

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Markéta Bolíková

ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE IBUPROFENU
Electrochemical oxidation of ibuprofen

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. 5. 2022

.....

Podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá elektrochemickou oxidací aktivní farmaceutické látky ibuprofenu jako jedné ze součástí studií stability léčivých přípravků. Úkolem je zajistit optimální podmínky pro průběh elektrochemické oxidace, při kterých vzniká největší procento degradačních produktů, porovnat průtokové a statické experimentální uspořádání a jeho vliv na výsledek elektrochemické oxidace a provést identifikaci vzniklých degradačních produktů. Mezi zkoumané podmínky patří pH pufru použitého pro rozpouštění ibuprofenu, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu a délka trvání oxidace.

K separaci a stanovení degradačních produktů byla použita metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Jako kolona byla zvolena Acquity UPLC BEH C18 o rozměrech 2,1 × 100 mm; 1,7 μm. Mobilní fázi tvořila vodná složka (10mM mravenčan amonný o pH 3,0) a organická složka (acetonitril). Detekce probíhala pomocí detektoru s fotodiodovým polem při vlnové délce 222 nm a pomocí kvadrupólového hmotnostního detektoru v rozsahu skenu m/z 50-400.

Elektrochemická oxidace byla uskutečněna v radiální elektrochemické průtokové cele a podmínky, za kterých vznikalo největší procento degradačních produktů, byly následující: 100mM octan amonný o pH 3,5, napětí vkládané na pracovní elektrodu 1,6 V, délka trvání oxidace 3600 s a statický mód. Bylo zjištěno, že ibuprofen při elektrochemické oxidaci podléhá degradaci a vznikají celkem tři degradační produkty s relativními retenčními časy 0,93, 0,98 a 1,14. Dva z těchto produktů byly identifikovány pomocí hmotnostního detektoru, jedná se pravděpodobně o 2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanovou kyselinu s relativním retenčním časem 0,93 a hlavní produkt 1-isobutyl-4-vinylbenzen s relativním retenčním časem 0,98. Degradační produkt s relativním retenčním časem 1,14 se nepodařilo identifikovat.

Klíčová slova: ibuprofen, elektrochemická oxidace, UPLC, degradační produkty

Abstract

This diploma thesis deals with the electrochemical oxidation of the active pharmaceutical ingredient ibuprofen as one of the parts of the stability studies of pharmaceutical products. The task is to ensure optimal conditions for the course of electrochemical oxidation, which produces the largest percentage of degradation products, to compare the flow and static experimental setup and its effect on the result of electrochemical oxidation and to identify the resulting degradation products. The examined conditions include the pH of the buffer used to dissolve ibuprofen, the potential applied to the working electrode and the duration of oxidation.

Ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass detection was used to separate and determine degradation products. Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm; 1.7 μm) was chosen as the separation column. The mobile phase consisted of an aqueous component (10mM ammonium formate with pH 3.0) and an organic component (acetonitrile). Detection was performed using a photodiode array detector at a wavelength of 222 nm and a quadrupole mass detector in the scan range m/z 50-400.

The electrochemical oxidation was performed in a radial electrochemical flow cell and the conditions under which the largest percentage of degradation products formed were as follows: 100mM ammonium acetate with pH 3.5, voltage applied to the working electrode 1.6 V, oxidation duration 3600 s and the static mode. Ibuprofen was found to degrade during electrochemical oxidation, producing three degradation products with relative retention times of 0.93, 0.98 and 1.14. Two of these products were identified by a mass detector, they were probably 2-[4-(2-methylpropanoyl)phenyl]propanoic acid with a relative retention time of 0.93 and the major product 1-isobutyl-4-vinylbenzene with a relative retention time of 0.98. A degradation product with a relative retention time of 1.14 could not be identified.

Key words: ibuprofen, electrochemical oxidation, UPLC, degradation products

Poděkování

Chtěla bych poděkovat RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za trpělivost a čas, který se mnou této práci věnoval. Dále patří obrovské díky Mgr. Filipu Vymyslickému za trpělivost, pomoc a rady, které mi poskytoval v průběhu měření a sepisování práce. Chtěla bych také poděkovat své rodině, která mi byla po celou dobu studia velkou oporou.

Obsah

1	Teoretický úvod	- 11 -
1.1	Cíl práce	- 11 -
1.2	Ibuprofen.....	- 11 -
1.3	Degradační studie ve farmaceutickém průmyslu	- 12 -
1.3.1	Vliv hydrolýzy.....	- 12 -
1.3.2	Vliv oxidace	- 13 -
1.3.3	Vliv teploty.....	- 13 -
1.3.4	Vliv fotolýzy	- 13 -
1.4	Mechanismy oxidace API	- 13 -
1.5	Metody oxidativní degradace ibuprofenu	- 15 -
1.6	Metody elektrochemické oxidace ibuprofenu.....	- 19 -
1.7	Lékopisné stanovení ibuprofenu	- 22 -
1.8	Další metody stanovení ibuprofenu	- 24 -
1.9	Spojení elektrochemie s hmotnostní detekcí	- 26 -
2	Experimentální část	- 29 -
2.1	Použité chemikálie a přístroje	- 29 -
2.1.1	Chemikálie	- 29 -
2.1.2	Přístroje a software.....	- 29 -
2.2	Příprava vzorků a pufrů	- 31 -
2.2.1	Příprava octanového pufru	- 31 -
2.2.2	Příprava mravenčanového pufru	- 31 -
2.2.3	Příprava vzorků ibuprofenu.....	- 31 -
2.3	Cyklická voltametrie.....	- 32 -
2.4	Elektrochemická oxidace	- 32 -
2.5	Chromatografické podmínky	- 34 -
2.6	Vyhodnocení dat softwarem Empower 3.....	- 35 -
2.7	Analytické zpracování dat	- 36 -
2.7.1	Výpočet směrodatné odchylky	- 36 -
2.7.2	Výpočet variačního koeficientu	- 36 -

3	Výsledky a diskuze	- 37 -
3.1	Příprava vzorků ibuprofenu	- 37 -
3.2	Cyklická voltametrie	- 37 -
3.3	Elektrochemická oxidace ibuprofenu	- 40 -
3.4	Vyhodnocení dat získaných elektrochemickou oxidací.....	- 41 -
3.5	Vliv podmínek na míru degradace	- 44 -
3.6	Vyhodnocení opakovatelnosti.....	- 51 -
3.7	Identifikace degradačních produktů.....	- 54 -
3.8	Porovnání výsledků chemické a elektrochemické oxidace.....	- 55 -
4	Závěr	- 57 -

Seznam použitých zkratek a symbolů

Použité zkratky

2-APA	2-arylpropionová kyselina
3DER	trojrozměrný elektrodový reaktor na bázi aktivního uhlí s kontinuálním průtokem
ACVA	4,4'-azo-bis(4-cyanovalerová kyselina)
ADME	Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Exkrece (toxikokinetické fáze)
AIBN	azobisisobutyronitril
API	léčivá látka přípravku (z anglického <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
DAD	detektor s diodovým polem (z anglického <i>Diode Array Detector</i>)
EO	elektrochemická oxidace
ESI	elektrosprejová ionizace (z anglického <i>Electrospray Ionization</i>)
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (z anglického <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (z anglického <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Mass Spectrometry</i>)
PDA	detektor fotodiodového pole (z anglického <i>Photo Diode Array</i>)
QDa	hmotnostní detektor (z anglického <i>Quadrupole Dalton Detection</i>)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (z

	anglického <i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
RRT	relativní retenční čas (z anglického <i>Relative Retention Time</i>)
S-NEA	S-(–)1-(1-naftyl)ethylamin
UPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UPLC-MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (z anglického <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
UV	ultrafialové záření (z anglického <i>ultraviolet</i>)
UV-LED	ultrafialové záření ve spojení s výkonnými světelnými diodami

Použité symboly

α	hladina významnosti
Φ_A	procentuální zastoupení vodné složky v mobilní fázi [%]
Φ_B	procentuální zastoupení organické složky v mobilní fázi [%]
c_m	hmotnostní koncentrace látky [mg/ml]
k_n	tabelovaný koeficient pro stanovený počet měření n pro koeficient spolehlivosti 0,95
m/z	poměr hmotnosti ku náboji iontu
R	rozpětí, rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou z daného souboru hodnot
r	poloměr válce [mm]
s	směrodatná odchylka
s_r	variační koeficient [%]
t	čas [s, min]
V	objem válce [mm ³ , μ l]
v	výška válce [mm]
\bar{x}	medián
x_{\max}	největší hodnota z daného souboru hodnot
x_{\min}	nejmenší hodnota z daného souboru hodnot

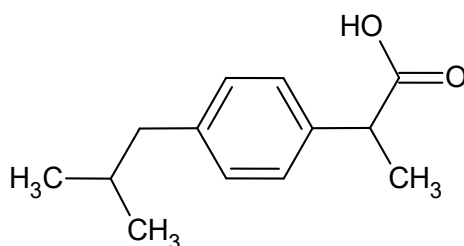
1 Teoretický úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo provést elektrochemickou oxidaci aktivní farmaceutické látky ibuprofenu, jako jeden z aspektů stabilitních studií farmaceuticky významných látek. Elektrochemická oxidace byla provedena za účelem získání a identifikace degradačních produktů, které vznikají v důsledku tohoto děje. Dalším cílem bylo nalézt a specifikovat optimální podmínky pro průběh elektrochemické oxidace, tedy především pH pufru použitého k rozpuštění ibuprofenu, napětí vkládané na pracovní elektrodu, dobu trvání elektrochemické oxidace a porovnání vlivu statického a průtokového módu na výsledek elektrochemické oxidace.

1.2 Ibuprofen

Ibuprofen je bílá krystalická protizánětlivě působící účinná látka, která se používá hlavně ke zmírnění bolesti nebo ke snížení horečky¹. Řadí se mezi chirální nesteroidní léčiva z kategorie 2-arylpropionové kyseliny (2-APA). Je téměř nerozpustný ve vodě a rozpustný v řadě organických rozpouštědel, jakými jsou například methanol, ether, dichlormethan nebo aceton². Perorálně přijatá forma ibuprofenu se vstřebává rychle a úplně³. Bylo prokázáno, že jeho účinky jsou podobné léčivému efektu aspirinu, ale s daleko menšími negativními účinky na žaludek⁴. V mnohých literárních zdrojích je zmíněno, že stejně jako řada dalších farmaceutických látek se ibuprofen podílí na znečištění životního prostředí, kdy se často objevuje v odpadních vodách⁵. Chemická struktura ibuprofenu je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny (R,S)-2-(4-isobutylfenyl)propionové (ibuprofenu) (Převzato z cit. ⁶ a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

1.3 Degradální studie ve farmaceutickém průmyslu

Degradální studie léčivých látek je nástrojem ke zkoumání vnitřní stability těchto látek a součástí farmaceutických procesů. Slouží k vytvoření analytických metod vedoucích k identifikaci pravděpodobně vznikajících degradačních produktů a také k tomu, aby konečná podoba léčivého přípravku byla co nejvíce stabilní a bezpečná. Studie stability se dotýká mnoha oblastí, které zahrnují i parametry výroby, způsoby skladování a dobu expirace léčivých přípravků, studie farmakokinetických fází ADME (Absorpce, Distribuce, Metabolismus a Exkrece), dopady na životní prostředí a v neposlední řadě také bezpečnostní a toxikologická rizika⁸.

Studie stability probíhá tak, že se vždy jedna šarže testované aktivní farmaceutické látky (active pharmaceutical ingredient, API) vystaví působení různých podmínek, za kterých budou vznikat degradační produkty. Testování by mělo zahrnovat vliv kyselého nebo alkalického prostředí, hydrolýzy, oxidace, tepelného rozkladu nebo fotolýzy⁸.

Studie nucené degradace pomáhají rozpoznat reakce způsobující degradaci farmaceutických látek. Vzniklé degradační produkty jsou nežádoucí a mohou ovlivnit účinnost a bezpečnost léčiv⁹. Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (ICH) vydala pokyny, podle kterých se řídí testování API za účelem určení podmínek skladování, doby expirace a přepravních podmínek. Z tohoto hlediska se provádí dlouhodobé (trvajících 12 měsíců za normálních podmínek) a zrychlené (trvajících 6 měsíců za extrémních podmínek) studie stability¹⁰.

1.3.1 Vliv hydrolýzy

Jedná se o chemické reakce léčivých látek s vodou v širokém rozmezí hodnot pH (obvykle 1-13). Hydrolýza za kyselých či bazických podmínek zahrnuje rovněž katalýzu hydrolytických reakcí. Nejpoužívanějšími katalyzátory jsou 0,1-1M kyselina chlorovodíková či kyselina sírová nebo 0,1-1M hydroxid sodný či hydroxid draselný. Pokud je pozorována patřičná degradace, lze testování stability v tomto bodě zastavit. Pokud za těchto podmínek není pozorována žádná degradace, je potřeba vystavit léčivou látku působení kyseliny/zásady o vyšší síle a po delší dobu. Teplota a hodnota pH jsou rozhodujícími parametry při posuzování stability léčiva, které je náchylné k hydrolýze. Po hydrolytické reakci dochází zpravidla k neutralizaci vzorku použitím vhodné kyseliny, zásady nebo pufru, aby se zamezilo dalšímu rozkladu⁹.

1.3.2 Vliv oxidace

Existují případy, kdy léčivá látka prochází tzv. autooxidací, tzn. oxidací za běžných skladovacích podmínek, která ke svému průběhu vyžaduje elementární kyslík v základním stavu. Autooxidace je reakcí volných radikálů, které jsou iniciátory řetězových reakcí. Autooxidaci iniciují zpravidla peroxid vodíku, kovové ionty nebo stopové nečistoty v léčivé látce⁹.

Nejčastěji se pro posouzení náchylnosti API k oxidaci používá peroxid vodíku o koncentracích v rozmezí 3-30 % při teplotě, která nepřesáhne 40 °C po dobu 2-8 dnů. Mechanismus oxidativní degradace zahrnuje přenos elektronů ke vzniku reaktivních nabitých iontů. Například z fenolů, aminů a sulfidů vznikají přenosem elektronů hydroxylaminy, N-oxidy, sulfony a sulfoxidy¹¹.

1.3.3 Vliv teploty

Léčivé látky snadno podléhají degradaci při vyšších teplotách. Termolytické reakce zahrnují například pyrolytické reakce, hydrolytické reakce, dekarboxylace, přesmyky, polymerace nebo izomerizace. Vliv teploty na degradaci léčiv je popsán pomocí Arrheniovy rovnice. K tepelné degradaci se nejčastěji používá rozmezí hodnot 40 až 80 °C. Nejvíce aplikovaná teplota je 70 °C při vysoké a nízké vlhkosti po dobu 1 až 2 měsíců. Při aplikaci teplot nad 80 °C se degradace nemusí ubírat odhadovanou cestou⁹.

1.3.4 Vliv fotolýzy

Fotolytická degradace závisí na intenzitě dopadajícího záření a na záření pohlceném molekulou léčivé látky. Léčivá látka je vystavena kombinaci ultrafialového a viditelného záření v rozsahu vlnových délek 300 až 800 nm. Fotolýza může být buď oxidativní nebo neoxidativní. Oxidativní fotolýza jde mechanismem singletového nebo tripletového kyslíku. Singletový kyslík reaguje s nenasycenými vazbami alkenů nebo dienů, zatímco tripletový kyslík reaguje s volnými radikály molekul léčivých látek za vzniku peroxidu. Záření tedy v těchto reakcích může hrát roli katalyzátoru oxidací. Neoxidativní fotolýza zahrnuje dimerizace, přesmyky, dekarboxylace, cyklizace atd.¹²

1.4 Mechanismy oxidace API

Oxidace je jednou z nejpoužívanějších metod nucené degradace API při degračních studiích. Existuje několik mechanismů oxidace, nejrozšířenější je

autooxidace, oxidace peroxidem vodíku nebo oxidace zprostředkovaná přenosem elektronů⁸.

Autooxidace, nebo také radikálově iniciovaná oxidace, je jednou z nejčastějších cest degradace API v reálných podmínkách při skladování. Je to děj, při kterém dochází k oxidaci API vlivem nečistot přítomných v lékové formě. Mezi nejběžnější nečistoty iniciující autooxidaci patří organické hydroperoxydy. Ty mohou s kovovými ionty vytvářet radikály vedoucí ke stabilním či metastabilním oxidačním produktům^{8,13}. Radikálově iniciovaná oxidace může být simulována použitím chemických sloučenin, např. 4,4'-azo-bis(4-cyanovalerová kyselina) (ACVA) nebo azobisisobutyronitril (AIBN), které slouží ke generování peroxylových radikálů tepelným rozkladem v roztoku. Tyto sloučeniny tedy simulují oxidaci API během skladování^{8,14,15}.

Při oxidaci iniciované peroxidem vodíku dochází k oxidaci skupin API, které jsou k oxidaci náchylné (tedy např. sekundární a terciární aminy, thioethery, ethery, hydroxylové skupiny) neradikálovým mechanismem. Stresovaný roztok API se vystaví působení peroxidu vodíku (0,1-3%) při neutrálním pH a pokojové teplotě po dobu 7 dnů. Teploty nad 30 °C by mohly vést k rozštěpení peroxidové vazby na hydroxylové radikály, které by mohly zapříčinit vznik nereálných degradačních produktů^{8,16}.

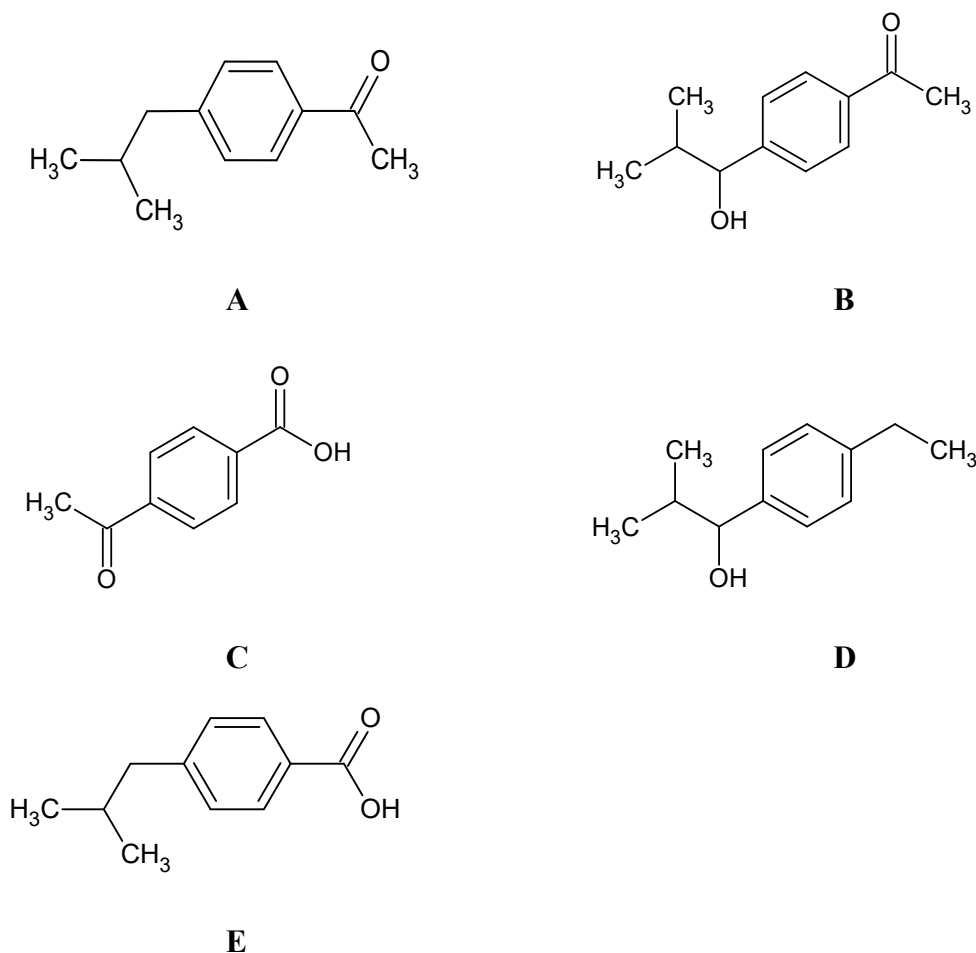
Oxidace zprostředkovaná přenosem elektronů může být způsobena reakcí s měďnatými a železitými ionty. Po získání elektronu z molekuly API dojde ke snížení oxidačního čísla kovového iontu a molekula API se oxiduje na nestabilní radikálový kation, který bude snadno reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku degradačního produktu. Výběr oxidačního činidla, jeho koncentrace a testovacích podmínek závisí na druhu stresované API a musí být optimalizovány tak, aby docházelo ke vzniku reálných a předvídatelných degradačních produktů^{8,13}.

Oxidativní degradace za pomoci elektrochemických metod je poměrně nová záležitost. Využívá se především k napodobení farmakokinetiky či metabolismu léčiv. Metoda elektrochemických oxidací vykazuje dobré výsledky, je výrazně rychlejší a simuluje silnější stresové podmínky než oxidace popsané výše. Časová úspora může vést k rychlejšímu, levnějšímu a přesnějšímu vývoji léčivých přípravků a přinést tak mnoho benefitů do farmaceutického průmyslu¹⁷. Oproti chemické oxidaci není nutné použití silných oxidačních činidel¹⁸. Elektrochemická oxidace se provádí přímo, tedy přenosem elektronů poté, co dojde k interakci analytu s povrchem elektrody. K přímé

oxidaci dochází především při nízkých aplikovaných potenciálech. Oxidují se skupiny v molekule analytu, které jsou k oxidaci náchylné a vyměněný náboj odpovídá očekávaným reakcím. Pro tento druh oxidace se volí elektrody z různých materiálů, třeba platinové, uhlíkové (např. elektroda ze skelného uhlíku), borem dopovaný diamant (BDD) atd. Může docházet také k nepřímé oxidaci, při které se vyvíjí kyslík na povrchu elektrody a následně reaguje s analytem. Forma produkovaného kyslíku záleží na zvoleném typu elektrody. Na aktivních elektrodách (z materiálů jako je Pt, IrO₂, RuO₂) vzniká kyslík ve vyšším oxidačním stavu díky adsorpci hydroxylových radikálů. To vede k částečné či selektivní oxidaci organických sloučenin. Na neaktivních elektrodách (z materiálů jako SnO₂ nebo PbO₂) jsou hydroxylové radikály sorbovány na povrchu, což vede k nespecifické oxidaci organických látek (např. při elektrochemickém zpracování odpadních vod)¹⁷.

1.5 Metody oxidativní degradace ibuprofenu

Oxidativní degradace ibuprofenu je v řadě studií zmiňována jako prostředek k rozkladu ibuprofenu v odpadních vodách. Jednou z možností, kterou využili Thomas Scheers a kol.¹⁹, bylo provedení fotoasistované Fentonovy reakce a použití peroxidu vodíku H₂O₂/UV. Využili aktivaci peroxidu vodíku pomocí UV záření ke generování hydroxylových radikálů, které jsou značně silnějšími oxidanty než samotný peroxid vodíku nebo ozon a nespecificky oxidují cílovou sloučeninu při vysokých reakčních rychlostech. Fentonova reakce byla provedena přidáním Fe²⁺ ze síranu železnatého, sloužícího jako katalyzátor reakce, a následně byl přidán peroxid vodíku. Reakce byla považována za ukončenou po 60 min, stejně jako aktivace peroxidu vodíku pomocí UV záření. Tento pokus ukázal, že obě metody degradace ibuprofenu byly účinné, mimořádných výsledků bylo dosaženo při fotoasistované Fentonově reakci, při které byla k efektivní degradaci ibuprofenu použita minimální koncentrace peroxidu vodíku. Rovněž bylo strukturálně objasněno pět hlavních degradačních produktů po provedení Fentonovy reakce. Jedná se o následující struktury: 4-isobutylacetofenon (viz obrázek 2A), 1-[4-(1-hydroxy-2-methylpropyl)fenyl]ethanon (viz obrázek 2B), kyselina 4-acetylbenzoová (viz obrázek 2C), 1-(4-ethylfenyl)-2-methylpropan-1-ol (viz obrázek 2D) a kyselina 4-(2-methylpropyl)benzoová (viz obrázek 2E).

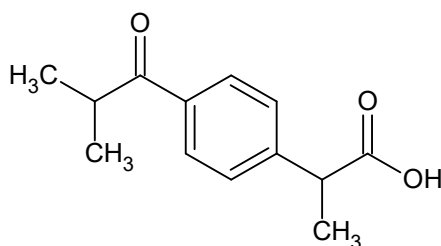


Obrázek 2: Struktura hlavních degradačních produktů ibuprofenu po provedení fotoasistované Fentonovy reakce. (Převzato z cit. ¹⁹ a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

Další studie Zhao Wang a kol.²⁰ se zabývá porovnáním účinků metod UV-LED/katalyzátory a UV-LED/oxidanty na oxidativní degradaci ibuprofenu v odpadních vodách. Spojení UV-LED znamená použití výkonných světelných diod emitujících ultrafialové světlo. Ukázalo se, že použití katalyzátorů oxidu titaničitého a oxidu zinečnatého ve spojení s UV-LED dosahovalo 99,99% degradační účinnosti a degradace probíhala v kratším časovém úseku, než při použití UV-LED/H₂O₂, hydrogenperoxosíranu draselného nebo peroxodisíranu draselného.

N. Sabri, K. Hanna a V. Yargeau²¹ provedli chemickou oxidaci ibuprofenu pomocí peroxidu vodíku a peroxodisíranu sodného, které aktivovali oxidem železnato-železitým v téměř neutrálním prostředí o pH 6,6. Vyšlo najevo, že peroxid vodíku a peroxodisíran sodný byly neaktivní v průběhu prvních 60 minut reakce bez aktivace pomocí Fe²⁺.

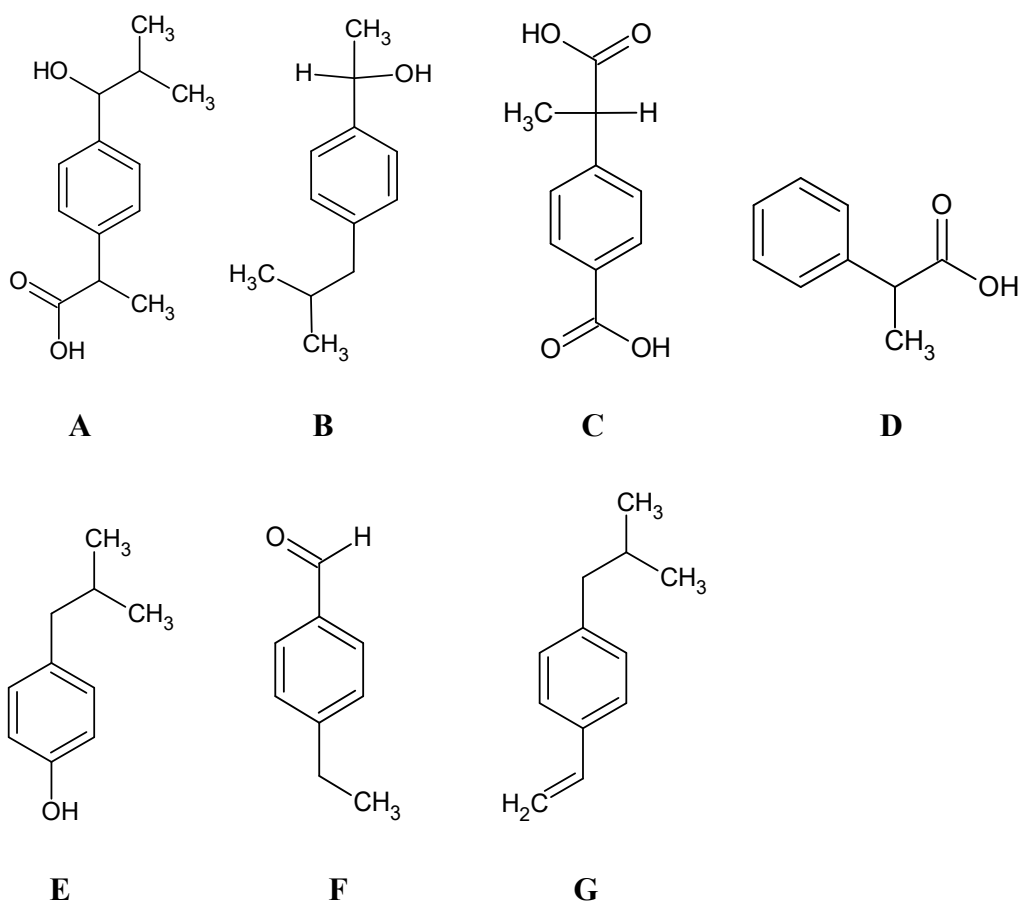
Degradace ibuprofenu se tedy aktivací oxidačních činidel prostřednictvím Fe^{2+} zrychlila a zefektivnila, v případě použití H_2O_2 o 93 % a v případě použití peroxodisíranu sodného o 63 %. Nakonec bylo identifikováno několik degradačních produktů, kterými byly: kyselina pyrohroznová, kyselina šťavelová, kyselina octová, kyselina mravenčí, kyselina 4-acetylbenzoová (viz obrázek 2C), oxo-ibuprofen (viz obrázek 3) a 4-isobutylacetofenon (viz obrázek 2A). Oxid železnato-železitý je jako katalyzátor stabilní, nenákladný, opakovatelně použitelný a šetrný k životnímu prostředí. Navíc lze použít v širokém rozmezí hodnot pH na rozdíl od homogenního Fe^{2+} , který se může při vysokých hodnotách pH vysrážet.



Obrázek 3: Struktura oxo-ibuprofenu jako degradačního produktu chemické oxidace. (Převzato z cit. ²¹ a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

Gabriele Caviglioli a kol.²² se zaměřili na identifikaci degradačních produktů ibuprofenu po působení oxidačních činidel a tepla. Studii provedli s myšlenkou, že ibuprofen je volně prodejný a hojně využívaný léčivý přípravek, který může být nadužíván, a proto je potřeba důkladně zkoumat produkty jeho oxidativního rozpadu, především z hlediska jejich dlouhodobé toxicity. Ibuprofen v pevném stavu i v roztoku vystavili působení manganistanu draselného, dichromanu draselného a 16% nebo 33% peroxidu vodíku po dobu několika hodin nebo dní. Ibuprofen vystavili i tepelné degradaci při různých teplotách, např. 50 °C, 100 °C nebo 180 °C po dobu několika hodin, dní nebo měsíců. Degradační produkty analyzovali dvěma metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) a plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS). Pro první metodu HPLC použili chromatografickou kolonu Waters μ Bondpack Phenyl (10 μm ; 3,9 \times 300 mm) a mobilní fázi tvořila směs methanolu a octanu amonného v poměru 6:94 (v/v) o pH 4. Dále byl použit detektor s diodovým polem (DAD). Pro druhou HPLC metodu použili kolonu Superspher 100 RP-18 (4 μm ; 2 \times 125 mm) a jako mobilní fázi směs vody a acetonitrilu o pH 2,5. Pro metodu

GC-MS byla použita kolona z taveného oxidu křemičitého o rozměrech 25 m × 0,2 mm, nesoucí zesíťovanou methylsiloxanovou vázanou fází. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium. V této práci detekovali celkem třináct degradačních produktů, z nichž sedm bylo vyhodnoceno jako doposud neznámých. Jednalo se o tyto produkty: kyselina 2-[4-(1-hydroxy-2-methylpropyl) fenyl]propanová (viz obrázek 4A), 1-(4-isobutylfenyl)-1-ethanol (viz obrázek 4B), kyselina 4-(1-karboxyethyl)benzoová (viz obrázek 4C), kyselina hydratropová (viz obrázek 4D), 4-isobutylfenol (viz obrázek 4E), 4-ethylbenzaldehyd (viz obrázek 4F) a 1-isobutyl-4-vinylbenzen (viz obrázek 4G).



Obrázek 4: Degradační produkty ibuprofenu po degradaci oxidačními činidly a světlem. (Převzato z cit. ²² a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

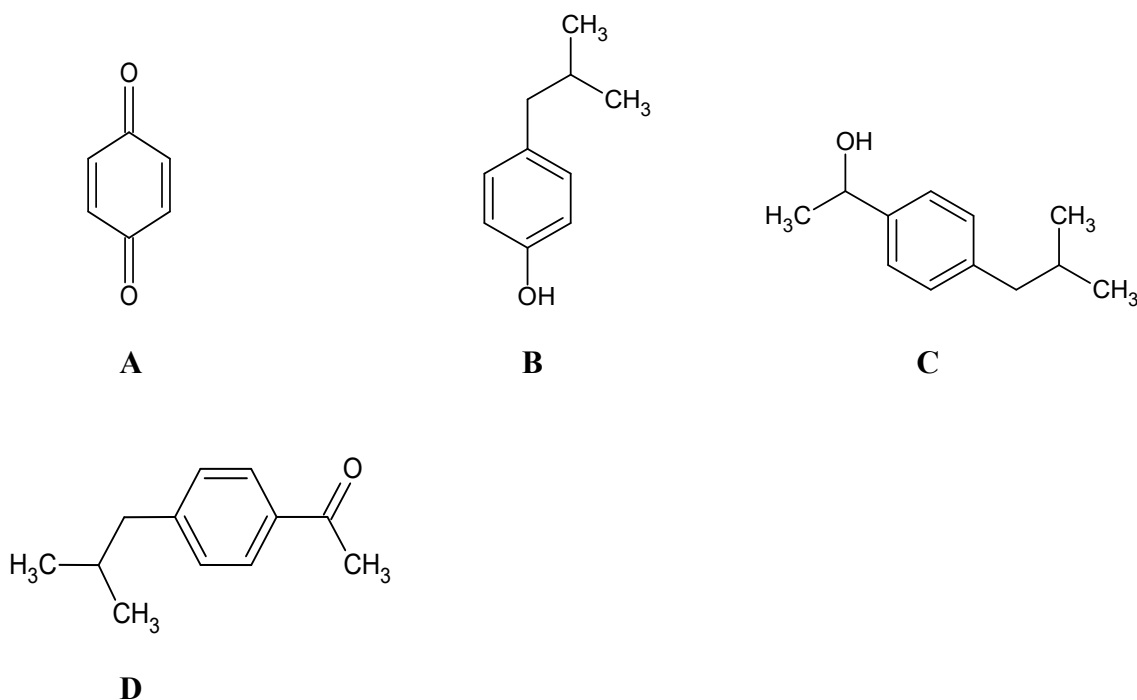
Skupina Quero-Pastora²³ se zabývala oxidativní degradací ibuprofenu ozonem, přičemž zkoumala především toxicitu ibuprofenu a jeho degradačních meziproductů. Ozon byl generován generátorem ozonu GZ15 s vysokofrekvenčními výbojkami a produkční kapacitou 15 g/h ozonu s přívodem okolního kyslíku. Za účelem kvantifikace ibuprofenu byla pro úpravu vzorků použita extrakce na pevné fázi LiChrolut EN 40-120 μm . Pevná fáze byla následně promyta acetonem a získaný ibuprofen byl rozpuštěn ve směsi methanolu a vody v poměru 70:30 (v/v). Směs methanolu a vody v poměru 70:30 (v/v) byla rovněž využita jako mobilní fáze pro kvantifikaci ibuprofenu pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla zvolena C18 v koloně o rozměrech 5 μm ; 15 \times 0,46 cm od společnosti Teknokroma. Jako detektor použili UV detektor při vlnové délce 220 nm. Bylo zjištěno, že toxicita ibuprofenu během oxidace roste s rostoucí počáteční koncentrací léčiva, a že degradační meziproducty jsou toxičtější než výchozí sloučenina.

1.6 Metody elektrochemické oxidace ibuprofenu

Jednou z moderních metod používaných k nucené degradaci léčiv je elektrochemická oxidace. Ciriaco a kol.²⁴ provedli elektrochemickou oxidaci ibuprofenu za účelem porovnání účinnosti odbourávání ibuprofenu z odpadních vod. Použili Ti/Pt/PbO₂ anodu a borem dopovanou diamantovou elektrodu (BDDE). Oba typy elektrod byly při degradaci ibuprofenu velmi účinné. Jako elektrolyt použili 0,035M síran sodný.

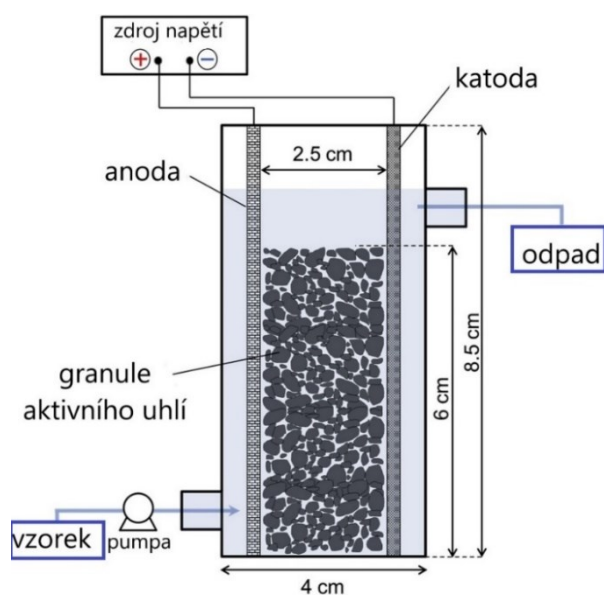
Ambuludi a kol.²⁵ se ve své studii zabývali elektrooxidativním odstraněním ibuprofenu z vodného roztoku pomocí elektro-Fentonovy reakce. K experimentu použili jednokomorovou celu s platinovou anodou nebo BDDE. Studovali vliv procházejícího proudu, koncentrace katalyzátoru a složení rozpouštědla analytu, kterým byla směs vody a acetonitrilu v poměru 80:20 (v/v), kvůli obtížné rozpustnosti ibuprofenu v čistě vodném prostředí. Ukázalo se, že degradace probíhala lépe při použití platinové elektrody z důvodu lepší regenerace Fe²⁺ katalyzátoru Fentonovy reakce. K pozorování reakce mezi ibuprofenem a hydroxylovými radikály generovanými Fentonovou reakcí byla zvolena metoda RP-HPLC s kolonou Purospher RP-18 (5 μm ; 25 \times 4,6 mm) s DAD detektorem. Detekce se uskutečnila při vlnové délce 228 nm. Jako mobilní fázi zvolili směs methanolu a vody s 1% kyselinou fosforečnou v poměru 68:32 (v/v). Ibuprofen eluoval okolo 12. minuty. Identifikace reakčních meziproductů byla uskutečněna pomocí GC-MS. Po porovnání s knihovnou spekter se jednalo o celkem čtyři meziproducty: p-benzochinon

(viz obrázek 5A), 4-isobutylfenol (viz obrázek 5B), 1-(1-hydroxyethyl)-4-isobutylbenzen (viz obrázek 5C) a 4-isobutylacetofenon (viz obrázek 5D).



Obrázek 5: Degradální produkty elektro-Fentonovy reakce. (Převzato z cit. ²⁵ a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

Cho a kol.²⁶ uskutečnili elektrochemickou degradaci ibuprofenu za účelem jeho odstranění z vody, a pro tuto příležitost vyvinuli trojrozměrný elektrodový reaktor na bázi aktivního uhlí s kontinuálním průtokem (3DER), jehož schéma je zobrazeno na obrázku 6. 3DER byl zkonstruován vyplněním prostoru mezi hlavními elektrodami granulovaným aktivním uhlím, které sloužilo jako částicová elektroda, a ke kterému byl kontinuálně po dobu 180 h přiváděn roztok ibuprofenu. Anoda a katoda byly tvořeny Ti-IrO₂ sít'ovou deskou a nerezovou sít'ovou deskou. Toto uspořádání zvýšilo účinnost degradace ibuprofenu z cca 65 % na 98 % za 4 hodiny od aplikace elektrického proudu, což je 2,5× více, než při použití dvojrozměrného elektrodového reaktoru. Ukázalo se, že největší vliv na degradaci ibuprofenu měla proudová hustota (v rozsahu 1-20 mA/cm²), zatímco průtoková rychlost ovlivnila kinetiku degradace minimálně.



Obrázek 6: Schéma trojrozměrného elektrodového reaktoru s kontinuálním tokem (převzato z cit. ²⁶)

Ambuludi a kol.²⁷ se zabývali elektrochemickou degradací ibuprofenu ve vodném roztoku. Jako metodu zvolili anodickou oxidaci. Elektrolýza byla prováděna při konstantním proudu v malém elektrochemickém článku. Jako anoda byla zvolena platinová elektroda nebo tenkovrstvá BDDE a katoda byla uhlíková. Zjistilo se, že při použití BDDE místo platinové anody dochází k rychlejší oxidaci. Při použití BDDE byla sledována kinetika pseudo-prvního řádu, přičemž zdánlivé rychlostní konstanty se zvyšovaly s aplikovaným proudem, zatímco počáteční koncentrace ibuprofenu je téměř neovlivňovala. Oxidaci ibuprofenu rovněž zlepšilo použití chloridu sodného jako pomocného elektrolytu místo síranu sodného, jelikož docházelo ke generování aktivních forem chloru, které sloužily jako zprostředkovatelé přenosu elektronů při oxidaci. Podařilo se detekovat některé aromatické meziproducty, např. *p*-benzochinon (viz obrázek 5A), 4-isobutylfenol (viz obrázek 5B), 1-(1-hydroxyethyl)-4-isobutylbenzen (viz obrázek 5C) a 4-isobutylacetofenon (viz obrázek 5D). Karboxylové kyseliny jako kyselina pyrohroznová, mravenčí, octová, šťavelová nebo glyoxylová byly hlavními meziproducty vzniklými během elektrolýzy, a nakonec byly mineralizovány na oxid uhličitý a vodu. Výsledkem této studie je, že využití anodické oxidace s BDDE je vhodnou metodou k čištění vod obsahujících ibuprofen, neboť tato metoda poskytuje rychlou a účinnou eliminaci tohoto léčiva i reakčních meziproductů.

Li a kol.²⁸ využili elektroperoxonový proces jako způsob degradace ibuprofenu za různých experimentálních podmínek, přičemž tento proces kombinoval metody ozonizace a elektrolýzy. V tomto procesu docházelo k elektrochemickému generování peroxidu vodíku v odtoku z generátoru ozonu. Celý tento děj byl uskutečněn na katodě z uhlíku. Peroxid vodíku dále reagoval s ozonem za vzniku hydroxylového radikálu, který účinně oxidoval ibuprofen ve velkém objemu roztoku. Při elektroperoxonovém procesu docházelo k ataku ibuprofenu hydroxylovými radikály v různých polohách, a tím vznikaly hydroxylované izomery ibuprofenu. Ty následně podstupovaly řadu dalších reakcí, jakými byly například dekarboxylace, demethylace a další hydroxylace, a vznikaly menší aromatické meziprodukty. Následná oxidace těchto meziproduktů působením hydroxylového radikálu a ozonu vedla ke štěpení benzenového kruhu a produkci lineárních karboxylových kyselin, které byly oxidovány hydroxylovým radikálem na oxid uhličitý a vodu, čímž bylo dosaženo kompletní mineralizace ibuprofenu. Tento proces se tedy ukázal jako jednoduchý, efektivní a ekologický způsob k odstranění farmaceutických přípravků z vodního prostředí.

1.7 Lékopisné stanovení ibuprofenu

V Českém lékopisu z roku 2009 (cit. ²⁹) jsou popsány zkoušky totožnosti ibuprofenu a zkoušky na čistotu. Zkoušky totožnosti se skládají ze stanovení teploty tání kapilární metodou, při které roztaje poslední částice sloupce léčiva v kapiláře. Teplota tání ibuprofenu se dle lékopisu pohybuje mezi 75 °C až 78 °C.

Dále se provádí absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti, při které se zjišťuje, zda se absorpční spektrum tablety zkoumané látky shoduje se spektrem tablety chemické referenční látky ibuprofenu. Měří se absorbance roztoku v rozmezí vlnových délek 240 až 300 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, a to při 264 nm a 272 nm (cit. ²⁹).

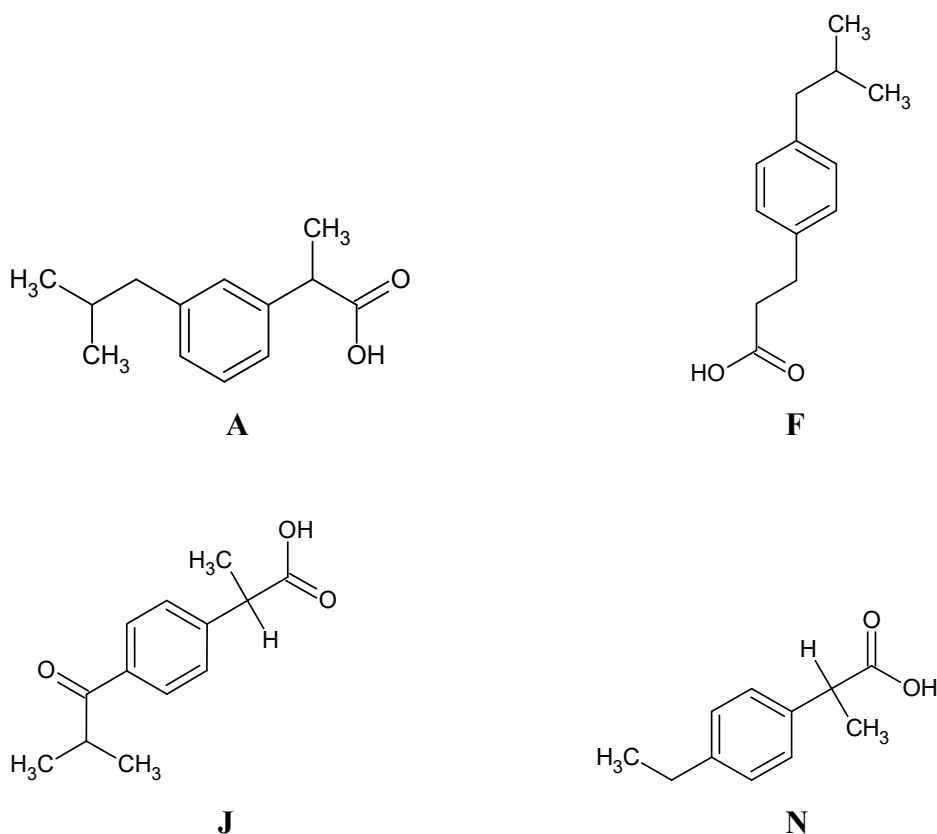
Další metodou je provedení tenkovrstvé chromatografie na vrstvě silikagelu. Na vrstvu silikagelu se nanese 5 µl zkoušeného a porovnávacího roztoku odděleně a vyvíjí se směsí bezvodé kyseliny octové, ethyl-acetátu a hexanu v poměru 5:24:71 (v/v) po dráze dlouhé 10 cm. Vrstva se následně suší po dobu 30 min při 120 °C a postříká se roztokem manganistanu draselného o koncentraci 10 g/l v kyselině sírové zředěné roztokem zkoumadla a zahřívá se po dobu 20 min při teplotě 120 °C. Pozorování probíhá při vlnové délce 365 nm v UV světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se musí

barvou, velikostí a polohou shodovat se skvrnou na chromatogramu referenčního roztoku²⁹.

Provádí se také zkoušky na čistotu, a to tak, že se zkoumá vzhled roztoku, který musí být čirý a bezbarvý. Dále se měří úhel optické otáčivosti v rozmezí $-0,05^\circ$ až $+0,05^\circ$ (cit. ²⁹).

Další metodou je kapalinová chromatografie. Jako chromatografická kolona se volí kolona z nerezové oceli naplněná oktadecylsilanizovaným silikagelem o rozměrech 5 μm ; 15 cm \times 4,6 mm. Mobilní fáze A je tvořena směsí kyseliny fosforečné, acetonitrilu a vody v poměru 0,5:340:600 (v/v), po ustálení se zředí vodou na 1000 objemových dílů. Mobilní fáze B je tvořena acetonitrilem. Průtoková rychlost je nastavena na 2 ml/min, objem nástriku je 20 μl a detekce probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 214 nm. Ibuprofen eluuje okolo 20. minuty (cit. ²⁹).

V Českém lékopisu jsou specifikovány celkem čtyři nečistoty: A, F, J a N. K identifikaci jejich píků se používá chromatogram dodávaný s ibuprofenem a chromatogram porovnávacího roztoku. Konkrétně se jedná o tyto nečistoty: A: 2-(3-isobutylfenyl)propanovou kyselinu, F: 3-(4-isobutylfenyl)propanovou kyselinu, J: 2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanovou kyselinu a N: 2-(4-ethylfenyl)propanovou kyselinu. Všechny jsou strukturně objasněny na obrázku 7. Relativní retenční časy nečistot vztažené k ibuprofenu jsou pro nečistotu A 0,9, pro nečistotu F 1,1, pro nečistotu J 0,2 a pro nečistotu N 0,3. Ostatní detekovatelné nečistoty není nutné k prokázání shody identifikovat, jelikož jsou limitovány obecným kritériem přijatelnosti pro jiné/nеспециfikované nečistoty²⁹.



Obrázek 7: Chemické struktury nečistot ibuprofenu specifikovaných v Českém lékopisu. (převzato z cit. ²⁹ a upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷)

1.8 Další metody stanovení ibuprofenu

Pro stanovení ibuprofenu je v literatuře popsána řada různých technik. Sádecká a kol.³⁰ se zaměřili na stanovení ibuprofenu v tabletách metodou kapilární izotachoforézy. Metodu zvolili jako alternativu k lékopisným stanovením ibuprofenu, jelikož je rychlá, jednoduchá a levná. Zároveň ji porovnali s fluorescenční spektrometrií. Byl použit izotachoforetický analyzátor s vodivostním detektorem a separační kapilárou (90 × 0,8 mm). Hnací proud byl nastaven na hodnotu 250 μA. Vedoucí elektrolyt tvořila 10mM kyselina chlorovodíková upravená kreatininem na pH 5,0 a 0,1% polyvinylpyrrolidon. Koncovým elektrolytem byla 10mM 4-morfolinethansulfonová kyselina. Fluorescenční spektrometrie byla provedena na luminiscenčním spektrometru s xenonovou výbojkou. Obě provedené techniky se ukázaly být vhodné pro stanovení ibuprofenu. Izotachoforéza i fluorescenční spektrometrie vykazovaly podobnou opakovatelnost. U fluorescenční spektrometrie však může docházet k horším hodnotám

opakovatelnosti kvůli vlivu matrice.

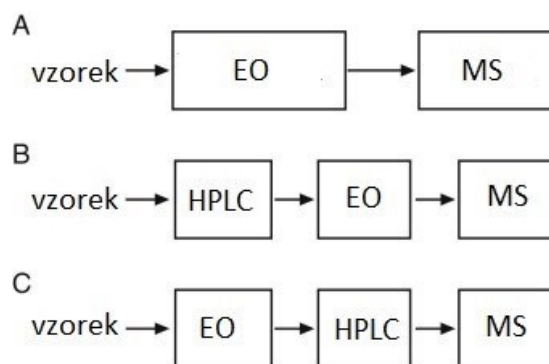
Farrar a kol.³¹ vyvinuli rychlou a jednoduchou metodu pro stanovení ibuprofenu v malém objemu lidské plasmy za využití HPLC. Vzorek k analýze HPLC byl připraven extrakcí na pevné fázi s naproxenem jako vnitřním standardem. Extrakce byla provedena na 96jamkové extrakční destičce, čímž se usnadnil a paralelizoval proces přípravy vzorků. Při analýze pomocí HPLC byla použita kolona Symmetry C18 (5 μ m; 4,6 \times 150 mm). Mobilní fázi tvořila směs vody a acetonitrilu v poměru 40:60 (v/v). Detekce proběhla pomocí UV detektoru při vlnové délce 220 nm. Tato metoda přinesla mnoho výhod, jednou z nich je například využití pouze 50 μ l plasmy k analýze, což umožňuje opakovanou analýzu vzorků. Další výhodou je zjednodušení procesu extrakce a snížení pravděpodobnosti laboratorní chyby díky použití 96jamkové extrakční destičky, kdy jsou vzorky eluovány přímo do injekčních vialek. Metoda se hojně využívá při bioekvivalenčních studiích a klinickém výzkumu, neboť vykazovala dostatečnou citlivost v rozmezí očekávaných koncentrací ibuprofenu při klinickém použití léku.

Canaparo a kol.³² provedli stanovení *S*-(+) a *R*-(-) enantiomerů ibuprofenu v lidské plasmě. Ve farmacii je známo, že více než polovina léčiv je chirální povahy a enantiomery mohou vykazovat rozdílné terapeutické účinky. Ibuprofen se prodává jako směs dvou výše zmíněných enantiomerů, přičemž farmakologická aktivita je způsobena výhradně enantiomerem *S*-(+). Přestože je *R*-(-) ibuprofen neaktivní, může interferovat s farmakokinetikou ostatních léčiv, především i s farmakokinetikou aktivního *S*-(+) enantiomeru³³. Sloučeniny byly extrahovány z plasmy do alkoholového média a byla provedena předkolonová derivatizace pomocí derivatizačního činidla S-NEA (*S*-(-)-1-(1-naftyl)ethylamin). Pro separaci vzniklých diastereomerů byla použita metoda HPLC s kolonou Symmetry C18 (5 μ m; 4,6 \times 150 mm) a gradientovou elucí. Mobilní fáze se skládala z těchto složek: acetonitril-voda-kyselina octová-triethylamin v poměru 60:40:0,1:0,02 (v/v) o pH 5,0 a po 20 min analýzy byla vyměněna za 100% acetonitril po dobu 5 min. Jako detektor byl zvolen spektrofluorometrický detektor s excitační vlnovou délkou 280 nm a emisní vlnovou délkou 320 nm. *S*-(+) enantiomer eluoval v čase 14,40 min a *R*-(-) enantiomer v čase 16,50 min. Bylo prokázáno, že tato metoda je vhodná a reprodukovatelná a využívá se při farmakokinetických studiích³².

Bonato a kol.³⁴ použili metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (HPLC-MS) k enantioselektivnímu stanovení ibuprofenu v plasmě. Vzorky byly připraveny extrakcí z kapaliny do kapaliny za použití směsi hexanu a ethylacetátu v poměru 8:2 (v/v). Chirální rozlišení ibuprofenu zajistilo použití chirální stacionární fáze na bázi derivátu tris-(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylosy za podmínek reverzní fáze (kolona Chiralpak AD-RH o rozměrech 5 µm; 150 × 4,6 mm). Mobilní fáze obsahovala směs methanolu a vody v poměru 8:2 (v/v) a zároveň 0,1% vodný roztok kyseliny fosforečné o pH 2,0, průtok byl nastaven na 0,6 ml/min. V negativním módu elektrospreje byl k eluátu přidán 4,5% vodný roztok hydroxidu amonného kvůli zajištění optimalizace napětí kužele, kolizního článku a multiplikátoru při elektrosprejové ionizaci, jelikož ostatní pokusy o optimalizaci těchto parametrů nevedly k lineárním kalibračním křivkám. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem. Oba enantiomery eluovaly okolo 8. minuty. Popsaná metoda je rychlá, reprodukovatelná, jednoduchá a vhodná pro farmakokinetické studie. Další výhodou je vysoká selektivita díky použití hmotnostního spektrometru jako detektoru.

1.9 Spojení elektrochemie s hmotnostní detekcí

V poslední době roste zájem o použití elektrochemických metod v kombinaci s hmotnostní detekcí. Ve farmaceutickém průmyslu je velkým benefitem takového spojení možnost identifikace a kvantifikace degradačních produktů, které vznikly důsledkem elektrochemické oxidace, pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Existuje několik možností experimentálního uspořádání. První možností je elektrochemická oxidace vzorku (EO) a následné spojení s hmotnostní spektrometrií přímou vazbou (viz obrázek 8, řádek A). Druhou možností je separace vzorku pomocí HPLC, poté provedení elektrochemické oxidace a následná detekce pomocí MS (viz obrázek 8, řádek B). Třetí možností (která byla využita i v této diplomové práci) je provedení elektrochemické oxidace, následně separace vzorku pomocí HPLC, a nakonec detekce prostřednictvím MS (viz obrázek 8, řádek C)³⁵.



Obrázek 8: Schematické znázornění experimentálního uspořádání tří instrumentálních technik při studiích oxidace³⁵.

K elektrochemické oxidaci se používají elektrochemické cely. Jsou vybaveny buď dvěma nebo třemi elektrodami, přičemž tříelektrodové uspořádání je běžnější a dosahuje lepšího řízení reakcí. Elektrochemické reakce na pracovní elektrodě jsou regulovány rozdílem potenciálu mezi pracovní a referenční elektrodou. Proud, který protéká pracovní elektrodou, je vyvážen shodným proudem na pomocné elektrodě. Existuje řada materiálů, ze kterých mohou být elektrody zhotoveny. Používají se například elektrody vyrobené z kovů (např. Pt), skelného uhlíku, porézního uhlíku nebo BDD. Jako referenční elektrody se volí například argentchloridová nebo kalomelová, které mají dobře definovaný standardní potenciál. Velmi oblíbené jsou ploché elektrody, které lze snadno vyjmout, zkontrolovat a vyčistit³⁵.

Potenciály vkládané na elektrody jsou generovány potenciostaty. Ty jsou ovládány počítačem a je možné díky nim provádět různé elektrochemické experimenty. Nejběžněji je elektrochemická oxidace prováděna při konstantním potenciálu. Ukázalo se, že experimenty s pulzními potenciály umožňují selektivní tvorbu jednoho konkrétního produktu v závislosti na době a hodnotě vloženého pulzu³⁵.

V případech, kdy je vyžadována krátká prodleva mezi elektrochemickou oxidací a hmotnostní detekcí, lze zvážit umístění elektrochemického článku do iontového zdroje hmotnostního detektoru. Jako iontový zdroj se nejčastěji používá elektrosprejová ionizace (ESI)³⁵.

Podmínky pro elektrochemickou oxidaci a tvorbu iontů ze vzorku v MS se liší, především v použití pufrů jako podpůrného elektrolytu. Zatímco kvarterní amoniové soli jsou v elektrochemii běžné, elektrosprejový zdroj je na jejich přítomnost vysoce citlivý

a dochází k zesílení signálu iontů na pozadí, a naopak k potlačení signálu iontů ze vzorku. Pro elektrochemickou oxidaci ve spojení s MS je tedy přijatelné použití pufrů, jako jsou mravenčan amonný nebo octan amonný³⁵.

Ve většině případů vede elektrochemická oxidace vzorku ke směsi produktů. K jejich separaci se běžně využívá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která ve spojení s hmotnostní detekcí poskytne informace o struktuře jednotlivých složek směsi produktů³⁵.

V posledních několika letech vzrostl zájem o elektrochemické napodobení oxidativního metabolismu léčiv. Ukázalo se, že lze provést jak biotransformační reakce I. fáze (např. oxidace a hydroxylace), tak i reakce II. fáze (např. konjugace reaktivních metabolitů s nukleofily)³⁵.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a přístroje

2.1.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda s měrným odporem $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Mili-Q[®], Merck Millipore, USA
- Methanol, LC-MS CHROMASOLV[™], $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Acetonitril, LC-MS/UPLC grade, HiPerSolv CHROMANORM, VWR, USA
- Deionizovaná voda, for HPLC LC-MS grade, VWR, USA
- Octan amonný, for HPLC, HiPerSolv CHROMANORM, VWR, USA
- Mravenčan amonný, for mass spectrometry, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid amonný, 25% p. a., Lach-Ner s. r. o., Česká republika
- Kyselina octová, 99% G.R., Lach-Ner s. r. o., Česká republika
- Kyselina mravenčí, ACS reagent, 98-100%, Merck, USA
- Ibuprofen, Zentiva, Česká republika

2.1.2 Přístroje a software

- Kapalinový chromatograf Acquity UPLC H Class s PDA a QDa detektorem, Waters, USA
- Jednoduchý kvadrupólový hmotnostní detektor Acquity QDa, Waters, USA
- Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 μm), Waters, USA
- Radiální průtoková cela o rozměrech 2 × 8,8 mm, ALS Co., Japonsko
- Pracovní disková elektroda ze skelného uhlíku o průměru 6 mm, ALS Co., Japonsko

- Referentní elektroda RE-3VT o průměru 10 mm, šroubovací typ, Ag/AgCl/nasycený KCl, ALS Co., Japonsko
- Pomocná elektroda z nerezové oceli ve tvaru trubičky o průměru 1,6 mm, ALS Co., Japonsko
- Teflonové těsnění o tloušťce 2 mm, ALS Co., Japonsko
- Potenciostat PalmSens³, PalmSens, Nizozemsko
- Stříkačkové čerpadlo, KD Scientific, USA
- Tuberkulínová injekční stříkačka Injekt-F o objemu 1 ml, B. Braun, Německo
- Ultrazvuková lázeň Elma S15, Elmasonic, Německo
- Analytické váhy Entris[®], Sartorius, Německo
- pH metr 3540 pH/conductivity meter, Jenway, UK
- Magnetická míchačka, Velp Scientifica, Itálie
- Software Empower 3, Waters, USA
- Program PStTrace 5, PalmSens, Nizozemsko
- MS Excel, Microsoft Corp., USA
- ACD/ChemSketch, ACD/Labs, Kanada

2.2 Příprava vzorků a pufrů

2.2.1 Příprava octanového pufru

Nejprve byl připraven 100mM octanový pufr o hodnotách pH 3,5, 5,0 a 7,0 tak, že bylo naváženo vždy 1,54 g octanu amonného a rozpuštěno v deionizované vodě. Poté bylo upraveno pH vzniklého roztoku na požadovanou hodnotu pomocí 99% kyseliny octové nebo 25% hydroxidu amonného a roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 200,0 ml. Následně byl pufr odplyňován pomocí ultrazvukové lázně po dobu přibližně 10 minut. Takto vzniklý pufr sloužil v kombinaci s organickým rozpouštědlem pro rozpuštění vzorku ibuprofenu.

2.2.2 Příprava mravenčanového pufru

Byl připraven 10mM mravenčanový pufr tak, že bylo naváženo 0,32 g mravenčanu amonného a rozpuštěno v deionizované vodě. Hodnota pH roztoku byla upravena pomocí 99% kyseliny mravenčí na hodnotu pH 3,0 a roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 500,0 ml. Výsledný roztok byl přefiltrován přes filtrační nylonovou membránu o velikosti pórů 0,22 μm za použití vakuové pumpy. Takto vzniklý pufr sloužil jako součást mobilní fáze k UPLC analýze vzorků po elektrochemické oxidaci.

2.2.3 Příprava vzorků ibuprofenu

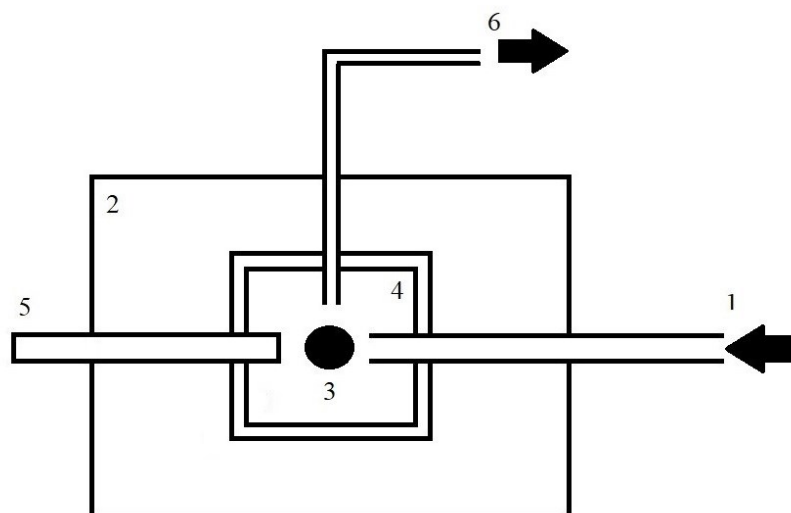
Zpočátku bylo nutné otestovat rozpustnost ibuprofenu, která byla následně vizuálně vyhodnocována. Při prvotních experimentech byly připravovány roztoky ibuprofenu o koncentracích 10 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml a 1 mg/ml. Bylo vždy naváženo příslušné množství ibuprofenu a rozpouštěno nejprve v organickém rozpouštědle a poté smícháno s puftrem. Poměr organického rozpouštědla a pufru byl nejprve 50:50 (v/v), a poté byl tento poměr upraven na 10:90 (v/v) (organické rozpouštědlo : pufr). Za organické rozpouštědlo byl zvolen v prvních experimentech methanol a později acetonitril. V dalších experimentech byl připraven roztok ibuprofenu o koncentraci 0,1 mg/ml, a to z důvodu špatné rozpustnosti vyšších koncentrací. Tato hodnota koncentrace roztoku ibuprofenu se dále využila pro elektrochemickou oxidaci. Roztok byl připraven navážením 10,00 mg ibuprofenu, rozpuštěním v 10,0 ml acetonitrilu a doplněn 90,0 ml octanového pufru na celkový objem 100,0 ml. Následně byl vzorek odplyňován po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni.

2.3 Cyklická voltametrie

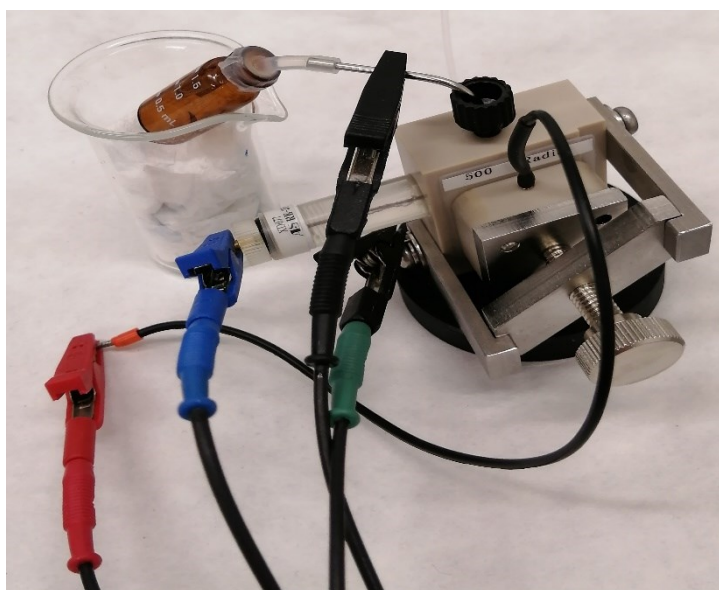
Prvotním experimentem provedeným s připraveným roztokem ibuprofenu byla cyklická voltametrie ve statickém a průtokovém módu s tříelektrodivým zapojením. Použity byly stejné elektrody, které jsou zmíněny v kapitole 2.4. Byly měřeny vždy čtyři skeny, v programu PSTrace 5 (cit. ³⁶) byly nastaveny následující parametry: rychlost skenu činila 0,01 V/s, s potenciálovým krokem 0,04 V a rozpětím potenciálů 0-2,5 V, přičemž počáteční napětí bylo nastaveno na 0 V. První sken byl proveden v pozitivním směru.

2.4 Elektrochemická oxidace

Pro elektrochemickou oxidaci vzorků ibuprofenu byla použita radiální elektrochemická průtoková cela o rozměrech 2 × 8,8 mm v tříelektrodivém provedení. Pracovní elektrodu tvořila disková elektroda ze skelného uhlíku o průměru 6 mm, pomocnou elektrodu tvořila trubička z nerezové oceli o průměru 1,6 mm a referentní elektroda byla argentchloridová, s nasyceným roztokem KCl o průměru 10 mm. Před pracovní elektrodu bylo vkládáno teflonové těsnění o tloušťce 2 mm, zvětšující objem cely, který tak činil 121,6 μ l. Odplyněný vzorek byl do cely přiváděn pomocí 27,4 cm dlouhé silikonové hadičky s vnitřním průměrem 0,4 mm. Bylo použito dvojí experimentální uspořádání: průtokové a statické. V průtokovém uspořádání proudil vzorek ibuprofenu k povrchu elektrody kontinuálně pomocí stříkačky a stříkačkového čerpadla, na kterém byla nastavena konstantní průtoková rychlost 1 ml/h. Vzorek z cely byl jímán do vialky. Při statickém uspořádání byl vzorek do cely nadávkován pomocí stříkačky jednorázově k povrchu elektrody, kde setrval po celou dobu oxidace. Poté byl z cely vzduchem z prázdné stříkačky vyhnán do vialky. Schéma radiální průtokové cely je znázorněno na obrázku 9 a foto pro lepší představu prostorového uspořádání radiální průtokové cely a jednotlivých elektrod je zobrazeno na obrázku 10. Degradční produkty elektrochemické oxidace byly poté identifikovány a stanoveny pomocí metody UPLC-MS.



Obrázek 9: Schematické znázornění radiální průtokové cely. Číslem 1 je označen vstup vzorku do cely silikonovou hadičkou, č. 2 je tělo průtokové cely, č. 3 znázorňuje pracovní elektrodu, č. 4 označuje teflonové těsnění, č. 5 je referentní elektroda a č. 6 znázorňuje pomocnou elektrodu/výstup vzorku z cely.



Obrázek 10: Radiální elektrochemická průtoková ceta v tříelektrodevém zapojení. Červeným kabelem je připojena pracovní elektroda ze skelného uhlíku, modrým kabelem je připojena referentní argentchloridová elektroda a černým kabelem pomocná elektroda ve formě trubičky z nerezové oceli. Na pomocnou elektrodu je nasazena krátká silikonová hadička, kterou odchází vzorek do připevněné vialky (vlastní foto).

Pomocí programu PStTrace 5 (cit. ³⁶) byly nastaveny podmínky oxidace. Byla zvolena metoda chronoamperometrie, při které se sleduje závislost procházejícího proudu na vloženém konstantním potenciálu. Hodnoty potenciálu a doba trvání oxidace byly pro jednotlivá měření voleny podle tabulky 1. Všechny v tabulce uvedené podmínky byly mezi sebou nakombinovány a změřeny jak ve statickém, tak i v průtokovém módu. Při průtokovém módu se na stříkačkovém čerpadle nastavovala průtoková rychlost na 1 ml/h a čerpaný objem roztoku na 1 ml. Při nastavené době oxidace na 900 s se tedy stihlo vyčerpat 0,25 ml, při 1800 s se vyčerpal 0,50 ml a při 3600 s se vyčerpal celý objem stříkačky, tedy 1,00 ml roztoku ibuprofenu. Celkem bylo provedeno 54 měření.

Tabulka 1: Podmínky elektrochemické oxidace ibuprofenu.

pH pufru	Potenciál V	Doba oxidace s
3,5	1,0	900
5,0	1,3	1800
7,0	1,6	3600

2.5 Chromatografické podmínky

Vývoj a validace chromatografické metody pro stanovení degradačních produktů ibuprofenu nebyly cílem této práce, a proto byly podmínky pro provedení UPLC-MS převzaty ze článku Ewy Bartosinske, ve kterém se zabývala efektem farmaceutických excipientů na elektrochemickou oxidaci ibuprofenu³⁷.

Jako mobilní fáze sloužila směs 10mM mravenčanu amonného o pH 3,0 (složka A) a acetonitrilu (složka B). Byla použita gradientová eluce, gradientový program je uveden v tabulce 2. Byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C18 o rozměrech 2,1 × 100 mm; 1,7 μm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min, objem nástřiku na 5 μl, teplota kolony na 40 °C a teplota automatického dávkovače na 15 °C. Jako detektor pro tuto analýzu byl zvolen detektor fotodiodového pole (PDA) a jednoduchý kvadrupólový hmotnostní detektor (QDa). Detekce analytů PDA detektorem probíhala při vlnové délce 222 nm, ale snímána byla všechna spektra v rozsahu 210-400 nm. QDa detektor pracoval v pozitivním ionizačním módu a byl využit k identifikaci hlavního píku ibuprofenu a píků degradačních produktů. Pracovní podmínky QDa detektoru byly nastaveny následovně: napětí na kapiláře 0,8 kV, teplota sondy 600 °C, napětí na kuželu 15 V a rozsah skenu m/z 50-400.

Tabulka 2: Gradientový program metody UPLC, podle kterého se měnilo zastoupení mobilní fáze složené z 10mM mravenčanu amonného (složka A) a acetonitrilu (složka B).

<i>t</i>	Φ_A	Φ_B
min	%	%
0	98	2
2	98	2
10	15	85
12	15	85
15	98	2
17	98	2

2.6 Vyhodnocení dat softwarem Empower 3

Po provedení UPLC-MS byl získán chromatogram obsahující hlavní pík ibuprofenu a píky degradačních produktů. Identifikovány a kvantifikovány jsou takové degradační produkty, které se vyskytují nad prahem identifikace (ve farmacii se obvykle uvádí hodnota 0,1 %) ³⁸. Píky látek byly manuálně integrovány za účelem získání údajů o plochách a retenčních časech daných látek. Z podílu retenčních časů jednotlivých degradačních produktů ku retenčnímu času ibuprofenu byly vypočteny relativní retenční časy (RRT) těchto produktů, sloužící k jejich identifikaci. K výpočtu celkové sumy degradačních produktů posloužila metoda vnitřní normalizace. Suma degradačních produktů byla získána jako součet ploch píků všech degradačních produktů dělený součtem ploch všech píků, včetně píku ibuprofenu. Pro získání hodnoty v procentech byl tento podíl vynásoben stem. Na základě tohoto výpočtu pak bylo možné určit, jestli vznikne větší procento degradačních produktů při statickém, nebo průtokovém experimentálním uspořádání.

2.7 Analytické zpracování dat

2.7.1 Výpočet směrodatné odchylky

Směrodatná odchylka pro malý počet n paralelních stanovení ($n \leq 7$) byla vypočtena podle vzorce (cit. ³⁹):

$$s = k_n \times R \quad (1)$$

kde k_n je tabelovaný koeficient pro stanovený počet měření n pro koeficient spolehlivosti 0,95 ($\alpha = 0,05$) a R je rozpětí vypočtené z rozdílu největší a nejmenší hodnoty x z daného souboru hodnot (cit. ³⁹):

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (2)$$

2.7.2 Výpočet variačního koeficientu

Variační koeficient neboli relativní směrodatná odchylka (s_r), vztahuje přesnost měření k velikosti střední hodnoty, tedy k aritmetickému průměru nebo k mediánu:

$$s_r (\%) = 100 \times \frac{s}{\bar{x}} \quad (3)$$

kde s je směrodatná odchylka spočítána podle rovnice 1 a \bar{x} je medián (cit. ³⁹). V této práci výpočet relativní směrodatné odchylky posloužil k vyhodnocení opakovatelnosti metody.

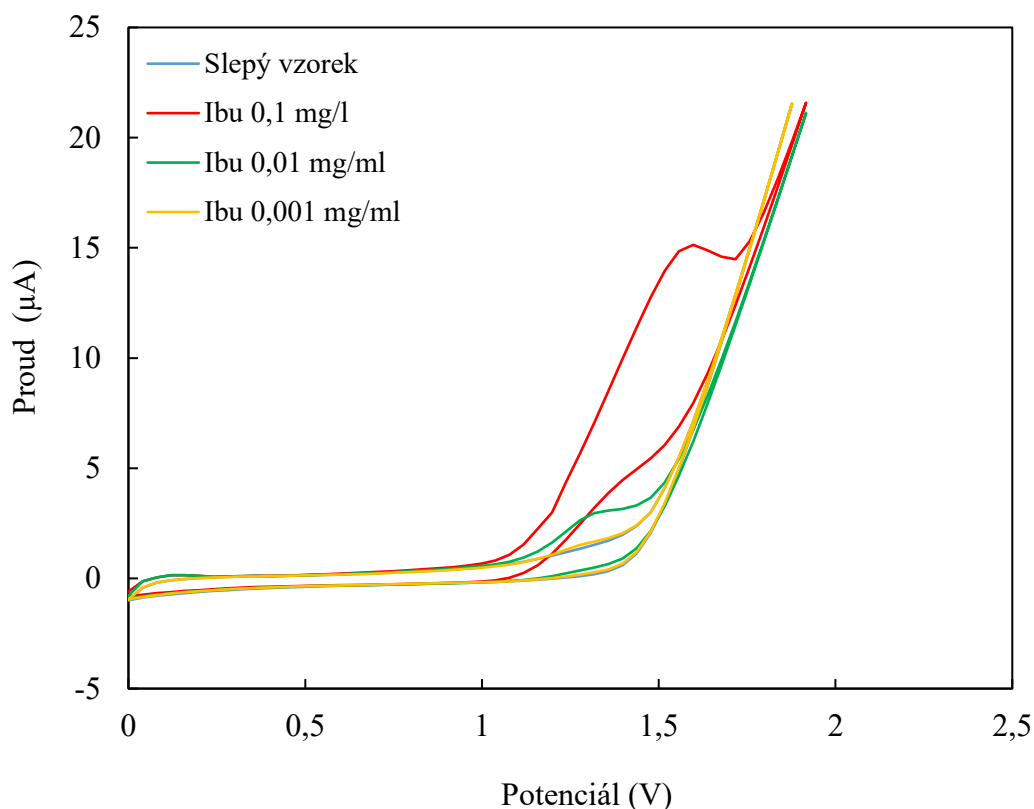
3 Výsledky a diskuze

3.1 Příprava vzorků ibuprofenu

Na začátek byl připraven roztok ibuprofenu o koncentraci 1 mg/ml. Bylo zapotřebí nalézt organické rozpouštědlo vhodné pro převedení API ibuprofenu do roztoku. V rozhodování mezi methanolem a acetonitrilem byl nakonec zvolen acetonitril, neboť se při předchozích laboratorních experimentech ukázalo, že acetonitril přispívá ke zvýšené tvorbě hlavního degradačního produktu³⁷. Jako rozpouštědlo vzorku byl zvolen 100mM octan amonný a acetonitril v poměru 90:10 (v/v), dle článku Ewy Bartosinske³⁷. Dále byla volena hodnota pH acetátového pufru. Literatura zmiňuje, že by se elektrochemická oxidace ibuprofenu měla provádět při hodnotách pH, které jsou blízké jeho pK_a (cit. ⁴⁰). Hodnoty pK_a ibuprofenu jsou uváděny jako 4,45, 4,91 nebo 5,20 (cit. ⁴¹). Je však známo, že nižší hodnoty pH (3,5 a nižší) zajišťují plnou protonizaci molekuly a oxidace je za těchto podmínek neúčinnější⁴⁰. Jako testované hodnoty pH acetátového pufru tedy byly zvoleny hodnoty 3,5, 5,0 a 7,0. Vybraná počáteční koncentrace ibuprofenu (1 mg/ml) byla problematická při rozpouštění, přestože se ibuprofen nejprve rozpouštěl v acetonitrilu a teprve poté byl do roztoku přidán acetátový pufr. Koncentrace ibuprofenu pro následující experimenty byla tedy snížena na 0,1 mg/ml.

3.2 Cyklická voltametrie

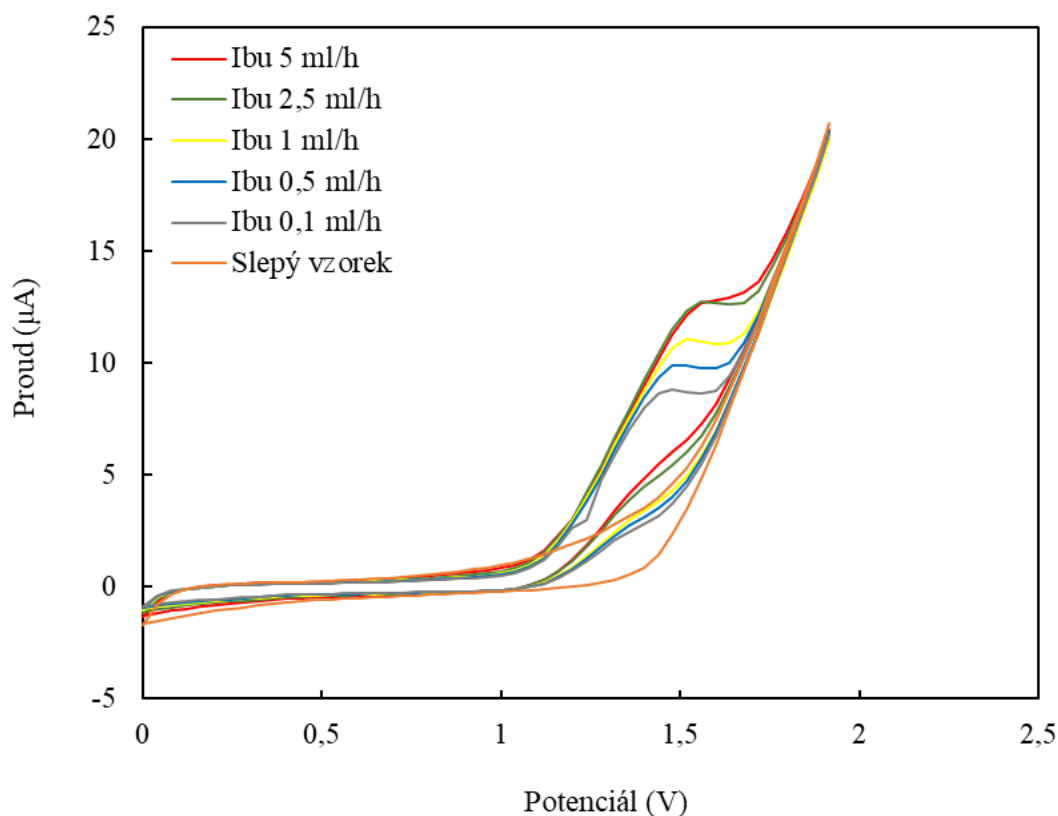
Počátečním experimentem provedeným s roztokem API ibuprofenu byla cyklická voltametrie, a to za účelem pozorování elektrochemických vlastností této látky. Pro následnou elektrochemickou oxidaci bylo zapotřebí zjistit, při jakém potenciálu se ibuprofen začíná oxidovat. V programu PSTrace 5 (cit. ³⁶) bylo zvoleno rozmezí potenciálů 0-2,5 V dle pracovního rozsahu vybrané uhlíkové elektrody. Rychlost jednoho skenu činila 0,01 V/s z toho důvodu, že při příliš vysokých rychlostech snímání se vytváří píky s velkými proudy, což vede ke zkreslení cyklických voltamogramů. Cyklická voltametrie byla prováděna dvakrát, jednou při statickém módu, kdy byl vzorek do cely nadávkován jednorázově a podruhé při průtokovém módu, kdy byl vzorek vnášen do cely pomocí stříkačkového čerpadla se zvolenými průtokovými rychlostmi. Výsledkem mělo být nejen pozorování elektrochemických vlastností ibuprofenu, ale i porovnání výsledků získaných při statickém a průtokovém uspořádání. Porovnání je znázorněno na obrázcích 11 a 12.



Obrázek 11: Cyklický voltamogram ibuprofenu ve statickém módu při pozitivním potenciálovém skenu v rozmezí 0-2,5 V a při rychlosti skenu 0,01 V/s. Jako rozpouštědlo vzorku byl použit 100mM octan amonný o pH 3,5 a acetonitril v poměru 90:10 (v/v). Připraveny byly pro porovnání ještě roztoky o koncentracích 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml.

V případě roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml jsou elektrochemické vlastnosti ibuprofenu nejlépe pozorovatelné. Z grafu na obrázku 11 je patrné, že ibuprofen podléhá oxidaci v rozmezí potenciálů 1,0-1,6 V. Z grafu je rovněž možné zpozorovat, že s rostoucí koncentrací analytu se posouvá pík oxidace k vyššímu potenciálu. To je způsobené tím, že při řízení procesu oxidace prostou difúzí může na elektrodě zároveň docházet k adsorpci analytu na její povrch. Adsorpce je relativně pomalý proces, který zpomaluje oxidaci a posouvá oxidační pík k vyšším potenciálům.

Cyklická voltametrie byla realizována i při hodnotách pH acetátového pufru 5,0 a 7,0. Při pH 5,0 se ibuprofen oxidoval pouze v rozmezí potenciálů 1,0-1,4 V a při pH 7,0 nebylo možné určit, v jakém potenciálovém rozmezí podléhá ibuprofen oxidaci, jelikož oxidační pík nebyl příliš výrazný. Proto do této práce byl zvolen pouze graf pro měření s pufrům o hodnotě pH 3,5, ze kterého lze údaje snadno vyčíst.



Obrázek 12: Cyklický voltamogram ibuprofenu ($c_m = 0,1$ mg/ml) v průtokovém módu při pozitivním potenciálovém skenu v rozmezí 0-2,5 V a při rychlosti skenu 0,01 V/s. Jako rozpouštědlo vzorku byl použit 100mM octan amonný o pH 3,5 a acetonitril v poměru 90:10 (v/v). Průtokové rychlosti byly na stříkačkovém čerpadle nastaveny na 5 ml/h, 2,5 ml/h, 1 ml/h, 0,5 ml/h a 0,1 ml/h.

Z grafu na obrázku 12 je patrné, že stejně jako při využití statického módu dochází k oxidaci ibuprofenu v rozmezí potenciálů 1,0-1,6 V. Také lze vypořadovat, že s klesající průtokovou rychlostí klesá i hodnota proudu. Vyšší proud při vyšším průtoku může být způsoben buď rychlejším přísunem nové API, nebo zmenšením difúzní vrstvy na povrchu elektrody, a tím i zrychlením transportu API k povrchu elektrody.

Po porovnání obou cyklických voltamogramů na obrázcích 11 a 12 lze říct, že mezi cyklickou voltametrií při statickém a průtokovém módu není žádný rozdíl, který by významně ovlivnil výsledky pozorování elektrochemických vlastností ibuprofenu. Jediným rozdílem je posun proudu pro cyklický voltamogram v průtokovém módu do nižších hodnot, což ale nemá vliv na volbu pracovního potenciálu pro oxidaci.

3.3 Elektrochemická oxidace ibuprofenu

Byla provedena elektrochemická oxidace ibuprofenu ve statickém a průtokovém módu. Oxidováno bylo celkem 54 vzorků ibuprofenu – 27 měření proběhlo ve statickém módu a 27 měření v průtokovém módu. Pro experimenty byl zvolen 100mM octan amonný s acetonitrilem v poměru 90:10 (v/v) jako rozpouštědlo ibuprofenu. Acetátový pufr byl vybrán z důvodu vhodnosti pro hmotnostní spektrometrii, která byla použita jako detekční technika v UPLC. Pufr byl připravován vždy tak, aby koncentrace acetátu byla 100mM. Hodnoty pH acetátového pufru byly zvoleny celkem tři: pH 3,5, při kterém je molekula ibuprofenu plně protonizovaná. Toto pH zajišťuje nejúčinnější průběh oxidace díky velkému množství H^+ iontů v roztoku. Předchozí experimenty na druhé straně ukázaly, že při nižších hodnotách pH než 3,5 může roztok obsahovat příliš velké množství H^+ iontů, které může vést k oxidaci neodpovídající reálným podmínkám, které mohou nastat při skladování léčivých přípravků. Dále bylo zvoleno pH 5,0, které je blízké pK_a ibuprofenu (viz kapitola 3.1) a neutrální hodnota pH 7,0. Zásadité hodnoty pH by byly nevhodné, protože přebytek OH^- iontů by mohl uměle tlumit oxidaci.

Při průtokovém experimentálním uspořádání byla nastavena hodnota průtokové rychlosti na 1 ml/h, takže dávkovaný objem vzorku 1,00 ml prošel celou při době trvání oxidace nastavené na 3600 s. Byl proveden výpočet objemu elektrochemické průtokové cely ve tvaru válce, která měla rozměry $2 \times 8,8$ mm, aby se zjistilo, jak dlouho se analyt udrží u povrchu pracovní elektrody uvnitř cely. Výpočet proběhl podle vzorce $V = \pi r^2 v$, kde r je poloměr válce v mm a v je výška válce v mm. Objem cely činil $121,6 \text{ mm}^3$, tedy $121,6 \text{ } \mu\text{l}$. Při průtokové rychlosti 1 ml/h se analyt uvnitř cely zdržel po dobu 7,30 minut.

Nakonec byly získány od každého vzorku tři vialky: jedna obsahovala nestresovaný vzorek API ibuprofenu, další obsahovala stresovaný vzorek API ibuprofenu a v poslední byl slepý vzorek, který tvořilo rozpouštědlo vzorku, tedy směs 100mM octanu amonného a acetonitrilu v poměru 90:10 (v/v).

3.4 Vyhodnocení dat získaných elektrochemickou oxidací

Po elektrochemické oxidaci proběhla UPLC analýza slepých vzorků, nestresovaných a stresovaných vzorků API ibuprofenu. Byly získány retenční časy, plochy, výšky a relativní plochy píků degradačních produktů a API ibuprofenu. Z retenčních časů degradačních produktů a retenčního času API ibuprofenu byly vypočteny relativní retenční časy jednotlivých degradačních produktů. U každého degradačního produktu byla zjištěna relativní plocha píku, ze které pak byla vypočtena suma relativních ploch píků jednotlivých degradačních produktů, čímž byla získána informace o jejich procentuálním zastoupení. Vyhodnocovaly se pouze degradační produkty, které přesáhly 0,1% práh identifikace. Výsledky jsou zpracovány do tabulky 3, kde jsou uvedeny vzorky měřené při statickém módu a do tabulky 4, kde jsou uvedeny vzorky měřené při průtokovém módu. V obou případech vznikaly celkem tři degradační produkty s relativními retenčními časy 0,93, 0,98 a 1,14.

Z tabulek 3 a 4 je patrné, že největší procento degradačních produktů vznikne při použití 100mM octanu amonného o hodnotě pH 3,5, potenciálu 1,6 V, době trvání oxidace 3600 s a statickém experimentálním uspořádání (vzorek 27). Tento výsledek se dal očekávat, neboť se počítalo s tím, že hodnota pH 3,5 je pro průběh oxidace nejvhodnější, potenciál 1,6 V je nejvyšší možný, který se dal aplikovat, aby byl dodržen rozsah, ve kterém dochází k oxidaci ibuprofenu, 3600 s je doba, při které vzorek podléhá nejdéle oxidaci a statický mód je vhodný, protože vzorek stráví delší dobu uvnitř elektrochemické cely bez toho, aniž by se její objem obměnil, zatímco při průtokovém módu je objem cely obměňován kontinuálně. Problémem statického módu může být následná oxidace degradačních produktů, které nejsou z cely kontinuálně odstraňovány, ale v tomto případě to pozorováno nebylo, protože v obou módech vznikaly stejné degradační produkty.

Tabulka 3: Výsledky elektrochemické oxidace ve statickém módu.

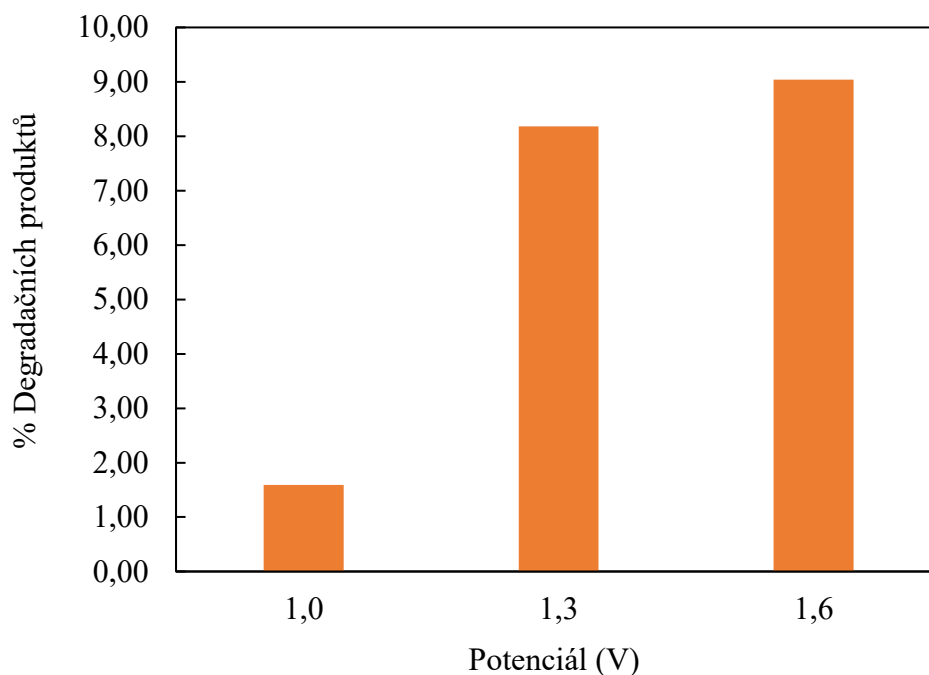
Relativní plochy píků degradačních produktů							
Vzorek č.	pH	Čas s	Potenciál V	RRT 0,93 %	RRT 0,98 %	RRT 1,14 %	∑ relativních ploch píků %
1	7,0	900	1,0	-	0,62	-	0,62
2	7,0	900	1,3	1,53	2,90	-	4,43
3	7,0	900	1,6	1,37	3,09	-	4,46
4	7,0	1800	1,0	0,93	0,51	-	1,44
5	7,0	1800	1,3	1,28	3,91	-	5,19
6	7,0	1800	1,6	2,26	4,65	-	6,91
7	7,0	3600	1,0	1,25	0,63	-	1,88
8	7,0	3600	1,3	2,74	2,93	-	5,67
9	7,0	3600	1,6	3,02	3,99	-	7,01
10	5,0	900	1,0	-	0,26	-	0,26
11	5,0	900	1,3	1,97	3,07	-	5,04
12	5,0	900	1,6	1,69	3,54	-	5,23
13	5,0	1800	1,0	1,23	0,32	-	1,55
14	5,0	1800	1,3	2,34	3,58	-	5,92
15	5,0	1800	1,6	2,38	4,72	0,19	7,29
16	5,0	3600	1,0	1,21	0,48	-	1,69
17	5,0	3600	1,3	2,77	4,18	-	6,95
18	5,0	3600	1,6	2,76	5,06	-	7,82
19	3,5	900	1,0	1,19	0,18	-	1,37
20	3,5	900	1,3	1,90	3,33	0,57	5,80
21	3,5	900	1,6	1,59	4,21	1,11	6,91
22	3,5	1800	1,0	1,45	0,16	-	1,61
23	3,5	1800	1,3	1,86	4,55	0,93	7,34
24	3,5	1800	1,6	1,33	5,30	1,57	8,20
25	3,5	3600	1,0	1,15	0,44	-	1,59
26	3,5	3600	1,3	2,41	4,86	0,91	8,18
27	3,5	3600	1,6	2,02	5,67	1,35	9,04

Tabulka 4: Výsledky elektrochemické oxidace v průtokovém módu.

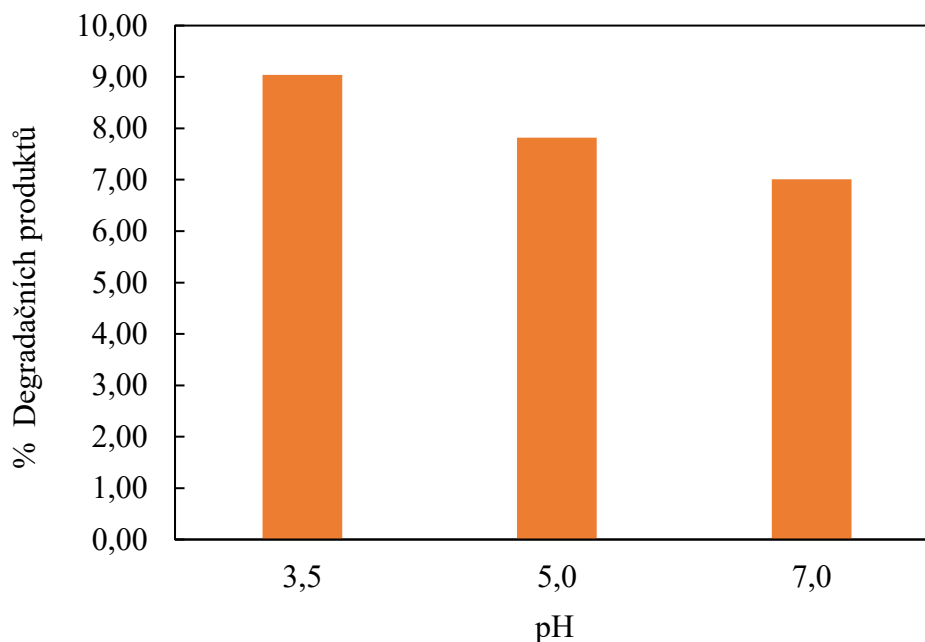
Relativní plochy píků degradačních produktů							
Vzorek č.	pH	Čas s	Potenciál V	RRT 0,93 %	RRT 0,98 %	RRT 1,14 %	Σ relativních ploch píků %
28	7,0	900	1,0	-	0,25	-	0,25
29	7,0	900	1,3	0,60	0,93	-	1,53
30	7,0	900	1,6	0,59	1,60	-	2,19
31	7,0	1800	1,0	-	0,32	-	0,32
32	7,0	1800	1,3	0,43	0,66	-	1,09
33	7,0	1800	1,6	0,56	1,07	-	1,63
34	7,0	3600	1,0	-	0,18	-	0,18
35	7,0	3600	1,3	0,42	0,44	-	0,86
36	7,0	3600	1,6	0,55	0,95	-	1,50
37	5,0	900	1,0	-	0,24	-	0,24
38	5,0	900	1,3	1,16	1,21	-	2,37
39	5,0	900	1,6	0,95	1,78	-	2,73
40	5,0	1800	1,0	-	0,28	-	0,28
41	5,0	1800	1,3	0,7	0,9	-	1,6
42	5,0	1800	1,6	0,74	1,72	-	2,46
43	5,0	3600	1,0	-	0,27	-	0,27
44	5,0	3600	1,3	0,88	0,66	-	1,54
45	5,0	3600	1,6	0,91	1,43	-	2,34
46	3,5	900	1,0	0,50	0,34	-	0,84
47	3,5	900	1,3	0,73	0,94	-	1,67
48	3,5	900	1,6	0,68	1,11	-	1,99
49	3,5	1800	1,0	-	0,35	-	0,35
50	3,5	1800	1,3	0,62	0,92	-	1,54
51	3,5	1800	1,6	0,84	1,89	0,45	3,18
52	3,5	3600	1,0	-	0,31	-	0,31
53	3,5	3600	1,3	0,92	1,03	0,18	2,13
54	3,5	3600	1,6	0,73	2,22	0,56	3,51

3.5 Vliv podmínek na míru degradace

Obrázky 13, 14 a 15 graficky znázorňují příklady procentuálního zastoupení degradačních produktů při aplikaci různých experimentálních podmínek.

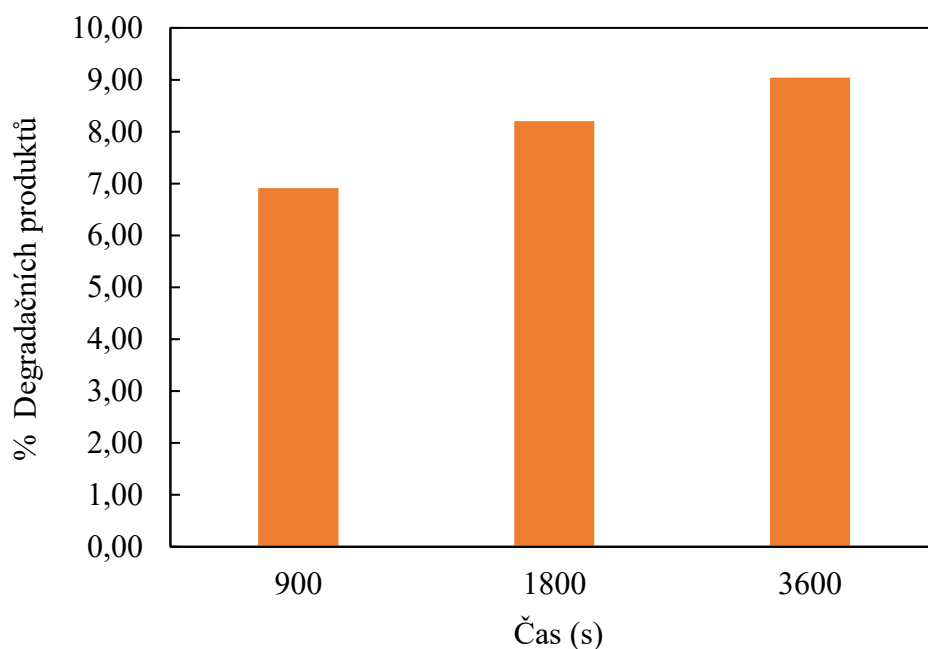


Obrázek 13: Graf znázorňující procento vzniklých degradačních produktů při pH 3,5, době trvání oxidace 3600 s a statickém módu.



Obrázek 14: Graf znázorňující procento vzniklých degradačních produktů při době trvání oxidace 3600 s, potenciálu 1,6 V a statickém módu.

Z grafu na obrázku 13 je patrné, že největší procento degradačních produktů vznikalo při nejvyšším vloženém potenciálu 1,6 V (přibližně 9 %). I při potenciálu 1,3 V již oxidace probíhala srovnatelnou rychlostí, vznikalo přibližně o 1 % degradačních produktů méně (cca 8 %). Při potenciálu 1,0 V byl rozsah oxidace výrazně menší, vznikalo pouze okolo 1,5 % degradačních produktů. Tento výsledek koresponduje i s polohou oxidačního píku API pozorovanou v cyklických voltamogramech na obrázcích 11 a 12. Z grafu na obrázku 14 vyplývá, že největší procento degradačních produktů vznikalo při pH 3,5 (9 %). Při pH 5,0 vznikalo přibližně 8 % a při pH 7,0 zhruba 7 % degradačních produktů.

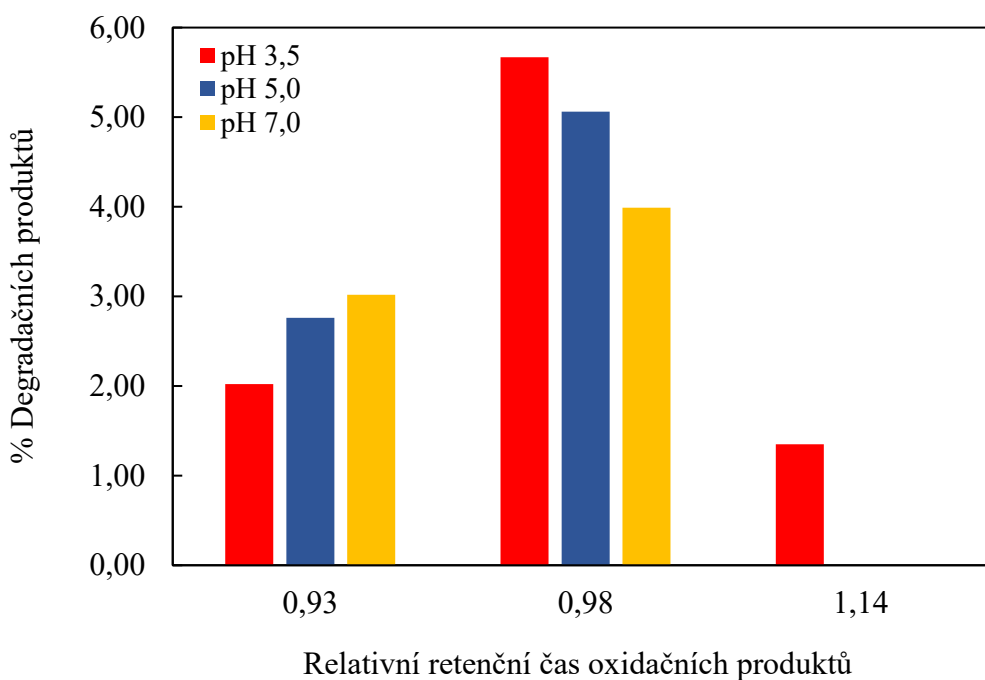


Obrázek 15: Graf znázorňující procento vzniklých degradačních produktů při pH 3,5, potenciálu 1,6 V a statickém módu.

Z grafu na obrázku 15 vyplývá, že největší procento degradačních produktů vznikalo při době trvání oxidace 3600 s (přibližně 9 %). Při době trvání 1800 s vznikalo asi 8 % degradačních produktů a při 900 s méně než 7 % degradačních produktů. Z grafu je patrné, že s prodlužujícím se časem narůstá množství degradačních produktů. Je zde nutno poznamenat, že doba trvání oxidace mezi prvním a druhým sloupcem a druhým a třetím sloupcem se vždy zdvojnásobuje. Přírůstek sumy degradačních produktů je přitom v obou případech srovnatelný, což naznačuje, že oxidace probíhala zpočátku rychleji a s rostoucí dobou trvání se mírně zpomalovala.

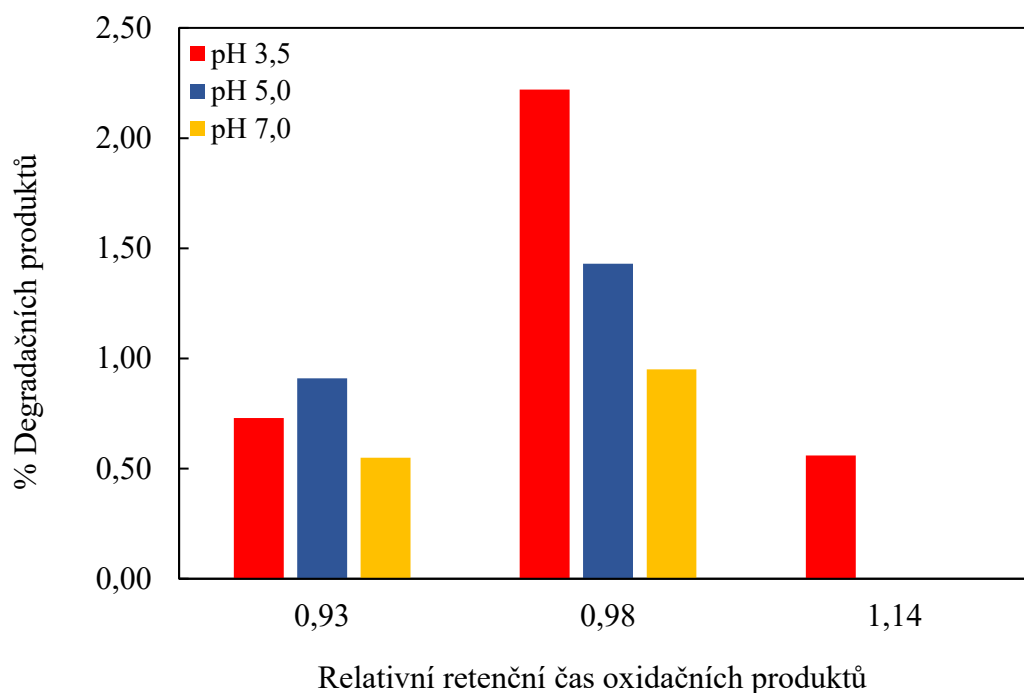
Byly také vytvořeny grafy, které obsahovaly data z měření za ostatních experimentálních podmínek (aplikace potenciálů 1,0 V a 1,3 V, použití acetátového pufru o hodnotách pH 5,0 a 7,0, doba trvání oxidace 900 s a 1800 s a průtokový mód). Trendy v grafech však byly obdobné, jako při použití optimálních podmínek, tj. pH acetátového pufru 3,5, potenciálu 1,6 V, doby oxidace 3600 s a statického módu. Proto byly do této diplomové práce umístěny pouze grafy vzniklé při aplikaci výše zmíněných optimálních podmínek.

Obrázky 16 a 17 představují grafy shrnující celkový procentuální vznik degradačních produktů a jejich relativní retenční časy ve statickém a průtokovém módu. Z grafu na obrázku 16 je zřejmé, že ve statické módu je hlavním degradačním produktem produkt s relativním retenčním časem 0,98, který byl při všech hodnotách pH nejvíce procentuálně zastoupen. Největší množství ho vznikalo při pH 3,5 (necelých 6 %). Produkt s RRT 0,93 naopak nejvíce vznikal při pH 7,0 (3 %), poté při pH 5,0 (necelá 3 %) a nejméně ho vzniklo při pH 3,5 (2 %). To může být dáno rozdílnými strukturami obou degradačních produktů. Produkt s RRT 1,14 vznikal v měřitelném množství pouze při pH 3,5 (cca 1,5 %), kdy docházelo k celkově největší míře degradace.



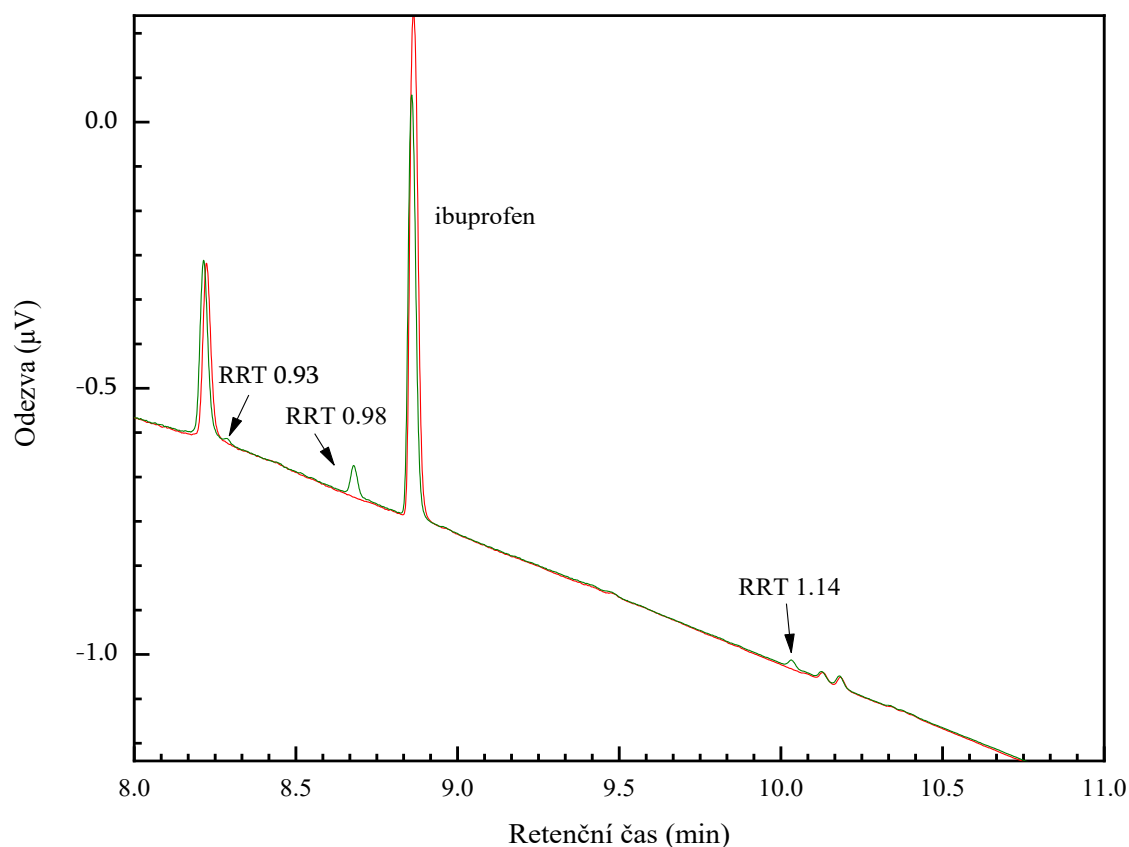
Obrázek 16: Graf shrnující celkový vznik degradačních produktů a jejich relativní retenční časy při měření ve statickém módu a při optimálních podmínkách: potenciálu 1,6 V a době trvání oxidace 3600 s. Červené sloupce představují měření při pH 3,5, modré sloupce představují měření při pH 5,0 a žluté sloupce měření při pH 7,0.

Z grafu na obrázku 17 je patrné, že při oxidaci v dynamickém módu vzniká oproti statickému módu výrazně méně všech degradačních produktů. Z nich je rovněž nejvíce procentuálně zastoupen produkt s RRT 0,98. Při průtokovém módu však tohoto produktu vzniká daleko méně, při pH 3,5 vzniklo 2,22 %, při pH 5,0 vznikalo přibližně 1,5 % a při pH 7,0 vznikalo 1 %. Vliv pH na vznik tohoto produktu byl tedy stejný. Produkt s RRT 0,93 vznikal nejvíce při pH 5,0 (0,91 %), dále při pH 3,5 (0,73 %) a nejméně při pH 7,0 (0,55 %). Ve srovnání se statickým módem byl tedy potlačen jeho vznik v neutrálním prostředí. Produkt s RRT 1,14 opět vznikal pouze při pH 3,5. Zatímco produkty s RRT 0,93 a 0,98 vznikají v různých poměrech při kyselém pH (3,5), pH blízkém pK_a ibuprofenu (5,0) i při neutrálním pH (7,0), je možné, že produkt s RRT 1,14 ke svému vzniku potřebuje prostředí s nízkou hodnotou pH a v méně kyselém nebo neutrálním prostředí vůbec nevzniká. Na druhé straně není vyloučeno, že by se nakonec objevil, kdyby oxidace probíhala ještě výrazně delší dobu.



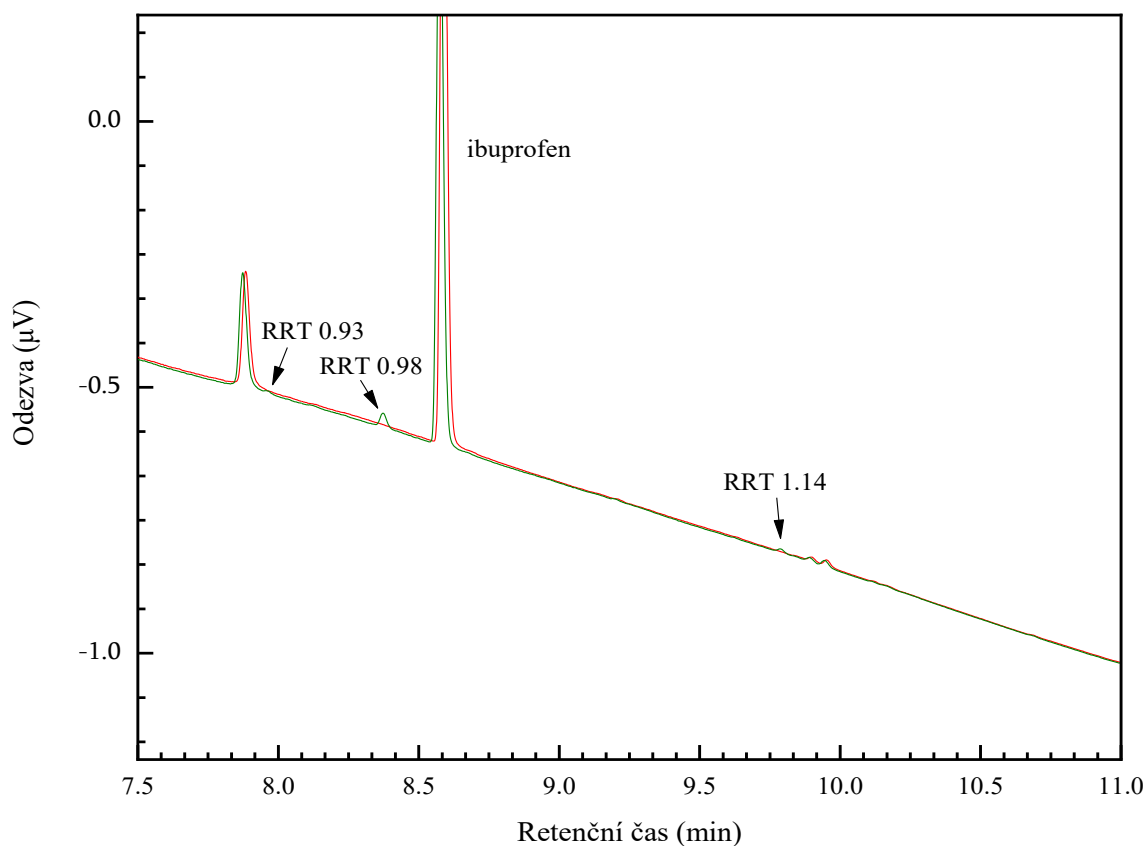
Obrázek 17: Graf shrnující celkový vznik degradačních produktů a jejich relativní retenční časy při měření v průtokovém módu a při optimálních podmínkách: potenciálu 1,6 V a době trvání oxidace 3600 s. Červené sloupce představují měření při pH 3,5, modré sloupce představují měření při pH 5,0 a žluté sloupce měření při pH 7,0.

Obrázky 18 a 19 obsahují vzorové chromatogramy oxidačních produktů a API ibuprofenu. Jedná se o chromatogramy vzorků získaných při oxidaci za optimálních podmínek, tedy při pH 3,5, potenciálu 1,6 V a době trvání oxidace 3600 s. Ibuprofen byl rozpuštěn ve směsi 100mM octanu amonného o pH 3,5 a acetonitrilu v poměru 90:10 (v/v) a jeho koncentrace činila 0,1 mg/ml.



Obrázek 18: Chromatogram vzorku ibuprofenu po oxidaci ve statickém módu za optimálních podmínek. Červená křivka v grafu zastupuje analýzu nestresovaného vzorku API ibuprofenu a zelená křivka představuje analýzu stresovaného vzorku API ibuprofenu. Byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 µm), mobilní fáze: směs 10mM mravenčanu amonného o pH 3,0 a acetonitrilu s gradientovou elucí popsanou v kapitole 2.5, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, objem nástřiku 5 µl, teplota kolony 40 °C, teplota automatického dávkovače 15 °C a vlnová délka 222 nm.

Ibuprofen eluoval okolo 9. minuty, produkt s RRT 0,93 eluoval kolem 8,3 minut, produkt s RRT 0,98 eluoval okolo 8,7 minut a produkt s RRT 1,14 v 10. minutě. Analýza trvala celkem 17 minut. Všechny degradační produkty jsou separovány na základní linii od sebe navzájem a od píku API, což dokládá vhodnost použité metody. Celková suma degradačních produktů vzniklých při oxidaci za optimálních podmínek ve statickém módu činila 9,00 %.



Obrázek 19: Chromatogram vzorku ibuprofenu po oxidaci v průtokovém módu za optimálních podmínek. Červená křivka v grafu zastupuje analýzu nestresovaného vzorku API ibuprofenu a zelená křivka představuje analýzu stresovaného vzorku API ibuprofenu. Byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 µm), mobilní fáze: směs 10mM mravenčanu amonného o pH 3,0 a acetonitrilu s gradientovou elucí popsanou v kapitole 2.5, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, objem nástřiku 5 µl, teplota kolony 40 °C, teplota automatického dávkovače 15 °C a vlnová délka 222 nm.

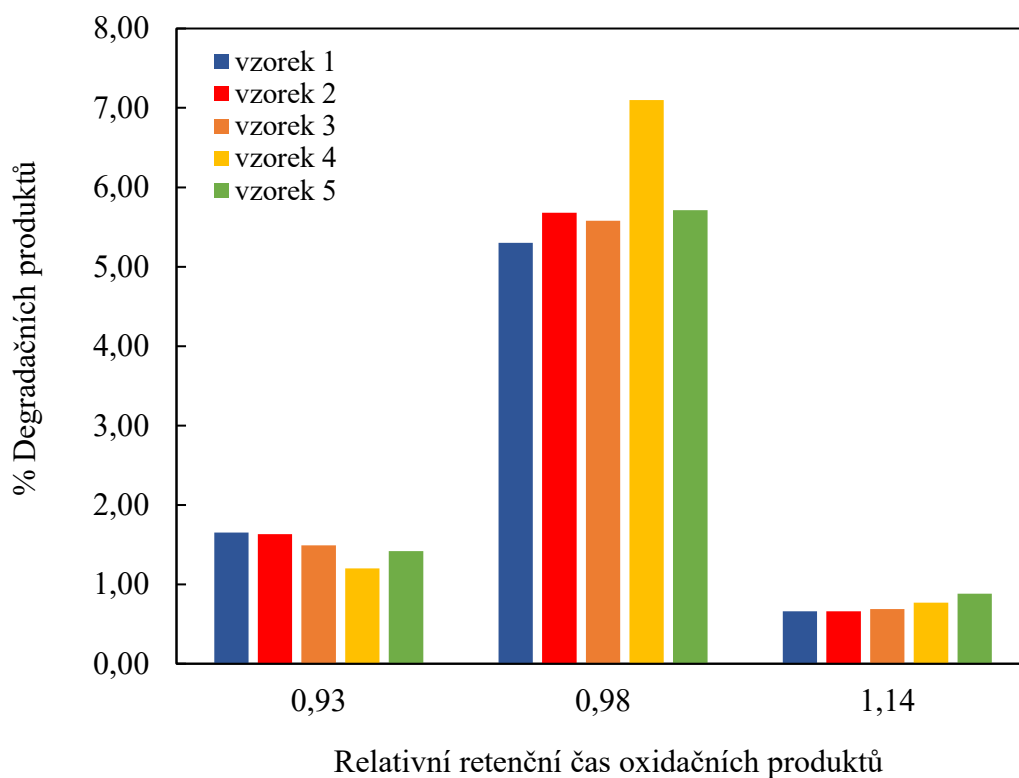
Z tohoto chromatogramu je zřejmé, že píky všech degradačních produktů mají nižší plochy i výšky píků, to dosvědčuje, že při průtokovém módu vzniká menší procento degradačních produktů. Rovněž došlo k nepatrnému posunu retenčních časů degradačních produktů a ibuprofenu do nižších hodnot oproti retenčním časům na chromatogramu vzniklém po elektrochemické oxidaci ve statickém módu. To může být zapříčiněno tím, že obě analýzy byly provedeny v jiné dny, a tudíž znovu připravená mobilní fáze v jiný den mohla mít lehce odlišnou hodnotu pH. Celková suma degradačních produktů vzniklých při oxidaci za optimálních podmínek v průtokovém módu činila 3,50 %.

3.6 Vyhodnocení opakovatelnosti

Po nalezení optimálních podmínek pro elektrochemickou oxidaci, kterými byly hodnota pH 100mM octanového pufru 3,5, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu 1,6 V, doba trvání oxidace 3600 s a statický mód, byla ověřována opakovatelnost měření. Byl připraven vzorek ibuprofenu o koncentraci 0,1 mg/ml, který byl pětkrát zoxidován při použití výše zmíněných optimálních podmínek. Všechna pět měření probíhalo ve stejný den a s jedním připraveným vzorkem. Výsledky oxidace byly analyzovány metodou UPLC a zpracovány do tabulky 5 a grafu na obrázku 20.

Tabulka 5: Výsledky elektrochemické oxidace za optimálních podmínek.

Relativní plochy píků degradačních produktů				
Vzorek č.	RRT 0,93 %	RRT 0,98 %	RRT 1,14 %	Σ relativních ploch píků %
1	1,65	5,30	0,66	7,61
2	1,63	5,68	0,66	7,97
3	1,49	5,58	0,69	7,76
4	1,20	7,10	0,77	9,07
5	1,42	5,71	0,88	8,01



Obrázek 20: Graf shrnující celkový vznik degradačních produktů a jejich relativní retenční časy po elektrochemické oxidaci pěti vzorků za optimálních podmínek (pH 3,5, potenciál 1,6 V, doba oxidace 3600 s a statický mód).

Z grafu na obrázku 20 je patrné, že je opět hlavním degradačním produktem produkt s RRT 0,98. Při oxidaci vzorků 1,2,3 a 5 vzniklo přibližně stejné procento tohoto produktu (cca 5,5 %), zatímco po oxidaci vzorku 4 byl tento produkt zastoupen ze 7 %. Tato odchylka by mohla být zapříčiněna tím, že oxidační děje na pracovní elektrodě nevykazují vysokou reprodukovatelnost. Nejméně zastoupený byl produkt s RRT 1,14, kterého po oxidaci všech pěti vzorků vzniklo vždy necelé 1 %. Suma relativních ploch pík degradačního produktu s RRT 0,93 se pohybovala okolo 1,5 %. Z grafu je dále zřejmé, že elektrochemická oxidace probíhala vždy stejným mechanismem, jelikož vzájemné poměry degradačních produktů jsou u všech pěti měření zhruba stejné.

Opakovatelnost elektrochemické oxidace byla vyhodnocena výpočtem relativní směrodatné odchylky (s_r) podle rovnic 1, 2 a 3 v kapitole 2.7 (strana 36). K výpočtu relativní směrodatné odchylky byly použity relativní plochy pík jednotlivých degradačních produktů vzniklých oxidací pěti vzorků. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 7 uvádí sumy produktů vzniklých oxidací pěti vzorků za optimálních podmínek jako měřítko celkové degradace a výpočet relativní směrodatné odchylky z těchto hodnot.

Tabulka 6: Vyhodnocení opakovatelnosti měření metodou UPLC.

RRT	R	\bar{x}	s	k_n	s_r
	%	%	%		%
0,93	0,45	1,49	0,19	0,43	13,00
0,98	1,80	5,68	0,77	0,43	13,60
1,14	0,22	0,69	0,09	0,43	13,70

Z tabulky 6 je zřejmé, že relativní plochy píků produktu s RRT 0,93 se lišily o 13,00 %, u produktu s RRT 0,98 se lišily o 13,60 % a u produktu s RRT 1,14 o 13,70 %. Takto vysoké relativní směrodatné odchylky bývají u elektrochemických oxidací využívajících uhlíkovou pracovní elektrodu časté, především z důvodu adsorpce analytu na její povrch.

Ve farmaceutickém průmyslu je stanoveno maximum pro relativní směrodatnou odchylku na 2 %. Pokud je tato hodnota přesažena, znamená to, že daná metoda není dostatečně precizní. Toto se týká pouze analytických metod stanovení obsahu látek, nikoli metody studia stability a degradace. Pro tento účel je uvedená preciznost dostačující.

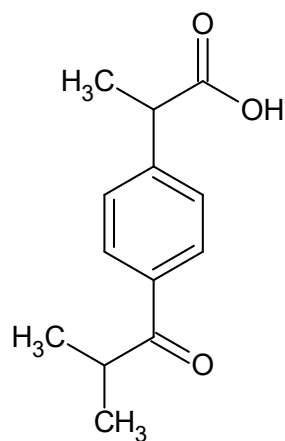
Tabulka 7: Vyhodnocení opakovatelnosti pro sumy produktů (celkovou degradaci).

Měření č.	Σ relativních ploch píků	R	\bar{x}	s	k_n	s_r
	%	%	%	%		%
1	7,61					
2	7,97					
3	7,76	1,46	7,97	0,63	0,43	7,90
4	9,07					
5	8,01					

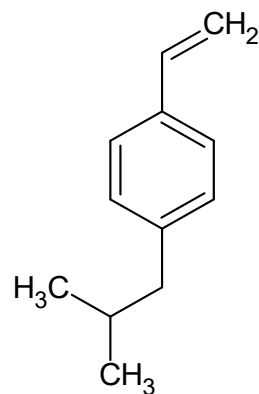
V tabulce 7 je uvedeno, že relativní směrodatná odchylka pro celkovou sumu degradačních produktů vzniklých oxidací pěti vzorků za optimálních podmínek činila 7,90 %. Pro hodnocení celkového rozsahu degradace vykazuje metoda vyšší preciznost než pro jednotlivé degradační produkty.

3.7 Identifikace degradačních produktů

Tři vzniklé degradační produkty byly identifikovány pomocí UPLC s hmotnostní detekcí jednoduchým kvadrupólovým detektorem (QDa) a porovnáním s literaturou. Detektor pracoval v pozitivním ionizačním módu a hlavní pík API ibuprofenu měl v hmotnostním spektru hodnotu m/z 224. Jedná se pravděpodobně o adukt s amonným iontem, který se nacházel v mobilní fázi. Hlavním degradačním produktem byl produkt s RRT 0,98, který v hmotnostním spektru poskytoval signál m/z 161. Po porovnání s literaturou se ukázalo, že se jedná nejspíše o 1-isobutyl-4-vinylbenzen. Tato látka obsahuje ve své struktuře oproti struktuře ibuprofenu navíc vinylovou skupinu, a naopak neobsahuje karboxylovou skupinu. Stejný degradační produkt vznikal i při chemické oxidaci provedené Gabrielou Caviglioli a kol. (cit. ²²). Degradační produkt s RRT 0,93 vykazoval v hmotnostním spektru hodnotu m/z 220. Po porovnání s literaturou se ukázalo, že jde pravděpodobně o 2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanovou kyselinu. Tato látka obsahuje ve své struktuře oproti struktuře ibuprofenu navíc karboxylovou skupinu. Stejný degradační produkt opět vznikal i při chemické oxidaci provedené Gabrielou Caviglioli a kol. (cit. ²²) a jedná se také o nečistotu J, uvedenou v Českém lékopisu z roku 2009 (cit. ²⁹). Degradační produkt s RRT 1,14 poskytl složité hmotnostní spektrum, které nebylo možné interpretovat a porovnat s literaturou. Patrně došlo k fragmentaci sloučeniny ve zdroji, a tudíž tento degradační produkt nebyl identifikován. Pravděpodobné struktury degradačních produktů s RRT 0,93 a 0,98 jsou uvedeny na obrázku 21.



Produkt 1



Produkt 2

Obrázek 21: Pravděpodobná struktura degradačních produktů vzniklých elektrochemickou oxidací ibuprofenu. Produkt 1, ((2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanov)kyselina, m/z 220, RRT 0,93) a Produkt 2, hlavní degradační produkt (1-isobutyl-4-vinylbenzen, m/z 161, RRT 0,98) (upraveno v programu ACD/ChemSketch⁷).

3.8 Porovnání výsledků chemické a elektrochemické oxidace

Ve člancích uvedených v teoretické části této práce se autoři zabývali chemickou oxidací ibuprofenu použitím chemických sloučenin, např. peroxidu vodíku, hydrogenperoxosíranu draselného, peroxodisíranu draselného, manganistanu draselného, dichromanu draselného či ozonu. Ve všech případech vznikalo mnoho degradačních produktů. V případě článku, jehož autorkou je Gabriele Caviglioli a kol. (cit. ²²), vzniklo za použití manganistanu draselného, dichromanu draselného a peroxidu vodíku celkem sedm degradačních produktů, které byly vyhodnoceny jako doposud neznámé. Elektrochemickou oxidací provedenou v rámci této diplomové práce vznikly degradační produkty pouze tři, z toho dva se svými hodnotami m/z shodují s degradačními produkty ze článku od Gabriele Caviglioli a kol. (cit. ²²) a jeden se dokonce shoduje s nečistotou J, specifikovanou v Českém lékopisu z roku 2009 (cit. ²⁹). Důvodem odlišného počtu vzniklých degradačních produktů je odlišný mechanismus obou druhů oxidací a také použití odlišných podmínek a metod při měření. Zatímco oxidace pomocí oxidačních činidel probíhá buď radikálovým mechanismem nebo jako peroxidem vodíku zprostředkovaná oxidace, elektrochemická oxidace na elektrodě z grafitizovaného uhlíku probíhá mechanismem přenosu elektronu. Například na BDD elektrodách se kromě

přenosu elektronu zapojuje i radikálová oxidace⁴². V případě ibuprofenu doprovází přenos elektronu tvorba radikálového kationtu a následuje proces dekarboxylace⁴⁰.

4 Závěr

V první části diplomové práce byly zkoumány elektrochemické vlastnosti API ibuprofenu ($c_m = 0,1$ mg/ml). Jako rozpouštědlo vzorku byl zvolen 100mM octan amonný a acetonitril v poměru 90:10 (v/v). Metodou pro zkoumání elektrochemických vlastností ibuprofenu byla cyklická voltametrie. Ukázalo se, že ibuprofen podléhá oxidaci v rozmezí potenciálů 1,0-1,6 V.

Dále byla provedena elektrochemická oxidace ibuprofenu. Probíhala za různých experimentálních podmínek a cílem bylo zjistit, za kterých z těchto podmínek vznikne největší procento degradačních produktů. Aplikovaly se následující parametry: 100mM acetátový pufr o hodnotách pH 3,5, 5,0 a 7,0, hodnoty napětí vkládaného na pracovní elektrodu 1,0 V, 1,3 V a 1,6 V, doba trvání oxidace 900 s, 1800 s a 3600 s a průtokový (průtoková rychlost 1 ml/h) či statický mód. Ze všech aplikovaných podmínek vyšlo najevo, že mezi optimální podmínky patří: hodnota pH pufru 3,5, doba trvání oxidace 3600 s, napětí vkládané na pracovní elektrodu 1,6 V a statický mód. Při této kombinaci parametrů vzniklo ve statickém módu celkem 9,00 % degradačních produktů a v průtokovém módu pouze 3,50 %. V obou módech vznikaly celkem tři degradační produkty s relativními retenčními časy 0,93, 0,98 a 1,14. Produkt s RRT 1,14 vznikal pouze při pH 3,5, zatímco ostatní produkty vznikaly v různých poměrech při všech použitých hodnotách pH. Rovněž byla vyhodnocována opakovatelnost elektrochemické oxidace na pěti vzorcích ibuprofenu. Relativní směrodatná odchylka pro degradační produkt s RRT 0,93 byla stanovena na 13,00 %, pro produkt s RRT 0,98 na 13,60 %, pro produkt s RRT 1,14 na 13,70 % a pro celkovou sumu degradačních produktů na 7,90 %.

Degradační produkty byly identifikovány pomocí hmotnostního detektoru a porovnány s dostupnou literaturou. Hlavní pík ibuprofenu vykazoval v hmotnostním spektru signál m/z 224 (adukt s amonným iontem). Produkt s relativním retenčním časem 0,93 poskytoval signál m/z 220. Jednalo se pravděpodobně o 2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanovou kyselinu. Hlavním degradačním produktem byl produkt s relativním retenčním časem 0,98. Ten vykazoval v hmotnostním spektru signál m/z 161. Jednalo se pravděpodobně o 1-isobutyl-4-vinylbenzen. Produkt s relativním retenčním časem 1,14 poskytl obtížně interpretovatelné hmotnostní spektrum a nepodařilo se ho identifikovat.

Seznam použité literatury

1. Rainsford, K. D.: Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacol*, Volume 17, p. 275–342 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x> (citováno 25. 10. 2020)
2. *Český lékopis: Pharmacopoea Bohemica* [online]. Praha: Grada Publishing, (1997) (citováno 27. 10. 2020)
3. Davies, N. M.: Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen. *Clin Pharmacokinet*, Volume 34, p. 101–154 (1998). <https://doi.org/10.2165/00003088-199834020-00002> (citováno 23. 10. 2020)
4. Kantor, T. G.: Ibuprofen. *Annals of Internal Medicine*, Volume 91, Issue 6, p. 877-882 (1979) (citováno 22. 10. 2020)
5. Madhavan J., Grieser F., Ashokkumar M.: Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 178, Issues 1-3, p. 202-208 (2010). (citováno 26. 10. 2020)
6. Sigma-Aldrich. *Ibuprofen*. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ibuprofen206281568727111?lang=en®ion=CZ> (citováno 27. 10. 2020)
7. Program na vytváření chemických struktur ACD/ChemSketch, ACD/Labs, Kanada (citováno 9. 2. 2022)
8. Baertschi S. W., Mills A. K., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 1-3, 2nd Ed., London, Informa Healthcare, 2011. (citováno 30. 10. 2020)
9. Singh R., Rehman Z. Ur.: Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, Volume 1, Issue 3, p. 54-63 (2012). (citováno 30. 10. 2020)
10. International Conference on Harmonization Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (2003). (citováno 30. 10. 2020)
11. Gupta A., Yadav J.S., Rawat S., Gandhi M.: Method Development and Hydrolytic Degradation Study of Doxofylline by RPHPLC and LC-MS/MS. *Asian J Pharm Ana*, Volume 1, Issue 1, p. 14-18 (2011). (citováno 30. 10. 2020)

12. Baertschi S.W., Thatcher S.R.: Sample presentation for photostability studies: problems and solutions, pp: 445, In; *Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology*. Piechocki J, Editor, Taylor & Francis, New York. (2006) (citováno 30. 10. 2020)
13. Hovorka S. W., Schoneich Ch.: Oxidative degradation of pharmaceuticals: Theory, mechanism and inhibition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 90, Issue 3, p. 253-269 (2001). (citováno 9. 3. 2022)
14. Ueyama E., et al.: Mechanistic study on degradation of azelnidipine solution under radical initiator-based oxidative conditions. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, Volume 61, p. 277 (2012). (citováno 9. 3. 2022)
15. Nefliu M., et al.: Artifacts Generated during Azoalkane Peroxy Radical Oxidative Stress Testing of Pharmaceuticals Containing Primary and secondary Amines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 104, Issue 12, p. 4287 (2015). (citováno 9. 3. 2022)
16. Alsante M. K., et al.: The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 59, Issue 1, p. 29 (2007). (citováno 9. 3. 2022)
17. He Y., et al.: Recent developments and advances in boron-doped diamond electrodes for electrochemical oxidation of organic pollutants. *Separation and Purification Technology*, Volume 212, p. 802 (2019). (citováno 9. 3. 2022)
18. Torres s., et al.: The application of electrochemistry to pharmaceutical stability testing-comparison with in silico prediction and chemical forced degradation approaches. *J Pharm Biomed Anal*, Volume 115, p. 487-501 (2015) doi: 10.1016/j.jpba.2015.08.010 (citováno 3. 3. 2022)
19. Scheers T., et al.: Evaluation of peroxide based advanced oxidation processes (AOPs) for the degradation of ibuprofen in water. *Desalination and Water Treatment*, Volume 50, Issues 1-3, p. 189-197 (2012). (citováno 31. 10. 2020)
20. Wang Z., et al.: Degradation of Ibuprofen by UV-LED/catalytic advanced oxidation process. *Journal of Water Process Engineering*, Volume 31 (2019). (citováno 1. 11. 2020)
21. Sabri N., Hanna K., Yargeau V.: Chemical oxidation of ibuprofen in the presence of iron species at near neutral pH. *Science of the total environment*, Volumes 427-

- 428, p. 382-389 (2012). (citováno 1. 11. 2020)
22. Caviglioli G., et al.: Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Volume 30, Issue 3, p. 499-509 (2002). (citováno 11. 2. 2021)
 23. Quero-Pastor M. J., et al.: Ozonation of ibuprofen: a degradation and toxicity study. *Science of the Total Environment*, Volumes 466-467, p. 957-964 (2014). (citováno 16. 2. 2021)
 24. Ciríaco L., et al.: Electrochemical degradation of ibuprofen on Ti/Pt/PbO₂ and Si/BDD electrodes. *Electrochimica Acta*, Volume 54, Issue 5, p. 1464-1472 (2009). (citováno 1. 11. 2020)
 25. Ambuludi S. L., et al.: Electro-Fenton degradation of anti-inflammatory drug ibuprofen in hydroorganic medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Volume 702, p. 31-36 (2013). (citováno 1. 11. 2020)
 26. Cho S., Kim Ch., Hwang I.: Electrochemical degradation of ibuprofen using an activated-carbon-based continuous-flow three-dimensional electrode reactor (3DER). *Chemosphere*, Volume 259 (2020) (citováno 1. 11. 2020)
 27. Ambuludi S. L., et al.: Kinetic behavior of anti-inflammatory drug ibuprofen in aqueous medium during its degradation by electrochemical advanced oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 20, Issue 4, p. 2381-2389 (2013). (citováno 16. 2. 2021)
 28. Li X., et al.: Degradation of the anti-inflammatory drug ibuprofen by electro-peroxone process. *Water research*, Volume 63, p. 81-93 (2014). (citováno 16. 2. 2021)
 29. *Český lékopis 2009*, dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>. (citováno 17. 2. 2021)
 30. Sadecka J., et al.: Determination of ibuprofen and naproxen in tablets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Volume 25, Issues 5-6, p. 881-891 (2001). (citováno 16. 2. 2021)
 31. Farrar H., Letzig L., Gill M.: Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *Journal of Chromatography B*, Volume 780, Issue 2, p. 341-348 (2002). (citováno 16. 2. 2021)
 32. Canaparo R., et al.: Determination of Ibuprofen in human plasma by high-

- performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography*, Volume 14, Issue 4, p. 219-226 (2000). (citováno 16. 2. 2021)
33. Adams S. S., et al.: Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, Volume 28, p. 256-257 (1976). (citováno 16. 2. 2021)
34. Bonato P.S., Del Lama M.P., De Carvalho R.: Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 796, Issue 2, p. 413-420 (2003). (citováno 16. 2. 2021)
35. Bruins A.P.: An Overview of electrochemistry combined with mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 70, p. 14-19 (2015). (citováno 11. 2. 2022)
36. Program PSTrace 5, PalmSens. Dostupné z: <http://palmsens.com> (citováno 24.2.2022)
37. Bartosinska E., Kozlík P., Kubíčková A., Křížek T.: The effect of pharmaceutical excipients on electrochemical oxidation of ibuprofen – case study (článek je v procesu schvalování) (citováno 3. 3. 2022)
38. ICH, Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, International Conference on Harmonization, Geneva (2000). Dostupné z: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002823.pdf (citováno 3. 3. 2022)
39. Katedra analytické chemie. Pokročilé praktikum z Analytické chemie. *Návody k praktickým úlohám pro studenty NANALD*, s. 7-9. Univerzita Karlova (2018). (citováno 26. 2. 2022)
40. Lima B.A., et al.: Electrochemical Oxidation of Ibuprofen and Its Voltammetric Determination at a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, Volume 25, Issue 7, p. 1585-1588 (2013). (citováno 15.3.2022)
41. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen#section=Dissociation-Constants> (citováno 15. 3. 2022)

42. Enache T.A, Oliveira-Brett A.M.: Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. *Bioelectrochemistry*, Volume 81, p. 46-52 (2011) (citováno 29. 4. 2022)