VNITŘNÍ STANDARD- valerofenon.

## RP-HPLC B

KOLONA-3,9×300 mm

DETEKCE- DAD při 240, 257 nm

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 1,25 ml/min

MOBILNÍ FÁZE- metanol-amonium acetát (0,15 M), 60:940 V/V, o pH 4 (stabilizovaná octovou kyselinou)

VNITŘNÍ STANDARD- valerofenon<sup>16)</sup>

Další experimentální práce se zabývá stanovením ibuprofenu a nečistoty 4-isobutylacetofenonu pomocí isokratické kapalinové chromatografie v gelech, tabletách a sáčcích. Tato metoda je podle autorů rychlejší a mobilní fáze má lepší vlastnosti oproti USP a BP.<sup>17)</sup>

MOBILNÍ FÁZE-roztok kyseliny fosforečné (pH 3,2):acetonitril 50:50.

KOLONA- 150×3.0 mm, náplň C18.

PRŮTOKOVÁ RYCHLOST- 0,5 ml/min.

DETEKCE- spektrofotometrický DAD detektor při 190-360 nm.<sup>17)</sup>

## 2.6 Izolace ibuprofenu a nečistot z krému a gelů<sup>18,19,20)</sup>

Možnosti obecné úpravy vzorků pro HPLC analýzu jsou následující:

- 1) bez zvláštní úpravy, pouze mast rozpustíme ve vhodném rozpouštědle a nastříkujeme na kolonu; k účinnější separaci sledovaných látek od balastů je vhodné použít předklonky.
- 2) sledované látky je vhodné extrahovat vhodným extrakčním činidlem. V úvahu připadají dva postupy: buď extrahujeme přímo a po případné centrifugaci použijeme extrakt k vlastnímu stanovení (pokud analyzovaná látka nepodléhá změnám při vyšších teplotách než je běžná laboratorní, je možné extrahovat zahřátým činidlem), nebo nejdřív mast rozpustíme ve vhodném rozpouštědle (vodném nebo organickém) a danou látku pak extrahujeme do fáze s opačnou polaritou než mělo použité rozpouštědlo. Pro zvýšení extrakční účinnosti je vhodné upravit kyselost / zásaditost jednotlivých fází.
- 3) další způsob extrakce hodnocených látek nabízí extrakce na pevných fázích s využitím extrakčních kolonek.<sup>18)</sup>

Naše lékopisy ani USP se touto problematikou nezabývají. V doplňku britského lékopisu najdeme toto: množství krému/gelu obsahující 0,1 g ibuprofenu se má silně protřepat s 25 ml metanolu (10 min), roztok poté dekantovat a filtrovat.<sup>19)</sup>

Další možností je přímý nástřik krému (bez předchozí izolace ibuprofenu) do systému. Je ovšem třeba použít předkolonu. Omezení této možnosti spočívá v nutnosti promývat kolonu i předkolonu cca po deseti nástřicích tetrahydrofuranem a n-hexanem.<sup>20)</sup>



### 3. CÍL PRÁCE

Rigorozní práce se zabývá hodnocením vybraných nečistot ibuprofenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jsou to nečistoty: **B**-kyselina (2*RS*)-2-(4-butylfenyl)propanová, **E**-1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on a **F**-kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová.

Tato rigorozní práce měla za cíl:

- 1) Analyzovat vybrané nečistoty (**B**, **E**, **F**) substance ibuprofenu
- 2) Stanovení nečistot ve vzorku krému

## **4. PRAKTICKÉ PROVEDENÍ**

## 4.1 Materiál a pomůcky

### **přístroje:**

kapalinový chromatograf Hewlett Packard série HP 1100, Waldbronn, Německo  
programovací jednotka Solvent delivery systém SP 8700, Spectra-Physics, St. Clara, CA, USA  
UV detektor Hewlett Packard 1050 series, Waldbronn, Německo  
dávkovací zařízení Rheodyne s 20  $\mu$ l smyčkou, Rheodyne, Cotati, CA, USA  
PC se softwarem- CSW, Data Apex s.r.o., Praha, ČR  
analytické váhy, AND, Japonsko, Sartorius analytic, NSR  
centrifuga T 51, Zentrifugbau, Angelsdorf, NDR  
elektromagnetická míchačka MM 2A, Laboratorní přístroje, Praha, ČR  
ultrazvuková kompaktní čistička K 10, Kraintek s.r.o., Nové Zámky, Slovensko

### **chromatografické kolony:**

chromatografická kolona- 0,15m $\times$ 3 mm, zrnitost- 7  $\mu$ m  
náplň- C18, Tessek Ltd., Praha, ČR  
chromatografická skleněná kolona- 0,125m $\times$ 4 mm, zrnitost- 5  $\mu$ m  
náplň- C18, Merck, Darmstadt, NSR

### **léčiva a chemikálie:**

ibuprofen- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA  
ibuprofen impurity **B** CRS (0,06 % roztok m/V v acetonitrilu)– Council of Europe, European pharmacopoeia, Strasbourg, Francie  
4-isobutylacetofenon 98 %- Lancaster, Eastgate, Velká Británie  
ibuprofen impurity **F** CRS- Council of Europe European pharmacopoeia, Strasbourg, Francie  
methylparaben- Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko  
propylparaben- Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko  
acetonitril p.a.- Lachema a.s., Neratovice, ČR  
kyselina *o*-fosforečná 85% p.a.- Lachema a.s., Neratovice, ČR  
hydroxid sodný p.a.- Lachema a.s., Neratovice, ČR

destilovaná voda

### **Pomůcky**

mikrostríkačky 25  $\mu$ l a 50  $\mu$ l - Hamilton, Švýcarsko

dělené pipety

balónek k pipetování

kádinky a odměrné baňky

odměrné válce

odsávací baňka

centrifugační zkumavky a zkumavky

## 4.2 Chromatografické podmínky analýzy

### 1) Izokratická eluce <sup>13)</sup>

Byly použity kolony-a) 0,15m×3 mm, zrnitost- 7 μm, náplň- silikagel C 18

b) 0,125m×4 mm, zrnitost- 5 μm, náplň- silikagel C 18

Použitá mobilní fáze byla- voda-acetonitril-kyselina fosforečná 85% v poměru 240- 136- 0,2.

Průtoková rychlost byla nastavena na 2,0 či 1,0 ml/min.

Detekoval jsem pomocí spektrofotometrického detektoru při vlnové délce 214 nm.

Nastříkoval jsem 20 μl připraveného vzorku.

Rovnováhu jsem ustavoval mobilní fází po dobu asi 45 min.

### 2) Gradientní eluce <sup>6, 12)</sup>

Byly použity kolony-a) 0,15m×3 mm, zrnitost- 7 μm, náplň- silikagel C 18

b) 0,125m×4 mm, zrnitost- 5 μm, náplň- silikagel C 18

Mobilní fáze byly:

**A:** směs vody- acetonitrilu-kyseliny fosforečné 85% v poměru 600-340-0,5 (v/v/v).

**B:** acetonitril

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B (v/v)
0-25	100	0
25-55	100→15	0→85
55-70	15	85
70-75	15→100	85→0

**Tab. č. 2:** Časový postup analýzy

Průtoková rychlost byla 2,0 ml/min.

Spektrofotometrický detektor byl nastaven na vlnovou délku 214 nm.

Nastříkovaný objem připraveného vzorku byl 20  $\mu$ l.

Rovnováhu jsem ustavoval mobilní fází A po dobu asi 45 min.

Mobilní fáze jsem před použitím přefiltroval přes fritu pomocí vodní vývěvy. K odplyňování mobilní fáze docházelo v degaséru, který byl součástí HP 1100. Při použití HPLC sestavy SP 8700 byla mobilní fáze odplyněna ultrazvukem.

Pro kvantitativní analýzu vzorků byla použita metoda vnějšího standardu (viz. kapitola 4.3).

## 4.3 Příprava roztoku vzorku a vnějšího standardu

### Příprava roztoku vzorku krému

Přesně asi 0,5 g krému jsem v centrifugační zkumavce alkalizoval 0,05 ml NaOH (1 mol/l), přidal jsem 2 ml acetonitrilu a zahříval 10 minut na vodní lázni 60° C teplé. Dal jsem na 10 min do mrazáku a poté opět zahříval 10 minut na vodní lázni 60° C teplé. Po 5 minutách třepání a následné 10 minutové centrifugaci jsem acetonitril odlil do zkumavky. Ke zbytku krému v centrifugační zkumavce jsem přidal nové 2 ml acetonitrilu a 2 minuty jsem zkumavku vystavil působení ultrazvuku. Poté jsem 2 ml prve odlité přilil zpět do centrifugační zkumavky a zkumavku, do níž byl předtím odlit acetonitril, jsem vypláchnul 2 x 1 ml acetonitrilu a celý objem (6 ml) jsem zcentrifugoval. Do 5,0 ml odměrné baňky jsem odpipetoval 2,4 ml supernatantu, doplnil mobilní fází po značku a zcentrifugoval.

### Příprava roztoku vnějšího standardu

20 mg ibuprofenu jsem rozpustil ve 2 ml acetonitrilu, přidal jsem 100 µl 0,06 % m/V roztoku neč. B v acetonitrilu. Poté jsem přidal 100 µl roztoku neč. E (roztok o koncentraci 0,6 mg neč. E na 1 ml acetonitrilu) a zředil mobilní fází na 10,0 ml.



## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1 Analýza vybraných nečistot v substanci ibuprofenu

V ČL 2002 (odvozen od Evropského lékopisu) jsou nečistoty substance ibuprofenu rozděleny na nečistoty kvalifikované (A, B, C, D, E) a nečistoty detekovatelné (F až R). Do této rigorózní práce byly vybrány nečistoty **B**, **E**, **F**. Nečistota **B**, která vzniká při syntéze ibuprofenu, se analyzuje v ČL 1997 pomocí isokratické eluce, ale v ČL 2002 se využívá eluce gradientní. O nečistotě **F**, která také vzniká při syntéze ibuprofenu, nalezneme stat' v ČL 2002. Zkouška na čistotu se provádí pomocí plynové chromatografie. O nečistotě **E** víme, že má toxický efekt na lidský organismus (neurotoxicita) a že vzniká jako rozkladný produkt ibuprofenu. Detekuje se stejně jako neč. **B**. Viz. kap. č. 2.5.

### 5.1.1 Hodnocení vybraných nečistot v substanci

Příprava vzorku nečistot **B**, **E**, **F** s ibuprofenem- 20 mg substance ibuprofenu, 100  $\mu$ l 0,06 % m/V roztoku nečistoty **B** v acetonitrilu, 100  $\mu$ l nečistoty **E** (roztok o koncentraci 0,6 mg nečistoty **E** na 1 ml acetonitrilu), 100  $\mu$ l nečistoty **F** (limitní koncentrace v lékopisu byla 0,1 % = 2  $\mu$ g/ml, proto tento roztok obsahoval 20  $\mu$ g látky na 100  $\mu$ l mobilní fáze) a vše jsem naředil na 10,0 ml. Výsledné koncentrace byly: ibuprofen- 2 mg/ml

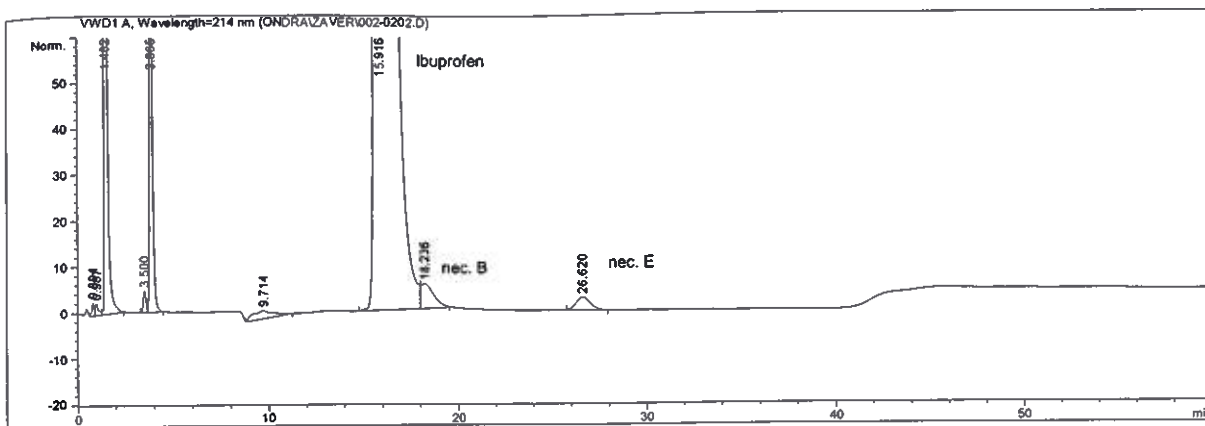
nečistota **B**- 6  $\mu$ g/ml

nečistota **E**- 6  $\mu$ g/ml

nečistota **F**- 2  $\mu$ g/ml

Viz. obr. č. 12.

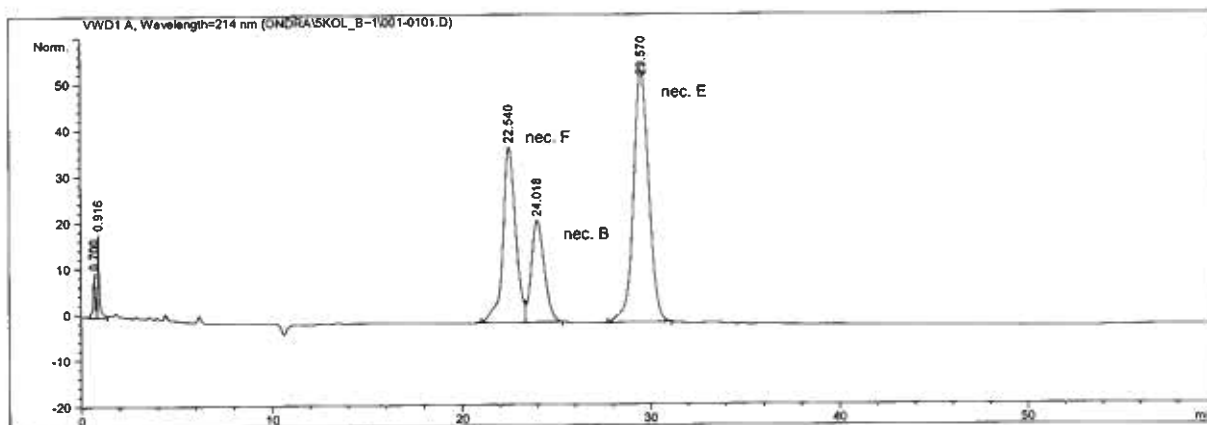
Tyto koncentrace nečistot odpovídají limitním koncentracím nečistot uvedených v ČL 2002. Pro nečistoty **B**, **E** je to 0,3 % a pro nečistotu **F** 0,1 %.



**Obrázek č.12:** Záznam ibuprofenu a nečistot **B, E, F** (a parabenů).

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2.

Pro další analýzu jsem zvolil průtok 2 ml/min použil kolonu se zrnitostí 5  $\mu\text{m}$  a upravil koncentrace nečistot **B, E, F** a ibuprofenu na 60  $\mu\text{g/ml}$  (viz. obr. č. 13).

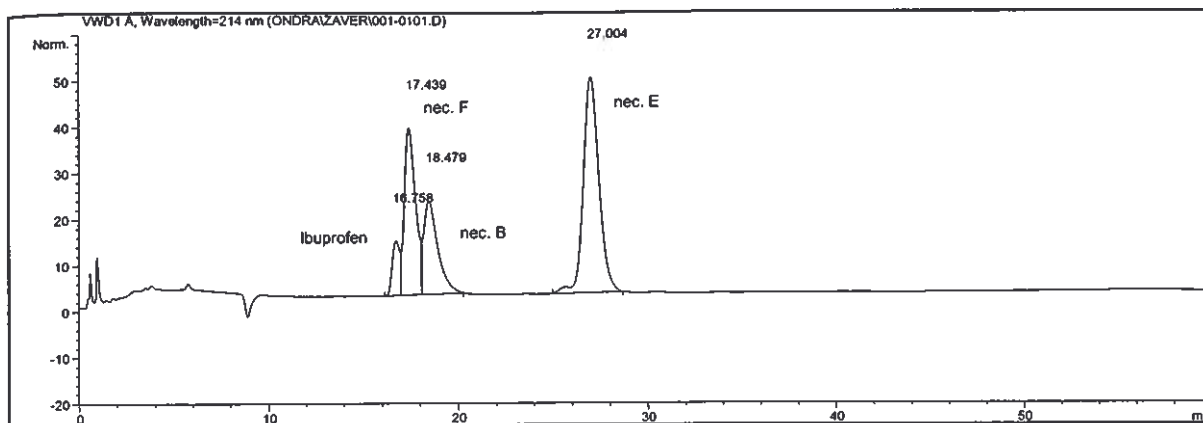


**Obrázek č.13:** Záznam nečistot **B, E, F**

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2.

Nečistoty **B, E, F** se dělí dostatečně.

Při dalším nástřiku jsem přidal substanci ibuprofenu o koncentraci 60  $\mu\text{m}/\text{ml}$  (oproti koncentraci v ČL 2002- 2 mg/ml)



**Obrázek č.14:** Záznam ibuprofenu a nečistot **B, E, F**

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2.

Na tomto záznamu, kde je nižší koncentrace ibuprofenu a 10-krát vyšší koncentrace nečistot **B,E** a 30-krát vyšší koncentrace nečistoty **F**, není rozlišení píků ibuprofenu a neč. **F** dostatečné.

**ZÁVĚR:** Za daných chromatografických podmínek (viz. kap. 4.2, kolona o zrnitosti 7 nebo 5  $\mu\text{m}$  a průtoku 2 ml/min) není současná analýza ibuprofenu o koncentraci 2 mg/ml a nečistot **B, E, F** o limitních koncentracích možná.

## 5.1.2 Studie vlivu změn chromatografických podmínek

Analyzoval jsem substanci ibuprofenu a jeho nečistoty B, E, F.

Měněné podmínky byly:

- 1) složení mobilní fáze- metoda (isokratická nebo gradientní)
- 2) zrnitost náplně kolony (5  $\mu\text{m}$  nebo 7  $\mu\text{m}$  a jiná délka kolon)
- 3) průtok mobilní fáze
- 4) změna přístroje (Hewlett Packard série HP 1100 nebo HPLC sestava SP 8700)
- 5) UV spektra

### 5.1.2.1 – gradient

Použité podmínky analýzy jsou stejné jako v ČL 2002 (resp. PhEur. 5).

Metoda- gradientní eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu$ m

Čas analýzy- 75 minut

Retenční časy- neč. F- 24,0 min

neč. B- 25,6 min

neč. E- 29,7 min

Koncentrace- neč. F- 60  $\mu$ g/ml

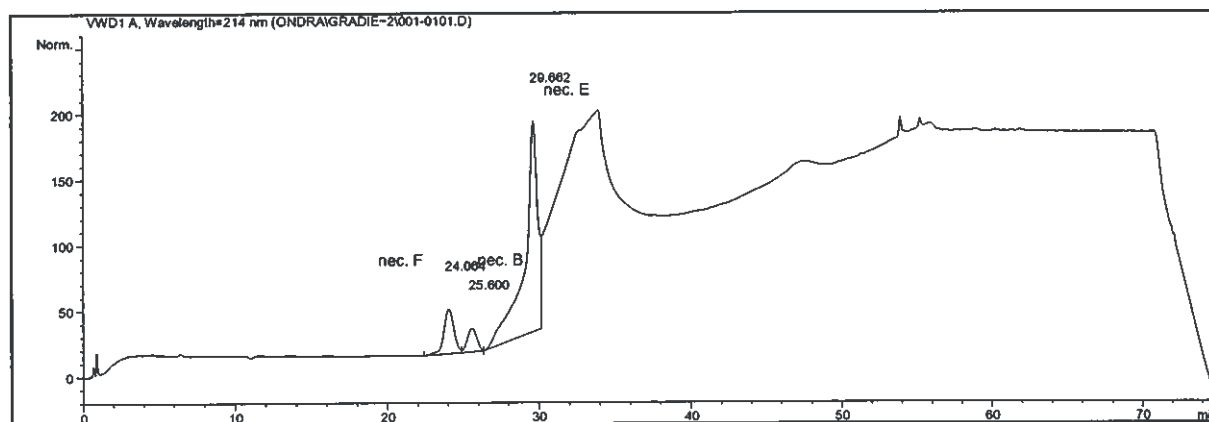
neč. B- 60  $\mu$ g/ml

neč. E- 60  $\mu$ g/ml

Viz. obr. č. 15.

Pro lepší rozlišení píků jsem zvolil vyšší koncentrace nečistot B,E, F.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 2).



**Obrázek č.15:** Záznam nečistot B, E, F.

CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY- gradientní eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 2).

Metoda- gradientní eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu$ m

Čas analýzy- 75 minut

Retenční časy- ibuprofen- 21,6 min

neč. F- 22,4 min

neč. B- 23,8 min

neč. E- 28,6 min

Koncentrace- ibuprofen- 60  $\mu$ g/ml

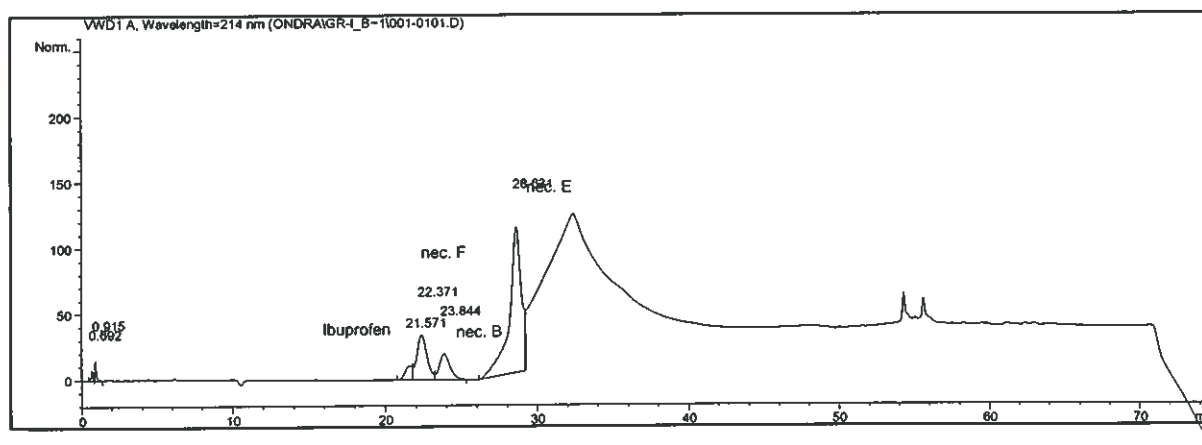
neč. F- 60  $\mu$ g/ml

neč. B- 60  $\mu$ g/ml

neč. E- 60  $\mu$ g/ml

Viz. obr. č. 16.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 2).



**Obrázek č.16:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

**CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY-** gradientní eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 2).

Metoda- gradientní eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu\text{m}$

Čas analýzy- 75 minut

Retenční časy- ibuprofen- 21,4 min

neč. F- překrytá píkem ibuprofenu

neč. B- 24,4 min

neč. E- 32,5 min

Koncentrace- ibuprofen- 2 mg/ml

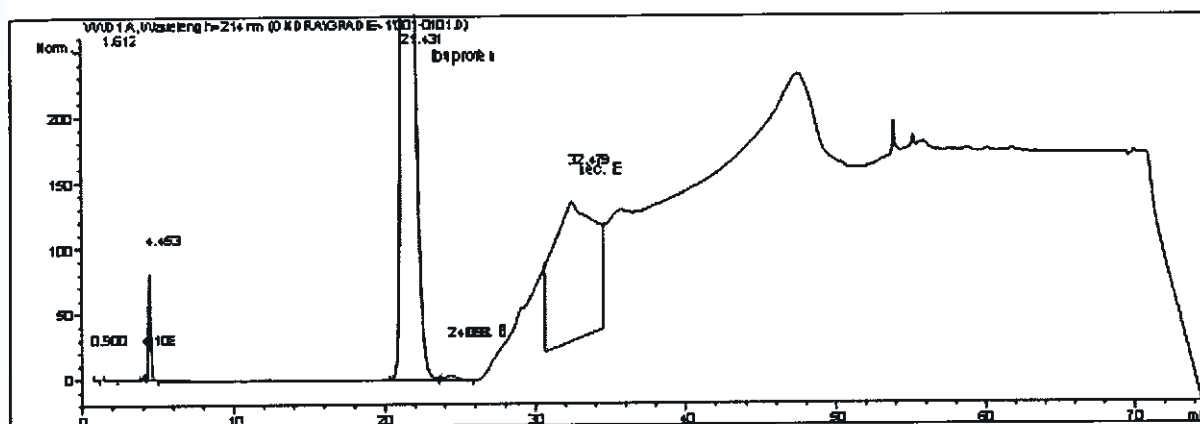
neč. F- 60  $\mu\text{g/ml}$

neč. B- 60  $\mu\text{g/ml}$

neč. E- 60  $\mu\text{g/ml}$

Viz. obr. č. 17.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 2).



**Obrázek č.17:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- gradientní eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 2).

**Závěr:** Gradientní eluce nijak nezlepšila separaci ibuprofenu a jeho nečistot. Ibuprofen a nečistotu F lze separovat pouze při koncentraci 60  $\mu\text{g/ml}$ .



### 5.1.2.2 – zrnitost náplně kolony (7 $\mu\text{m}$ a 5 $\mu\text{m}$ ) a délka kolony

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu\text{m}$

Délka kolony- 0,125m

Čas analýzy- 60 minut

U této analýzy jsem zvolil vyšší koncentrace nečistot, aby došlo k oddělení píku neč. **F** a neč. **B**.

Retenční časy- neč. **F** - 22,5 min

neč. **B**- 24,0 min

neč. **E**- 29,6 min

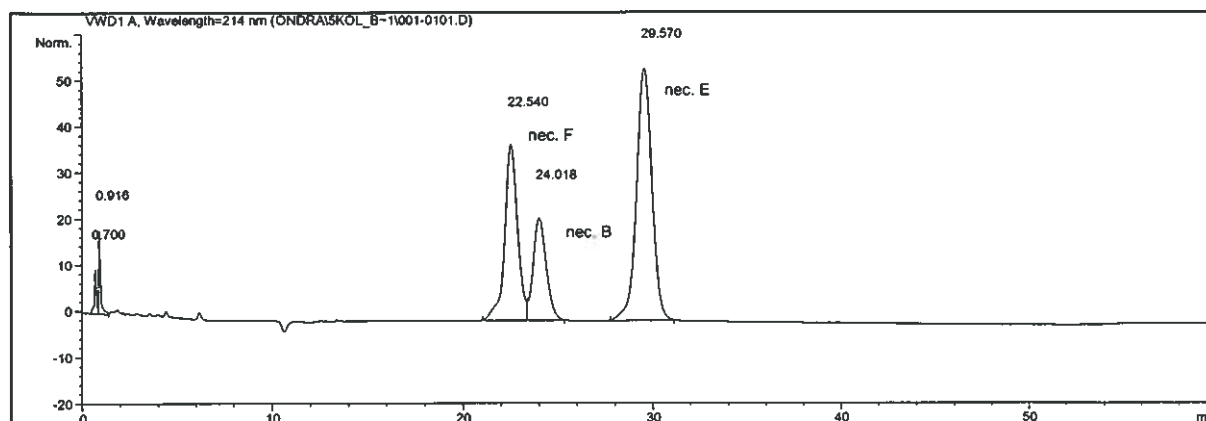
Koncentrace- neč. **F** - 60  $\mu\text{g/ml}$

neč. **B**- 60  $\mu\text{g/ml}$

neč. **E**- 60  $\mu\text{g/ml}$

Viz. obr. č. 18.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 1).



**Obrázek č.18:** Záznam nečistot **B**, **E**, **F**.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu$ m

Délka kolony- 0,125m

Čas analýzy- 60 minut

Retenční časy- ibuprofen- 22,2 min

neč. F- 23,1 min

neč. B- 24,6 min

neč. E- 30,3 min

Koncentrace- ibuprofen- 60  $\mu$ g/ml

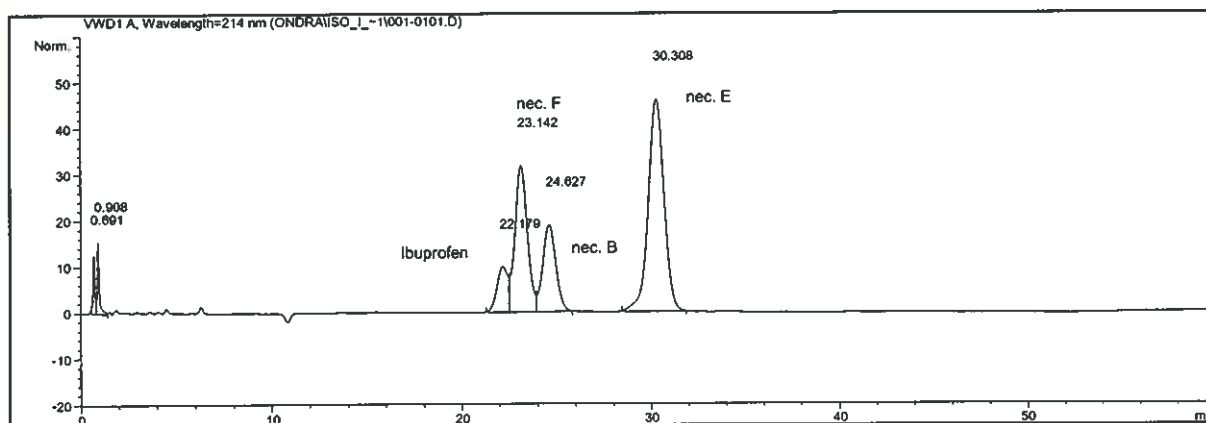
neč. F- 60  $\mu$ g/ml

neč. B- 60  $\mu$ g/ml

neč. E- 60  $\mu$ g/ml

Viz. obr. č. 19.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 1).



**Obrázek č.19:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 1).

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 5  $\mu\text{m}$

Délka kolony- 0,125m

Čas analýzy- 60 minut

Retenční časy- ibuprofen- 22,0 min

neč. B- 25,1 min

neč. E- 30,7 min

neč. F- interferuje s píkem ibuprofenu

Koncentrace- ibuprofen- 2 mg/ml

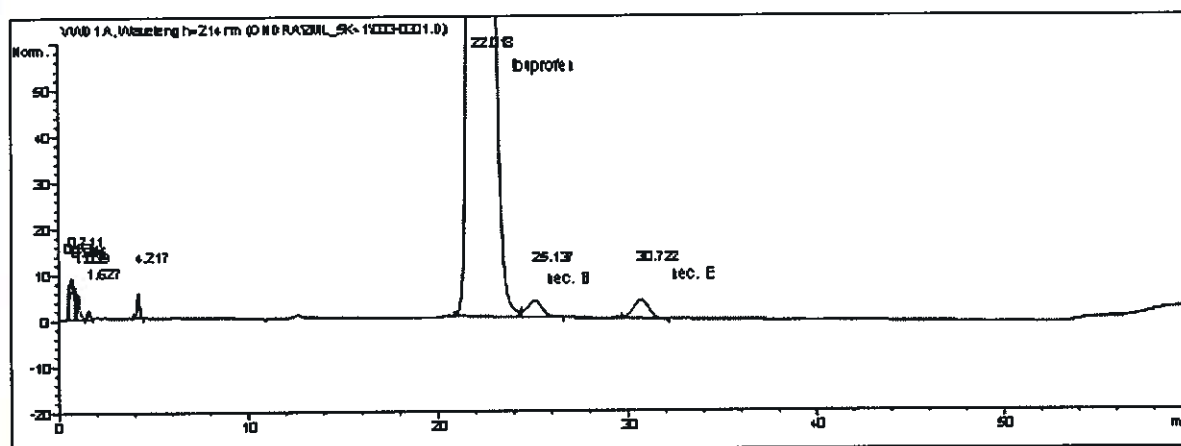
neč. B- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. E- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. F- 6  $\mu\text{g/ml}$

Viz. obr. č. 20.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 1).



**Obrázek č.20:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 5  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

Z tohoto záznamu je patrné, že při zvýšení koncentrace ibuprofenu (z 60  $\mu\text{g/ml}$  na 2 mg/ml) došlo k překrytí píku neč. F.

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 2ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 7  $\mu$ m

Délka kolony- 0,15m

Čas analýzy- 60 minut

Retenční časy- ibuprofen- 16,8 min

neč. F- 17,4 min

neč. B- 18,5 min

neč. E- 27,0 min

Koncentrace- ibuprofen- 60  $\mu$ g/ml

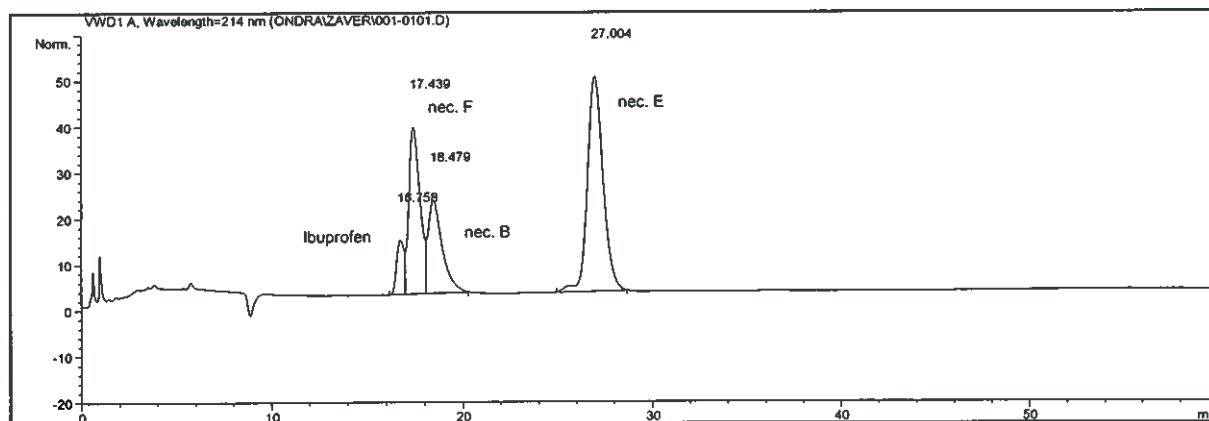
neč. F- 60  $\mu$ g/ml

neč. B- 60  $\mu$ g/ml

neč. E- 60  $\mu$ g/ml

Viz. obr. č. 21.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 1).



**Obrázek č.21:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 1).

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 2 ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 7  $\mu\text{m}$

Čas analýzy- 60 minut

Retenční časy- ibuprofen- 15,9 min

neč. F- překryta píkem ibuprofenu

neč. B- 18,2 min

neč. E- 26,6 min

Koncentrace- ibuprofen- 2 mg/ml

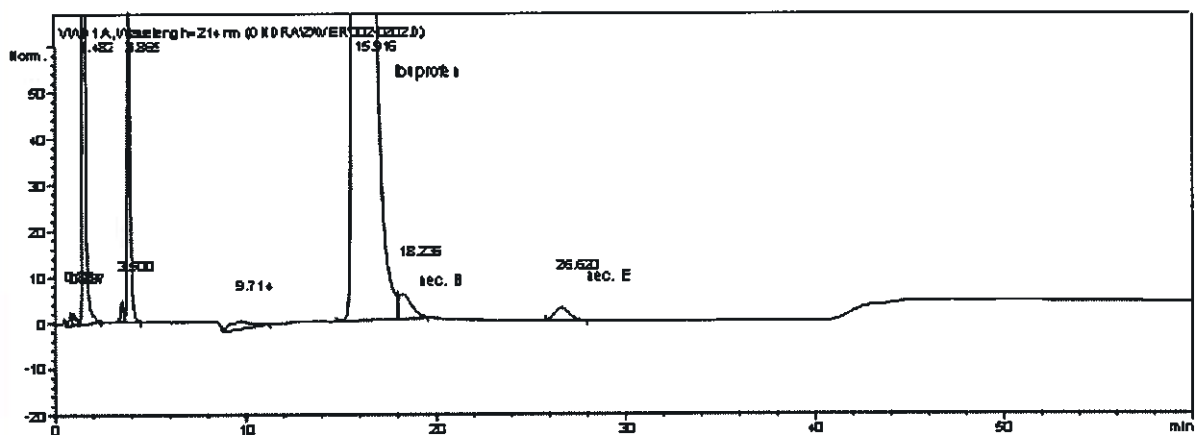
neč. F- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. B- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. E- 2  $\mu\text{g/ml}$

Viz. obr. č. 22.

Ostatní chromatografické podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2 1).



**Obrázek č.22:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 2 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

Při navýšení koncentrace ibuprofenu na lékopisnou koncentraci (2 mg/ml) došlo k očekávanému překryvu píku neč. F píkem ibuprofenu.

**Závěr:** Zrnitost náplně kolon (5 a 7  $\mu\text{m}$ ) neovlivnila separaci ibuprofenu a jeho hodnocených nečistot.

### 5.1.2.3 – změna průtoku mobilní fáze

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 1 ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 7  $\mu\text{m}$

Čas analýzy- 100 minut

Retenční časy- neč. F- 29 min

neč. B- 18,2 min

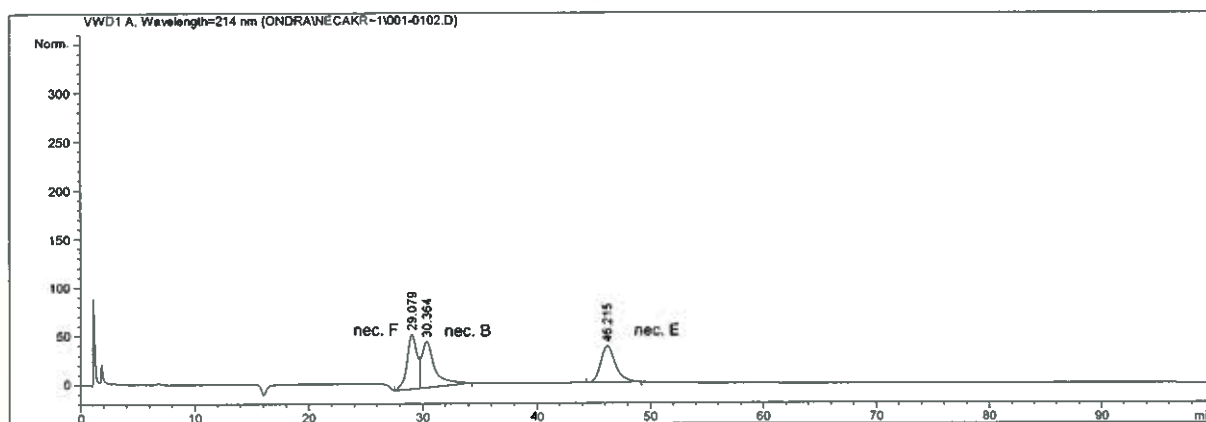
neč. E- 26,6 min

Koncentrace- neč. F- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. B- 6  $\mu\text{g/ml}$

neč. E- 6  $\mu\text{g/ml}$

Viz. obr. č. 23.



**Obrázek č.23:** Záznam ibuprofenu a nečistot B, E, F.

CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2.

**Závěr:** Doba analýzy se prodloužila a nedošlo k lepšímu oddělení píků.

### 5.1.2.4 – změna přístroje

Vzorky jsem analyzoval jak za použití přístroje Hewlett Packard série HP 1100 (s autosamplerem, vše ovládáno počítačem), tak i na HPLC sestavě SP 8700, kde byl vzorek dávkován smyčkou a CSW systém použit k vyhodnocení chromatogramů. Na obou systémech jsem analyzoval vzorek s parabenem, ibuprofenem (2 mg/ml) a nečistotami B,E (6 µg/ml).

Metoda- isokratická eluce

Průtok- 1 ml/min

Stacionární fáze- C18, zrnitost- 7 µm

Retenční časy- ibuprofen- 31 a 33 min

neč. F- překrytá píkem ibuprofenu

neč. B- cca 36 a 37 min

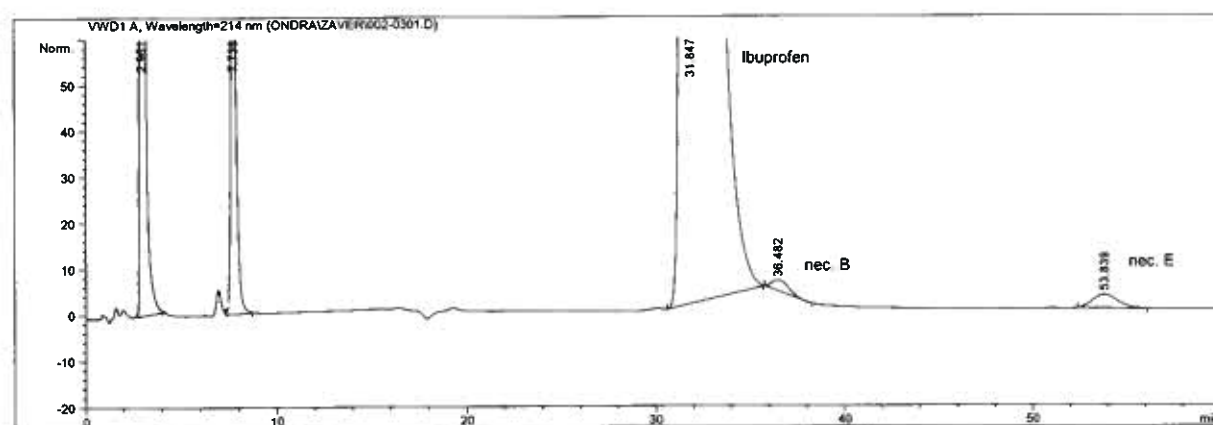
neč. E- cca 53 a 55 min

Koncentrace- ibuprofen- 2 mg/ml

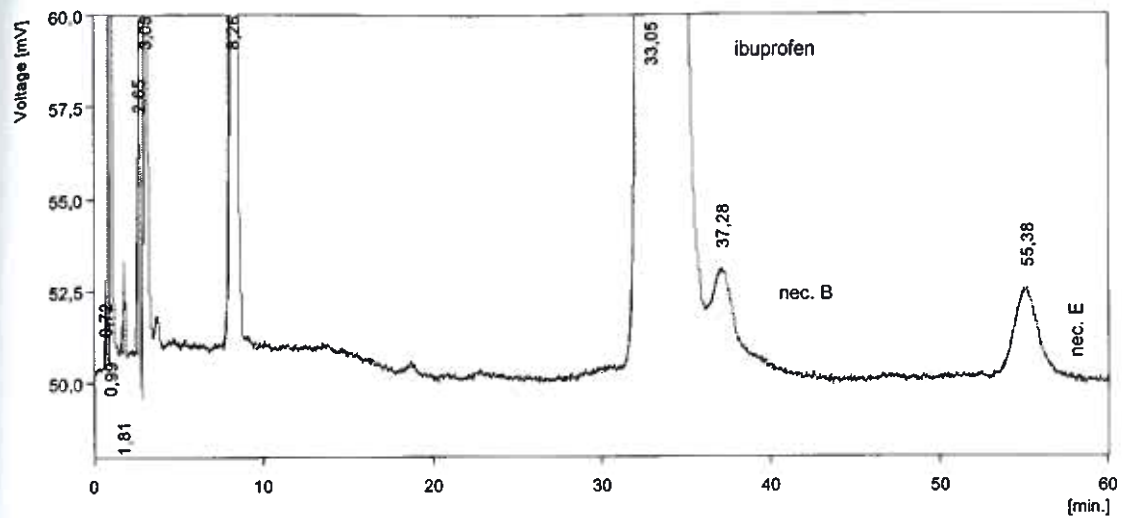
neč. F- 6 µg/ml

neč. B- 6 µg/ml

neč. E- 6 µg/ml



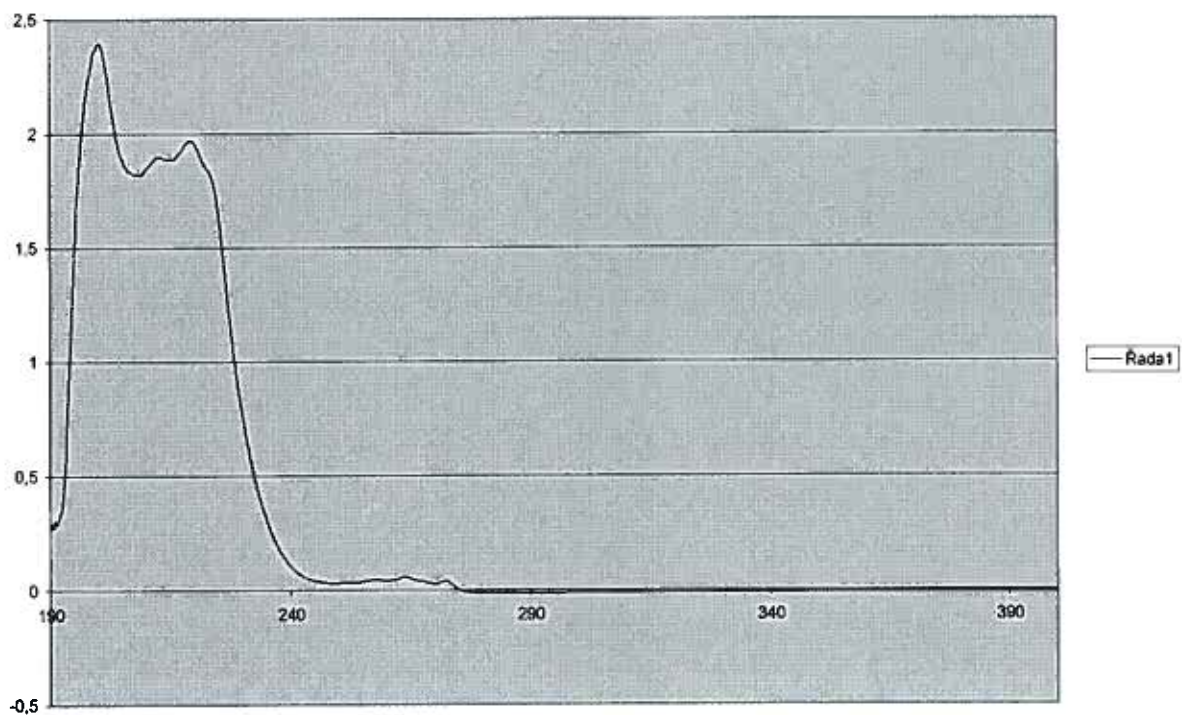
**Obrázek č.24:** Hewlett Packard série HP 1100



**Obrázek č.25:** SP 8700

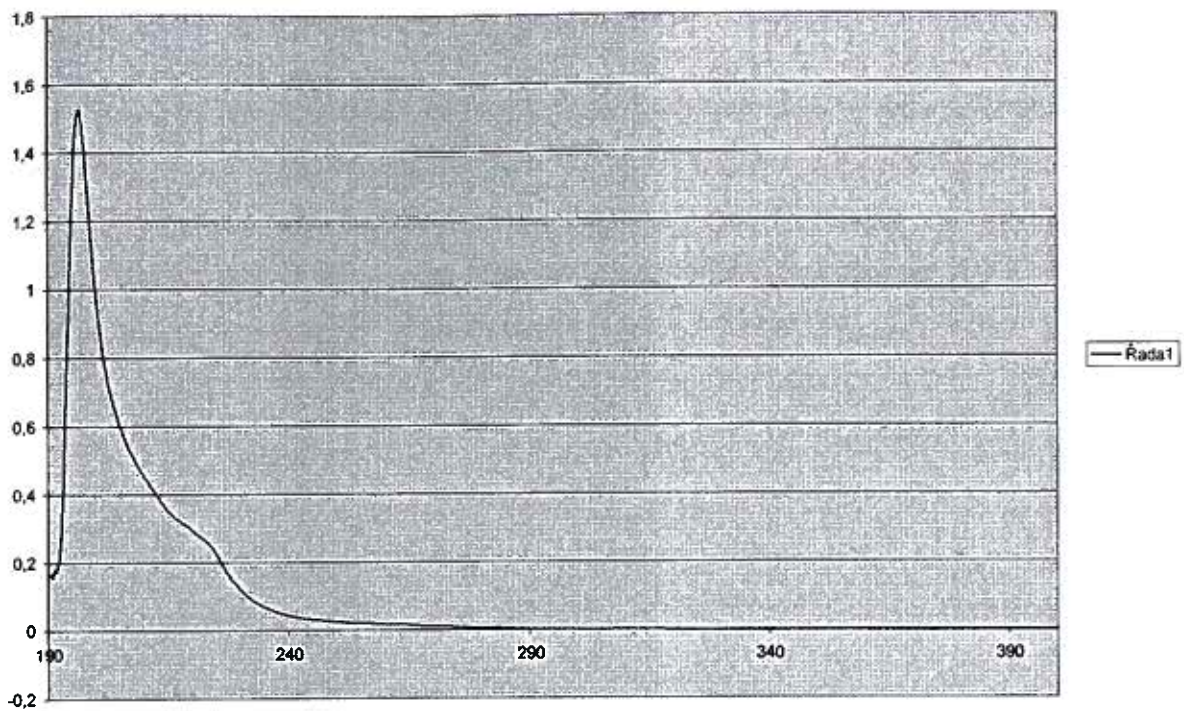
### 5.1.2.5 – UV spektra

Spektrofotometricky jsem proměřil vzorky substance ibuprofenu a nečistot **B, E, F**.

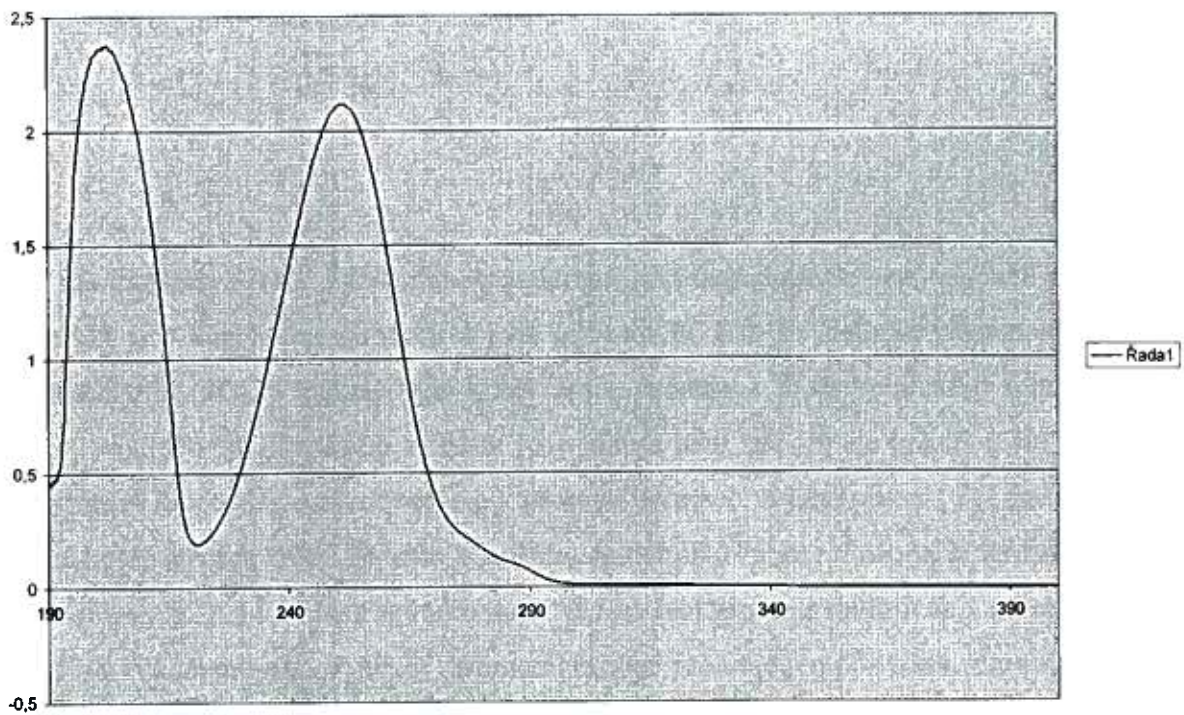


**Obrázek č.26:** záznam UV spektra ibuprofenu

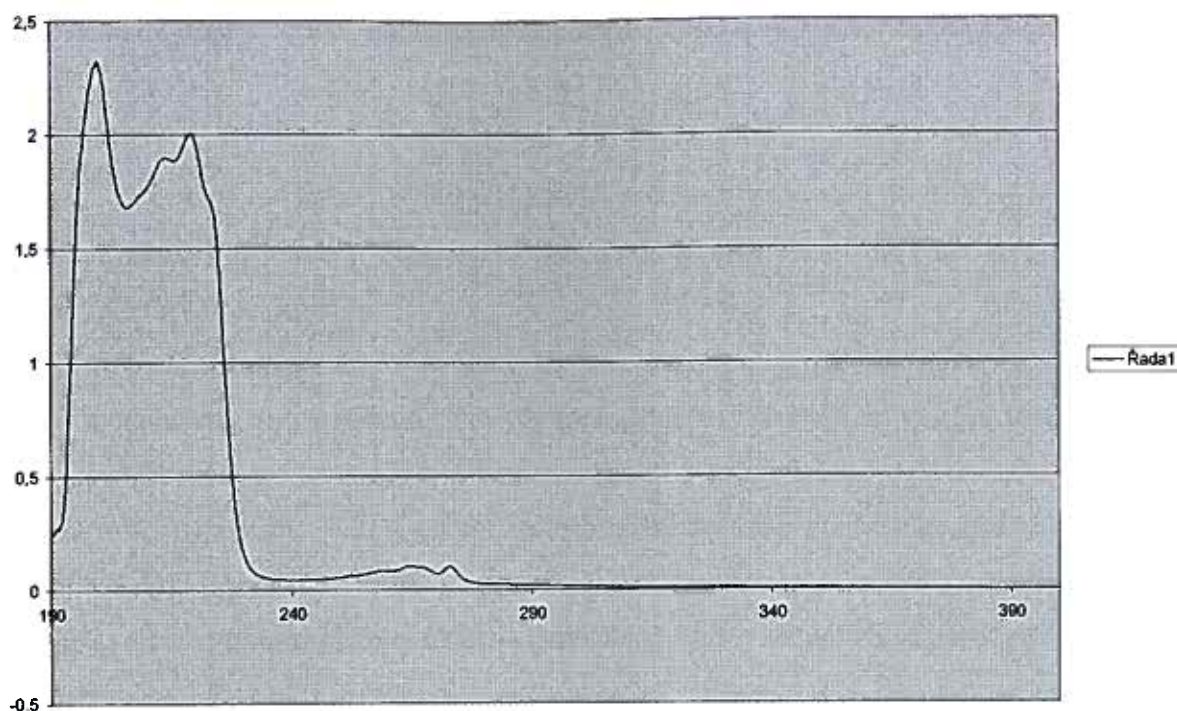




**Obrázek č.27:** záznam UV spektra neč. B



**Obrázek č.28:** záznam UV spektra neč. E



**Obrázek č.29:** záznam UV spektra neč. F

Z uvedených záznamů vyplývá, že lékopisem používaná vlnová délka (214 nm) je pro detekci nejvhodnější.

**ZÁVĚR kapitoly 5.1.2.:** Měněním chromatografických podmínek jsem se snažil najít ideální podmínky pro analýzu ibuprofenu a jeho nečistot B, E a F. Nejprve jsem použil metodu gradientní (ČL 2002)- pokud byla koncentrace substance ibuprofenu nižší (cca 60  $\mu\text{g/ml}$  místo 2 mg/ml), tak docházelo k dělení jeho píku a píku neč. F, ale pokud došlo ke zvýšení koncentrace ibuprofenu, tak docházelo k překrytí píku neč. F jeho píkem. Při změně zmitosti náplně kolon a délce kolon nedošlo k lepšímu dělení píků- pouze došlo ke změnám retenčních časů. Ani při změně rychlosti průtoku mobilní fáze (snížení ze 2 ml/min na 1 ml/min) nedošlo k lepšímu rozdělení píků. Použité chromatografické přístroje jen potvrdily robustnost metody a též skutečnost, že při použití chromatografických podmínek lze hodnotit ibuprofen a pouze nečistoty B a E, nečistota F je překryta píkem ibuprofenu. Další změny chromatografických podmínek by byly nad rámec této práce.

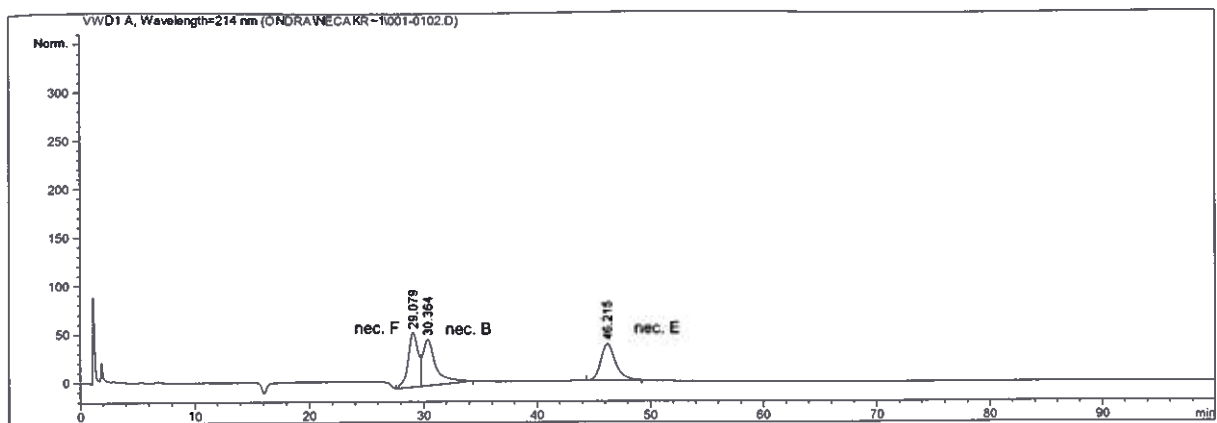
## 5.2 Stanovení nečistot ibuprofenu ve vzorku krému

Ve vzorcích krému byla jako hlavní nečistota sledována především neč. E, která vzniká rozkladnými procesy. Současně s nečistotou E byla sledována i nečistoty B, která je hodnotitelná z téhož záznamu.

Pro kvantitativní stanovení nečistot B, E ve vzorcích krémů („novější“ a „starší“) jsem použil metodu vnějšího standardu. Pro tvorbu kalibrační křivky jsem každou izolaci placebo krému s přídavkem nečistot a ibuprofenu nastříknul 3-krát. Nečistoty jsem extrahoval podle návodu uvedeným v kap. 4.3. K určení kalibrační křivky jsem použil jako 100 % koncentraci nečistot B, E 6 µg/ml (tzn. přidal jsem 125 µl každé nečistoty). Ostatní koncentrace (52, 76, 124, 148) jsem vypočítal přímou úměrou (viz. tab. č.3). Ke každé izolaci jsem přidával 25 mg ibuprofenu.

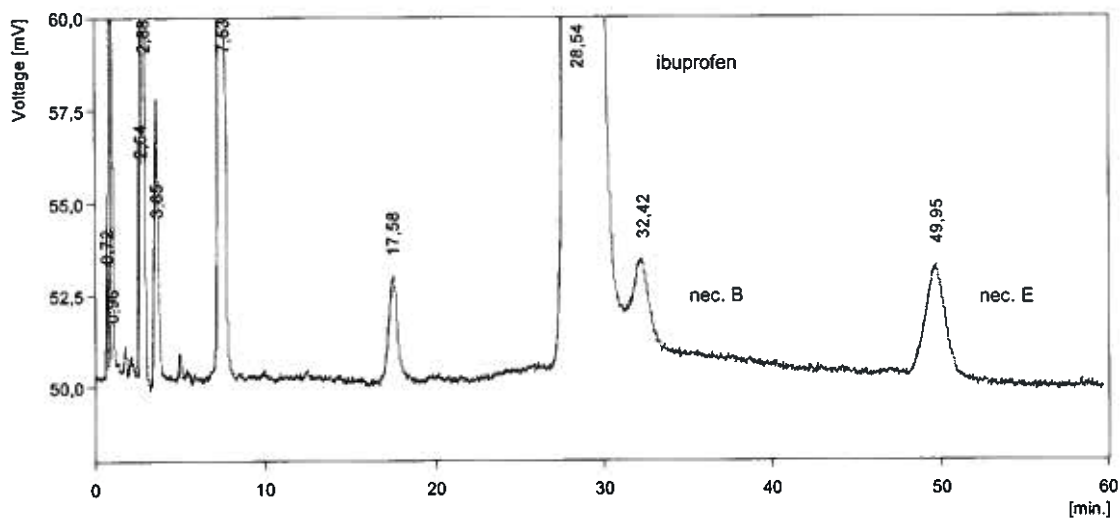
Koncentrace nečistot B,E [%]	Plocha pod píkem neč. B	Plocha pod píkem neč. E	Přidané množství nečistot B,E [µl]	Koncentrace nečistot B,E v izolaci [µg/ml]
52	103,42	76,32	65	3,12
76	138,46	122,98	95	4,56
100	210,09	225,42	125	6,0
124	232,06	291,81	155	7,44
148	270,34	385,49	185	8,8

Tab. č. 3: Použité koncentrace neč. B a E.



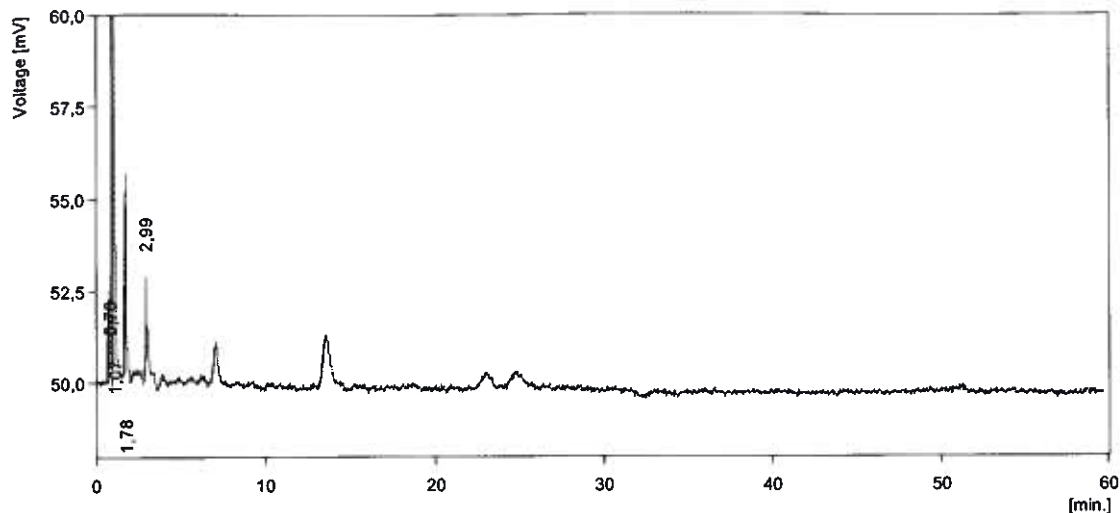
**Obrázek č.30:** Standardy neč. B, E, F o koncentraci 6 µg/ml.

CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7 µm viz. kapitola 4.2 1).



**Obrázek č.31:** Standardy parabenů, ibuprofenu (2 mg/ml), neč. B, E o koncentraci 6 µg/ml.

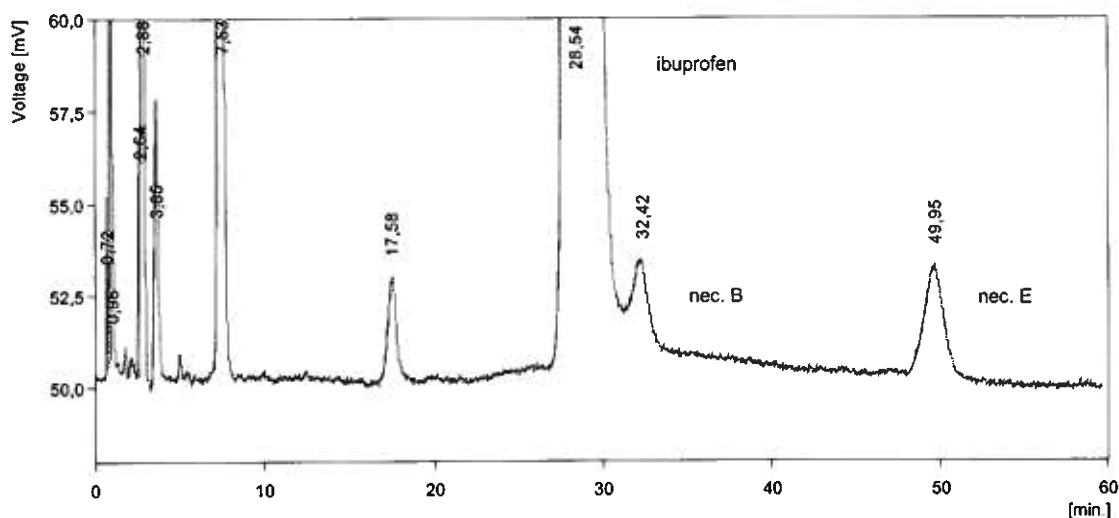
CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7 µm viz. kapitola 4.2 1).



**Obrázek č.32:** Izolace placebo krému bez parabenů.

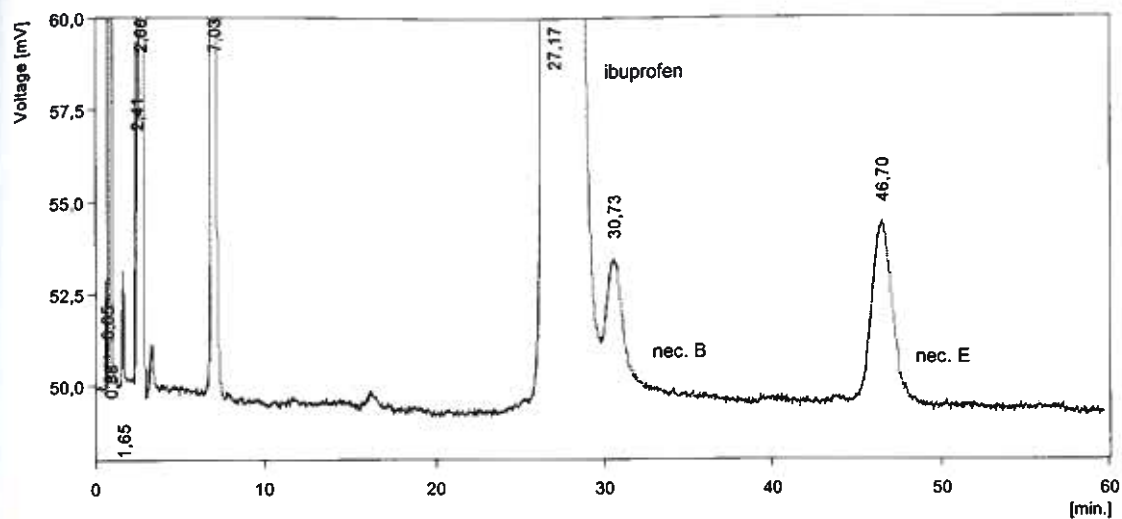
CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

Záznamy nástřiků vzorků krému s přísadkou ibuprofenu a neč. B,E o koncentracích 52%, 100% a 148% využitých pro výpočet kalibrační křivky:



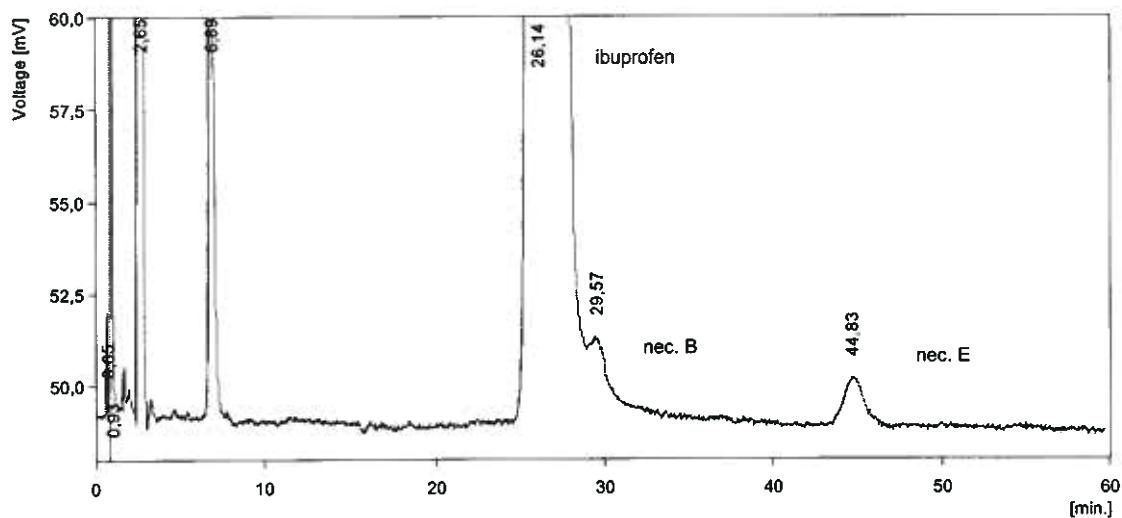
**Obrázek č.33:** Vzorek krému- Ibuprofen o koncentraci 2 mg/ml a 100 % koncentrace nečistot B,E (6 $\mu\text{g/ml}$ ).

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).



**Obrázek č.34:** Vzorek krému- Ibuprofen o koncentraci 2 mg/ml a 148% koncentrace nečistot B,E (8,8 $\mu$ g/ml).

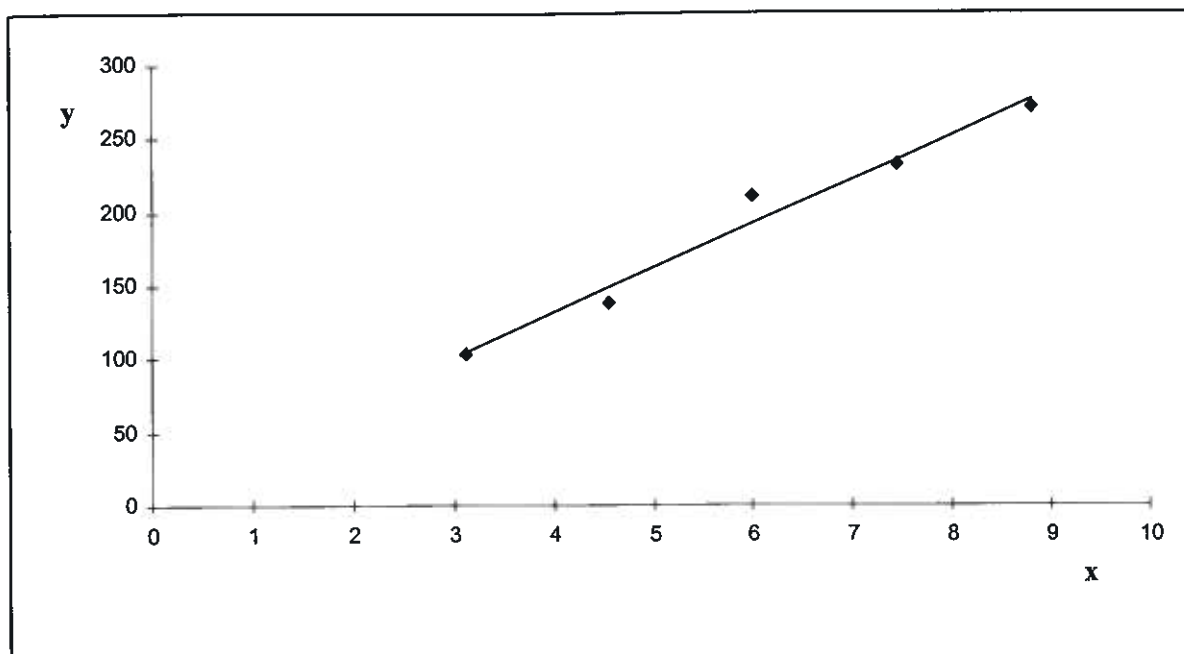
CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 1).



**Obrázek č.35:** Vzorek krému- Ibuprofen o koncentraci 2 mg/ml a 52% koncentrace nečistot B,E (3,12  $\mu$ g/ml).

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu$ m viz. kapitola 4.2 1).

## Kalibrační křivka nečistoty B



**Obrázek č.36:** Kalibrační křivka neč. B.

Regresní funkce :  $y = kx + q$

počet: bodů  $n = 5$                       počet stupňů  $v$   
volnosti:  $= 3$

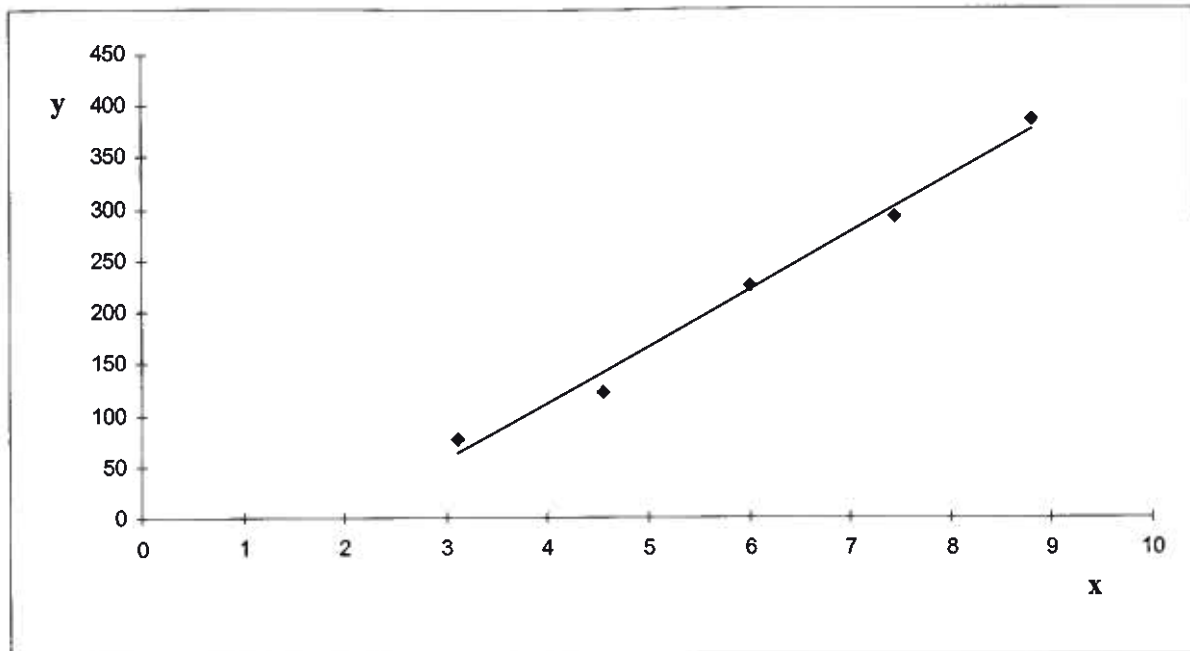
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
Směrnice		k = 30,0	± 2,8
absolutní člen		q = 11	± 18

koeficient korelace	R = 0,987
reziduální odchylka	$S_{rez}$ = 12,6

hodnota F-statistiky	F = 115
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99 % .	

X	y
3,121	103,42
4,56	138,46
6	210,09
7,44	232,06
8,8	270,34

## Kalibrační křivka nečistoty E



**Obrázek č.37:** Kalibrační křivka neč. E.

Regresní funkce : $y = kx + q$
--------------------------------

počet: bodů	n =	5	počet stupňů	v	volnosti:	=	3
-------------	-----	---	--------------	---	-----------	---	---

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
Směrnice		k	= 55,3 ± 3,5
absolutní člen		q	= -110 ± 22

koeficient korelace	R = 0,9941
reziduální odchylka	$s_{rez} = 15,7$

hodnota F-statistiky	F = 251
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	

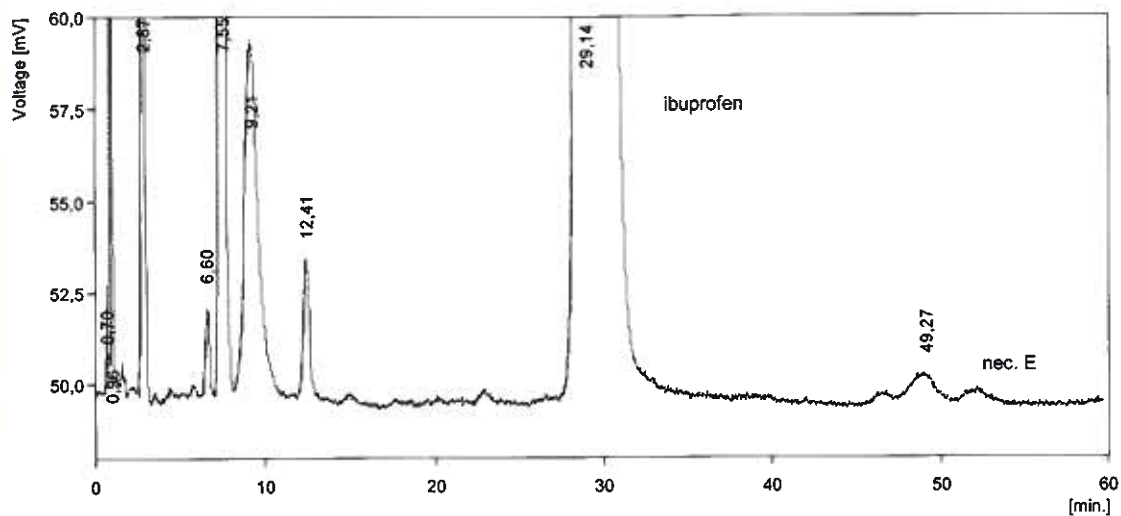
X	y
3,121	76,32
4,56	122,98
6	225,42
7,44	291,81
8,8	385,49



### Záznamy analýz vzorků krému:

U obou analýz byla použita izolační metoda uvedená v kap. č. 4.3.

1) Analýza vzorku krému označeného jako „novější“.

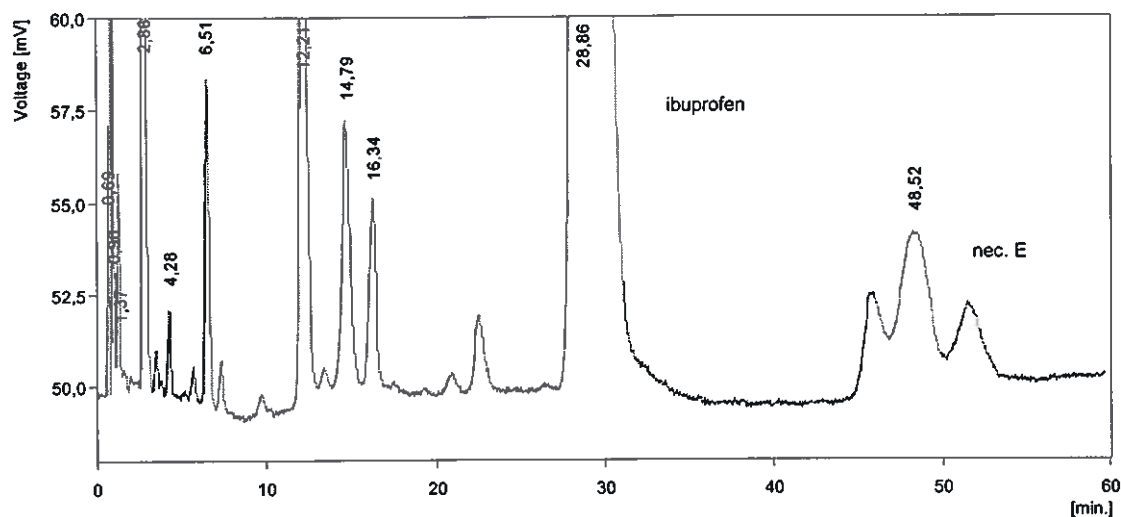


**Obrázek č.38:** „novější“ vzorek krému.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

Z chromatogramu je patrné, že vzorek „novějšího“ krému obsahuje minimum neč. B. Neč. E byla obsažena v množství: plocha- 77,27 odpovídá koncentraci 3,39  $\mu\text{g/ml}$  (0,17%). Další dva píky neznámých nečistot jsem nebral v potaz.

## 2) Analýza vzorku krému označeného jako „starší“.



**Obrázek č.39:** „starší“ vzorek krému.

CHROMATOGRÁFICKÉ PODMÍNKY- isokratická eluce s průtokem 1 ml/min a kolonou o zrnitosti 7  $\mu\text{m}$  viz. kapitola 4.2 1).

I u této analýzy je množství neč. B nehodnotitelné. Neč. E byla obsažena v množství: plocha- 583,45 odpovídá koncentraci 12,54  $\mu\text{g/ml}$  (0,627%).

**Závěr:** U obou analyzovaných vzorků krémů nebyla detekována neč. B. U „novějšího“ vzorku byla naměřena koncentrace neč. E 3,39  $\mu\text{g/ml}$  a u „staršího“ 12,54  $\mu\text{g/ml}$ . V obou chromatogramech se objevují v okolí píku neč. E další píky dvou nečistot.

## 6. ZÁVĚR

V této rigorosní práci jsem analyzoval vybrané nečistoty ibuprofenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Ibuprofen je široce používané a levné nesteroidní antiflogistikum, které se často používá k topické aplikaci. Během výroby nebo při nesprávném skladování vznikají doprovodné látky, z nichž některé mohou mít nežádoucí účinky na lidský organismu. V práci byly hodnoceny tyto nečistoty: **B**- kyselina (2RS)-2-(4-butylfenyl)propanová, **E**- 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on a **F**- kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová.

Při analýzách jsem používal isokratickou nebo gradientní eluci. Vzorky jsem nastříkoval v množství 20  $\mu$ l na kolonu (0,15m $\times$ 3 mm nebo 0,125m $\times$ 4 mm) se stacionární fází silikagel C18 o zrnitosti 7  $\mu$ m nebo 5  $\mu$ m. U isokratické eluce jsem použil jako mobilní fázi směs voda-acetonitril-kyselina fosforečná 85% v poměru 240-136-0,2. U gradientní eluce byly připraveny mobilní fáze A a B (A: směs vody- acetonitrilu-kyseliny fosforečné 85% v poměru 600-340-0,5 (v/v/v), B: acetonitril). Vzorky jsem detekoval v UV oblasti- při vlnové délce 214 nm. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 2 nebo 1 ml/min.

Nejprve jsem hodnotil vybrané nečistoty (**B**, **E**, **F**) ibuprofenu. Tři nečistoty byly separovány. Ovšem analýzu substance ibuprofenu (koncentrace 2 mg/ml) a jeho tří nečistot v limitních koncentracích (**B**, **E**- 6  $\mu$ g/ml a **F**- 2  $\mu$ g/ml) nebylo možno vyhodnotit. Důvod byl překrývání píku nečistoty **F** píkem ibuprofenu. Až po úpravě koncentrací všech látek na 60  $\mu$ g/ml, bylo možné záznam hodnotit. Ovšem tyto koncentrace nejsou v praxi pro analýzu lékopisných nečistot reálné.

Dále jsem zkoušel měnit chromatografické podmínky pro lepší rozdělení píku ibuprofenu a píků nečistot. Měněné podmínky byly: použití gradientní eluce, zrnitost stacionární fáze a délka kolony či průtok mobilní fáze. Také jsem zkoušel analýzu provádět na dvou různých HPLC chromatografech. Žádná z provedených obměn neprokázala zlepšení separace ibuprofenu a jeho vybraných nečistot.

V další kapitole jsem stanovoval množství nečistot **B** a **E** ve vzorcích krémů. Hodnocené látky byly z krému extrahovány do acetonitrilu. Nejprve jsem sestrojil kalibrační křivky pro nečistoty **B** a **E**. Poté jsem kvantifikoval jejich množství v modelových vzorcích krémů. Při analýze se potvrdilo zvýšené množství nečistoty **E** u vzorku, který byl skladován dlouhodobě. Ani u jednoho vzorku nebyla detekována nečistota **B**. Naměřené hodnoty nečistoty **E** byly: u „novějšího“ vzorku- 3,39  $\mu$ g/ml (0,17%) a u „staršího“ vzorku- 12,54  $\mu$ g/ml (0,627%).

## **7. LITERATURA**

- 1) Suchopár J. a kol.: Remedial Compendium, třetí vydání, Panax, Praha 1999
- 2) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984
- 3) Pacáková V., Štulík K.: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
- 4) Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha, 1980
- 5) <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, březen 2005
- 6) Český lékopis 2002 (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- 7) [www.webprostor.cz/veda\\_a\\_vyzkum/HPLC/](http://www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/), leden 2005
- 8) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 9) Hartl J., Palát K., Doležal M., Miletín M., Opletalová V.: Farmaceutická chemie II, Karolinum, Praha 1997
- 10) SUKL Praha: Mikroverze AISLP 2004.1 pro MS Windows, Praha 2004-03-26
- 11) Katzung B. G.: Základní a klinická farmakologie, H&H, Jinočany 1994
- 12) European Pharmacopoea 5. edice, Aubin, Liguge, 2004
- 13) Český lékopis 1997, Grada, Praha, 1997
- 14) The United States Pharmacopoeia XXVI, Rockville, USA, 2003
- 15) British Pharmacopoeia 1993. HMSO, London, 1993
- 16) Caviglioli G., Posocco V., Parodi B., Cafaggi S., Alzati A., Bignardi G.:  
Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments, J. Pharm. Biomed. Anal., 30, 2002, s. 499-509
- 17) Gasco-Lopez A., Izquierdo-Hornillos R., Jimenezb A.: LC method development for ibuprofen and validation in different pharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal., 21, 1999, s. 143-149
- 18) Chalabala M., Mandák M., Gruntová Z., Melichar M., Rak J., Liekové formy, Osveta, Martin 1992
- 19) British Pharmacopoeia 2004, Vol III. HMSO, London 2004
- 20) Haikala, Veikko E.; Heimonen, Irma K.; Vuorela, Heikki J. Determination of ibuprofen in ointments by reversed-phase liquid chromatography  
J. Pharm. Sci. 1991, 80(5), s. 456-8.