

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Ibuprofen- farmakologické vlastnosti a metody stanovení
Bakalářská práce

2020

Veronika Šantrůčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Šantrůčková**
Osobní číslo: **C16370**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Ibuprofen – farmakologické vlastnosti a metody analýzy**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné literatuře vyhledejte a popište práce zabývající se Ibuprofenem. Stručně popište fyzikálně-chemické vlastnosti této molekuly, metody syntézy a shrňte farmakologické účinky ibuprofenu.
2. Popište používané metody analýzy ibuprofenu. Detailněji se zaměřte na analýzy pomocí kapalinové chromatografie a na využití různých typů detekce.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 07. 2020

.....
Veronika Šantrůčková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání této závěrečné práce. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce formou literární rešerše je zaměřena na ibuprofen. Úvodní část práce popisuje chemické a fyzikální vlastnosti, syntézy ibuprofenu, farmakologické vlastnosti a lékové formy. Další část popisuje metody stanovení ibuprofenu se zaměřením na kapalinovou chromatografii s různým typem detekce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ibuprofen, dexibuprofen, NSAIDs, HPLC, derivatizace

TITLE

Ibuprofen- pharmacological properties and methods of determination

ANNOTATION

This bachelor thesis in the form of a literary research is focused on ibuprofen. The introductory part of the work describes chemical and physical properties, synthesis of ibuprofen, pharmaceutical properties and dosage forms. The next part describes methods for the determination of ibuprofen with a focus on liquid chromatography with different types of detection.

KEYWORDS

Ibuprofen, dexibuprofen, NSAIDs, HPLC, derivatization

OBSAH

1.	Ibuprofen	11
1.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	12
1.3	Syntéza ibuprofenu	13
1.4	Farmakologické účinky.....	16
1.5	Lékové formy s ibuprofenem.....	18
2.	Metody stanovení ibuprofenu.....	20
2.1	Acidobazická titrace	20
2.2	Tenkvrstvá chromatografie.....	20
2.3	Vysokotlaká kapalinová chromatografie	21
2.4	Kapilární zónová elektroforéza	21
2.5	UV spektrofotometrie.....	21
2.6	Spektrofluorimetrie.....	21
3.	Stanovení ibuprofenu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií.....	22
3.1	Nepřímá metoda chirální separace.....	23
3.1.1	Separace na chirální stacionární koloně na bázi R-N-(3,5-nitrobenzoyl) fenyglycinu	23
3.1.2	Separace na achirální oktadecylové silikagelové koloně	23
3.1.3	Separace na chirální stacionární fázi na bázi celulózy	25
3.1.4	Separace na stacionární fázi na bázi R-1-(1-naftyl)-ethylmočoviny	26
3.2	Přímá metoda chirální separace	26
	ZÁVĚR	39
	POUŽITÁ LITERATURA	40

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura Ibuprofenu 1	11
Obrázek 2: Stereoizomery ibuprofenu	12
Obrázek 3: Originální syntéza ibuprofenu	13
Obrázek 4: Zkrácená syntéza ibuprofenu	14
Obrázek 5: Syntéza ibuprofenu	15
Obrázek 6: Chromatogram pro celkový iont (A), ibuprofen (B) a vnitřní standard naproxen (C)	28
Obrázek 7: Spektrum negativní elektrosprejové ionizace: A-ibuprofen, B- produktový iont ibuprofenu, C-naproxen, D- produktový iont naproxenu	28
Obrázek 8: Chromatogramy- koncentrace ibuprofenu v plazmě v závislosti na čase	29
Obrázek 9: Profil plazmatické koncentrace na čase	30
Obrázek 10: Chromatogram enantiomerů ibuprofenu - HPLC-MS	31
Obrázek 11: Chromatogram standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml) s UV spektrem a čistotou	34
Obrázek 12: Chromatogram alkalické hydrolyzy standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml) ukazující R-izomer ibuprofen jako produkt rozkladu	35
Obrázek 13: Chromatogram kyselé hydrolyzy standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml)	35
Obrázek 14: Profil HPLC-UV NMR metabolitů ibuprofenu obsažených v moči	37
Obrázek 15: Spektrum pro HMPPA glukuronid	38
Obrázek 16: Spektrum pro glukuronid ibuprofenu	38

SEZNAM TABULEK

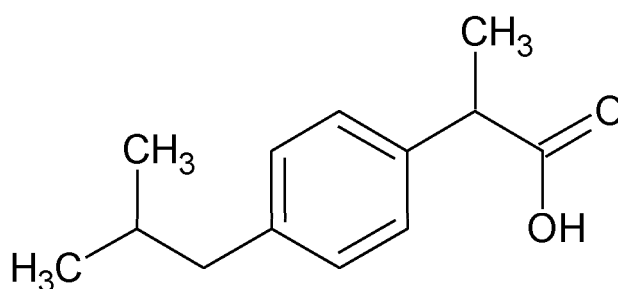
Tabulka 1: Údaje o přesnosti dexibuprofenu.....	33
Tabulka 2: Údaje o preciznosti ibuprofenu.....	33

SEZNAM ZKRATEK

COX	Cyklooxygenáza
DAD	Detektor s diodovým polem
ECF	Ethylchlorformiát
EOA	Ethanolamin
GC	Plynová chromatografie
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
IS	Vnitřní standard
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé léky
PGHS	Prostaglandin-endoperoxid H syntáza
RSD	Relativní směrodatná odchylka
S-NEA	S-1-(1-naftyl) ethylamin
SPE	Extrakce pevnou fází
TEA	Triethylamin
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

1. Ibuprofen

Ibuprofen **1** (Obr. 1) je chemickým názvem (*RS*)-2-(4-isobutylfenyl]propanová kyselina. Známy je také pod obchodními názvy jako BRUFEN, BRUFALGIN, DOLGIT, IBALGIN, NUROFEN.^[1]



Obrázek 1: Chemická struktura Ibuprofenu **1**

Byl objeven v padesátých letech minulého století týmem, který vedl Stewart Adams spolu s chemikem Johnem Nicholsonem v laboratořích Boots Company v Nottinghamu. Hlavním úkolem byl vývoj nového léku pro léčbu bolesti a zánětů kloubů u revmatoidní artritidy. Nahradil tak Aspirin, který byl tehdy nejoblíbenějším a středně účinným lékem proti revmatoidní artritidě. Zároveň měl mnohem nižší nežádoucí účinky. Ibuprofen byl patentován v roce 1962 a v roce 1969 byl schválen k léčbě jako lék na lékařský předpis.

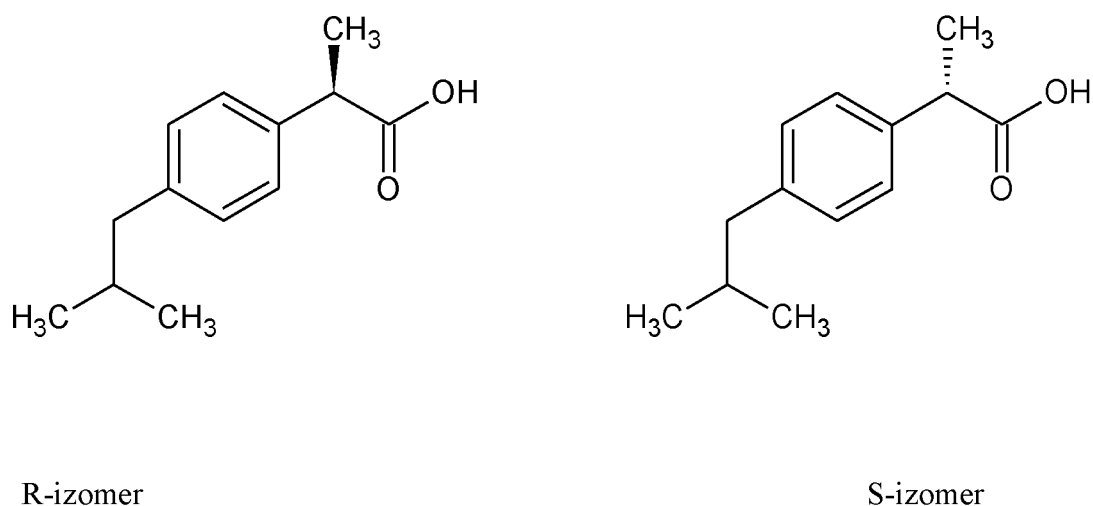
Dnes je to pravděpodobně jeden z nejčastěji používaných léků proti bolesti. Jedná se o nesteroidní protizánětlivý lék (NSAIDs). Jeho charakteristikou je dobrý analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek.

Z důkazů v klinicko-epidemiologických studiích vyplývá, že lék redukoval výskyt rakoviny tračníku, prostaty a prsu. Také studie naznačily, že Ibuprofen může zabránit ve vývoji Alzheimerovy demence a Parkinsonovy choroby. Pro stanovení dávky a načasování příjmu léku je třeba dlouhodobých studií.^[2]

1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Ibuprofen je bezbarvá krystalická pevná látka. Je velmi rozpustný v acetonu, methanolu, chloroformu a ve většině organických rozpouštědel, mírně rozpustný v ethylacetátu a zcela nerozpustný ve vodě. Jeho molární hmotnost je $206,28 \text{ g/mol}^{-1}$, sumární vzorec $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ a teplota tání $75 \text{ }^\circ\text{C}$ až $77 \text{ }^\circ\text{C}$. V katalozích lze ibuprofen nalézt pod CAS číslem 15687-27-1. ^[3]

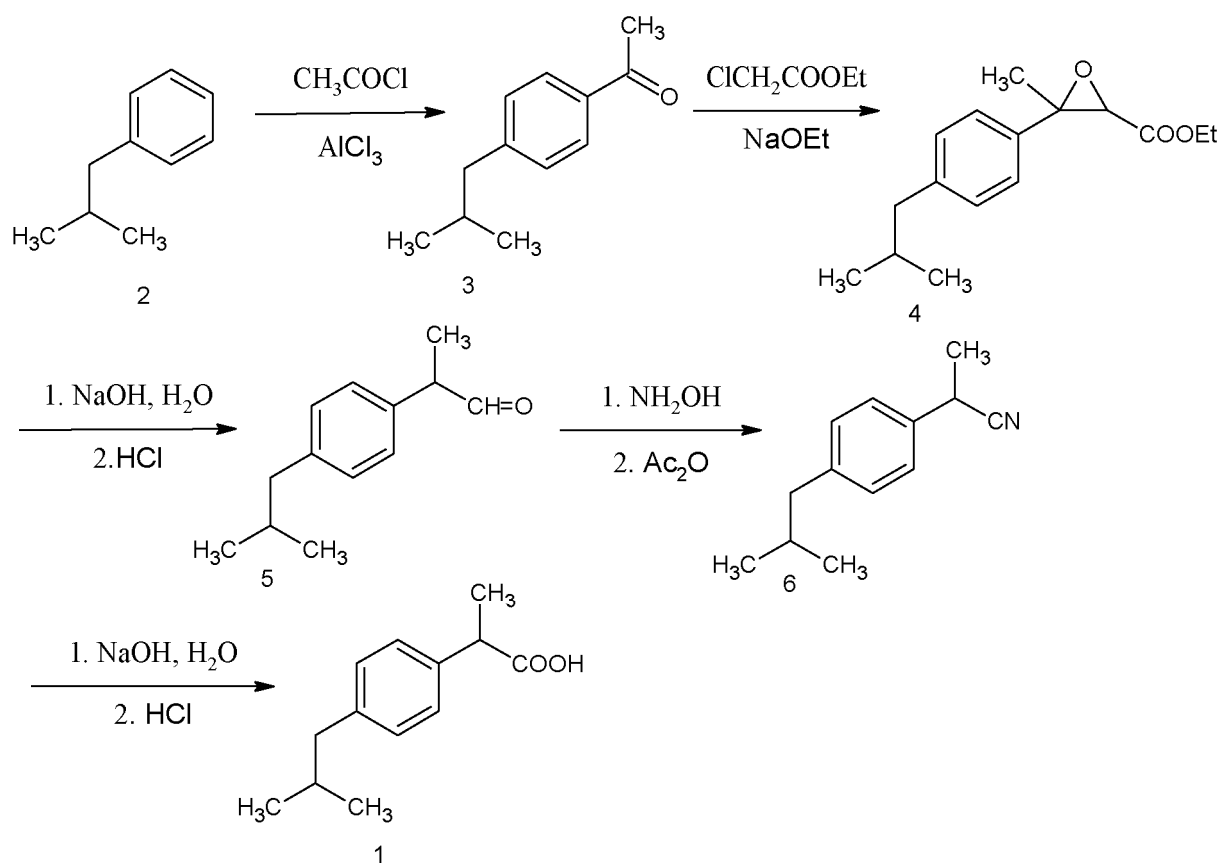
Připravuje a podává se jako racemát, přestože protizánětlivé účinky vykazuje především (S)-stereoizomer (Obr. 2). Předpokládá se, že v organismu dochází k transformaci (R)-izomeru na (S)-izomer. (R)-izomery lze tedy považovat za proléčiva inhibitorů cyklooxygenasy. ^[1]



Obrázek 2: Stereoizomery ibuprofenu

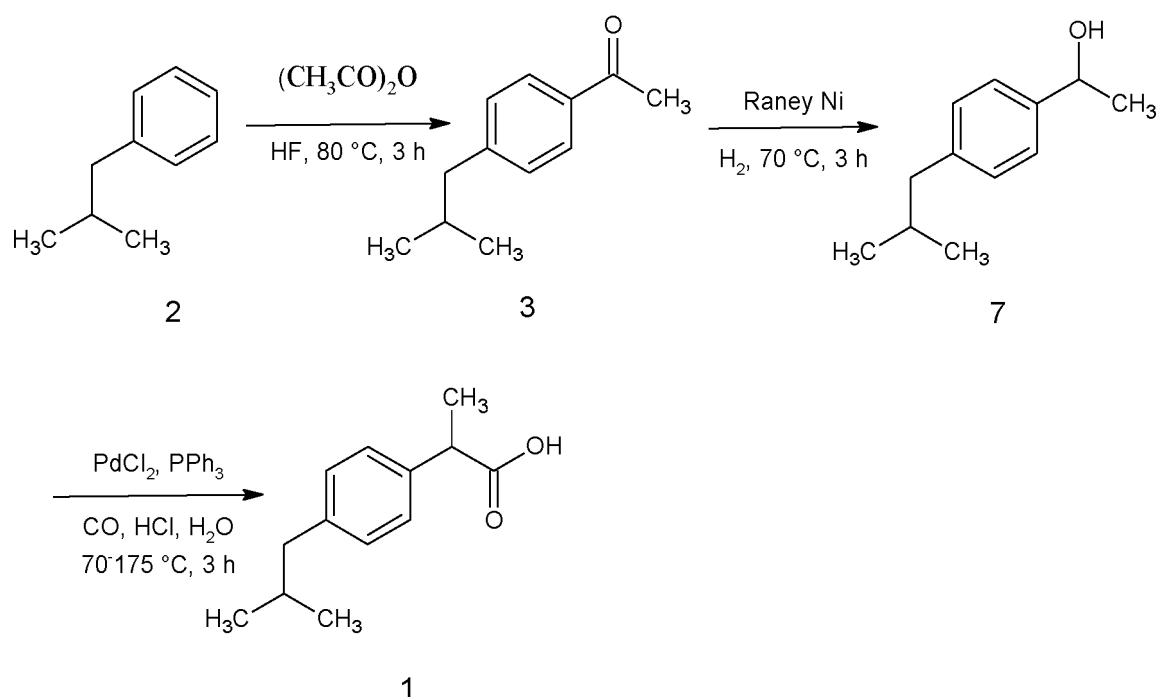
1.3 Syntéza ibuprofenu

Jedná se o originální syntézu firmy Boots. Pro syntézu ibuprofenu (**1**) (Obr. 3) jako výchozí látka je použit isobutylbenzen (**2**). Friedelovou-Craftsovou acetylací isobutylbenzenu (**2**) se získá fenon (**3**). Následuje Darzensova reakce, kdy fenon (**3**) reaguje v přítomnosti ethanolátu sodného s ethyl-chloracetátem za vzniku glycidesteru (**4**). Ester po zmýdelnění a následném otevření epoxidového kruhu, eliminaci vody a dekarboxylaci poskytne aldehyd (**5**). Karbonylová skupina aldehydu reaguje s hydroxylaminem a dále probíhá dehydratace vzniklého oximu na nitril. Karboxylová skupina vzniká zmýdelněním nitrilu (**6**).^[1]



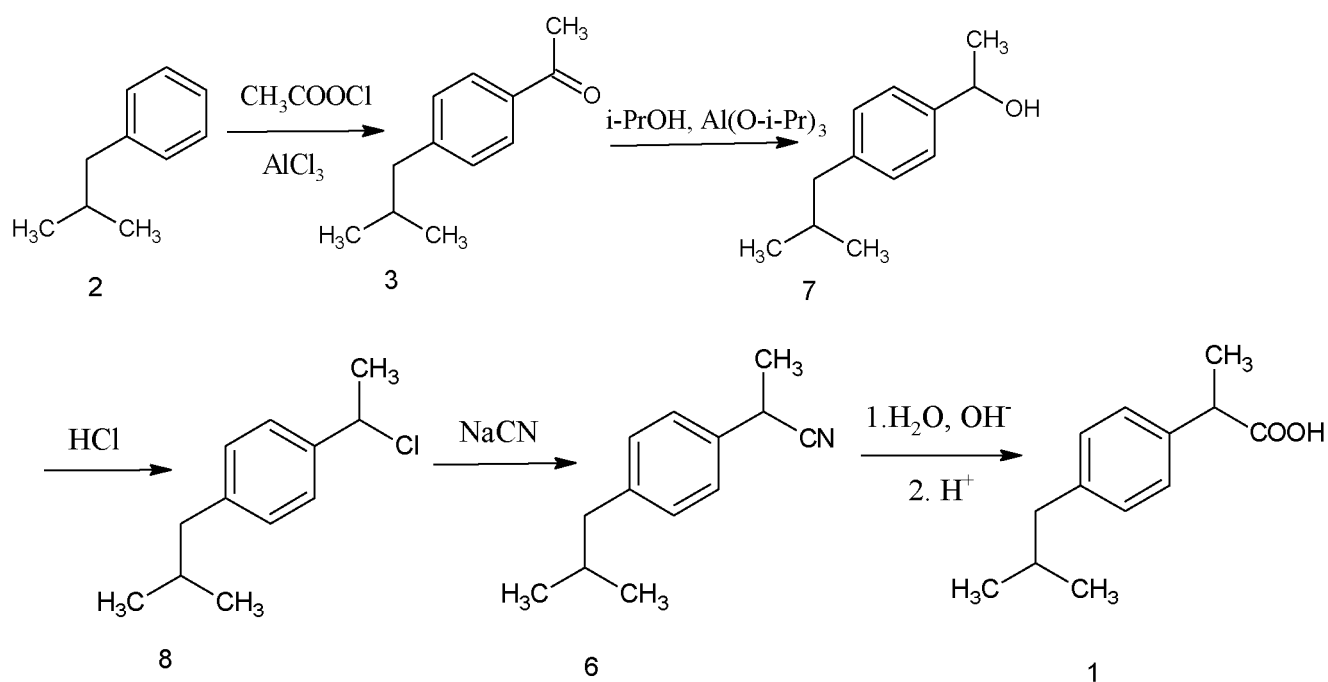
Obrázek 3: Originální syntéza ibuprofenu

Původní syntéza byla vylepšena podnikem Boots and Hoescht Company a zkrácena na tři kroky (Obr. 4), jelikož původní syntéza byla příliš dlouhá a produkovala mnoho odpadu. V roce 1997 podnik získal ocenění Green Chemistry za alternativní syntetické cesty. Z isobutylbenzenu (**2**) Friedel-Craftsovou acetylací vzniká fenon (**3**). Reakce zahrnuje použití recyklovaného fluorovodíku jako katalyzátoru. V druhém kroku následuje hydrogenace ketonu (**3**) na alkohol (**7**) za působení Raneyova niklu a nízkého tlaku. Závěrečný krok zahrnuje karboxylační krok katalyzovaný paládiem, které se recykluje.^{[4] [5]}



Obrázek 4: Zkrácená syntéza ibuprofenu

Při další syntéze (Obr. 5) bylo taktéž využito Friedel-Craftsovy acetylce isobutylbenzenu za vzniku fenonu (**3**). Následnou Marweinovou reakcí se fenon (**3**) redukuje isopropylátem hlinitým na sekundární alkohol (**7**). Ten zreaguje s kyselinou chlorovodíkovou na chlorderivát (**8**). Jde o substituci hydroxylové skupiny benzylového typu. Ve vzniklém chlorderivátu se provede nukleofilní substituce kyanidovým iontem vedoucí k nitrilu (**6**). Jeho alkalickou hydrolyzou a následným okyselením se získá ibuprofen (**1**).^[6]



Obrázek 5: Syntéza ibuprofenu

1.4 Farmakologické účinky

Farmakodynamické účinky

Mechanismem účinku ibuprofenu je inhibice cyklooxygenázy (COX), oficiálně známé jako prostaglandin-endoperoxid H syntáza (PGHS). Vyskytuje se ve dvou formách COX 1 a COX 2 (také PGHS 1 a 2). Jedná se o enzymy katalyzující cyklooxygenázovou reakci, při které se arachidonát přemění na prostaglandin. Ačkoliv mají podobné struktury aktivního místa, katalytické mechanismy, produkty a kinetiku, přesto existují strukturální rozdíly, které mají důležité farmakologické a biologické důsledky. Nežádoucí účinky v oblasti gastrointestinálního ústrojí jsou důsledkem inhibice COX 1. COX 2 je zodpovědný za produkci zánětlivých prostaglandinů. Inhibicí COX 2 se snižuje zánět, bolest, horečka. Při dlouhodobém užívání snižuje vývoj rakoviny tračnicku a Alzheimerovy choroby. ^[7]

Farmakokinetické účinky

Vyazuje kinetiku 1. řádu. Při perorálním podání se ibuprofen rychle absorbuje z gastrointestinálního traktu, přičemž maximální plazmatické koncentrace (t_{max}) dosáhne přibližně za 1 – 2 hod. Ibuprofen je charakterizován vysokou vazbou na plazmatické proteiny a proto má nízký distribuční objem (V_D). Biologický poločas má průměrně mezi 2-3 h. Ibuprofen je primárně metabolizován v játrech na farmakologicky neaktivní metabolity 2-hydroxylibuprofen a 2-karboxylibuprofen. Jako nejvýznamnější katalyzátory zodpovědné za metabolismus ibuprofenu byly identifikovány CYP2C8 a CYP2C9, které jsou hlavními podtypy CYP450. Vylučuje se močí a celkové vyloučení z organismu trvá 24 h od poslední dávky ibuprofenu. ^{[8][9]}

Nežádoucí účinky

Ibuprofen se řadí mezi nejbezpečnější a jeho nežádoucí účinky jsou velmi nízké ve srovnání s jinými NSAIDs. Způsobuje nežádoucí účinky gastrointestinální, kardiovaskulární, renální, hepatotoxické a hypersenzitivní.

1. Gastrointestinální

Ibuprofen může interagovat s membránami a fosfolipidy na sliznicích. Riziko gastrointestinálních (GIT) nežádoucích účinků závisí na dávce a délce léčby. Při dlouhodobém používání může ohrozit integritu sliznice a zvýšit její propustnost k různým škodlivým látkám. Podle epidemiologických studií v porovnání s jinými léky má ibuprofen nejnižší riziko způsobující GIT nežádoucí účinky. Například může způsobovat krvácení, vředy, zvracení, nevolnost, pálení žáhy.

Některé faktory zvyšují riziko:

- Současná léčba aspirinem, antidepresivy, kortikosteroidy, léky proti srážlivosti krve a trombóze
- Infekce *Helicobacterem pylori*
- Alkohol a kouření
- Věk > 65
- Používání dalších NSAIDs

2. Kardiovaskulární (CV)

Za riziko ibuprofenu na kardiovaskulární systém je považována inhibice produkce prostaglandinů v renálním systému. Z kontrolovaných studií existuje nedostatek důkazů, tudíž rizika způsobená ibuprofenem na kardiovaskulární systém jsou sporná. Nežádoucí účinek se může projevit mozkovou mrtvicí, trombózy, infarktem myokardu, srdečním selháním, edémem nebo hypertenzí.

3. Renální

Ledviny produkují prostacyklin a prostaglandin E2 a předpokládá se, že je ibuprofen ovlivňuje inhibicí COX-1 nebo COX-2. COX-1 reguluje a řídí glomerulární filtraci, zatímco COX-2 pomáhá regulovat vylučování soli a vody. Renální prostaglandiny podporují vazodilataci, která zase podporuje průtok krve ledvinami. Inhibice syntézy prostaglandinů může mít za následek akutní poškození ledvin, edém, hypertenzi, hyperkalémii (zvýšená hladina draslíku v krvi). Není vhodný u geriatrických pacientů s chronickým onemocněním ledvin nebo srdečním selháním.

4. Hepatotoxické

Při užívání ibuprofenu je nízká míra toxicity jater.

5. Hypersenzitivita

Hypersenzitivita je spojena s idiosynkratickou reakcí na léčivo typu B, která se může vyskytnout u citlivějších pacientů. Lze ji popsat jako reakci, která zahrnuje horečku a vyrážku. Reakce na přecitlivělost jsou vzácné.^[10]

1.5 Lékové formy s ibuprofenem

Ibuprofen je na trhu nabízen v několika lékových formách a zároveň je podáván různými způsoby. Existuje ve formě tablet (potahované, obalené), měkkých tobolek, šumivých tablet, suspenzí, které se podávají perorálně. Rektálně se podává v podobě čípků, parenterálně v podobě infuzního roztoku. Dále je dostupný pro kožní podání ve formě krému nebo gelu.

V tabletách, měkkých tobolkách, šumivých granulích je nejčastěji ibuprofen obsažen v 200, 400 nebo 600 mg. V suspenzích je obsah ibuprofenu 20 mg/ml. Krémy a gely obsahují 50 mg/g ibuprofenu a čípky 60 nebo 125 mg.

• **PERORÁLNÍ PODÁNÍ**

❖ **Potahované tablety**

Mezi přípravky obsahující ibuprofen jako jedinou účinnou látku patří, APO IBUPROFEN 400 mg, BRUFEN 400 a 600 mg, BRUFEN RAPID 400 mg, DOLGIT 800 mg, IBALGIN 200, 400 A 600 mg, IBUMAX 200, 400 A 600 mg, IBUPROFEN AL 400 mg.

Do skupiny, kde se kombinují dvě účinné látky ibuprofen a pseudoefedrin-hydrochlorid patří IBALGIN GRIP 200 mg/ 5 mg, MODAFEN 200 mg/ 30 mg.

❖ **Obalené tablety**

NUROFEN 200 A 400 mg

❖ **Dispergovatelné tablety v ústech**

NUROFEN PRO DĚTI ACTIVE 100 mg

❖ **Měkké tobolky**

NUROFEN RAPID 400 mg, NUROFEN JUNIOR POMERANČ 100 mg, IBALGIN RAPIDCAPS 400 mg

❖ **Šumivé granule**

BRUFEN 600 mg

❖ **Suspenze**

NUROFEN PRO DĚTI 20 mg/ml, IBUPROFEN APOTEX 100 mg/5ml, IBUDOLOR 40 mg/ml, IBALGIN BABY 20 mg/ml

• **PARENTERÁLNÍ PODÁNÍ**

Pedea 5mg/ml

• **REKTÁLNÍ PODÁNÍ**

Nurofen pro děti 60mg

Nurofen pro děti čípky 125 mg

• **KOŽNÍ PODÁNÍ**

❖ **Gel**

IBUMENT-50 mg/g, IBALGIN GEL 50 mg/g, DOLGIT GEL 50 mg/g

❖ **Krém**

IBALGIN DUO EFFECT 50 mg/g+2mg/g, IBALGIN 50 mg/g, DOLGIT KRÉM 50mg/g. ^[11]

2. Metody stanovení ibuprofenu

Pro stanovení ibuprofenu byly již použity různé metody. Mezi hlavní techniky doposud patří metody chromatografické (vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC, plynová chromatografie GC, vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie HPTLC, tenkovrstvá chromatografie TLC), elektroforetické, spektrometrické (ultrafialová UV, infračervená IR), titrimetrické s vizuální a potenciometrickou indikací, dále také spektrofluorimetrické a voltametrické stanovení. ^[12]

2.1 Acidobazická titrace

Acidobazické titrace se také nazývají neutralizační reakce, kdy kyseliny jsou titrovány zásadami a naopak. Bod ekvivalence je detekován buď pomocí barevných indikátorů či potenciometricky skleněnou elektrodou. Barevné indikátory vykazují změnu barvy při změně pH v acidobazických titračních reakcích. Většina indikátorů jsou slabé organické kyseliny nebo barviva, které přijímají nebo darují elektrony. Podle The British Pharmacopoeia se připravený roztok ibuprofenu titruje 0.1 M roztokem NaOH za použití fenolftaleinu jako indikátoru. ^[13]

2.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvou chromatografií lze separovat enantiomery ibuprofenu. Separace probíhá na silikagelových deskách impregnované L-argininem. Na desky se aplikuje malé množství vzorku připraveného z racemického ibuprofenu v ethanolu. Po zaschnutí vzorku se desky vloží do vyvíjecí komory s mobilní fází acetonitril-methanol-voda v poměru 5:1:1. Po zaschnutí jsou vyvinuté desky vloženy do jodové komory, která slouží k detekci. Je to jednodušší a levnější metoda z hlediska nákladů na zařízení a na provoz. ^[14]

2.3 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Při vysokotlaké kapalinové chromatografii dochází k separaci látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází, která za vysokého tlaku prochází kolonou. Stacionární fází tvoří kolona naplněna silikagelem a mobilní fáze je připravena z fosfátového pufru a acetonitrilu. Po průchodu vzorku separační kolonou je vzorek detekován, jeho měřenou veličinou může být absorbance. Výstupem z detektoru je chromatogram - závislost odezvy detektoru na retenčním čase. Lze stanovit přítomnost i koncentraci ve vzorku.

Koncentrace ibuprofenu ve vzorku se stanoví porovnáním výšky píku analytu se standardem. Ke stanovení přítomnosti se využije retenčních časů. ^[15]

2.4 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární elektroforéza je separační technika pro kvalitativní a kvantitativní stanovení. Metoda je založena na rozdílné pohyblivosti elektricky nabitých částic. Separace se provádí v tavené křemenné kapiláře, která je naplněna základním elektrolytem. Převážně se jedná o vhodně zvolený pufr. Na separaci má vliv elektroosmotický tok, kdy anionty se pohybují směrem ke katodě. ^[16]

2.5 UV spektrofotometrie

Tato metoda je založena na absorpci elektromagnetického záření. Ibuprofen vykazuje absorpci v UV rozsahu, tudíž lze UV spektrofotometrií stanovit obsah ibuprofenu ve vzorku. Ibuprofen má dvě absorpční maxima, a to při 264 nm a 272 nm. ^[17]

2.6 Spektrofluorimetrie

Stanovení obsahu ibuprofenu spektrofluorimetrií je založeno na intenzitě emitovaného záření. Molekula ibuprofenu excituje ze základního elektronového stavu do vyššího, poté následuje návrat do základního stavu emisí záření. Buzení molekuly ibuprofenu začíná při vlnové délce 263 nm a emise nastává při vlnové délce 288 nm. ^[12]

3. Stanovení ibuprofenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Existuje mnoho analytických metod využívající chromatografii, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) pro separaci a kvantifikaci enantiomerů ibuprofenu v biologických vzorcích. Většina z nich trpí dlouhou přípravou vzorku, přítomností endogenních interferencí, špatnou citlivostí, drahou chirální stacionární fází a dlouhou dobou analýzy.

K rozlišení enantiomerů ibuprofenu kapalinovou chromatografií se v dnešní době používají tyto kroky:

- 1, Přímé oddělení pomocí chirálních kolon
- 2, Předkolonová derivatizace s opticky čistými chirálními činidly a separace na achirální koloně nebo příprava derivátů s achirálními činidly jako jsou aminy nebo alkoholy před oddělením na chirálních kolonách
- 3, Použití achirálních kolon HPLC s chirální mobilní fází

Derivatizace slouží ke zlepšení separace a detekčních limitů. Derivatizací se převádí chemická sloučenina na produkt podobné chemické struktury, nazývaný derivát. Ibuprofen má slabý chromofor a UV detekce malého množství v podobě nanogramů je obtížná. Díky derivatizaci je zavedena skupina s vysokou molární UV absorpcí. Karboxylová skupina enantiomerů ibuprofenu je přeměněna na ester, anilid, nebo amidovou skupinu. Derivatizace je prováděna s čistým činidlem, což vede k tvorbě diastereoizomerů, které se následně oddělí na chirální koloně na bázi (R)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-fenylglycinu nebo na achirální oktadecyl silikagelové koloně. Také pro derivatizaci enantiomerů ibuprofenu lze použít achirální činidlo a separovat na jedné ze stacionárních fází na bázi celulózy nebo na chirální stacionární fází sestávající z R-1-(1-naftyl)-ethylmočoviny kovalentně vázané na silikagel prostřednictvím propylové vazby.

Enantiomery nederivatizovaného ibuprofenu se separují pomocí stacionární fáze glykoproteinů s kyselinami, stacionární fáze lidského sérového albuminu, cyclobond-I β - cyklodextrínová silika a stacionární fáze na bázi námelových alkaloidů. ^[18]

3.1 Nepřímá metoda chirální separace

3.1.1 Separace na chirální stacionární koloně na bázi R-N-(3,5-nitrobenzoyl) fenylglycinu

Crowther a kolektiv (1984) ^[19] a dvojice **Wainer a Doyle** (1984) ^[20] provádí derivatizaci s enantiomerně čistým činidlem N-(1-naftyl) ethyl aminem. Derivatizace vede k tvorbě diastereoizomerů, které jsou separovány na chirální stacionární koloně na bázi R-N-(3,5-dinitrobenzoyl) fenylglycinu. Eluce je prováděna mobilní fází složené z hexanu a isopropyl alkoholu v poměru 97:3.

3.1.2 Separace na achirální oktadecylové silikagelové koloně

Derivatizaci s enantiomerně čistým činidlem vedoucím k tvorbě diastereoizomerů, které jsou následně separovány na achirální oktadecyl silikagelové koloně provádí ve svých studiích **Shimada a kol.** (1987) ^[21], **Mehvar a kol.** (1988) ^[22], **Avgerinos a Hutt** (1987) ^[23], **Hutt a kol.** (1986) ^[24], **Wright a kol.** (1992) ^[25], **Lee a kol.** (1984) ^[26], **Lemko a kol.** (1993) ^[27], **Péhourcq a kol.** (1995) ^[28], **Lau** (1996) ^[29].

Shimada a kolektiv vyvinul novou derivatizační metodu využívající chirální ferrocenová činidla jako je (R)-(-)-1-ferrocenylethyl amin nebo (S)-(+)-1-ferrocenylpropyl amin. Separace probíhá na koloně Develosil ODS-5 za použití acetonitrilu se sodným acetátovým pufrem jako mobilní fází a za podmínek obrácené fáze. Při elektrochemické detekci vykazuje uspokojivou citlivost + 0,45 V. ^[21]

Mehvar a kolektiv používá jako derivatizační činidlo S-(-)-1-(1-naftyl)ethylamin. Naftylethylamidové deriváty ibuprofenu jsou následně separovány na koloně obrácené fáze C18 s mobilní fází acetonitrilu, vody, kyseliny octové a triethylaminu. Diastereoizomery ibuprofenu jsou detekované při 232 nm. ^[22]

Studie **Avgerinos a Hutt** je založena na štěpení diastereoizomerních amidů vzniklých reakcí enantiomerů ibuprofenu s S-(-)-1-(1-naftyl)ethylaminem. Štěpení probíhá na koloně Hypersil za použití mobilní fáze složené z hexanu a ethylacetátu. Enantiomery jsou detekovány při 254 nm. 0,25 µg/ml je nejnižší koncentrace, která lze stanovit. ^[23]

Lee a kolektiv převádí izomery ibuprofenu na diastereoizomerické S-(+)- oktyl estery pomocí S-(+)-D-Octan-2-olu. Jsou separovány na dvou silikagelových kolonách a mobilní fáze je složena z isopropyl alkoholu v heptanu. UV detektor je nastaven na vlnovou délku 220 nm. [26]

Lemko a kolektiv derivatizuje ibuprofen pomocí S-(-)-1-(1-naftyl) ethylaminu. Odpovídající diastereoizomery jsou separovány na koloně s reverzní fází za použití acetonitrilu, vody, kyseliny octové a triethylaminu jako mobilní fáze. Fluorescenční detekce pro excitaci je 280 nm a pro excitaci 320 nm. Tato metoda vykazuje 0,1 µg/ml jako nejnižší kvantifikovatelnou koncentraci. [27]

L-leucinamidem je derivatizován ibuprofen ve studii **Péhourcq a kolektiv**. Diastereoizomerní amidy jsou separovány na koloně Ultrabase C18 s obrácenými fázemi za použití chirální fáze složené z KH₂PO₄, acetonitrilu, triethylaminu. Detekce je při 225 nm. Tento test umožňuje stanovení 0,1 µg/ml enantiomerů ibuprofenu s přijatelnou přesností. [28]

Studie **Lau** je založena na separaci diastereoizomerů vytvořených reakcí enantiomerů ibuprofenu s S-(-)-1-(1-naftyl) ethyl aminem. Separace probíhá na koloně Inertsil ODS-2 s mobilní fází složenou z vody a acetonitrilu s užitím fluorescenční detekce. Pro excitaci je vlnová délka 280 nm a pro emisi 320 nm. Tato metoda umožňuje nejnižší kvantifikovatelnou koncentraci 0,1 µg/ml. [29]

Stanovení ibuprofenu v lidské plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofluorometrickým detektorem

Tato studie je založena na stanovení enantiomerů ibuprofenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofluorometrickým detektorem a navazuje na práci Lemko a kol. (1993).

Příprava vzorků je provedena podle Lemk a kol. (1993) s malými úpravami. Tudiž k 0,5 ml vzorku plazmy je přidáno 5 µg / ml vnitřního standardu a 200 µl a 1 M kyselina sírová. Po chvíli jsou přidány 3 ml isooktanu a isopropanolu (95: 5 obj./obj.) Po smíchání je prováděno odstředění. Organická fáze je přenesena do čisté zkumavky a odpařen do sucha ve vodní lázni pod proudem dusíku při teplotě 40 °C. Zbytek je znovu rozpuštěn ve 300 µl triethylaminu (TEA) a je přidáno 50 µl ethylchlorformiátu (ECF). Po krátkém míchání je přidáno asi 25 µl derivatizačního činidla S-1-(1-naftyl) ethylaminu (S-NEA). Reakce je zastavená přidáním

25 ul ethanolaminu (EOA). Roztok je přenesen do lahvičky z jantarového skla a je připraven pro automatické injekční dávkování do systému HPLC.

Standards jsou připraveny postupným ředěním zásobních roztoku v rozmezí koncentrací od 50 do 0,2 ug/ml. Zásobní roztok je připraven rozpuštěním racemického ibuprofenu v acetonitrilu, kdy je získán roztok o koncentraci 0,2 mg/ml. Racemický fenoprofen je rozpuštěn v taktěž v acetonitrilu a je získán roztok o koncentraci 5 ug/ml.

Ibuprofen a vnitřní standard Fenoprofen je separován na koloně Symmetry 2 C18 při pokojové teplotě. Mobilní fáze je složena z acetonitrilu, vody, kyseliny octové, triethylaminu v poměru 60:40:0,1:0,02. Výsledné pH mobilní fáze je 5. Po 20-ti minutách je použit 100% acetonitril jako mobilní fáze. Eluát je monitorován spektrofluorometrickým detektorem při 280 nm jako excitační vlnové délce a při 320 nm jako emisní vlnové délce. Fenopren je eluován za 9,50 minut, S enantiomer ibuprofenu za 14,40 minut a R enantiomer ibuprofenu za 16,50 minut.

Vyhodnocení testu je provedeno pomocí kalibrační křivky v koncentračním rozmezí od 0,1 do 50 µg/ml. ^[30]

3.1.3 Separace na chirální stacionární fázi na bázi celulózy

V některých případech se pro derivatizaci enantiomerů ibuprofenu používá achirální činidlo a separace probíhá na jedné ze stacionárních fází na bázi celulózy. Ve svých studiích se tímto zabývá **Okamoto a kol.** (1989) ^[31] a **Van Overbeke a kol.** (1995,1996) ^[32].

Okamoto a kol. provádí separaci pomocí HPLC s UV detekcí. Derivatizaci převádí ibuprofen s opticky aktivními aminy na diastereoizomery. Vzniklý anilidový derivát je podroben separaci pomocí tris-(3,5-dimethyl-fenylkarbamát) celulózy nebo amylozy jako chirální stacionární fáze. Mobilní fázi tvoří hexan-proan-2-ol. ^[31]

Van Overbeke a kol. (1995) se ve studii zaměřují na štěpení ibuprofenu na kolonách Tolycelulóza a Chiralcel OJ. Tolycelulóza obsahuje tris-(4-methylbenzoát) celulózy podobně jako Chiralcel OJ. Karboxylová skupina je derivatizovaná 1-naftylmethylaminem, benzylaminem, 2-methylaminem a benzyl alkoholem. Deriváty 1-naftylmethylaminu vykazují nejlepší výsledky na Tolycelulóze za podmínek obrácené fáze. Chiralcel OJ kolona vykazuje lepší výsledky za normální fáze. Chirální separace závisí na uspořádání polymerních řetězců,

na skutečné konformaci benzoylových skupin nebo na poloze a počtu methylových substituentů na fenylových skupinách. [32]

3.1.4 Separace na stacionární fázi na bázi R-1-(1-naftyl)-ethylmočoviny

Další možností, kterou se zabývá **Ahn a kol.** je separace derivatizovaného ibuprofenu achirálním činidlem p-nitrobenzylamin hydrochloriden na chirální stacionární fázi sestávající z R-1-(1-naftyl)-ethylmočoviny kovalentně vázané na silikagel prostřednictvím propylové vazby. Před samotnou separací je nutné připravit vzorek. K 0,5 ml plazmy obsahující ibuprofen se přidá vhodný vnitřní standart (0,1-0,2 ml) a kyselina sírová (0,2-0,5 ml). Ibuprofen a vnitřní standard se extrahují dichlormethanem nebo isooktan-isopropanolem. Organická vrstva se převede do čisté zkumavky a odpaří se do sucha. Následně se zpracuje derivatizačním činidlem. Minimální kvantifikovatelná koncentrace (MOC) pro každý enantiomer ibuprofenu je 2,5 µg/ml. [33]

Většina metod využívá nepřímé chirální chromatografické metody založené na tvorbě diastereomerních derivátů před analýzou. Tento krok může zavést nepřesnosti při stanovení enantiomerního poměru v důsledku chirálních nečistot v činidle nebo racemizace během procesu derivatizace. Možnou analytickou chybu z enantiomerní kontaminace činidla a racemizace lze eliminovat použitím achirálního činidla pro derivatizaci, např. p-nitrobenzylamin hydrochlorid, 1-naftyl-methylamin, benzylamin, 2-methylbenzylamin a benzyl alkohol. Dále těmto problémům se vyhýbá přímá enantiomerní analýza s použitím enantioselektivních chirálních stacionárních fází. [18]

3.2 Přímá metoda chirální separace

K přímému stanovení enantiomerů nederivatizovaného ibuprofenu **Camilleri a Dyke** (1990) a **De Vries a kolektiv** (1994) využívají ve svých studiích glykoproteinovou stacionární fázi s kyselinami. **Camilleri a Dyke** provádí chirální štěpení enantiomerů ibuprofenu pomocí fosfátového pufru jako mobilní fáze. Ta se skládá z 0,01 M KH_2PO_4 . Pomocí 0,01 M KH_2PO_4 se upraví na požadované pH. UV detekce je při 225 nm. [34] **De Vries** používá jako mobilní fázi fosfátový pufr s dimethyloktyl aminem. UV detekce je při 220 nebo 245 nm. [35]

Při přímém stanovení ve studii používá stacionární fázi z lidského sérového albuminu **Noctor a kol.** (1991). Mobilní fáze je založena na dihydrogenfosforečnanu sodném-hydrogenfosforečnanu sodném modifikovaném kyselinou oktanovou a 18-ti % acetonitrilem. Detekce je pomocí UV absorbance při 254 nm. [36]

Castellani (1994) zkoumá separaci na stacionární fázi na bázi námellových alkaloidů. Mobilní fázi tvoří acetát draselný a acetonitril. Detekce je při 254 nm. [37]

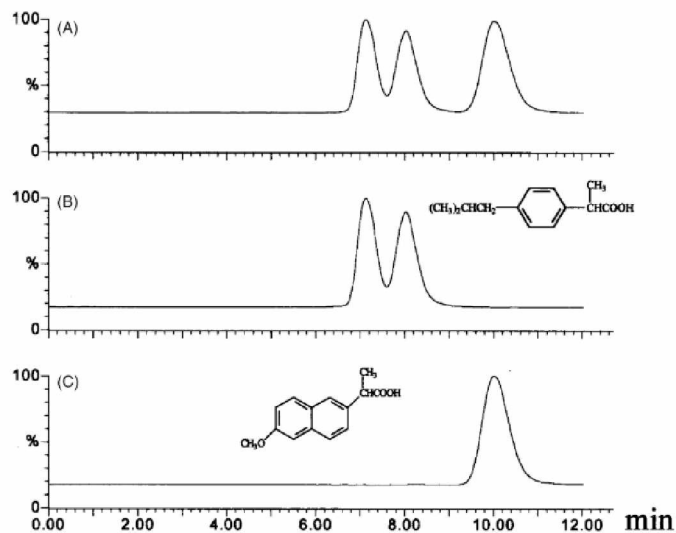
Farkas (1993) a kolektiv se zabývá separací enantiomerů pomocí stacionární fáze cyclobond-I β-cyklodextrinového silikagelu. Eluce probíhá pomocí mobilní fáze složené z citrátu, acetonitrilu, vody s triethylaminem. [38]

Přímé stanovení R a S ibuprofenu v lidské plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrosprejovou hmotnostní detekcí

Bonato a kolektiv se zabývají enantioselektivní analýzou ibuprofenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spolu s elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS-MS).

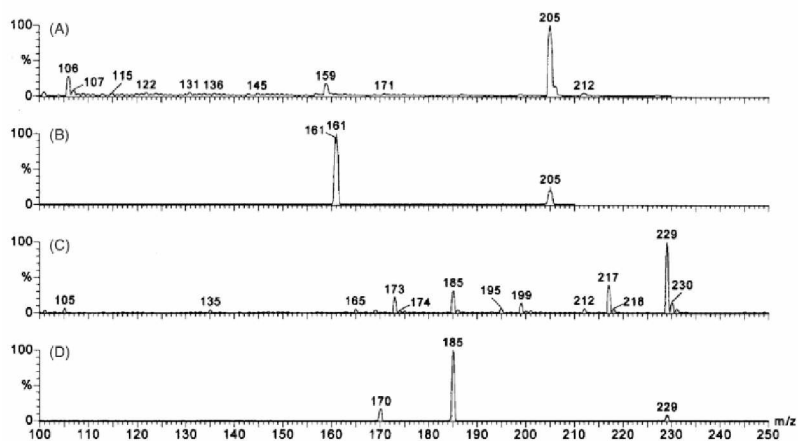
Vzorky plazmy jsou obohaceny o vnitřní standard naproxen a připraveny extrakcí kapalina-kapalina za použití hexanu a ethylacetátu (8:2, obj./obj.).

Štěpení ibuprofenu pomocí HPLC je získáno za použití kolony CHIRALPAK AD-RH s chirální stacionární fází na bázi derivátu tris-(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy za podmínky obrácené fáze. Mobilní fáze je složena z methanolu a vody v poměru 8:2 (V/V) obsahující 0,1% vodného roztoku kyseliny fosforečné při pH 2 a průtoku 0,6 ml/min. Kyselina fosforečná musí být udržována na co nejnižší úrovni z důvodu škodlivého účinku na hmotnostní spektrometrii. Použitím tohoto mírně kyselého roztoku dochází k detekci léčiv, ale kalibrační křivky nejsou v požadovaném rozmezí (0,12-90 ng/ml), tudíž nevedou k lineárním kalibračním křivkám. Tento problém je vyřešen smícháním eluátu s 4,5% vodným roztokem NH₄OH před vstupem do zdroje elektrosprejové ionizace. Za těchto optimalizovaných podmínek jsou na obrázku 6 vyobrazeny chromatogramy monitorovaných reakcí pro celkový iont, ibuprofen a naproxen.



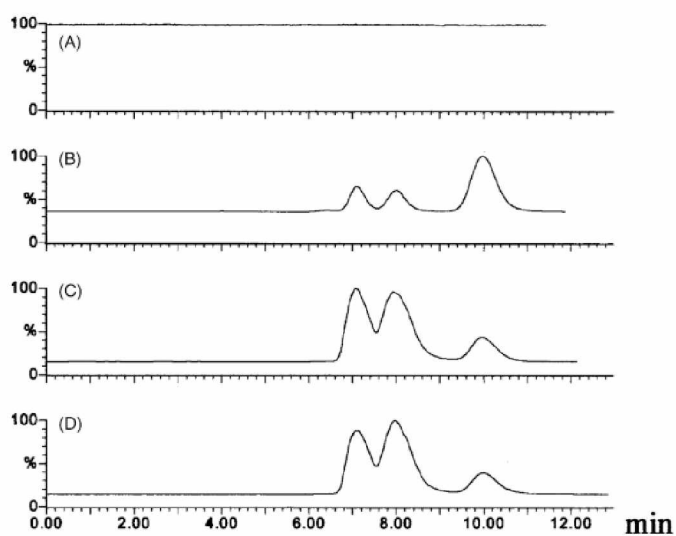
Obrázek 6: Chromatogram pro celkový iont (A), ibuprofen (B) a vnitřní standard naproxen (C)

Systém hmotnostní spektrometrie je třístupňový kvadrupól a elektrosprejová ionizace probíhá v negativním režimu. Kvantifikace je provedena pomocí deprotonovaných molekul a jejich odpovídajících produktových iontů pomocí kalibrační metody vnitřního standardu s plochou píku. Na obrázku 7 je zobrazeno spektrum závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z).



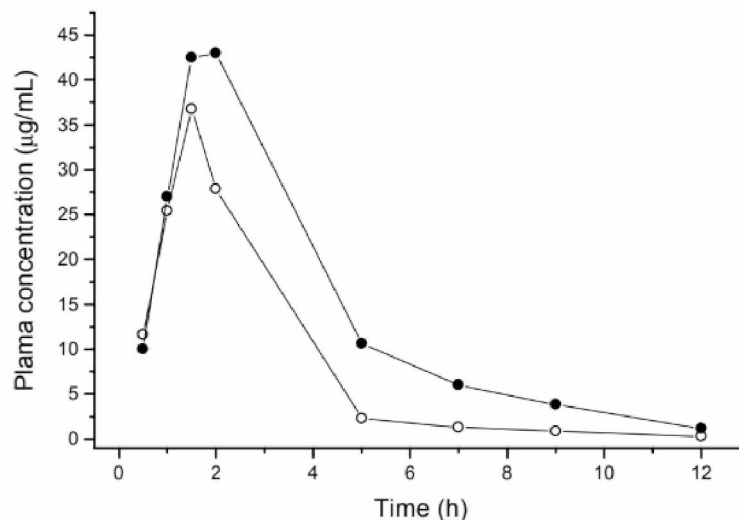
Obrázek 7: Spektrum negativní elektrosprejové ionizace: A-ibuprofen, B- produktový iont ibuprofenu, C-naproxen, D- produktový iont naproxenu

Chromatogram (Obr. 8) a graf závislosti plazmatické koncentrace na čase (Obr. 9) zobrazuje analýzu enantiomerů ibuprofenu v odebraných vzorcích plazmy zdravých dobrovolníků po podání 600 mg racemického ibuprofenu. Na chromatogramu (Obr. 8) je zobrazen slepý vzorek lidské plazmy (A), extrahovaný vzorek lidské plazmy obohacený o 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ enantiomerů ibuprofenu (B), extrahovaný vzorek lidské plazmy odebraný po 1,5 hodině po podání 600 mg rac-ibuprofenu (C) a extrahovaný vzorek lidské plazmy odebraný po 2 hodinách (D).



Obrázek 8: Chromatogramy- koncentrace ibuprofenu v plazmě v závislosti na čase

V grafu (Obr. 9) plné kolečka zobrazují (S)- izomer a prázdné kolečka (R)- izomer.



Obrázek 9: Profil plazmatické koncentrace na čase

Vyvinutá metoda je ověřena vyhodnocením, linearitou, přesností, precizností a kvantifikačním limitem. Mez kvantifikace je 0,12 g/ml a lineární rozmezí pro oba enantiomery 0,12 až 90 µg/ml. [39]

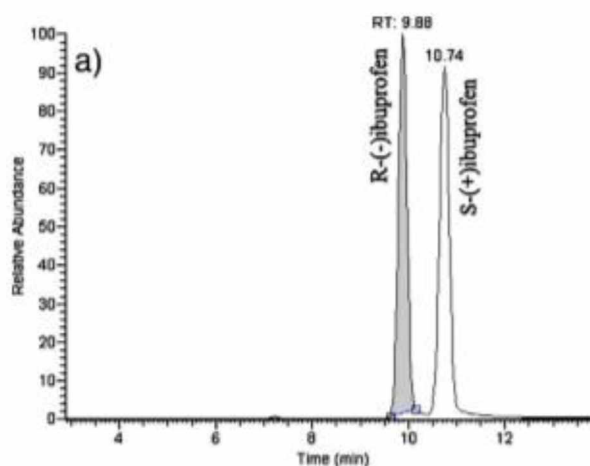
Většina chirálních kolon vyžaduje mobilní fázi, která není kompatibilní s MS systémem, proto většina publikovaných bioanalytických metod pro stanovení ibuprofenu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívá derivatizační proces. Bonato a kolektiv uvádí přímou metodu HPLC/MS/MS, kde problém kompatibility mobilní fáze se systémem MS je překonán přidavkem roztoku NH₄OH. [39] [40]

Přímé stanovení R a S ibuprofenu v lidské plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Přímé stanovení S- a R- izomeru ibuprofenu v lidské plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí v režimu negativní elektrosprejové ionizace je obecně výhodnější pro chromatografickou separaci a probíhá ve velmi krátkém čase. Nepřímé metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí nebo fluorimetrickou detekcí vyžadují velký objem vzorku (plazma 0,5 ml), delší dobu přípravy vzorku v důsledku derivatizačního procesu a nejsou vhodné pro bioekvivalentní studie, kde je potřeba velkého počtu vzorků. Užitím přímého stanovení se vyhne nevýhodám derivatizačního procesu.

V této studii **Nakov a kolektiv** stanovují S- a R- izomer ibuprofenu v lidské plazmě po podání 400 mg racemického ibuprofenu. Jako rozpouštědlo vzorku racemického ibuprofenu je použit methanol (2 mg/ml) a voda v poměru 50:50. Jako vnitřní standart (IS) je použit ketoprofen rozpuštěn v methanolu (1 mg/ml), protože eluuje v blízkosti enantiomerů ibuprofenu a i jeho extrakce je podobná jak u enantiomerů ibuprofenu.

Separace S- a R- ibuprofenu je prováděna na chirální koloně na bázi celulózy jako stacionární fáze za použití 0,1% kyseliny octové ve směsi ethanolu a vody v poměru 90:10 % (obj./obj.) jako mobilní fáze. V této studii kyselina octová nahrazuje kyselinu mravenčí, díky níž se získá molekulární iont ibuprofenu, který se dále fragmentován na hlavní produktový ion (m/z 161). Tudíž zvolená mobilní fáze je kompatibilní se systémem hmotnostní spektrometrie a je dosaženo dobrého rozlišení mezi enantiomery (Obr. 10). Běžnou součástí mobilní fáze v režimu elektrosprejové ionizace ESI je mravenčan amonný, což vede ke ztrátě rozdělení enantiomerů. Přidáním kyseliny mravenčí v methanolu a vodě se docílí chirálního rozdělení. Vede k tvorbě aduktu iontu ibuprofenu s m/z 251 přičemž molekulární iont ibuprofenu (m/z 205) nelze získat.



Obrázek 10: Chromatogram enantiomerů ibuprofenu - HPLC-MS

Nejkritičtějších krokem v bioanalýze je příprava vzorku, proto je nutné použít jednoduchý extrakční postup, který generuje dobré hodnoty výtěžnosti a čisté extrakty. Jsou optimalizovány dva typy přípravy vzorku. A to extrakce kapalina- kapalina (LLE) a extrakce v pevné fázi (SPE), pro které je zkoumán i matricový efekt (ME). Zkoumáním matricového efektu pro LLE a SPE s použitím normální, hyperlipidemické a hemolyzované plazmy je

zjištěno, že LLE poskytuje čistší produkt než SPE a jsou získány pro oba extrakční postupy vynikající hodnoty výtěžnosti. Pro LLE je výtěžnost 85% a pro SPE 95%.

Dalším nejkritičtější krokem je možná chirální konverze in vitro během přípravy vzorku, proto je zkoumán vliv pH a teploty. Zkoumané hodnoty pH ukazují procento interkonverze pro R-ibuprofen menší než 0,5% a pro S-ibuprofen 1%. Procentuální vzájemná přeměna pro R-ibuprofen a S-ibuprofen je přibližně 0,5%. Tudíž ke konverzi in vitro nedochází pod vlivem pH nebo teploty.

Výhodou této metody je enantioselektivita, malý objem vzorku, jednoduchost extrakce, žádný matricový efekt a absence chirální konverze v průběhu celého analytického postupu. Metodu lze použít pro potřeby farmakokinetických a bio ekvivalentních studií.^[40]

Enantioselektivní stanovení dexibuprofenu v tabletách pomocí HPLC za použití detektoru diodového pole

Studie Awad a kolektiv se zabývá kvantifikací dexibuprofenu v dexibuprofenových tabletách pomocí HPLC s ovomucoidní chirální stacionární fází za použití UV/VIS detektoru s diodovým polem DAD. Eluce je prováděna mobilní fází složené z 0,025 M hydrogenfosforečnanu draselného a methanolu s ethanolem.

Tato metoda splňuje specifitu, přesnost, robustnost a stabilitu, tudíž se může používat pro rutinní analýzu dexibuprofenu ve farmaceutických lékových formách.

Příprava vzorku:

Dexibuprofen je rozdrcen na jemný prášek. 50 mg dexibuprofenu je převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml, rozpustěn a doplněn methanolem po rysku. Poté je zředěn na 25 g/ml pomocí 0,025 M hydrogenfosforečnanu draselného při pH 4,5.

Linearita:

Je stanovena řadou pěti koncentrací při 15, 20, 25, 30 a 35 µg/ml. Kalibrační křivka je konstruována vynesemím koncentrací dexibuprofenu na osu X proti chromatografické ploše píku každé koncentrace na ose Y. Pomocí kalibrační křivky je provedena lineární regrese pro výpočet sklonu a průniku.

Rozsah:

Je stanoven v rozsahu tří koncentrací- 80%, 100% a 120%. Relativní směrodatná odchylka dexibuprofenu je 1,075%, což je menší než 2%.

Přesnost a preciznost:

Přesnost je zkoumána u tří koncentrací- 80%, 100% a 120%. Jedná se o neaktivní materiály dexibuprofenu, ke kterým je přidán referenční materiál dexibuprofenu. Přesnost je určena srovnáním zjištěných hodnot koncentrace s očekávanými.

Procentuální výtěžnost pro tři vzorky prezentující koncentrace 80, 100, 120% je 99,135% a relativní směrodatná odchylka (% RSD) je 0,443%. Relativní směrodatná odchylka pro vzorky opakovatelnosti je 1,597% a pro vzorky reprodukovatelnosti je 1,226%. Směrodatné odchylky jsou menší, než 2% což prokazuje, že metoda je přesná pro kvantifikaci ibuprofenu a má dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost.

Vzorek	Koncentrace	Teoretická koncentrace (g/ml)	Naměřená koncentrace (g/ml)	Procenta
1.	80%	6,4	6,350	99,218
2.	100%	8,0	7,931	99,136
3.	120%	9,6	9,488	98,829

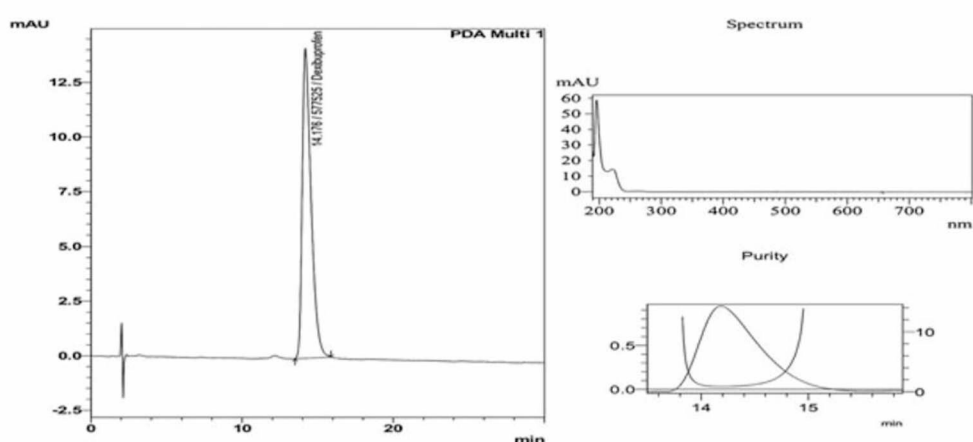
Tabulka 1: Údaje o přesnosti dexibuprofenu

Vzorek	% výtěžnost opakovatelnosti	% výtěžnost reprodukovatelnosti
1.	102,291	102,449
2.	100,994	100,081
3.	100,636	99,345
4.	101,161	100,253
5.	104,924	100,987
6.	103,157	102,215

Tabulka 2: Údaje o preciznosti ibuprofenu

Specifičnost:

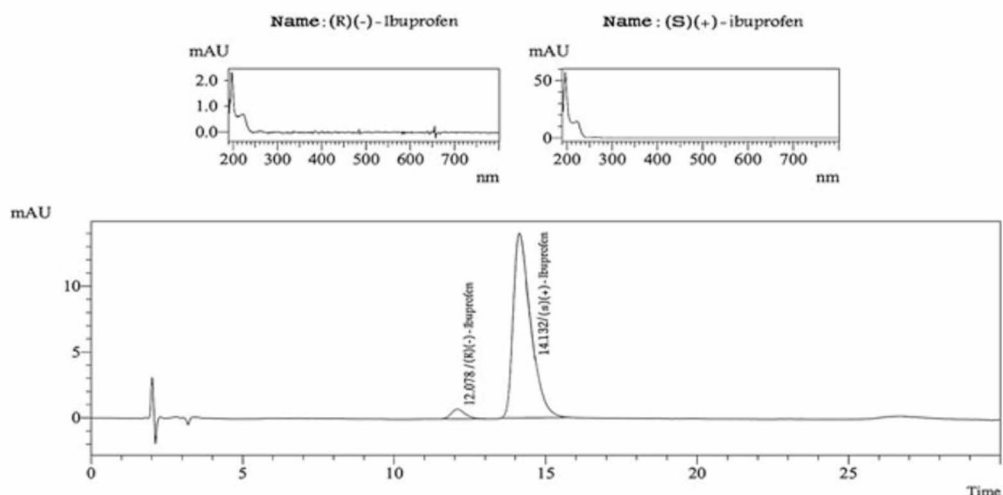
Je schopnost posoudit analyt v přítomnosti dalších složek, které lze očekávat. Chromatogram standardního roztoku dexibuprofenu (Obr. 11) je porovnáván s testovacím roztokem, placebo roztokem a namáhaným roztokem. Je zkoumána maximální čistota dexibuprofenu. Zjištěná čistota 0,9999, což vykazuje schopnost metody stanovit dexibuprofen za přítomnosti rušivých látek.



Obrázek 11: Chromatogram standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml) s UV spektrem a čistotou

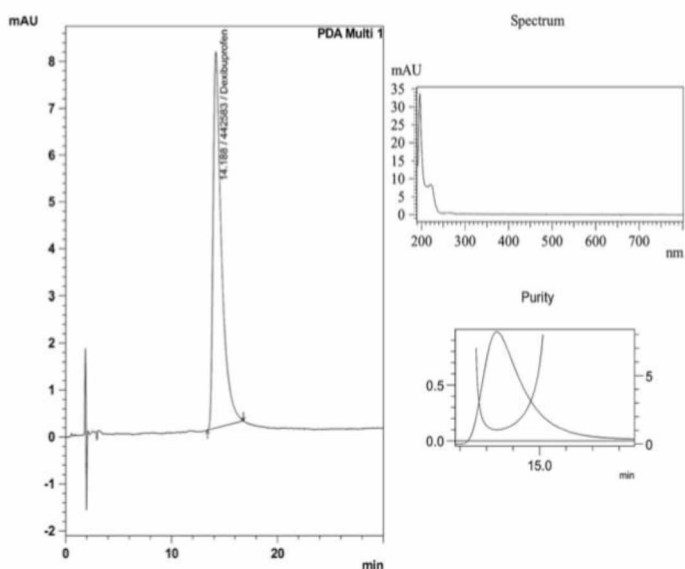
Zátěžový degradační test:

Pro test je použit referenční roztok dexibuprofenu s koncentrací 25 mg/ml a je vystaven zátěžovým podmínkám. Vykazuje, že metoda je enantioselektivní pro kvantifikaci dexibuprofenu (S- izomeru) za přítomnosti R-izomeru ibuprofenu (Obr. 12). Maximální čistota dexibuprofenu při alkalické hydrolýze je 0,9999. Alkalická hydrolýza je provedena použitím 5 M hydroxidu sodného s refluxem po dobu 8 hodin. R-izomer ibuprofenu je identifikován touto metodou injekcí racemického roztoku ibuprofenu (25 mg/ml), což ukazuje s dobrým rozlišením dva píky obou enantiomerů (R, S). Dochází ke snížení plochy píku S-izomeru o 2% a mírnému zvýšení plochy píku R-izomeru, jako produktu degradace. UV spektra S-izomeru a R-izomeru při alkalické hydrolýze jsou identická.



Obrázek 12: Chromatogram alkalické hydrolyzy standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml) ukazující R-izomer ibuprofen jako produkt rozkladu

Maximální čistota při kyselé hydrolyze je 0,9999. Alkalická hydrolyza je provedena použitím 0,01 M kyseliny chlorovodíkové s refluxem po dobu 4 hodin při 40 °C. Dochází ke snížení plochy píku dexibuprofenu o 23% bez detekce produktu degradace. Dexibuprofen je zcela stabilní vůči oxidaci 30-ti % roztokem peroxidu vodíku (H₂O₂) při pokojové teplotě. Do 48 není pozorována žádná degradace.



Obrázek 13: Chromatogram kyselé hydrolyzy standardního roztoku dexibuprofenu (25 mg/ml)

Robustnost:

Malými, ale záměrnými změnami parametrů metody jako je změna teploty, mobilní fáze, pH roztoku pufru v mobilní fázi jsou získány přijatelné procentuální změny výtěžnosti. [41]

Změny parametrů metody	Výtěžek %
Teplota z 25°C na 27 °C	100,947 ± 0,024%
Složení mobilní fáze (pufr-methanol-ethanol) z poměru 85:10:5 na 85:8:7	100,527 ± 0,132%
pH pufru v mobilní fázi z 4,5 na 4,4	100,85 ± 0,011%

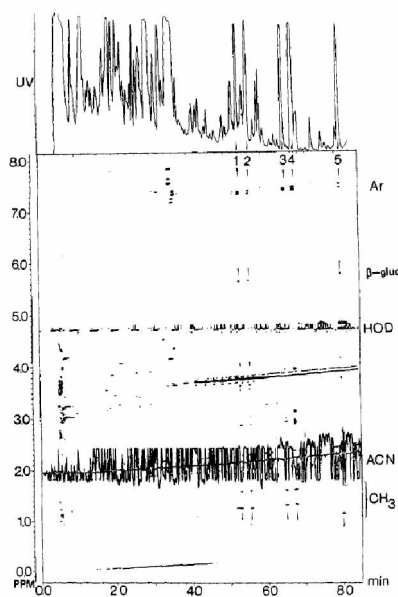
Tab. 3 Údaje o robustnosti dexibuprofenu

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená se spektroskopií nukleární magnetické rezonance: Stanovení metabolitů ibuprofenu v moči

Propojení technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a nukleární magnetické rezonance (NMR) poskytuje vysoce kvalitní spektrální údaje, které umožňují jednoznačnou identifikaci metabolitů ibuprofenu v moči. Zejména se ukazuje jako užitečná i pro nestabilní sloučeniny, jako jsou estery glukuronidu ibuprofenu. Protože tyto sloučeniny se rozkládají v průběhu zdlouhavého izolačního postupu.

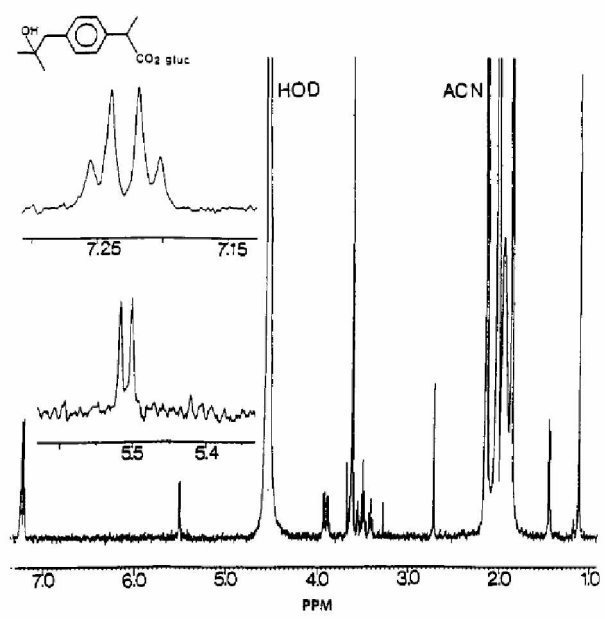
V této studii je moč získána od zdravého dobrovolníka po jediné terapeutické dávce ibuprofenu (400 mg). Aby se zabránilo rozkladu metabolitů esteru glukuronidu, vzorek je při odběru okyselen na pH 2 pomocí HCl. Analýza jednoho podílů tohoto vzorku (10 ml) je prováděna na lyofilizovaném koncentrátu moči. Analýza druhého podílu je prováděna na vyčištěném extraktu, který se získá extrakcí z pevné fáze.

Na obrázku 14 je znázorněn typický chromatogram ilustrující jak absorpci UV záření, tak detekci NMR.

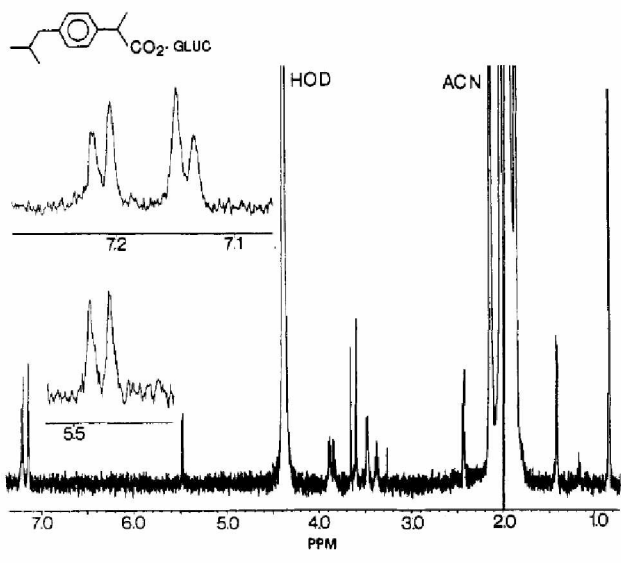


Obrázek 14: Profil HPLC-UV NMR metabolitů ibuprofenu obsažených v moči

Jsou získaná spektra pro metabolity glukuronidu hydroxylované 2-[4-(2-hydroxy-2 methyl propylfenyl) kyseliny propionové (Obr. 15) a ibuprofen glukuronidu (Obr. 16). Na obrázku 14 je zobrazen chromatogram, kdy spektra odpovídají jeho píkům s retenčními časy 53,69 a 81,16 minut (píky 1 a 5). Pík 3 odpovídá spektru pro nekonjugovanou HMPPA s retenčním časem 65,70 minut. Pík 4 odpovídá pro 2-[4-(2-karboxy-2-methyl-propylfenyl) propionovou kyselinu s retenčním časem 68,40 minut a jeho odpovídajícímu glukuronidu náleží pík 2 s retenčním časem 56,38. [42]



Obrázek 15: Spektrum pro HMPPA glukuronid



Obrázek 16: Spektrum pro glukuronid ibuprofenu

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat rešerši o ibuprofenu. První část se zabývá chemickými a fyzikálními vlastnostmi, farmakologickými vlastnostmi, lékovými formami a syntézami ibuprofenu. Další část stručně popisuje metody stanovení ibuprofenu se zaměřením na kapalinovou chromatografii s různým typem detekce.

Ibuprofen se řadí do skupiny nesteroidních antiflogistik. Využívá se k tlumení bolesti, zánětů a horeček. Mechanismem účinku je inhibice enzymu cyklooxygenázy, která zodpovídá za tvorbu prostaglandinů. To jsou látky, které způsobují bolest a zvyšují teplotu. Prodává se jako racemická směs ale protizánětlivé účinky vykazuje (S)- izomer. Existuje ve formě tablet, suspenzí, čípků, gelů a krémů.

Ibuprofen lze stanovit několika analytickými metodami. Nejčastější metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Slouží především k separaci metabolitů a vícevzorkové analýze. K separaci enantiomerů ibuprofenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se používají přímé nebo nepřímé metody. Nepřímá metoda je založena na derivatizaci před analýzou, což vede k tvorbě diastereoizomerních derivátů. Nevýhodou této metody je možný vznik nepřesnosti při stanovení enantiomerů a racemizace v průběhu derivatizace. Těmto problémům je možné předejít přímou metodou chirální separace. U vysokoúčinné kapalinové chromatografie se hojně používá spektrofotometrický detektor v UV a VIS oblasti a detektor diodového pole. Dále je využívána tandemová hmotnostní detekce s elektrosprejovou ionizací a spektrofluorometrická detekce.

POUŽITÁ LITERATURA

1. HAMPL, František, RÁDL, Stanislav, PALEČEK, Jaroslav. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
2. RAINSFORD, Kim D. Ibuprofen: from invention to an OTC therapeutic mainstay. *International Journal of Clinical Practice*, 2013, 67, 9-20.
3. Ibuprofen. The Merck Index* online [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, 2018. Last Revised 2013. [6.12.2019]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6189/ibuprofen?q=authorize>
4. GREENHALGH, Mark D., KOLODZIEJ, Adam, SINCLAIR, Fern, THOMAS, Stephen P. Iron-Catalyzed Hydromagnesiation: Synthesis and Characterization of Benzylic Grignard Reagent Intermediate and Application in the Synthesis of Ibuprofen. *Organometallics*., 2014, 33 (20), 5811-5819.
5. MURPHY, Mark A. Early Industrial Roots of Green Chemistry and the history of the BHC Ibuprofen process invention and its Quality connection. *Foundations of Chemistry*., 2018, 20 (2), 121-165.
6. HAMPL, František, PALEČEK, Jaroslav. *Farmakochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. ISBN 80-708-0495-5.
7. SMITH, William L., DEWITT, David L., GARAVITO, Michael. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*., 2000, 145-182.
8. KAPEDANOVSKA NESTOROVSKA, Aleksandra, JAKJOVSKI, Krume, NAUMOVSKA, Zorica, STERJEV, Zoran, GESKOVSKA MATEVSKA, Nadica, MLADENOVSKA, Kristina, SUTURKOVA, Ljubica, DIMOVSKI, Aleksandar. AKR1D1*36 C>T (rs1872930) allelic variant is associated with variability of the CYP2C9 genotype predicted pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers – a pilot study in healthy volunteers. *Acta Pharmaceutica*., 2019, 69 (3), 399-412.
9. LEWIS, Fraser, CONNOLLY, Mark P., BHATT, Aomesh. A Pharmacokinetic Study of an Ibuprofen Topical Patch in Healthy Male and Female Adult Volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*., 2018, 7 (7), 684-691.

10. VARRASSI, Giustino, PERGOLIZZI, Joseph V., DOWLING, Pascal, PALADINI, Antonella. Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative. Review. *Advances in Therapy.*, **2020**, 37, 61-82.
11. <http://www.sukl.cz/> (cit. 24.03.2020)
12. DAMIANI, Patricia C., BEARSOTTI, Mariela, CABEZÓN, Miguel A. Spectrofluorimetric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, **2001**, 25, 679–683.
13. ADUSEI, Emmanuel B. A., ADOSRAKU, Reimmel K., OPPONG-KYEKYEKU, James, AMENGOR, Cedric D. K.. Investigation of Acid-Base Indicator Property of Plumbagin from *Plumbago zeylanica* Linn. *International Journal of Analytical Chemistry.*, **2019**, 1-13.
14. BHUSHAN, Ravi, PARSHAD, Vineeta. Resolution of (\pm)-ibuprofen using l-arginine-impregnated thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **1996**, 721 (2), 369-372.
15. HIRAI, Toshio, MATSUMOTO, Shozo, KISHI, Ikuo. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.*, **1997**, 692 (2), 375-388.
16. TOASAKSIRI, S., D.L. MASSART a Y.Vander HEYDEN. Study of method validation criteria in a capillary electrophoresis method for the separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Analytica Chimica Acta.*, **2000**, 416 (1), 29-42.
17. SUNARIC, Slavica, PETKOVIC, Milica, DENIC, Marko, MITIC, Snezana, PAVLOVIC, Aleksandra. Determination of ibuprofen in combined dosage forms and cream by direct spectrophotometry after solid- phase extraction. *Acta Poloniae Pharmaceutica.*, **2013**, 70 (3), 403-411.
18. MARTENS, Jurgen, BHUSHAN, Ravi. Resolution of Enantiomers of Ibuprofen by Liquid Chromatography: A review. *Biomed. Chromatogr.*, **1998**, 12, 309-316.
19. CROWTHER, Joan ,COVERY, Thomas, DEWEY, E.A. , HENION, John. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of optically active drugs. *Anal. Chem.*, **1984**, 56 (14), 2921-2926.

20. WAINER, Irving, DOYLE, Thomas. Applications of high performance liquid chromatography, chiral stationary phases to pharmaceutical analysis: structural and conformational effects in the direct enantiomeric resolution of α -methyl aryl acetic acid anti-inflammatory agents. *J. Chromatogr.*, **1984**, 284, 117-124.
21. SHIMADA, Kazutake, HANIUDA, Emi, OE, Tomoyuki, NAMBARA, Toshio. Ferrocene derivatisation reagents for optical resolution of carboxylic acids by hplc with electrochemical detection. *J. Lig. Chromatogr.*, **1987**, 10, 3161- 3172.
22. MEHVAR, Reza, JAMALI, Fakhreddin, PASUTTO, Franco. Liquid chromatographic assay of ibuprofen enantiomers in plasma. *Clin. Chem.*, **1988**, 34, 439-496.
23. AVGERINOS, Andreas, HUTT, Andrew. Determination of enantiomeric composition of ibuprofen in human plasma by HPLC. *Journal Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1987**, 5, 75-83.
24. HUTT, Andrew, FOURNEL, Simone, COLDWELL, James. Application of a racemic compression column to the hplc separation of the enantiomers of soe 2-arylpropionic acids as their diastereoisomeric S(-)-1-(1-naphtyl) ethyl amides. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1986**, 51, 409-418.
25. WRIGHT, Matthew, SATTARI, Saeed, BROCKS, Dion, JAMALI, Fakhreddin. Improved HPLC assay method for the enantiomers of ibuprofen. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1992**, 121, 259-265.
26. LEE, Edmund, WILLIAMS, Kenneth, GRAHAM, Garry, DAY, Richard, CHAMPION, David. Liquid chromatographic determination and plasma concentration profile of optical isomers of ibuprofen in human, *J. Pharma. Sci.* **1984**. 73, 1542-1544.
27. LEMKO, Cathy, CAILLE, Gilles, FOSTER, Robert. Stereospecific sample assay of ibuprofen: improved sensitivity and sample processing efficiency. *J. Chromatogr.*, **1993**, 130, 330- 335.
28. PEHOUCQ, Fabienne, LAGRANGE, Fabrice, LABAT, Laurence, BANNWARTH, Bernard. Simultaneous measurement of flurbiprofen, ibuprofen and ketoprofen enantiomer concentrations in plasma using L-leucinamide as the chiral coupling component. *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 3969-3979.

29. LAU, Yau Yi. Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by derivatisation and HPLC with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **1996**, 19, 2143-2153.
30. CANAPARO, Roberto, MUNTONI, Elisabetta, ZARA, Gian Paolo. Determination of Ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.*, **2000**, 14 (4), 219-226.
31. OKAMOTO, Yoshio, ABURATANI, Ryo, KAIDA, Yuriko, HATADA, Koichi, INOTSUME, Nobuo, NAKANO, Masahiro. Direct chromatographic separation of 2-aryl propionic acid enantiomer using tris-3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases. *Chirality*, **1989**, 1, 239-242.
32. VAN OVERBEKE, An, BAEYENS, Willy, DEWAELE, Chris. Comparative study on the enantiomeric separation of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on two cellulose based chiral stationary phases. *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 2427-2423.
33. AHN, Hy, SHIU, Gerald, TRAFTON, Walter, DOYLE, Thomas. Resolution of the enantiomers of ibuprofen; comparison study of diastereomeric method and chiral stationary phase method. *J. Chromatogr. B*, **1994**, 653, 163-169.
34. CAMILLERI, Patrick, DYKE, Catherine. Effect of deuterium oxide (heavy water) on the resolution of the optical isomers of ibuprofen on an α -acid glycoprotein column. *J. Chromatogr.*, **1990**, 518, 277-281.
35. DE VRIES, Jennie. SCHMITZ-KUMMER, E., SIEMON, D. The analysis of ibuprofen enantiomers in human plasma stationary phase. *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, 17, 2127-2145.
36. NOCTOR, Graham, FELISE, Lawrence, WAINER, Irving. Stereochemical resolution of enantiomeric 2-aryl propionic acid NSAID on human serum albumin based hplc chiral stationary phase. *Chromatographia*, **1991**, 31, 55-59.
37. CASTELLANI, Loredana, FLIEGER, Miroslav SINIBALDI, Massimo. Enantiomer separation of 2-arylpropionic acids on an ergot alkaloid based stationary phase microbore column application. *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, 17, 3695-3703.

38. FARKAS, Gyula, IRGENS, Leif, QUINTERO, Gilberto, BESSON, Michelle. Displacement chromatography on cyclodextrin silicas IV. Separation of the enantiomers of ibuprofen. *J. Chromatogr.*, **1993**, 645, 67-74.
39. BONATO, Pierina Sueli , DEL LAMA, Maria Perpetua F.M., CARVALHO, Roberto de. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spektrometry. *Journal of Chromatography B*, **2003**, 413–420.
40. NAKOV, Natalija, PETKOVSKA, Rumenka, UGRINOVA, Liljana, KAVRAKOVSKI, Zoran, DIMITROVSKA, Aneta, SVINAROV, Dobrin. Critical development by design of a rugged HPLC-MS/MS method for direct determination of ibuprofen enantiomers in human plasma. *Journal of Chromatography B*, **2015**, 992, 67-75.
41. AWAD, Hanan, ABOUL-ENEIN, Hassan Y., LASHIN, Sherif. A validated enantioselective HPLC assay of dexibuprofen in dexibuprofen tablet formulations. *Biomedical Chromatography*, **2012**, 26 (4), 502-506.
42. SPRAUL, Manfred., HOFMANN, Martin, DVORTSAK, Peter, NICHOLSON, Jeremy K., WILSON, Ian D. High-performance liquid chromatography coupled to high-field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: application to the urinary metabolites of ibuprofen. *Analytical Chemistry*, **2002**, 65 (4), 327-330.