

## **OZNACZANIE NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH TECHNIKĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją ROZPRASZANIA ŚWIATŁA PRZEZ ODPAROWANIE**

### **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 postępom 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 specjalnej 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 optymalizacja warunków detekcji rozproszenia światła przez odparowanie do chromatograficznego oznaczania ibuprofenu w preparatach farmaceutycznych oraz analiza ilościowa próbek niesteroidowych leków przeciwzapalnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz i porównanie zawartości ibuprofenu z wartością deklarowaną przez producentów.

## 3. Odczynniki i aparatura

### 3.1. Aparatura i sprzęt chemiczny

- chromatograf ciekowy 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;
- dejonizator wody Millipore (MILI-Q-PLUS);
- waga laboratoryjna Scaltec SBC 21;
- pipety automatyczne;
- statywy na probówki;
- kolby miarowe, zlewki, naczynka wagowe, lejki, probówki typu Eppendorf, fiolki do HPLC.

### 3.2. Odczynniki

- 85% 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
- prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min
- objętość wprowadzanej próbki: 5 µl
- czas analizy: 2 minuty
- analityczna długość fali (UV-Vis): 264 nm

#### Domyślne warunki detekcji ELS:

- przepływ gazu: 1,6 SLM
- temperatura parownika: 30 °C
- temperatura nebulizatora: 30 °C
- wzmocnienie sygnału fotopowielacza (gain): 1
- tempo danych: 10 Hz
- wygładzenie: 30

- intensywność źródła światła: 100%

Schemat postępowania:

1. Włączenie chromatografu cieczowego oraz detektora (postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia oraz instrukcją od chromatografu i detektora).
2. Podłączenie kolumny do chromatografu (postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia) i jej uruchomienie.
3. Kondycjonowanie kolumny chromatograficznej.
4. Ustawienie parametrów metody (NLPZ\_SPECJALIZACYJNE.M) i sekwencji analiz (NLPZ\_SPECJALIZACYJNE.S).
5. Wykonanie analiz (Subdirectory: NLPZ\_SPECJALIZACYJNE).
6. Umycie kolumny chromatograficznej i przygotowanie do dłuższego przechowywania.

#### 4.2. Optymalizacja warunków detekcji rozproszenia światła przez odparowanie

Schemat postępowania:

1. **Przygotowanie roztworu roboczego ibuprofenu.** Z roztworu podstawowego ibuprofenu o stężeniu 5 mg/ml przygotować 1 ml roztworu roboczego o stężeniu 0,5 mg/ml. Rozcieńczenie roztworu macierzystego ibuprofenu wykonać na podstawie samodzielnie wykonanych obliczeń. Do rozcieńczeń wykorzystać metanol.
2. **Optymalizacja temperatury parownika.** Wykonać analizy chromatograficzne roztworu roboczego ibuprofenu dla zakresu temperatur parownika 30 – 55 °C, we wzroście co 5 °C. Dla pozostałych parametrów detektora, zastosować wartości domyślne. Wykonać wykres zależności powierzchni piku od temperatury parownika. Na podstawie uzyskanych wyników, wybrać optymalną temperaturę parownika.
3. **Optymalizacja temperatury nebulizatora.** Wykonać analizy chromatograficzne roztworu roboczego ibuprofenu dla zakresu temperatur nebulizatora 40 – 90 °C, we wzroście co 10 °C. Dla pozostałych parametrów detektora, zastosować wartości domyślne oraz zoptymalizowaną temperaturę parownika. Wykonać wykres zależności powierzchni piku od temperatury nebulizatora. Na podstawie uzyskanych wyników, wybrać optymalną temperaturę nebulizatora.
4. **Optymalizacja przepływu gazu parownika.** Wykonać analizy chromatograficzne roztworu roboczego ibuprofenu dla zakresu przepływu gazu parownika 1,0 – 3,0 SLM, we wzroście co 0,5. Dla pozostałych parametrów detektora, zastosować wartości domyślne oraz zoptymalizowane temperatury parownika i nebulizatora. Wykonać wykres zależności powierzchni piku od przepływu gazu parownika. Na podstawie uzyskanych wyników, wybrać optymalną wartość przepływu gazu parownika.
5. **Optymalizacja tempa wysyłania danych (Hz) z detektora ELS.** Wykonać analizy chromatograficzne roztworu roboczego ibuprofenu dla wartości tempa danych równych 10, 40 oraz 80 Hz. Dla pozostałych parametrów detektora, zastosować wartości domyślne oraz zoptymalizowane temperatury parownika i nebulizatora, a także dobraną prędkość przepływu gazu. Wykonać wykres zależności powierzchni piku od

tempa wysyłania danych z detektora ELS. Na podstawie uzyskanych wyników, wybrać optymalną wartość tempa danych.

- 6. Optymalizacja czasu odpowiedzi (wygładzania).** Wykonać analizy chromatograficzne roztworu roboczego ibuprofenu dla wartości wygładzania równych 1, 5, 10, 30, 40, 50. Dla pozostałych parametrów detektora, zastosować wartości domyślne oraz zoptymalizowane: temperatury parownika i nebulizatora, prędkość przepływu gazu oraz tempo danych. Wykonać wykres zależności powierzchni piku od czasu odpowiedzi (wartości wygładzania). Na podstawie uzyskanych wyników, wybrać optymalną wartość wygładzenia sygnału.

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

Schemat postępowania:

1. Przygotować dwie serie roztworów, w których końcowe stężenie ibuprofenu (w próbce po rozcieńczeniu do objętości 1 ml) wynosi: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 mg/ml. Szereg rozcieńczeń roztworu macierzystego ibuprofenu wykorzystywanych do sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotować na podstawie przeprowadzonych samodzielnie obliczeń. Rozcieńczenia przygotować w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Do rozcieńczeń wykorzystać metanol.
2. Wykonać analizy chromatograficzne przygotowanych próbek do krzywej kalibracyjnej, stosując zoptymalizowane parametry detekcji ELS.

4.4. Przygotowanie roztworów preparatów farmaceutycznych w dwóch powtórzeniach.

Schemat postępowania:

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

Masa tabletki ~ 0,7 g (400 mg ibuprofenu) → naważka 8x mniejsza → naważkę rozpuścić w metanolu w kolbie 5 ml → pobrać 1 ml i rozcieńczyć do 10 ml metanolem → pobrać 1 ml i rozcieńczyć do 10 ml metanolem

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

Masa tabletki ~ 0,7 g (200 mg ibuprofenu + 325 mg paracetamolu) → naważka 4x mniejsza → naważkę rozpuścić w metanolu w kolbie 5 ml → pobrać 1 ml i rozcieńczyć do 10 ml metanolem → pobrać 1 ml i rozcieńczyć do 10 ml metanolem

UWAGA: każdorazowo należy sprawdzić dokładną masę całej tabletki!

## 5. Opracowanie wyników

1. Do sprawozdania należy dołączyć wykresy zależności uzyskane w wyniku optymalizacji warunków detekcji rozproszenia światła przez odparowanie wraz z tabelą, w której zestawione zostaną wyznaczone wartości podstawowych parametrów detektora ELS.

Optymalizowany parametr detekcji ELS	Wartość
Temperatura parownika, °C	
Temperatura nebulizatora, °C	
Przepływ gazu parownika, SLM	
Tempo danych, Hz	
Wygładzenie sygnału	

2. Metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną (zależność logarytmu dziesiętnego średniej powierzchni pików od logarytmu dziesiętnego stężenia ibuprofenu), wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji  $R^2$ . Wyliczyć względne odchylenie standardowe oraz odzysk dla poszczególnych stężeń. Wyniki zamieścić w tabeli.

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

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

## 6. Literatura

- Z. Witkiewicz, W. Wardencki, I. Malinowska, Chromatografia cieczowa – teoria i praktyka, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2019, Warszawa.
- Agilent Serii 1200 Infinity ELSD – Podręcznik użytkownika, Agilent Technologies, 2013, Niemcy.
- 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.