

# OZNACZANIE STĘŻENIA IBUPROFENU W PRODUKTACH FARMACEUTYCZNYCH

Instrukcja opracowana w Katedrze Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

## 1. Wprowadzenie

Ogromnie pożądane w przemyśle farmaceutycznym jest posiadanie prostych, niewymagających konserwacji detektorów do rutynowych zastosowań chromatograficznych. W przypadku związków zawierających chromofor, standardem w zastosowaniach kontroli jakości jest detekcja UV-Vis. Jednak to podejście może napotkać problemy, gdy zostanie zastosowane do cząsteczek, które nie mają wystarczającej absorpcji. Dzięki najnowszym postęmom technologicznym detekcja rozpraszania światła przez odparowanie (ELSD) jest uważana za wartościową alternatywę dla detekcji UV substancji pół-lotnych i nielotnych, gdyż jest niezależna od właściwości optycznych związku. W detektorze ELS substancja opuszczająca kolumnę chromatograficzną w postaci aerozolu powoduje rozproszenie promieniowania laserowego. Zasada działania detektora opiera się na nebulizacji rozpuszczalnika zawierającego analit przy użyciu gazu obojętnego. Mieszanina gazu i eluentu tworzy aerozol złożony z równomiernie rozłożonych kropelek, który następnie przenoszony jest przez przepływ gazu nośnego do komory parownika. W sekcji parownika rozpuszczalnik jest odparowywany przy jednoczesnym pozostawieniu mgiełki suchych cząsteczek analitu, która rozprasza światło na urządzenie światłoczułe (fotodioda lub fotopowielacz) i powoduje powstawanie sygnału odpowiedzi w czasie rzeczywistym. Ilość wykrytego światła jest zależna od stężenia rozpuszczonej substancji oraz rozkładu wielkości cząsteczek substancji rozpuszczonej. Poziom światła rozproszonego na fotopowielaczu przez opary czystego rozpuszczalnika jest niewielki i stanowi stałą linię tła.

Ze względu na znikomą zależność sygnału detektora od rodzaju wykrywanej substancji, powszechnie ELSD uważany jest za detektor uniwersalny. Należy jednak pamiętać, że detektor ten działa dobrze tylko wtedy, gdy cząsteczka będąca przedmiotem zainteresowania jest nie tylko mniej lotna niż zastosowana faza ruchoma, ale ma również zdolność do zachowania swojej natury rozpraszania światła, gdy przepływa przez detektor. Padająca wiązka jest najskuteczniej rozpraszana przez analit w postaci cząstek, a nie jego postać ciekłą. Parametry ELSD należy zoptymalizować dla każdej badanej cząsteczki. Jednym ze sposobów wstępnego sprawdzenia, czy ten detektor może być realnym wyborem, jest sprawdzenie temperatury topnienia analitu będącego przedmiotem zainteresowania. Sygnał z analitów o niższych temperaturach topnienia może być bowiem trudny do odróżnienia od tła odparowanej matrycy fazy ruchomej.

Eluenty stosowane w ELSD nie muszą być wysokiej czystości, jednakże nie powinny zawierać rozpuszczonych ciał stałych. Nie należy również stosować nielotnych roztworów buforowych. Wykres kalibracji detektora jest nieliniowy, a dużą wykrywalność i powtarzalność wskazań można uzyskać dzięki pewnym dodatkom do eluentu.

Modyfikatorami fazy ruchomej kompatybilnymi z detekcją ELS są np.: kwas mrówkowy, kwas trifluoroctowy, amoniak, octan amonu czy kwas pentafluoropropionowy. W detekcji rozpraszania światła przez odparowanie dopuszcza się stosowanie elucji gradientowej.

## 2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie stężenia ibuprofenu w produktach farmaceutycznych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją rozproszenia światła przez odparowanie.

## 3. Odczynniki i aparatura

### 3.1. Aparatura i sprzęt chemiczny

- chromatograf cieczowy Agilent Technologies 1220 LC System;
- oprogramowanie OpenLAB CDS ChemStation Edition;
- detektor ELSD 1260 Infinity II Agilent Technologies;
- kolumna chromatograficzna Poroshell 120 SB-C18 (75 × 4,6 mm; 2,7 μm), Agilent Technologies;
- waga laboratoryjna Scaltec SBC 21;
- pipety automatyczne;
- kolby miarowe, naczynka wagowe, naczynka chromatograficzne 1,5 mL, probówki typu Eppendorf.

### 3.2. Odczynniki

- 0,1% kwas mrówkowy;
- acetonitryl;
- 5 mg/mL roztwór standardowy ibuprofenu (w metanolu);
- metanol;
- woda dejonizowana;
- preparaty farmaceutyczne: Metafen (200 mg ibuprofenu + 325 mg paracetamolu, POLPHARMA), Ibuprom Max 400mg (USP Zdrowie).

### Wymagane środki ostrożności:

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia Student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1272/2008/WE):

*Acetonitryl* – F Produkt wysoce łatwopalny R11, T Produkt toksyczny R23/24/25, R39/23/24/25

*Kwas mrówkowy 85%* – C Produkt żrący R34, EUH071 Działa żrąco na drogi oddechowe, H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu, H331 Działa toksycznie w następstwie wdychania, P280 Stosować rękawice ochronne/ochronę oczu/ochronę twarzy

*Ibuprofen* – H302 Działa szkodliwie po połknięciu

*Metanol* – H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary, H301 Działa toksycznie po połknięciu, H301 + H311 + H331 Działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania, H311 Działa toksycznie w kontakcie ze skórą, H370 Powoduje uszkodzenie narządów

Pozostałe substancje wykorzystywane w ćwiczeniu nie zostały sklasyfikowane jako niebezpieczne.

#### **Pierwsza pomoc:**

- ✓ w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody;
- ✓ w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece;
- ✓ jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze; jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie; zasięgnąć porady medycznej;
- ✓ w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem;
- ✓ w razie spożycia: przepłukać usta wodą. NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

## **4. Wykonanie ćwiczenia**

### **4.1. Przygotowanie układu chromatograficznego do pracy**

#### Warunki chromatograficzne:

- kolumna chromatograficzna Poroshell 120 SB-C18 (75 × 4,6 mm; 2,7 µm), Agilent Technologies
- faza ruchoma: A – 0,1% kwas mrówkowy, B – acetonitryl
- elucja izokratyczna: 20% A, 80% B
- objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 mL/min
- objętość wprowadzanej próbki na kolumnę: 5 µL
- czas analizy: 2 minuty
- analityczna długość fali (UV-Vis): 264 nm

#### Parametry detekcji ELS:

- przepływ gazu: 1,5 SLM
- temperatura parownika: 30 °C
- temperatura nebulizatora: 60 °C
- wzmacnienie sygnału fotopowielacza (gain): 1
- tempo danych: 10 Hz
- wygładzenie: 1
- intensywność źródła światła: 100%

Schemat postępowania:

1. Kondycjonowanie kolumny chromatograficznej.
2. Ustawienie parametrów metody (NLPZ\_SPECJALIZACYJNE.M).
3. Ustawienie sekwencji analiz (NLPZ\_SPECJALIZACYJNE.S).
4. Ustawienie zapisu analiz (Subdirectory: NLPZ\_SPECJALIZACYJNE.).

**4.3. Przygotowanie próbek do krzywej kalibracyjnej z roztworu standardowego ibuprofenu o stężeniu 5 mg/mL w dwóch powtórzeniach**

1. Przygotować dwie serie roztworów: końcowe stężenie ibuprofenu po rozcieńczeniu do objętości 1 mL wynosi: 0,0 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,7 mg/mL. Szereg rozcieńczeń roztworu standardowego ibuprofenu wykorzystywanych do sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotować na podstawie przeprowadzonych samodzielnie obliczeń. Rozcieńczenia przygotować w naczynkach chromatograficznych o objętości 1,5 mL. Do rozcieńczeń wykorzystać metanol.
2. Dla każdego wzorca zarejestrować chromatogram, zanotować czas retencji, powierzchnię i wysokość uzyskanego sygnału (piku);

**4.4. Przygotowanie roztworów preparatów farmaceutycznych w dwóch powtórzeniach**

**1. Preparat Ibuprom Max 400mg (USP Zdrowie):**

Na wadze analitycznej zważyć tabletkę (~ 0,7 g, 400 mg ibuprofenu) i zanotować masę → tabletkę przenieść do moździerza porcelanowego w celu rozdrobnienia → pobrać naważkę 8x mniejszą od masy tabletki → naważkę rozpuścić w metanolu w kolbie 5 mL poprzez wytrząsane ręczne przez 5 min → odstawić kolbę na 5 min → pobrać 1,5 mL roztworu znad osadu do probówki typu Eppendorf → odwirować przez 5 min przy RPM 12000 w wirówce automatycznej → próbkę rozcieńczyć 50x w naczynku chromatograficznym (dwa powtórzenia).

Zarejestrować chromatogram próbki, zanotować czas retencji, powierzchnię i wysokość uzyskanego sygnału (piku).

**2. Preparat Metafen (POLPHARMA):**

Na wadze analitycznej zważyć tabletkę (~ 0,7 g, 200 mg ibuprofenu + 325 mg paracetamolu) i zanotować masę → tabletkę przenieść do moździerza porcelanowego w celu rozdrobnienia → pobrać naważkę 4x mniejszą od masy tabletki → naważkę rozpuścić w metanolu w kolbie 5 mL poprzez wytrząsane ręczne przez 5 min → odstawić kolbę na 5 min → pobrać 1,5 mL do probówki typu Eppendorf → odwirować przez 5 min przy RPM 12000 w wirówce automatycznej → próbkę rozcieńczyć 50x w naczynku chromatograficznym (dwa powtórzenia).

Zarejestrować chromatogram próbki, zanotować czas retencji, powierzchnię i wysokość uzyskanego sygnału (piku).

## 5. Opracowanie wyników

1. Metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną: zależność logarytmu dziesiątego średniej powierzchni piku lub wysokości piku od logarytmu dziesiątego stężenia ibuprofenu, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji  $R^2$ . Wyliczyć względne odchylenie standardowe oraz odzysk dla poszczególnych stężeń. Wyniki zamieścić w Tabelach 1 i 2 (wg wzoru poniżej).

Stężenie ibuprofenu [ $\cdot 10^{-2}$ mg/ml]	Log (C)	Średnia powierzchnia piku [mV*s]	Log ( $A_{\text{sr}}$ )	Log ( $C_{\text{sr}}$ krzywa)	SD	RSD [%]	Odzysk [%]
0							
5							
10							
20							
30							
50							
70							

2. Oznaczyć zawartość ibuprofenu w próbkach preparatów farmaceutycznych i porównać z wartością deklarowaną przez producentów przeliczając na zawartość w Tabeli 1 i 2.
3. Skomentować uzyskane wyniki.

## 6. Literatura

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 2012.
2. Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, WNT, Warszawa, 2012.
3. Z. Witkiewicz, W. Wardencki, I. Malinowska, *Chromatografia cieczowa – teoria i praktyka*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2019, Warszawa.
4. Agilent Serii 1200 Infinity ELSD – Podręcznik użytkownika, Agilent Technologies, 2013, Niemcy.
5. Webster, G. K., Jensen, J. S., & Diaz, A. R. (2004). An investigation into detector limitations using evaporative light-scattering detectors for pharmaceutical applications. *Journal of chromatographic science*, 42(9), 484–490.