

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI IONTOVÝCH KAPALIN PRO SEPARACI  
NEČISTOT IBUPROFENU**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Mgr. Lenka Komůrková

## Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Lenka Komůrková

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D

Název rigorózní práce: **Stacionární fáze na bázi iontových kapalin pro separaci nečistot ibuprofenu**

Rigorózní práce byla zaměřena na stanovení ibuprofenu a jeho lékopisných nečistot B, E, F a J pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analýza byla provedena na kapilární koloně SLB-IL 100 se stacionární fází na bázi iontové kapaliny -1,9-di(3-vinyl-imidazolium)nonan bis(trifluormethyl)sulfonyl imidu.

Ibuprofen byl derivatizován pomocí alkylchloroformiátu (isobutylchloroformiát, ethylchloroformiát, heptafluorochloroformiát) za přítomnosti příslušného alkoholu (isobutanol, ethanol, heptafluorbutan-1-ol). Derivatizační reakce proběhla úspěšně u všech používaných derivatizačních činidel. Avšak nejlepší se jevílo použití ethylchloroformiátu z důvodu nejnižšího zbytku nezderivatizovaného ibuprofenu. Následně byl zkoušeno množství přidaného alkoholu, derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni a vliv rozpouštědla ibuprofenu na derivatizaci a následnou analýzu. Posléze byla vyvinutá metoda aplikovaná na analýzu lékopisných nečistot ibuprofenu v koncentracích 0,1 % pro nečistoty F, B a 0,15 % pro nečistoty E a J. Byly testovány vybrané validační parametry.

**Klíčová slova:** ibuprofen, plynová chromatografie, iontové kapaliny, derivatizace

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Lenka Komůrková

Supervisor: Doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Stationary phase based on ionic liquids for separation of ibuprofen impurities.**

Rigorous thesis was focused on the determination of ibuprofen and its pharmacopoeial impurities B, E, F and J using gas chromatography coupled with mass spectrometry. The analysis was performed on a SLB-IL 100 capillary column with a stationary phase based on ionic liquid – 1,9-di(3-vinylimidazolium)nonane bis(trifluoromethyl) sulfonyl imide. Ibuprofen was derivatized with alkyl chloroformate (isobutyl chloroformate, ethyl chloroformate, heptafluorochloroformate) in the presence of the appropriate alcohol (isobutanol, ethanol, heptafluorobutan-1-ol). The derivatization reaction was successful for all derivatizing agents used. However, the use of ethyl chloroformate appeared to be the best due to the negligible amount of non-derivatized ibuprofen residue. Subsequently, the amount of added alcohol, the derivatization of ibuprofen depending on the retention of the sample in the ultrasonic bath and the influence of the ibuprofen solution on the derivatization and subsequent analysis were investigated. The developed method was applied to the analysis of pharmacopoeial impurities of ibuprofen in concentrations of 0,1 % for impurities F, B and 0,15 % for impurities E and J. Selected validation parameters were tested.

**Key words:** ibuprofen, gas chromatography, ionic liquid, derivatization

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení práce a velkou dávku trpělivosti při připomínkování rigorózní práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>2</b>
2.1	Plynová chromatografie.....	2
2.1.1	Mobilní fáze.....	3
2.1.2	Regulace tlaků a průtoku.....	3
2.1.3	Dávkovací zařízení .....	3
2.1.4	Kolona .....	5
2.1.5	Stacionární fáze .....	6
2.1.6	Detektor .....	8
2.2	Hmotnostní spektrometrie .....	9
2.2.1	Ionizační techniky .....	11
2.2.2	Analyzátory.....	12
2.2.3	Detektor .....	15
2.2.4	Režim skenování SIM vs FULL SCAN .....	15
2.3	Iontové kapaliny .....	16
2.3.1	Složení .....	16
2.3.2	Historie.....	17
2.3.3	Vlastnosti a použití .....	17
2.3.4	Využití iontových kapalin jako stacionární fáze v plynové chromatografii .....	19
2.3.5	Stacionární fáze používaná v experimentální části práce .....	23
2.4	Derivatizace .....	23
2.4.1	Silylace .....	24
2.4.2	Alkylace .....	25
2.4.3	Acylace .....	25
2.5	Derivatizace s alkylchloroformiáty .....	26
2.5.1	Derivatizace karboxylových kyselin alkylchloroformiáty .....	27
2.6	Nesteroidní antiflogistika .....	28
2.6.1	Rozdělení NSAID .....	28
2.6.2	Mechanismus účinku .....	29
2.6.3	Farmakokinetika .....	29

2.6.4	<i>Nežádoucí účinky a interakce</i> .....	29
2.7	<b>Ibuprofen</b> .....	30
2.7.1	<i>Historie ibuprofenu</i> .....	30
2.7.2	<i>Chemická struktura a vlastnosti</i> .....	30
2.7.3	<i>Syntéza ibuprofenu</i> .....	30
2.7.4	<i>Zkouška čistoty ibuprofenu – příbuzné látky</i> .....	32
2.7.5	<i>Současný přístup k analýze nečistoty F</i> .....	33
2.7.6	<i>Popis nečistot ibuprofenu používaných v experimentální části práce</i> .....	35
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>38</b>
4.1	<b>Použité chemikálie, přístroje a metody</b> .....	38
4.1.1	<i>Chemikálie</i> .....	38
4.1.2	<i>Přístroj</i> .....	39
4.1.3	<i>Počítačové programy</i> .....	39
4.1.4	<i>Pomůcky</i> .....	39
4.2	<b>Derivatizační činidla</b> .....	39
4.3	<b>Příprava vzorku</b> .....	41
4.3.1	<i>Porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100</i> 41	
4.3.2	<i>Vliv změny teploty v nástřikovém prostoru na množství nezderivatizovaného ibuprofenu</i> .....	42
4.3.3	<i>Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni</i> .....	42
4.3.4	<i>Vliv množství alkoholu na derivatizaci ibuprofenu ECF</i> .....	42
4.3.5	<i>Vliv rozpouštědla na derivatizace ibuprofenu ECF</i> .....	42
4.3.6	<i>Derivatizace lékopisné směsi k identifikaci píků nečistot ibuprofenu</i> .....	42
4.3.7	<i>Derivatizace nečistot ibuprofenu v koncentraci odpovídající limitu 0,1 % pomocí ECF</i> 43	
4.3.8	<i>Validační parametr – linearita</i> .....	43
4.3.9	<i>Validační parametr – linearita u nečistot - směs ibuprofenu v koncentraci odpovídající 40- 120 % povoleného obsahu nečistot</i> .....	43
4.3.10	<i>Validační parametr – opakovatelnost</i> .....	44
4.3.11	<i>Validační parametr – limit detekce a koantifikace</i> .....	44
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>46</b>

5.1	Porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100 .....	46
5.2	Vliv změny teploty v nástřikovém prostoru na množství nezderivatizovaného ibuprofenu .....	49
5.3	Vlastnosti a fragmenty nečistot ibuprofenu.....	50
5.4	Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni	52
5.5	Vliv množství alkoholu na derivatizaci ibuprofenu ECF .....	53
5.6	Vliv rozpouštědla na derivatizaci ibuprofenu ethylchloroformiátem .....	53
5.7	Linearita odezvy ibuprofenu v závislosti na koncentraci a nástřiku vzorku	54
5.8	Derivatizace lékopisné směsi k identifikaci píků nečistot ibuprofenu .....	56
5.9	Derivatizace nečistot ibuprofenu v koncentraci odpovídající limitu 0,1 % pomocí ECF.....	59
5.10	Vybrané validační parametry .....	61
5.10.1	<i>Linearita</i> .....	61
5.10.2	<i>Opakovatelnost</i> .....	62
5.10.3	<i>Správnost metody</i> .....	63
5.10.4	<i>Limit detekce a kvantifikace</i> .....	63
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek</b> .....	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Citovaná literatura</b> .....	<b>70</b>



# 1 Úvod

Rigorózní práce je zaměřena na použití iontové kapaliny jako stacionární fáze v plynové chromatografii pro separaci nečistot ibuprofenu.

Chromatografie je fyzikální separační metoda, jejíž principem je rozdílná distribuce analytu mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází.

Plynová chromatografie používá jako mobilní fázi plyn. Je vhodná především pro analýzu těkavých látek. V případech, kdy látka není dostatečně těkavá, má špatnou tepelnou stabilitu, je hůře detekovatelná na určitém typu detektoru, lze upravit strukturu původní látky pomocí chemické reakce – derivatizace. Derivatizovaná látka má lepší fyzikálně - chemické vlastností (např. vyšší těkavost, stabilitu, atd.).

Iontové kapaliny (IL) jsou kapaliny složené z organického kationtu a organického nebo anorganického aniontu. Mají vysoké uplatnění v oborech chemie, biologie či bioinženýrství z důvodu jejich vlastností – vysoká vodivost, chemická a tepelná stabilita či nehořlavost. Dále se IL díky svým vlastnostem jako je vysoká viskozita, možnost změny selektivity (obměna kombinace kationtů a aniontů) a vysoká tepelná stabilita, používají jako stacionární fáze v plynové chromatografii.

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií je dnes již rutinní analytická metoda, při které je vzorek ionizován v plynné fázi a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ).

Teoretická část rigorózní práce se zabývá plynovou chromatografií, iontovými kapalinami, hmotnostní spektrometrií, derivatizací, nesteroidními antiflogistiky a problematikou stanovení lékopisných nečistot ibuprofenu.

Experimentální část práce se věnuje optimalizaci podmínek pro separaci nečistot ibuprofenu na iontových kapalinách jako stacionární fázi.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Plynová chromatografie

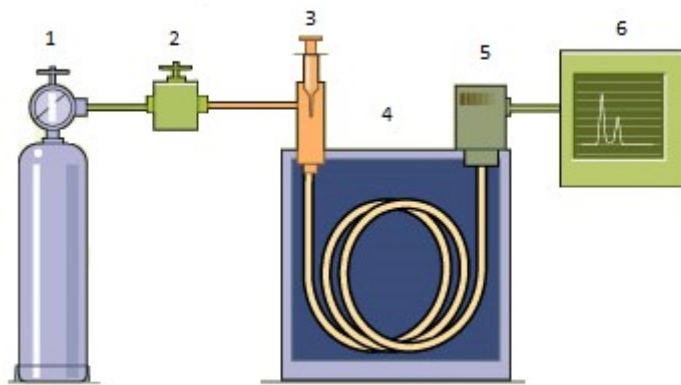
Plynová chromatografie – Gas Chromatography (GC) patří mezi unikátní a všestrannou separační techniku. Používá se pro analýzu těkavých látek, které jsou za zvýšené teploty převedeny na páry, aniž by došlo k jejich rozkladu. Jestliže vzorek není těkavý, lze ho převést vhodnou chemickou reakcí s derivatizačními činidly na těkavější deriváty. (1)

Plynová chromatografie se používá v různých oblastech. Níže jsou uvedeny některé příklady:

1. Environmentální analýza – analýza organických látek znečišťujících vzduch, vodu a odpadní vody.
2. Ropný průmysl – GC zde slouží k separaci a identifikaci komponent ropy
3. Klinické studie – klinické, farmaceutické a forenzní laboratoře analyzují léky z moči, krve a jiných biologických tekutin.
4. Potravinářský průmysl – stanovení konzervačních látek, antioxidantů, příměsí. (2)

Při plynové chromatografii se vzorek, který může být plynný nebo kapalný, vstříkne do injektoru, kde dojde případně k jeho zplynění a dále je unášen mobilní fází kolonou, kde se složky vzorku oddělují na základě jejich schopnosti distribuovat se mezi mobilní a stacionární fázi.

Obrázek 1 znázorňuje plynový chromatograf, který se skládá z těchto částí: zásobník mobilní fáze, regulátor tlaku a průtoku, dávkovací zařízení (injektor), termostat, chromatografická kolona, detektor, PC s příslušným chromatografickým softwarem pro ovládání chromatografu a vyhodnocení jednotlivých chromatogramů. (3)



*Obrázek 1 Plynový chromatogram (převzato a upraveno (3))*

*1 - zdroj nosného plynu, 2- regulace průtoku a tlaku, 3 - injektor - nástřik vzorku,  
4 - kolona v termostatu, 5 - detektor, 6 - zpracování výsledků PC*

#### 2.1.1 Mobilní fáze

Nejběžnější mobilní fáze pro GC jsou helium (He), vodík (H) a dusík (N<sub>2</sub>). Tyto plyny jsou chemicky inertní vůči vzorku i stacionární fázi. Výběr nosného plynu je určován typem detektoru přístroje. Průtok u náplňových kolonou je obvykle v rozmezí 25-150 ml /min, zatímco v kapilárních kolonách je průtok 1-25 ml/min. (2)(4)

#### 2.1.2 Regulace tlaků a průtoku

Nedílnou součástí plynového chromatografu je regulátor tlaku plynu. Ten umožňuje stálý průtok nosného plynu kolonou a detektorem, bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak je potom proměnnou veličinou. Je nastaven tak, aby byl průtok nosného plynu konstantní. (4)

#### 2.1.3 Dávkovací zařízení

Injektor (Obrázek 2) je místo, kde je aplikován vzorek do proudu mobilní fáze. Vzorek je vstřikován přes septum autosamplerem nebo ručně. Součástí injektoru je skleněná vložka (liner). Teplota musí dosahovat alespoň o 50 °C víc, než je teplota varu analyzované látky. (2)(5)

Kapilární kolony mají určité omezení, a to v množství vstřikovaného vzorku na kolonu. Je to dáno tím, že kapilární kolony lehce dosahují přetížení, které se projeví například neoddělením píků dvou analyzovaných látek, které mají blízký retenční čas. Přetížení

můžeme předejít například dostatečným naředěním vzorku nebo efektivnější metodou, a to zvýšením splitovacího poměru ve split/splitless injektoru. Tento injektor je řízen softwarově. Před analýzou se nastaví split ratio (poměr toku splitovacím ventilem a kolonou). Doporučené splitovací poměry dle průměru kapilární kolony jsou uvedeny v Tabulce 1. (6)

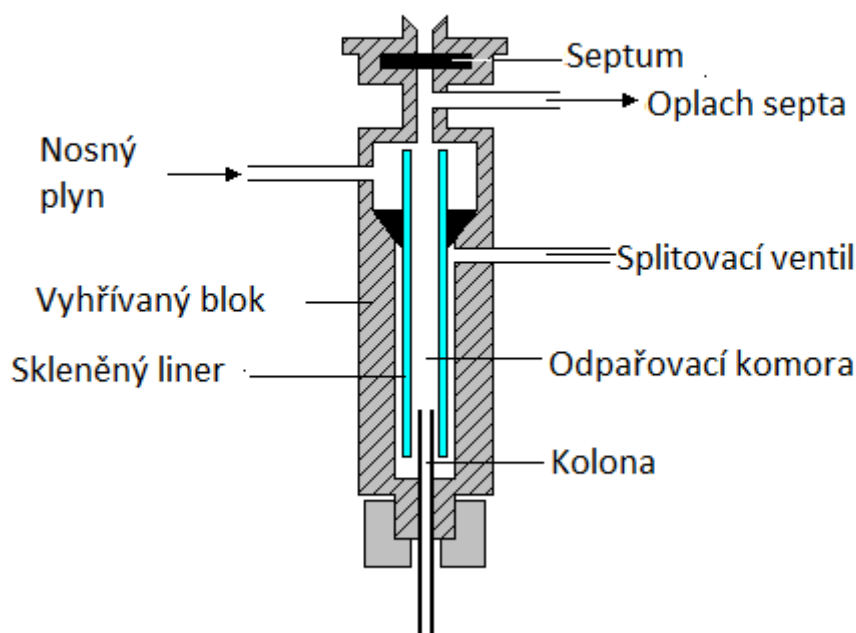
Vnitřní průměr kolony (mm)	Nejnižší split ratio
0,1	1:50 - 1:75
0,18-0,25	1:10 - 1:20
0,32	1:8 - 1:15
0,53	1:2 - 1:5

*Tabulka 1 Splitovací poměry dle průměru kapilární kolony (6)*

Vzorek může být nastříknut pomocí tří technik:

- a) Split – technika pro vstřikování vzorku na kolonu, kde pouze malé množství vzorku je následně separováno na koloně (0,1-1 % vzorku se analyzuje, zbytek vzorku je pomocí splitovacího ventilu odvedeno do odpadu). Nevýhodou této metody je diskriminační efekt (některé složky vzorku, s vysokou molekulovou hmotností, mají rozdílnou těkavost). Z tohoto důvodu se pro kvantifikaci doporučuje používat metodu vnitřního standardu nebo standardního přídatku.
- b) Splitless – technika, při které celý dávkovaný objem vzorku je zaveden stříkačkou přes septum do lineru. Objem par vzorku/rozpouštědla po jeho odpaření nesmí překročit 50 % objemu lineru, z důvodu nebezpečí vzniku tzv. „backflash“ (únik vzorku mimo liner a nebezpečí kontaminace dalšího vzorku). V momentě dávkování je uzavřen dělič toku a celý vzorek je unášen nosným plynem do kolony. Používá se u stopové analýzy nebo při analýze směsí látek, které mají výrazně odlišný bod varu.
- c) On column injection – přímé vstříknutí tepelně nestabilního vzorku na kapilární kolonu (2)(5)

## SPLIT/ SPLITLESS INJEKTOR



Obrázek 2 Injektor ((převzato a upraveno (7))

### 2.1.4 Kolona

Chromatografická kolona je místem, kde probíhá separace analytu mezi stacionární a mobilní fází. Aby bylo dosaženo dobré separace analytu, je kolona uložena v termostatu. Při isotermické metodě je v koloně udržovaná konstantní teplota, která je obvykle nastavena podle očekávané nejnižší teploty varu rozpuštěné látky. Nevýhodou isotermické metody je skutečnost, že teplota, která upřednostňuje separaci rozpuštěných látek s nízkou teplotou varu, může způsobit nepříjemně dlouhé retenční časy pro rozpuštěné látky s vyšší teplotou varu. Další možnou teplotní metodou je gradientová metoda, při níž se teplota po dobu separace mění. (2)

V plynové chromatografii rozeznáváme základní dva druhy kolon kapilární a náplňová.

#### 1. Náplňová kolona

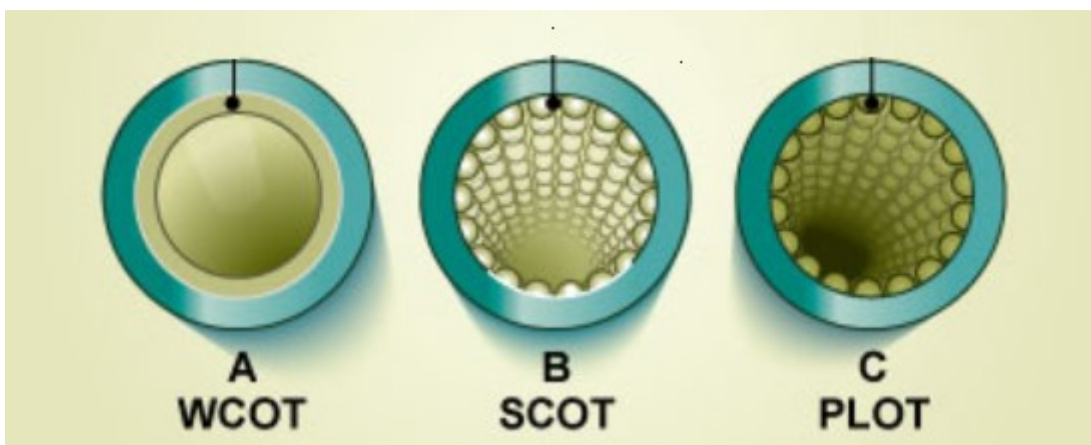
Náplňová kolona je vyrobena ze skla nebo z nerezové oceli. Její délka je obvykle 2-6 m, vnitřní průměr 2-4 mm. Průměrná velikost částic 37-44  $\mu\text{m}$  až 250-354  $\mu\text{m}$ . Kolona je naplněna buď nosičem se zakotvenou kapalnou fází (GLC) nebo absorbentem (GSC). Náplňové kolony jsou již nahrazovány kapilárními kolonami, které mají vyšší účinnost. (2)(8)(9)

## 2. Kapilární kolona

Kapilární kolony mají mnohem menší průměr oproti náplňovým kolonám a to 0,1–0,53 mm. Délka kolony může být až 100 m. Kolony jsou obvykle křemenné potažené ochranným polymerem (polyimidem) z důvodu vyšší pevnosti a pružnosti. (2)(8)(9)

Kapilární kolony dělíme na tyto typy (Obrázek 3):

1. WCOT wall-coated open tubular - Nejběžnější typ kolony. Obsahuje tenkou vrstvu kapalné stacionární fáze, která je uvnitř kolony.
2. SCOT support-coated open tubular - Obsahuje nosič potažený tenkou vrstvou kapalné stacionární fáze. V porovnání s WCOT má vyšší kapacitu, ale nižší efektivitu.
3. PLOT porous layer open tubular - Je obdoba SCOT. Absorbent je zachycen na vnitřní straně kapiláry. (10)



Obrázek 3 Typy kapilárních kolon (převzato a upraveno (3))

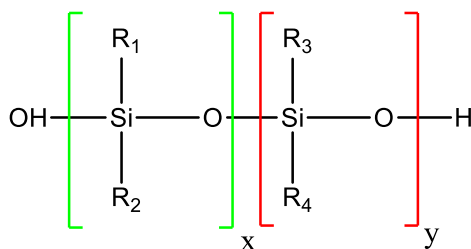
### 2.1.5 Stacionární fáze

Stacionární fáze (SF) by měla být chemicky inertní, teplotně stabilní, s nízkou tenzí par. Nízká tenze par zabraňuje „krvácení“ kolony (degradace SF a její únik z kolony) při analýze za vyšších teplot. Dále je důležitá přítomnost polárních/nepolárních skupin. Platí, že nepolární látky se snadněji separují na nepolární SF a polární látky na polární SF. U kapilárních kolon se v současné době používají nejčastěji tři druhy SF: polysiloxany, polyethylenglykoly a iontové kapaliny. (2)

## 1) Polysiloxanové SF

Základní jednotkou je methylsiloxanová jednotka s různým stupněm polymerace. Základní struktura polysiloxanové SF je na Obrázku 4. Polysiloxanové SF jsou teplotně odolné a snadno se do jejich struktury zavádějí polárnější skupiny (fenyl, vinyl, kyanopropyl atp.). Mají široké rozmezí použití od velmi nepolárních až po velmi polární SF. U nepolárních SF je separace založena především na velikosti molekul analytu a jejich tvaru. Používají se pro separaci neutrálních až slabě kyselých léčiv. Středně polární fáze se používají k separaci látek s několika - OH skupinami (např. steroidy). (11)

V porovnání s iontovými kapalinami je jejich nevýhodou aktivní hydroxylová skupina (-OH), která způsobuje tzv. „back - biting“ reakce (intramolekulární reakce koncových skupin) v přítomnosti kyslíku a vlhkosti. Dále dochází k degradaci SF a „krvácení“. (12)

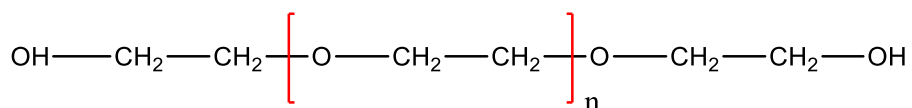


Obrázek 4 Polysiloxanová SF (12)

## 2) Polyethylenglykolové SF

Polyethylenglykolové SF mají použití hlavně jako polární fáze pro analýzu silně bazických součenin. (11)

Základní struktura polyethylenglykolové SF je na Obrázku 5. Problematika koncových hydroxylových skupin je stejná jako u polysiloxanových SF. Další nevýhodou oproti IL je jejich teplotní stabilita do 230 °C. (12)



Obrázek 5 Polyethylenglykolová SF (12)

### 3) Iontové kapaliny SF

Iontové kapaliny jako stacionární fáze jsou popsány v samostatné kapitole 2.3.4

#### 2.1.6 Detektor

Poslední částí plynového chromatografu je detektor. Detektor zaznamenává signál, který odpovídá fyzikálním nebo chemickým vlastnostem analyzované látky separované na chromatografické koloně. Výsledkem je chromatogram, který ukazuje velikost signálu v závislosti na čase. Ideální detektor má několik důležitých vlastností, a to nízký detekční limit, lineární odezvu na širokou škálu koncentrací rozpuštěných látek, citlivost, selektivitu a rychlou odezvu. (2)(13)

V plynové chromatografii se používá několik typů detektorů:

1. Tepelně vodivostní detektor (TCD – Thermal conductivity detector)

TCD je univerzální detektor, jehož principem je porovnání tepelné vodivosti analytu s nosným plynem. Slouží k analýze anorganických plynů a malých molekul uhlovodíku. TCD neničí vzorek, ale může vykazovat nižší citlivost v porovnání s jinými detektory. (14)(15)

2. Hmotnostní spektrometr (MSD – Mass selective detector)

Principem metody je ionizace látky v ionizační komoře. Vzniklé ionty jsou dále separovány a detekovány na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Každá látka má charakteristickou fragmentaci na menší ionty a proto lze tuto metodu použít k identifikaci určité látky. Při identifikaci neznámé látky ve vzorku mohou pomoci knihovny hmotnostních spekter. (2)(16)

3. Detektor elektronového záchyty (ECD – Electron capture detector)

Je příkladem selektivního detektoru. Principem je ionizace mobilní fáze (obvykle  $N_2$ )  $\beta$  zářením (zdrojem  $^{63}Ni$ ). Vzniklé elektrony vedou elektrický proud mezi dvěma elektrodami. Pokud se ve vzorku objeví analyt s elektronegativní funkční skupinou (halogen, nitroskupina) dochází k vychytávání elektronů a tím snížení proudu (signál na detektoru). (2)



#### 4. Plamenoionizační detektor (FID – Flame ionization detector)

Principem metody je spalování organických sloučenin v kyslíko-vodíkovém plameni a vznik iontů, které jsou nadále detekovány. FID je selektivní, destruktivní detektor organických sloučenin. (2)

## 2.2 Hmotnostní spektrometrie

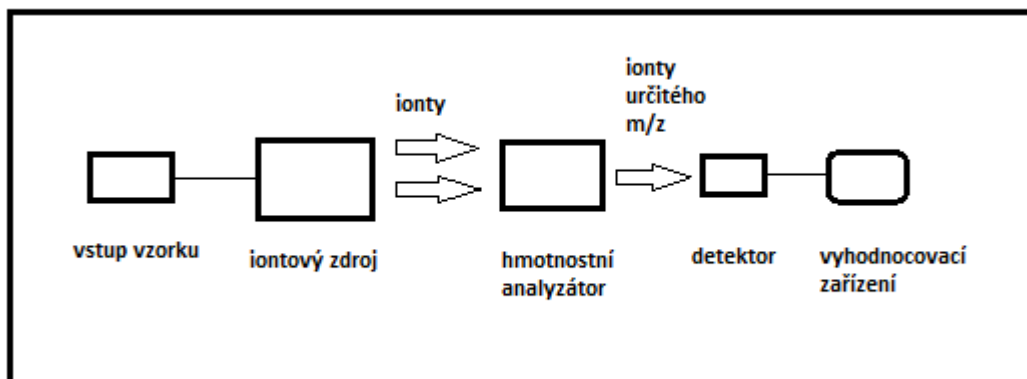
Hmotnostní spektrometrie je analytická separační metoda, při které je vzorek převeden na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). (4)

Velmi významným průkopníkem této metody byl nositel Nobelovy ceny J.J. Thomson, který v letech 1912-1913 studoval hmotnostní spektra atmosférických plynů a dokázal existenci izotopu  $^{22}\text{Ne}$  ve vzorku s  $^{20}\text{Ne}$ . Dalšími významnými osobnostmi, které získali Nobelovu cenu ve spojení s MS jsou F.W. Aston, W. Paul či J.B.Fenn a K. Tanaka. (17)

V dnešní době patří hmotnostní spektrometrie k nepostradatelné metodě, která se používá ve farmaceutickém průmyslu ve všech fázích vývoje léčiva – objevení účinné látky, zjištění struktury, syntéze, farmakokinetice, farmakodynamice a metabolismu léčiva. V klinické praxi se používá hmotnostní spektrometrie takřka denně při testování tělních tekutin, ve kterých jsou obsaženy hledané komponenty v různé koncentraci tzv. markery. Markery nám mohou signalizovat například onemocnění rakovinou. Při léčbě rakoviny se dále může sledovat obsah markerů v tělní tekutině v závislosti na dávce léku tzv. jestli je léčba dostatečná či nikoliv. Další oblastí, ve které se MS používá, je životní prostředí. Pomocí MS se sleduje kvalita vody a vzduchu. V neposlední řadě se MS používá v biotechnologii k identifikaci proteinů, lipidů či polysacharidů. (17)

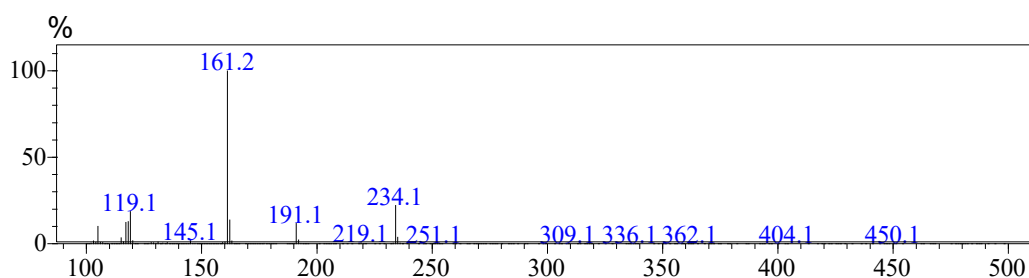
Hmotnostní spektrometr se skládá z několika částí (Obrázek 6)

- 1) systém vstupu vzorku
- 2) iontový zdroj (vznik iontů)
- 3) hmotnostní analyzátor (separace iontů na základě  $m/z$ )
- 4) iontový detektor
- 5) vakuový systém (prevence ztráty iontů zapříčiněných kolizí s neutrálními molekulami plynu)
- 6) počítač (generování dat, kontrola systému) (18)



Obrázek 6 Základní části hmotnostního spektrometru (4)

Analyt může být ve formě kapaliny, pevné látky nebo plynu, ale do iontového zdroje vstupuje v plynné formě. Vzorek může být zaveden do iontového zdroje přímo nebo do iontového zdroje ústí výstup z kolony plynového chromatografu. V tomto případě dochází k analýze již separovaných složek vzorku. V iontovém zdroji jsou neutrální molekuly vzorku ionizovány (vznikají nabitě částice). Vzniklé ionty jsou dále transportovány do analyzátoru, kde jsou separovány na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Poté jsou detekovány na detektoru a signál je zaznamenán a zpracován v datovém systému (PC). Výstupem je hmotnostní spektrum (Obrázek 7) – horizontální osa hmotnostního spektra je označena  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost iontu a  $z$  je počet nábojů iontu. Obecně platí, že ionizační metody používané v GC/MS produkují ionty s jednotkovým nábojem tj.  $Z=1$  a proto lze  $m/z$  považovat za hmotnost iontů. Svislá osa hmotnostního spektra nám ukazuje intenzitu signálu. Nejvyšší iont ve spektru je nazýván “base peak“, jehož intenzita je považována za 100 %. Tento iont představuje nejstabilnější iont, který je důležitý pro identifikaci sloučeniny. Dále se můžeme setkat s pojmem molekulový iont. To je iont, který vzniká z molekuly ztrátou jednoho elektronu. Base peak může odpovídat molekulovému iontu. Dále na hmotnostním spektru můžeme najít tzv. fragmentované ionty, které vznikají rozpadem molekulových iontů v iontovém zdroji. Rozložení iontových fragmentů odráží chemickou strukturu sloučenin. (17)(19)(20)



Obrázek 7 Příklad hmotnostního spektra derivatizovaného ibuprofenu z experimentální části práce (osa x-m/z, osa y-intenzita signálu)

### 2.2.1 Ionizační techniky

Hmotnost atomu je většinou připisována jádru, které je složeno z protonů a neutronů. Celkový počet protonů a neutronů se nazývá nukleonové číslo. Počet protonů se nazývá protonové číslo a charakterizuje chemické vlastnosti prvku. Atomy stejného chemického prvku, které se liší nukleonovým číslem nazýváme izotopy. Například uhlík má dva izotopy:  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ . Oba mají stejné chemické vlastnosti, protože mají stejné protonové číslo, ale hmotnost uhlíku  $^{13}\text{C}$  je větší než  $^{12}\text{C}$  z důvodu jednoho neutronu navíc. Pro vyjádření hmotnosti atomu nebo molekul používáme jednotku atomové hmotnosti (u). Tato jednotka je definována jako 1/12 hmotnosti atomu izotopu  $^{12}\text{C}$ . Hmotnostní spektrometry rozlišují atomovou hmotnost až na 6 desetinných míst. Tato přesnost umožňuje zjistit elementární složení iontu. (19)(20)

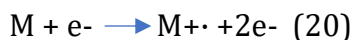
Ionizace produkuje pozitivně nebo negativně nabitě ionty (atomy, molekuly nebo fragmenty). Podle množství dodané energie se ionizační techniky dělí na měkké (menší pravděpodobnost fragmentace) a tvrdé. Výběr ionizační techniky závisí na stanoveném účelu měření. Například pokud je naším cílem zjistit molekulovou hmotnost látky, volíme měkkou ionizační techniku. Pokud potřebujeme určit strukturu molekuly, volíme tvrdou ionizační techniku, při které vznikají fragmenty primárního iontu. Tyto fragmenty jsou pro každou sloučeninu charakteristické. Grafickým zobrazením rozdělení iontů je poté hmotnostní spektrum. Z hmotnostního spektra můžeme získat informace o molekulové hmotnosti a molekulové struktuře a tím identifikovat i neznáme vzorky. (19)(20)

Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii jsou: elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). (18)(19)

## 1) Elektronová ionizace (EI)

EI ionizace je nejstarší a nejprozkoumanější ionizační metoda. Také patří mezi nejčastěji používanou metodu v GC/MS. Řadíme ji k tvrdým technikám, při kterých vznikají fragmenty molekuly, které jsou důležité pro identifikaci vzorku sloučeniny z hmotnostního spektra. (19)

Principem metody je interakce analyzované látky s proudem elektronů za vzniku radikál-kationtu ( $M^+$ ). (19)



Zdrojem elektronů je rheniové nebo wolframové rozžhavené vlákno. V EI se používají elektrony s energií 70 eV Tyto elektrony mají dostatek energie, aby došlo k ionizaci sloučenin a vznikly z nich fragmenty. Například pro methan je molekulární iont  $CH_4^+$ . Pokud se odštěpí vodíkový radikál vzniká fragment  $CH_3^+$ . Pravděpodobnost vytvoření každého iontu je konstantní a tím lze získat reprodukovatelné spektrum, pokud se zachovají stejné analytické podmínky. Mluvíme o takzvaném otisku prstu (tzv. „fingerprinting“). (19)(21)

Pro zjednodušení práce se dnes používají knihovny hmotnostních spekter, se kterými můžete porovnat hmotností spektra analyzované látky (spektra jsou měřena při energii 70 eV, proto je doporučeno při analýze používat také napětí 70 eV). (19)

V experimentální části této práce byl použit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací.

## 2) Chemická ionizace (CI)

Chemická ionizace patří mezi měkké techniky, při kterých se používají reakční plyny například methan, isobutan nebo amoniak. V CI se používá ionizovaný reakční plyn, který interaguje s analytem. Dochází k přenášení protonu na analyt a vznikají molekuly  $[M+H]^+$ . Při této metodě dochází k menší fragmentaci analytu, a proto je tato technika vhodná ke kvantitativní analýze. (18)(21)

### 2.2.2 Analyzátoři

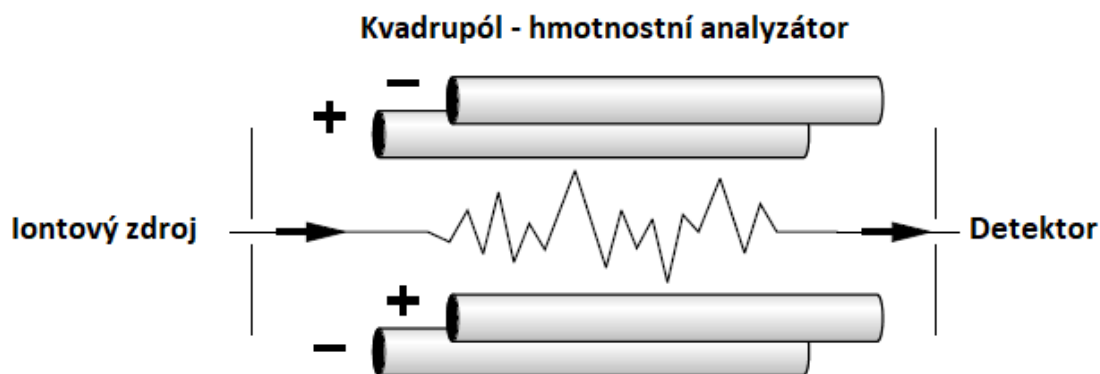
Poté, co je vzorek ionizován v iontovém zdroji, ionty jsou pomocí iontové optiky přivedeny do hmotnostního analyzátoru, který je rozdělí podle poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Separace iontů je umožněna na základě jejich odlišného chování v magnetickém poli, elektrickém poli nebo rozdílné rychlosti letu. Analyzátoři se dají rozdělit na základě schopnosti separace iontů s blízkých hodnot  $m/z$

na analyzátory s nízkým a vysokým rozlišením. Mezi analyzátory s nízkou rozlišovací schopností patří: kvadrupól a iontová past. Analyzátory s vysokým rozlišením jsou analyzátory s dobou letu (TOF), orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. (4)(22)

V experimentální části této práce byl použit hmotnostní spektrometr s kvadrupólem.

#### Kvadrupól (QP)

Nejběžnějším hmotnostním analyzátozem je kvadrupól (QP). QP se skládá ze čtyř tyčí o délce cca 20 cm, které jsou paralelní. Zarovnání tyčí musí být přesné, aby došlo k vytvoření symetrického elektrického pole, které je potřebné k oddělení iontů s různými poměry hodnot  $m/z$ . Na každou z tyčí kvadrupólu je aplikováno napětí, přitom na dvou protilehlých tyčích je aplikováno kladné stejnosměrné napětí a na další dvě tyče stejnosměrné záporné napětí (Obrázek 8). Na všechny tyče je dále superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty, které jsou přivedeny do QP začnou oscilovat. Pouze ionty s určitou hodnotou  $m/z$  mají stabilní oscilaci a mohou projít analyzátozem a jsou detekovány detektorem. Ostatní ionty mají nestabilní oscilace. (18)(19)



*Obrázek 8 Hmotnostní analyzátoz - kvadrupól (převzato a upraveno)(23)*

Dále se můžeme setkat s pojmem trojitý kvadrupól. Jedná se o tři kvadrupóly řazené za sebou, přitom prostřední kvadrupól funguje jako kolizní cela. V tomto kvadrupólu se dále nachází kolizní plyn, (např. argon), který napomáhá fragmentaci molekuly. Získané fragmenty jsou v posledním kvadrupólu separovány dle jejich poměru  $m/z$ . Tento typ analyzátozu se používá převážně v kvantitativní analýze. (18)(22)

### Sférická iontová past (Ion Trap IT)

Tvoří ji středová a dvě koncové elektrody, na které je vložen poměr stejnosměrného a střídavého napětí, díky kterému jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Změnou poměru jsou dále dle jejich  $m/z$  vypuzovány na detektor. (22)

### Lineární iontová past (LIT)

Lineární iontová past je nástupcem iontové pasti. Tvoří ji v podstatě kvadrupól na jehož koncích jsou vloženy elektrody s určitým potenciálem, který umožňuje uchovávání iontů. Ionty mohou být vypuzovány radiálně nebo axiálně. Ve srovnání s iontovou pastí má vyšší kapacitu a vyšší účinnost detekce iontů. (22)(24)

### Analyzátor doby letu (TOF)

Ionty jsou pulzně urychleny a letí trubicí analyzátoru. Ionty s menší hodnotou  $m/z$  při vložení stejné kinetické energie se pohybují rychleji, a proto se dostanou na detektor jako první. TOF neumožňuje fragmentaci iontu, a proto bývá časté spojení s kvadrupólem za vzniku hybridního Q-TOF. (22)

### Orbitrap

Je nejnovější typ hmotnostního analyzátoru. Je složen z dvou elektrod – vnější a středové, na které je vloženo napětí. Ionty oscilují okolo středové elektrody a jejich oscilace je zaznamenána. Hmotnostní spektrum je získáno po Fourierově transformaci signálu. (22)(24)

### Iontová cyklotronová rezonance s využitím Fourierovy transformace (FT-ICR)

Princip FT-ICR je založen na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli. ICR cela se nachází v homogenním supravodivém magnetu s vysokým statickým magnetickým polem. Dochází zde k záchytu iontových oblaků pomocí vnějšího magnetického pole. Pokud se ion dostane do magnetického pole, začne se pohybovat epicykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí. Každá hodnota  $m/z$  má charakteristickou cyklotronovou frekvenci. Krátké vložení střídavého proudu způsobí simultánní excitaci všech iontů v cele. Pomocí Fourierovy transformace se přepočtou cyklotronové frekvence do stupnice  $m/z$  a tím se získá hmotnostní spektrum. (24)(25)

### 2.2.3 Detektor

Detektor je zařízení, které detekuje ionty separované hmotnostním analyzátozem. Dochází zde k převádění proudu dopadajících iontů na proud elektronů.

#### Faradayova klec

Jednoduchý detektor tvořený dynodou s povrchem z BeO nebo GaP. Pokud ion dopadne na dynodu, způsobí vyražení elektronu z povrchu. Elektron dále dopadá na anodu. Vzniklý elektrický proud je dále zesílen zesilovačem.

#### Elektronový násobič

Konverzní dynoda umožňuje konvertovat ionty na sekundární elektrony a ty dále emitují další elektrony. Elektrody zde zesilují elektronový proud 104 až 108krát.

#### Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem

Konverzní dynoda umožňuje konvertovat ionty na sekundární elektrony a ty dále interagují s fosforem (fosforescenční stínítko) a emitují fotony. Tento signál je zesílen ve fotonásobiči. (4)(26)

### 2.2.4 Režim skenování SIM vs FULL SCAN

Při analýze neznámého vzorku je primárně volen režim FULL SCAN. Při tomto režimu je skenován vybraný hmotnostní rozsah  $m/z$ .

Režim SIM (selected ion monitoring) umožňuje detekci specifických iontů se zvýšenou citlivostí (10 - 100x). Obvykle se volí 1-4 hodnoty  $m/z$ , které jsou charakteristické pro sledovanou sloučeninu v očekávaném retenčním čase. Tato metoda je vhodná, pokud známe strukturu analyzované látky, při stopové a kvantitativní analýze. (27)(24)

U experimentální části byly používány oba režimy skenování. Vzorek byl nejprve měřen v režimu FULL SCAN a následně byly získány hodnoty  $m/z$  pro měření v režimu SIM.

## 2.3 Iontové kapaliny

Iontové kapaliny (IL) jsou pozoruhodné chemické sloučeniny jejichž vývoj jde stále kupředu. Jsou používány v mnoha oblastech moderní vědy. Díky svým výjimečným vlastnostem se staly důležité v oblastech – syntézy, katalýzy, extrakce, elektrochemie, analytiky a biotechnologie. (28)

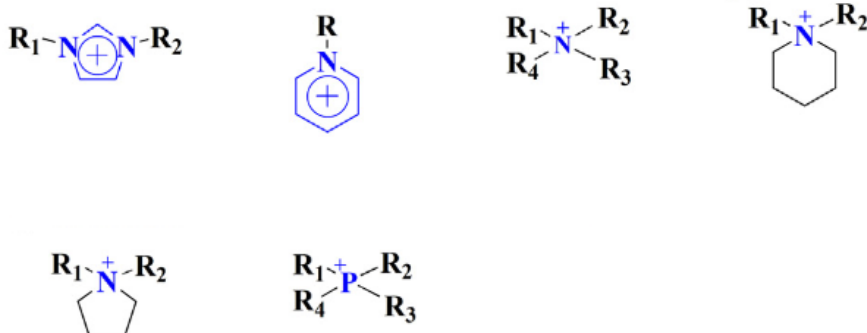
V oblasti chemie jsou IL používána jako unikátní a neobvyklá rozpouštědla. Rozpouštějí organické i anorganické látky. IL mohou poskytnout některé vlastnosti, které nemají klasická rozpouštědla např. – vysokou vodivost, vysokou chemickou a tepelnou stabilitu v širokém teplotním rozmezí, nehořlavost a nízkou tenzi par. (29)(30)

### 2.3.1 Složení

Iontové kapaliny se skládají z organického kationtu a organického nebo anorganického aniontu (Obrázek 9, Obrázek 10). Dle typu kationtu se obvykle dělí na imidazoliové, pyridiniové, pyrrolidiniové, alkylamoniové, alkylsulfoniové a alkylfosfoniové soli.

IL mají bod tání pod 100 °C. Některé jsou dokonce kapalné i při běžné pokojové teplotě RTILs (room temperature ionic liquids). Kapalnost iontových kapalin je způsobena objemnými ionty, jejichž náboj je delokalizován. (31)(32)(33)

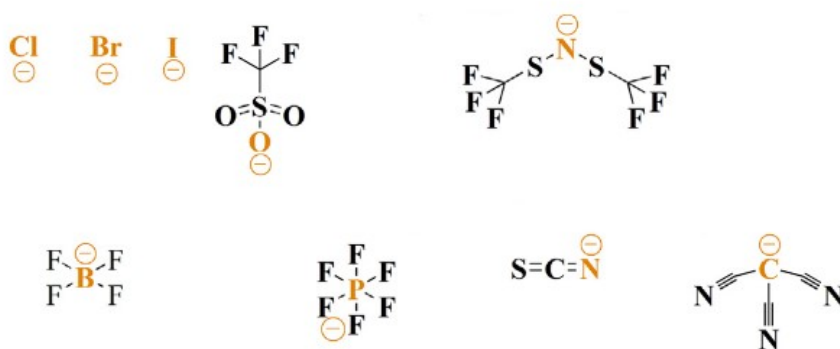
#### Bežné kationty



Obrázek 9 Běžně používané kationty v iontových kapalinách (převzato a upraveno(34))



### Bežné anionty



Obrázek 10 Běžně používané anionty v iontových kapalinách (převzato a upraveno(34))

#### 2.3.2 Historie

První nízkotající iontovou kapalinu připravil v roce 1914 Walden. Jednalo se o ethylammonium nitrát (EAN), s bodem tání 12 °C. EAN byla látka vodivá, bezbarvá, bez zápachu a viskózní. (33)(35)(36)

V roce 1951 Hurley a Wier zkoušeli vlastnosti iontových kapalin vzniklých reakcí alkylpyridinium chloridu s chloridem hlinitým. Tyto IL se vyznačovaly nedostatečnou stabilitou ve vlhkém a vzdušném prostředí. (36)

Dalším mezníkem ve vývoji IL je rok 1992. Wilkes a Zaworotka vytvořili IL na bázi imidazolu a tetrafluoroborátu, které byly stabilní ve vzdušném i vlhkém prostředí a kapalné při pokojové teplotě. (36)

V současné době se výzkum IL stává multidisciplinární. Zájem je o ně v oblastech chemie, fyziky, biologie či inženýrství. (36)

#### 2.3.3 Vlastnosti a použití

Vlastnosti iontových kapalin se odvíjí od jejich struktury. Za velmi důležité považujeme vlastnosti jako je teplota tání, termostabilita, viskozita a vodivost. Pro vysokou tepelnou stabilitu a mnohočetné interakce jsou používány jako stacionární fáze pro plynovou chromatografii, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, kapilární elektrochromatografii či kapilární elektroforézu. (33)(37)(38)

## Teplota tání

Hlavními faktory ovlivňující bod tání jsou delokalizace náboje, schopnost vodíkové vazby a symetrie kationtu. Při porovnání bodu tání IL s anorganickými solemi (např. NaCl 803 °C a 60 °C u 1-propyl-3-methylimidazoliumchloridu) je zřejmé, že snížení teploty tání je způsobené nahrazením malých anorganických kationtů objemnými asymetrickými organickými kationty. Bod tání u některých iontových kapalin je nejistý, protože podléhají podchlazení, tzn. jsou kapalné i za nižší teploty, než je jejich teplota tání. Obecně platí, že s rostoucí délkou alkylového řetězce obvykle dochází ke snížení teploty tání. (33)

## Termostabilita a rozpustnost

Termostabilita je závislá na velikosti aniontu. S rostoucí velikostí aniontu roste i termostabilita. Platí zde toto pořadí:  $N(CF_3SO_2)_2 > PF_6 \sim BF_4 > Cl$ . Tepelnou stabilitu lze zvýšit alkylovou substitucí. Nicméně Awad a kol. prokázali, že pouze lineární alkylové řetězce zvyšují tepelnou stabilitu, zatímco sekundární a terciální alkylová substituce může ve skutečnosti celkovou tepelnou stabilitu snížit. (37) (38)

Podobné pořadí IL platí i pro rozpustnost iontových kapalin. Imidazolium hexafluorofosfáty a bis(trifluormethylsulfonyl)imidy jsou nemísitelné s vodou, zatímco halogenidy, acetáty, nitráty a trifluoracetáty s vodou mísitelné jsou. Dále ovlivňuje rozpustnost délka alkylových řetězců kationtu. Některé IL (např. chloroalumináty) pokud jsou ve styku s vodou hydrolyzují, a musí být, proto skladovány tak, aby byla vyloučena vzdušná vlhkost. (31)

## Viskozita

Viskozita IL je opět závislá na složení a pohybuje se rozmezí 35-500 mPa. Vysokou viskozitu mají hlavně hexafluorofosfáty, perfluoralkansulfonáty a perfluoralkanoáty. Vysoká viskozita IL je srovnatelná s běžnými organickými rozpouštědly a může být jednou z nevýhod, která se objeví při jejich použití. Například při operacích jako je rozpouštění tuhých látek, míchání a filtrace.

Viskozita IL coby stacionární fáze ovlivňuje celkovou efektivitu separace a životnost kolony. Ideální stacionární fáze pro plynovou chromatografii by měla mít vysokou viskozitu, která se výrazně nemění se změnami teplot. Viskozita IL je dána převážně vodíkovou vazbou a van der Waalsovými interakcemi mezi kationtem a aniontem. Nejvyšší viskozitu vykazují IL se silně koordinovanými anionty a to Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> a I<sup>-</sup>. Naopak

velké anionty, jako je například bis(trifluormethylsulfonyl)imid a trifluormethansulfonát, ve kterých je náboj rozptýlen, mají nižší viskozitu. (32)(39)(40)

### **Vodivost**

Vodivost iontových kapalin je využívána v oblasti elektrochemie. Přitom nejvyšší vodivost vykazuje imidazoliový kation oproti kationtům - tetraalkyamonium, pyrrolidinium a piperidinium. V porovnání s amoniovými analogy mají fosfoniové IL vyšší vodivost. (40)

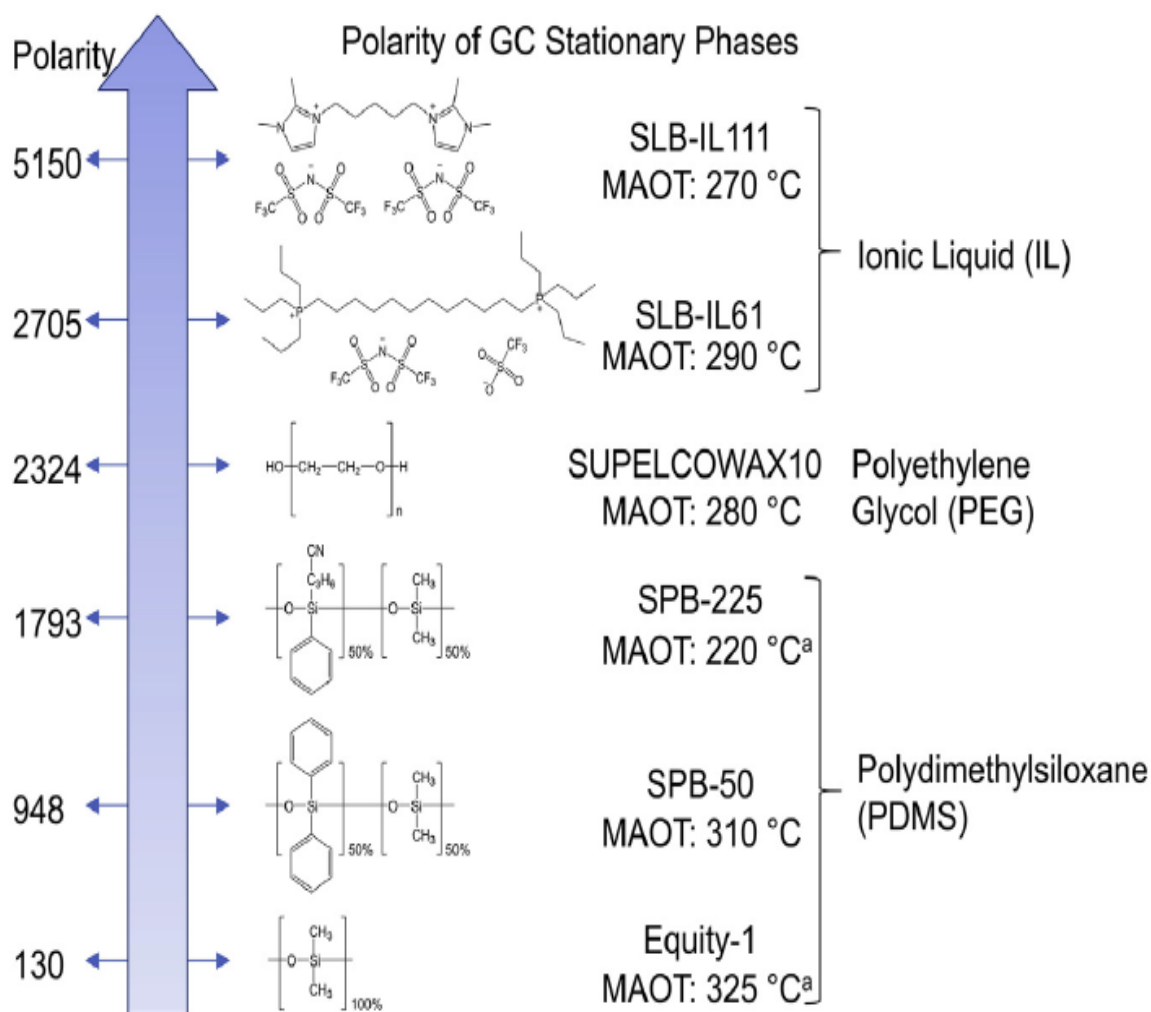
### **Tenze par**

Iontové kapaliny mají zanedbatelnou tenzi par – neodpařují se ani při zvýšené teplotě. Povrchové napětí souvisí se strukturou a výrazně klesá se zvyšující se délkou alkylového řetězce. (40)

2.3.4 Využití iontových kapalin jako stacionární fáze v plynové chromatografii  
IL splňují většinu požadavků ideální stacionární fáze v plynové chromatografii jako je vysoká viskozita, možnost změny selektivity (obměna kombinace kationtů a aniontů) a vysoká tepelná stabilita.(12) (31)

Iontové kapaliny jako stacionární fáze nemají aktivní hydroxylové skupiny, existuje mnohem větší škála jejich modifikace a jsou stabilní při vyšších teplotách. Jejich polarita je obecně vyšší než SF s polyethylenglykolem nebo polydimethylsiloxanem.

Názorně je uvedena zvyšující se polarita u stacionárních fází na Obrázku 11. (12)



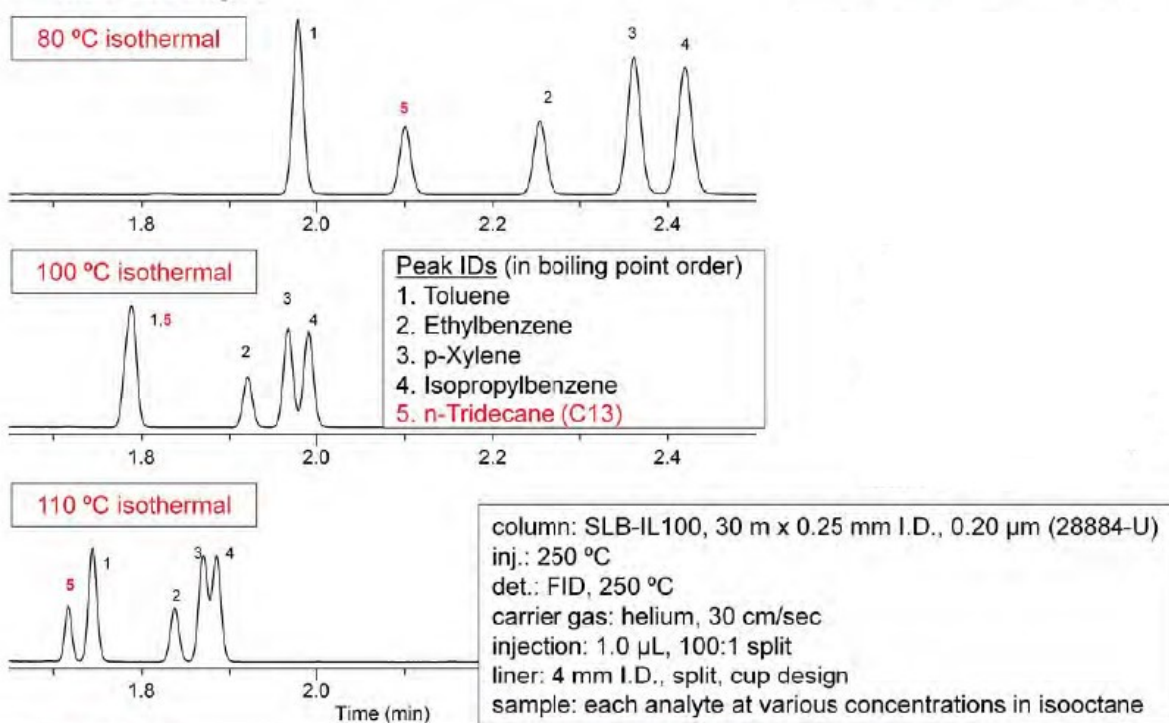
Obrázek 11 Chemická struktura a hodnota celkové polarity vybraných komerčně dostupných stacionárních fází GC (polarita vypočtena na základě celkových hodnot polarity ref. (41))

U vysoce až extrémně polárních SF můžeme pozorovat fenomén teplotního efektu (méně často lze efekt pozorovat i u středně polárních a polárních SF). Tento fenomén byl pozorován při analýze na SLB-IL 100, kde bylo analyzováno pět látek – alkan (n- tridekan) a aromatické látky (toluen, ethylbenzen, p-xylen a isopropybenzen) (Obrázek 12)

Měření probíhalo za izotermických podmínek – 80 °C, 100 °C a 110 °C. Ostatní podmínky měření zůstávaly konstantní. Teplota 110 °C v porovnání s teplotou 80 °C způsobila sníženou retenci a změnu v selektivitě všech analytů. Bylo to způsobeno tím, že vyšší teplota oslabuje interakce mezi analytem a SF. Alkany jsou primárně zadržovány díky disperzními silami, zatímco aromatické látky jsou zadržovány díky

dipól-indukovaný dipól interakcemi. Interakce SF – analyt jsou vysokou teplotou oslabeny, nicméně nedochází k tomu ve stejnou dobu. Alkany ztrácí retenci rychleji než aromatické látky.(12)

Právě SLB – IL 100 byla použita v experimentální části práce. (kapitola 4)



Obrázek 12 Fenomén teplotního efektu u SLB-IL 100(12)

V Tabulce 2 je uvedeno základní rozdělení komerčně dostupných stacionárních fází na bázi iontových kapalin od firmy Sigma Aldrich (mimo SLB-IL100, která je uvedena v samostatné kapitole 2.3.5)

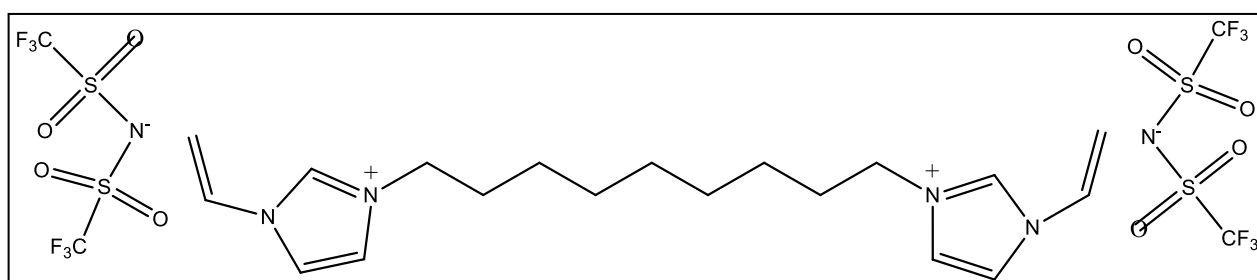
SLB-IL111		SLB-IL82	
Název IL	1,5-di(2,3-dimethylimidazolium)pentan bis(trifluoromethanesulfonyl)imid	Název IL	1,12-di(2,3-dimethylimidazolium)dodekan bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
Vlastnosti	Po koloně SLB-IL100 to byla druhá komerčně dostupná kolona pro GC. Separace polarizovatelných analytů (obsahujících dvojně a trojně vazby C-C) z nepolárních analytů	Vlastnosti	Stacionární fáze je vhodná pro analýzu neutrálních a středně bazických analytů.
Teplotní limit	50 °C - 270 °C	Teplotní limit	50 °C - 270 °C
	extrémně polární		SF není vázaná chemicky
SLB-IL76		SLB-IL61	
Název IL	tri(triethylphosphoniumhexanamido) triethylamin bis(trifluoromethylsulfonyl)imid	Název IL	1,12-di(triethylphosphonium)dodekan bis (trifluoromethylsulfonyl)imid trifluoromethylsulfonát
Vlastnosti	Stacionární fáze je schopna mnoha interakčních mechanismů s analytem. V porovnání s ostatními kolonami s podobnými hodnotami polarizace SF má rozdílnou selektivitu.	Vlastnosti	Jedná se o upravenou verzi SLB-IL59 s vyšší inertností. Vhodná pro analýzu neutrálních a slabě bazických látek
	SF není vázaná chemicky		SF není vázaná chemicky
Teplotní limit	270 °C	Teplotní limit	40 °C - 290 °C
SLB-IL60		SLB-IL59	
Název IL	1,12-di(triethylphosphonium)dodekan bis (trifluoromethylsulfonyl)imid	Název IL	1,12-di(triethylphosphonium)dodekan bis (trifluoromethylsulfonyl)imid
Vlastnosti	Jedná se o upravenou (deaktivace) verzi SLB-IL59. V porovnání s PEG má vyšší teplotní limit (300 °C vs 270-280 °C)	Vlastnosti	V porovnání s PEG má vyšší teplotní limit (300 °C vs 270-280 °C), je selektivnější pro polárnější analyt. Vhodná pro analýzu neutrálních a slabě bazických analytů.
	SF není vázaná chemicky		SF není vázaná chemicky
Teplotní limit	35 °C - 300 °C	Teplotní limit	do 300 °C

Tabulka 2 Komerčně dostupné kolony s iontovou kapalinou jako SF (12)

### 2.3.5 Stacionární fáze používaná v experimentální části práce

V experimentální části práce byla používána kolona se stacionární fází SLB-IL100.

**SLB-IL100** byla první komerčně dostupná kolona pro plynovou chromatografii na světě. Používá se pro analýzu neutrálních a polarizovatelných látek obsahujících dvojnásobné a/nebo trojnásobné vazby mezi uhlíky. Polaritou je podobná 1,2,3-tris(2-kyanoethoxypropan) tzv. TCEP jedné z nejpolarnějších stacionárních fází, která je v současné době komerčně dostupná (analýza aromatických sloučenin). Výhoda SLB-IL100 je vyšší maximální teplota 230 °C oproti použitelnosti TCEP do 140 °C. Chemická struktura je znázorněna na Obrázku 13. (12)



Obrázek 13 Chemická struktura SLB-IL100 (41)

## 2.4 Derivatizace

Derivatizace je proces, při kterém je sloučenina chemicky změněna na sloučeninu zcela novou, s lepšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi (snižuje polaritu analytu, mění rozpustnost ve vodné nebo organické fázi, těkavost). Důvodů vedoucích k derivatizaci v plynové chromatografii je více, nejčastěji jsou to tyto:

1. zlepšení vlastností sloučeniny, které nelze analyzovat z důvodu nedostatečné těkavosti či stability (organické kyseliny, amidy, hydroxysloučeniny, aminokyseliny)
2. zlepšení chromatografického chování (především zlepšení selektivity)
3. zamezení nežádoucí sorpce funkční skupiny analytu se stacionární fází
4. zlepšení detekce

Důležitým krokem derivatizace je zvolení správného derivatizačního činidla, aby byla chemická reakce reprodukovatelná a efektivní.

Analyt (A-X), s vhodnou funkční skupinou, vstupuje do chemické reakce s derivatizačním činidlem (D-Y) a vzniká produkt – derivát (A-Y) jak je znázorněno na Obrázku 14.

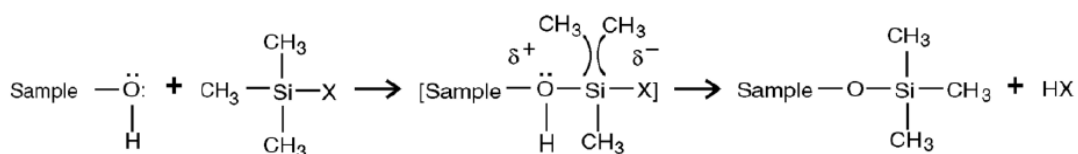


Obrázek 14 Obecná chemická reakce s derivatizačním činidlem (42)

K optimalizaci derivatizační reakce je důležité i správně zvolené rozpouštědlo analytu. Rozpouštědlo nesmí reagovat s derivatizačním činidlem a musí být bez nečistot. Běžně používaná rozpouštědla jsou acetonitril, pyridin, dimethylformamid, dimethylsulfoxid a tetrahydrofuran. Plynová chromatografie rozlišuje tři základní typy derivatizačních reakcí a to silylaci, acylaci a alkylaci. (43)

#### 2.4.1 Silylace

Silylační činidla se používají převážně ke zvýšení těkavosti analytu a snížení absorpce na povrch stacionární fáze. Silylové deriváty se tvoří vytěsněním aktivního vodíku ze skupin -OH, -SH a -NH (kyseliny, alkoholy, thioly, aminy, amidy, aldehydy).. Takto vzniklé silylové deriváty jsou obecně více těkavé, méně polární a teplotně stabilnější. Stericky bráněné skupiny jsou méně reaktivní, ale poskytují stabilnější deriváty po proběhlé silylaci. Chemická reakce silylace je uvedena na Obrázku 15.



Obrázek 15 Schéma chemické reakce – silylace (X= chlorid)(44)

V plynové chromatografii jsou nejvíce používané trimethylsilyl (TMS) deriváty. BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) a BSA (N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid) jsou nejpoužívanější derivatizační činidla, která poskytují trimethylsilyl výměnou za aktivní vodík. K reakci je zapotřebí použití katalyzátoru – TMCS (trimethylchlorosilan), TFA (trifluoroacetamid), piperidin nebo pyridin. Katalyzátor zvyšuje schopnost výměny aktivního vodíku za – silyl.



Nejsnadnější je reakce s funkčními skupinami v tomto pořadí:

- alkohol > fenol > karboxyl > amin > amid > hydroxyl

Přitom alkoholy nejsnadněji reagují v tomto pořadí:

- primární > sekundární > terciální (43)(45)(46)

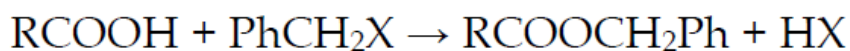
Nevýhody silylace:

- 1) Silylové deriváty jsou citlivé na vlhkost, která rozkládá TMS činidla i deriváty. To se dá minimalizovat použitím většího množství derivatizačního činidla
- 2) Silylace vyžaduje zahřívání.
- 3) Doba derivatizace je dána konkrétní sloučeninou, která má být derivována. Je zapotřebí dobrá rozpustnost látky v rozpouštědle (popřípadě zahřívání). (45)(46)

Silylace se nejčastěji používá při derivatizaci cukrů, mastných kyselin, steroidů a aminokyselin. (42)

#### 2.4.2 Alkylace

Při alkylační derivatizaci se nahrazuje kyselý vodík (karboxylové skupiny, fenoly) alifatickou nebo aromatickou skupinou. Po derivatizaci vznikají estery, ethery, thioethery, N-alkylaminy, amidy a sulfonamidy. Obecná chemická reakce je uvedena na Obrázku 16. Slabě kyselé funkční skupiny jako jsou alkoholy, potřebují k reakci bazický kazalyzátor (methoxid sodný, methoxid draselný). Kyselější funkční skupiny jako jsou fenoly, karboxylové kyseliny, vyžadují méně zásadité katalyzátory (fluorid boritý). (45)



*Obrázek 16 Obecná alkylační reakce (X= halogen, alkylový skupina R, H= další alkylová skupina R)*

#### 2.4.3 Acylace

Při acylaci je acylová skupina zavedena do organické sloučeniny. Při acylaci se také využívá aktivního vodíku ve funkčních skupinách -OH, -SH, -NH analytu. Po chemické reakci vznikají estery, thioestery a amidy. V případě karboxylové kyseliny acylová skupina nahrazuje hydroxy skupinu. Příklad chemické reakce je uveden níže na Obrázku 17.



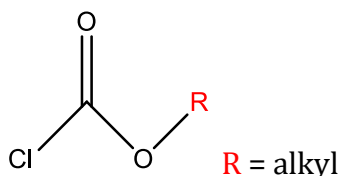
Obrázek 17 Příklad chemické reakce - acylace

Nejčastěji používanými acylačními činidly jsou anhydridy kyselin (acetanhydrid, trifluoracetyl-, pentafluoropropionyl-, heptafluorobutyryl-), halogenidy kyselin (perluorokranoyl, pentafluorobenzoyl-) acylamidy (N-methylbis(trifluoracetamid)) a acylimidazoly.

Acylace se nejčastěji používá při derivatizaci aromatických aminů a chirální analýze aminokyselin. Kromě toho acylační reagentia umožňují zavedení skupin do molekuly analytu, které zachycují elektrony a zvyšují tak detekovatelnost během analýzy. (42)(45)

## 2.5 Derivatizace s alkylchloroformiáty

Derivatizace pomocí alkylchloroformiátů je typ reakce – acylace. Alkylchloroformiáty (RCF) jsou derivatizační činidla, která reagují s funkčními skupinami i ve vodném prostředí během pár sekund. Používají se k derivatizaci aminoskupin, mastných kyselin, organických kyselin, alkaloidů a herbicidů. Základní chemická struktura derivatizačního činidla je uvedena na Obrázku 18. (44)(47)



Obrázek 18 Základní chemická struktura alkylchloroformiátu

Většina derivatizačních reakcí probíhá v organickém prostředí rozpouštědla za bezvodých podmínek. Vlhkost je pro reakci nežádoucí, například pro silylaci (kapitola 2.4.1). S alkylchloroformiáty lze pracovat i ve vodném prostředí. Použití alkylchloroformiátů jako derivatizačních činidel karboxylových a aminoskupin ve vodném prostředí popsal ve své práci Petr Hušek. (48)

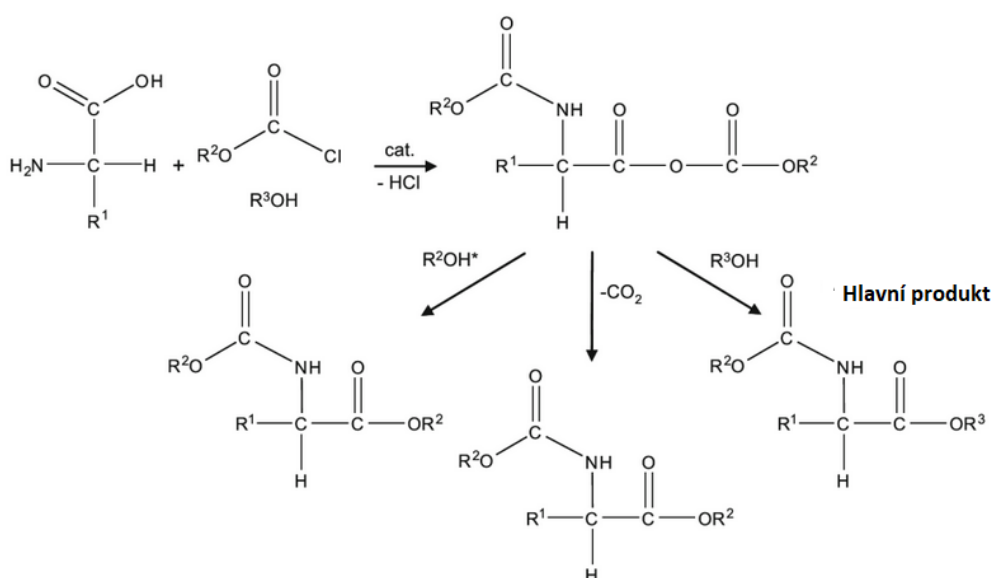
Optimalizace derivatizace s alkylchloroformiáty spočívá v nalezení vhodného reakčního média, které je složeno z alkoholu, katalyzátoru a rozpouštědla. Reakční

médium je v určitém poměru, tím se minimalizuje tvorba vedlejších produktů a maximalizuje se účinek derivatizace. (42)(47)

V experimentální části práce bylo použito reakční médium složené z acetonitrilu (rozpuštědlo), pyridinu (PYR) (katalyzátor) a příslušného alkoholu (ROH) k derivatizačnímu činidlu - isobutanol, ethanol nebo heptafluorbutan-1-ol v poměru 22 (ACN):2(PYR):1(ROH).

### 2.5.1 Derivatizace karboxylových kyselin alkylchloroformiáty

Derivatizace karboxylových kyselin probíhá za přítomnosti alkoholu a rozpouštědla/katalyzátoru. Jako katalyzátor se používá pyridin, 3-pikolin, 4- (dimethylamino)pyridin a N-methylpiperidin. Přidání alkoholu do reakčního media je nezbytné z důvodu reakce - esterifikace karboxylové skupiny. Použitý alkohol by měl mít identickou alkylovou strukturu k derivatizačnímu činidlu (např. ethanol, ethylchloroformiát). V případě přidání alkoholu s odlišnou alkylovou skupinou by vznikla směs esterů, které by vytvářely na chromatogramu více píků. U alkylchloroformiátu může dojít k hydrolýze a uvolnění alkoholu, který reaguje s anhydridem. K dekarboxylaci anhydridu dochází v malém rozsahu, což vede k tvorbě esteru obsahujícího alkylovou skupinu z činidla - Obrázek 19. Derivatizace ve vodném prostředí probíhá rychle. Méně polární deriváty se poté extrahují do organického rozpouštědla jako je chloroform nebo isooktan. Celý postup derivatizace lze snadno automatizovat. Pracuje se s minimálním množstvím vzorku. (48)(49)



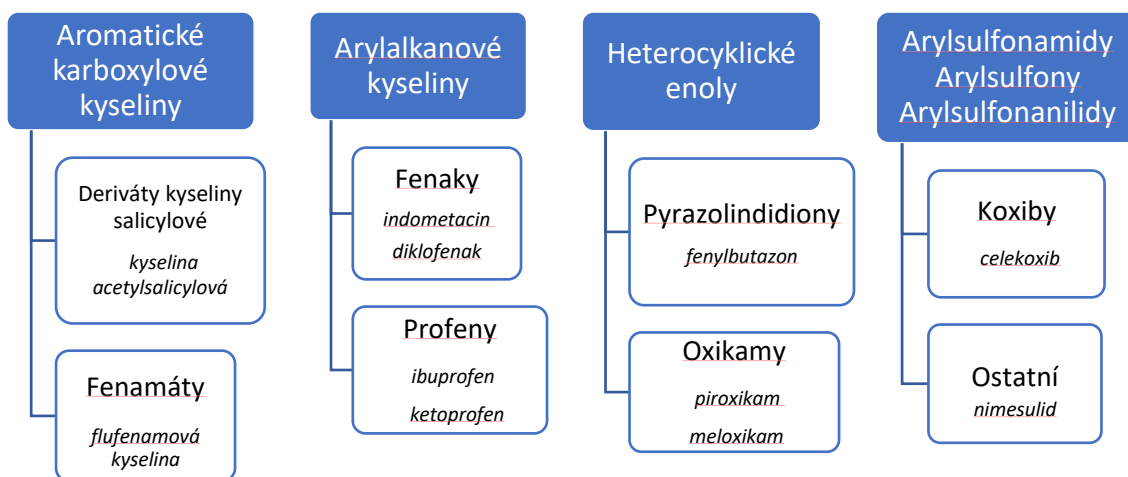
Obrázek 19 Reakční schéma chemické reakce alkylchloroformiátu (48)

## 2.6 Nesteroidní antiflogistika

Nesteroidní antiflogistika (non-steroidal anti-inflammatory drugs NSAID) jsou léčiva používaná na bolest (analgetika), horečku (antipyretika) a při vyšší dávce na záněty. Jsou to převážně symptomatická léčiva potlačující bolest na úrovni periferie a centrální nervové soustavy. Nepůsobí na viscerální bolesti. Výhodou oproti další skupině používané na léčbu bolesti, opiátů, je nenávykovost. Často se používají pro potlačení zánětu u revmatických onemocnění a z tohoto důvodu jsou známy také pod názvem nesteroidní antirevmatika. Některá léčiva mají také účinek antiagregační (kyselina acetylsalicylová). Jejich mechanismus účinku spočívá především v inhibici syntézy prostaglandinů. (50)(51)(52)

### 2.6.1 Rozdělení NSAID

NSAID lze rozdělit dle několika faktorů, např. podle chemické struktury (Obrázek 20), podle selektivity k cyklooxygenáze 1 (COX-1)/cyklooxygenáze 2 (COX-2) nebo podle léky biologického poločasu. Všeobecně se jedná o látky kyselé povahy, která je dána výskytem karboxylové funkční skupiny nebo enolovou, sulfonamidovou funkční skupinou. (50) (51)



Obrázek 20 Rozdělení NSAID dle chemické struktury (53)

### 2.6.2 Mechanismus účinku

NSAID působí převážně na inhibici cyklooxygenázy (COX). Tento enzym pomáhá při syntéze prostaglandinů, prostacyklinů a tromboxanů, které se významně podílejí na rozvoji bolesti, horečky a zánětu.

V lidském těle existuje několik izoform cyklooxygenázy. Konstituční cyklooxygenáza (COX-1) se podílí na tvorbě prostaglandinů, které jsou důležité pro fyziologické procesy v těle (agregace trombocytů, protekce žaludeční sliznice proti kyselému pH atd.). Indukovatelná forma cyklooxygenázy (COX-2) odpovědná za vznik prostanoidů, které mají patologický vliv na organismus (zánět, horečka, bolest). NSAID se dají rozdělit na tři skupiny léčiv dle mechanismu působení na COX - preferenční COX-2, selektivní COX-2, neselektivní. (50)(51)

### 2.6.3 Farmakokinetika

Většina NSAID se rychle vstřebává z gastrointestinálního traktu a dosahuje maximální koncentrace do 2-3 hodin po podání. Potrava snižuje rychlost absorpce léku, ale množství vstřebané látky nesnižuje.

Mnoho léčiv z NSAID se váže na plazmatické bílkoviny a mohou tak zapříčinit lékové interakce s jinými léčivy vázajícími se na plazmatické bílkoviny. Dobře pronikají do kloubů i do centrální nervové soustavy.

Eliminace nejčastěji probíhá jaterním metabolismem a exkrecí ledvinami. Proto se nedoporučuje užívání NSAID u vážného onemocnění ledvin nebo jater. (50)(51)

### 2.6.4 Nežádoucí účinky a interakce

Nežádoucí účinky často souvisí s inhibicí COX-1. Nejčastěji to bývají nežádoucí účinky v gastrointestinálním traktu – abdominální bolesti, nauzea, průjemy, perforace, ulcerace, perforace. Dále snižují aktivitu krevních destiček, což vede k zvýšené krvácivosti a vzniku krevních podlitin. Vlivem snížení prostaglandinů v ledvinách dochází k retenci sodíku a vody (otoky), snížení účinku antihypertenziv a diuretik, sníženému vylučování kyseliny močové a hyperkalemii. U některých jedinců se vyskytuje i hypersenzitivita – angioedém, astma, kopřivka, fotosenzitivita (ketoprofen). (50)(51)(52)

## 2.7 Ibuprofen

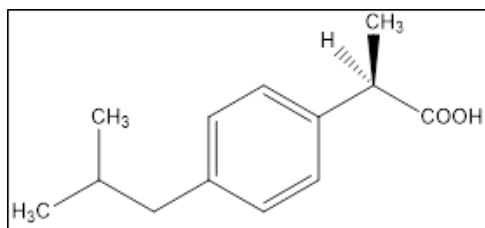
Ibuprofen (IBU) patří mezi jedno z nejpoužívanějších léčiv v terapii bolesti, zánětu a horečky. V léčbě revmatických onemocnění je volbou číslo jedna. IBU je léčivo patřící do skupiny profenů. (54)

### 2.7.1 Historie ibuprofenu

Za objevitele ibuprofenu je považován profesor Stewart Adams, který pracoval pro společnost Boots Company v anglickém Nottinghamu. Jeho objev je datován do 50. let 20. století. Cílem bylo nalézt novou chemickou strukturu nesteroidního léčiva na léčbu revmatoidní artritidy. Do té doby se léčila revmatoidní artritida salicyláty a kortikosteroidy. V roce 1961 byl ibuprofen patentován a po řadě klinických zkoušek byl v roce 1969 schválen pro léčbu revmatoidní artritidy ve Velké Británii. (55)

### 2.7.2 Chemická struktura a vlastnosti

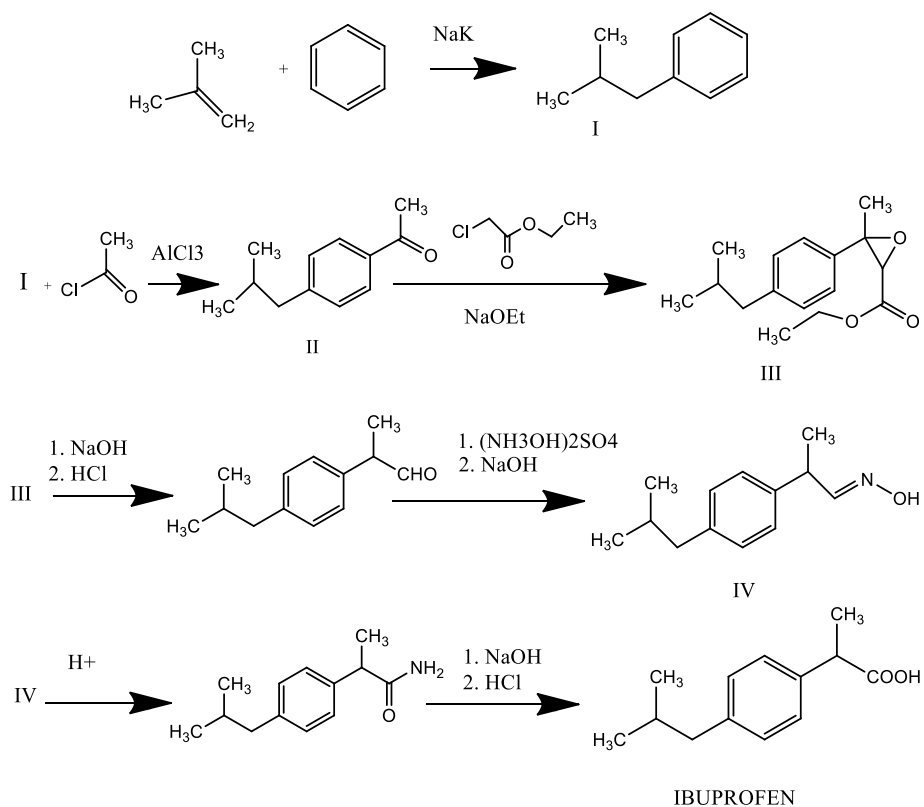
Ibuprofen (2-(4-isobutylfenyl)propanová kyselina) je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo se vyskytuje ve formě bezbarvých krystalů. Má dobrou rozpustnost v acetonu, methanolu a v dichlormethanu. Není rozpustný ve vodě. Jeho molární hmotnost je  $206,28 \text{ g mol}^{-1}$ . Teplota tání  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  až  $78 \text{ }^\circ\text{C}$ . Chemický vzorec ibuprofenu je na Obrázku 21. Ibuprofen se vyskytuje ve dvou izomerech (R a S), přitom u S-(+) izomeru se předpokládá, že má protizánětlivé účinky. (56)



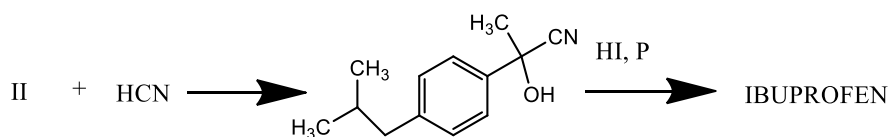
Obrázek 21 Chemický vzorec ibuprofenu (56)

### 2.7.3 Syntéza ibuprofenu

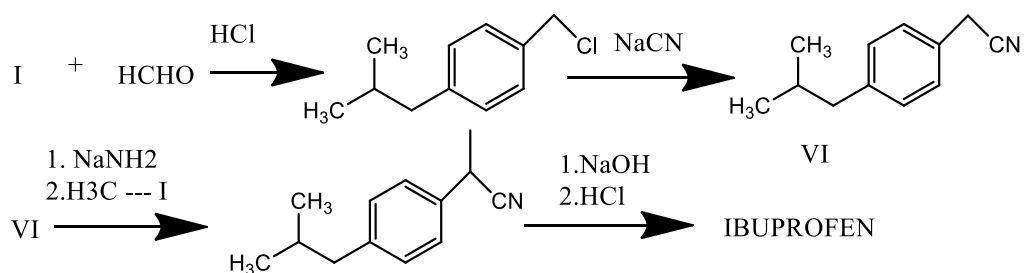
Za průkopníka v syntéze ibuprofenu se dá považovat firma Boots Pure Drug Company. Jejich postup syntézy ibuprofenu představuje Obrázku 22– Syntéza ibuprofenu první metodou. V první řadě dochází k Friedel-Craftsově acylaci a vzniku 4 - isobutylacetofenonu (II). Dále Darzenovou reakcí vzniká epoxyester (III), následuje hydrolýza, dekarboxylace a vzniká aldehyd, který následnou oxidací dává vzniku ibuprofenu. Na Obrázcích 23-26 následují jiné možnosti syntézy ibuprofenu.



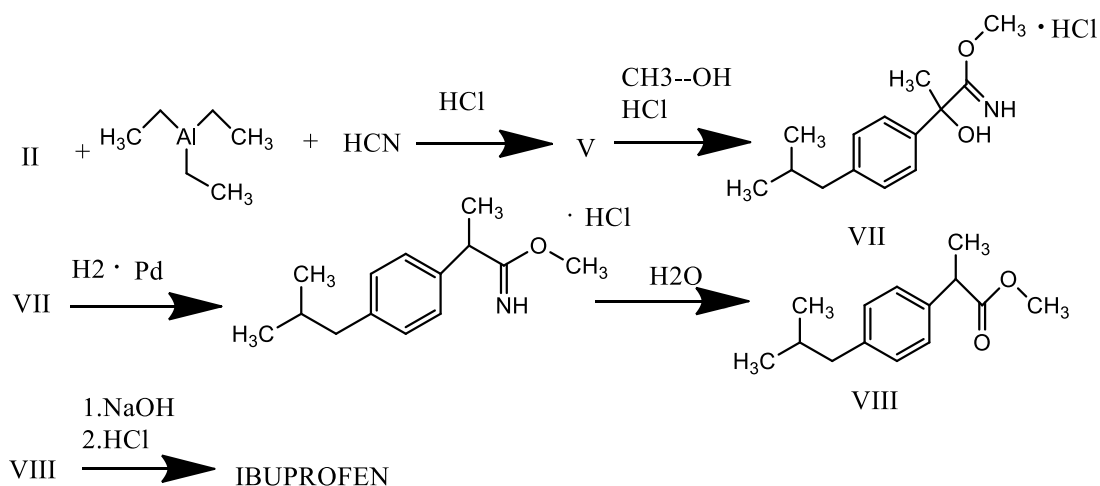
Obrázek 22 Syntéza ibuprofenu první metodou (57)



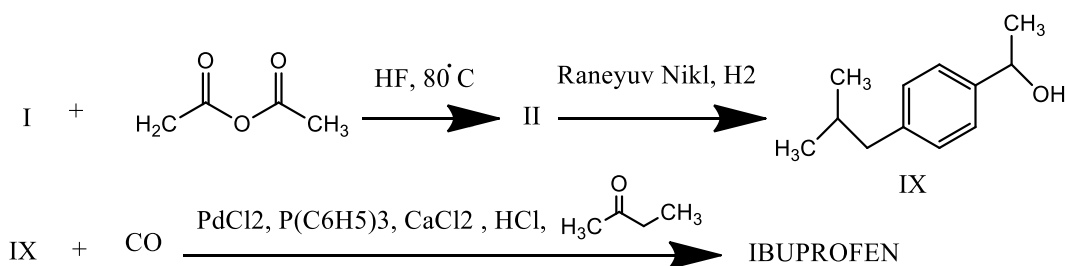
Obrázek 23 Syntéza ibuprofenu druhou metodou (57)



Obrázek 24 Syntéza ibuprofenu třetí metodou (57)



Obrázek 25 Syntéza ibuprofenu čtvrtou metodou (57)



Obrázek 26 Syntéza ibuprofenu pátou metodou (57)

#### 2.7.4 Zkouška čistoty ibuprofenu – příbuzné látky

Nečistoty ibuprofenu vznikají již při výrobním procesu (např. 4- isobutylacetofenon) nebo vznikají z ibuprofenu jeho degradací (1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on, kyselina (2RS)-2-(2-isobutylfenyl)propanová). Přítomnost nečistot ovlivňuje teplotu tání, degradaci ibuprofenu a tím jeho účinnost. Dále některé nečistoty působí toxicky na organismus či životní prostředí, proto je jejich sledování objektem zájmu. (58)(59)

Nejčastější nečistoty ibuprofenu:

nečistota A = kyselina (2RS)-2-(3-isobutylfenyl)propanová

nečistota B = kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propanová

nečistota E = IBF = 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on

nečistota F = kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová

nečistota J = BOPA = (2RS)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová kyselina

Dle českého lékopisu 2017 se zkouška na specifikované nečistoty provádí pomocí kapalinové (A, J a N) a plynové chromatografie (F).



V HPLC metodě se používá stacionární fáze se silikagelem (oktadecylsilylovaný R) s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ . Jako mobilní fáze A se používá směs objemových dílů kyseliny fosforečné, acetonitrilu a vody (0,5+340+600). Mobilní fáze B je acetonitril. Detekce probíhá pomocí spektrofotometrického detektoru při vlnové délce 214 nm. K identifikaci nečistot ibuprofenu A, J a N se používá *ibuprofen pro identifikace píků CRL* (obsahuje nečistoty A, J a N). K ověření separační účinnosti se používá roztok *ibuprofenu nečistoty B CRL* a *ibuprofenu CRL*. Limit pro každou nečistotu (A, J a N) je 0,15 %. Pro každou další nečistotu je to 0,05 %. Celkový obsah nečistot je maximálně 0,2 %. Tato metoda je poměrně časově náročná (retenční čas ibuprofenu 21 min). (56)

Plynovou chromatografií, metodou normalizace, se stanovuje nečistota F (kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová). V této metodě se používá kolona o délce 25 m s vnitřním průměrem 0,53 mm. Stacionární fáze s makrogolem 20 000 R (tloušťka filmu 2  $\mu\text{m}$ ). Teplotní program – kolona 150 °C, nástřikový prostor 200 °C a detektor 250 °C. Detekce probíhá pomocí plamenoionizačního detektoru. Limit pro nečistotu F je 0,1 %. Tato metoda je poměrně časově náročná na přípravu vzorku k analýze. Retenční čas ibuprofenu je 17 min a nečistoty F 25,5 min. (56)

#### 2.7.5 Současný přístup k analýze nečistoty F

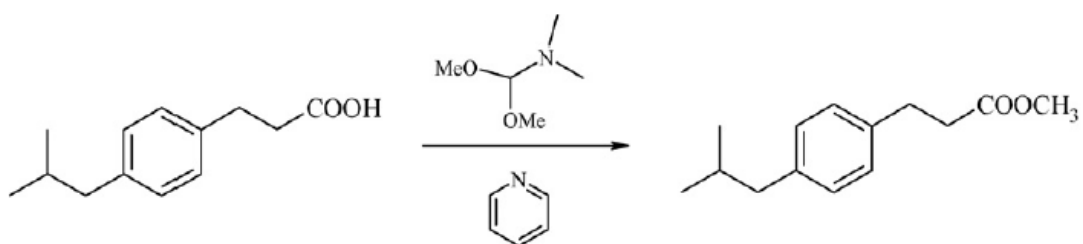
Přístup k hodnocení ibuprofenu a jeho nečistot se liší mezi celosvětově uznávanými lékopisy. Evropský lékopis a Britský lékopis využívá gradientovou metodu s použitím silikagelové  $\text{C}_{18}$  kolony (kromě nečistoty F). Zkouška lze hodnotit, pokud je dostatečná separace hlavního píku ibuprofenu a nečistoty B. Poměr výšky píku nečistoty B k sedlu je minimálně 1,5. (56)(60)(61)

Kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová jako nečistota F byla zavedena do Evropského lékopisu v dodatku 4.2. Na rozdíl od jiných nečistot ibuprofenu, které jsou hodnoceny pomocí HPLC, obsah nečistoty F se stanoví plynovou chromatografií, které předchází derivatizace látky methylovaním. Schéma této reakce je uvedeno níže na Obrázku 27. Po methylačním postupu (100 °C, 20 min) se produkt ochladí a suší pod proudem dusíku. Poté se rozpustí v ethylacetátu a je analyzovaný pomocí GC-FID. Relativní retence nečistoty F k ibuprofenu je 1,5. Limit pro nečistotu F je 0,1 %. Americký lékopis používá metodu RP-HPLC pro odhad příbuzných látek. Plocha píků nečistot nesmí překročit limit 0,3 % a limit pro součet všech jednotlivých nečistot je 1 %. (56)(62)

Nečistota F a ibuprofen jsou poziční izomery a rozdíl mezi jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi je velmi malý. Separace těchto analytů je proto obtížná. (62)

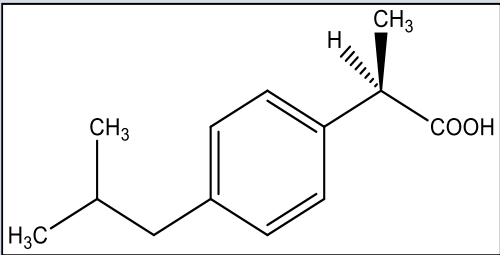
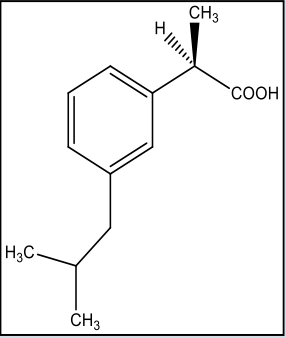
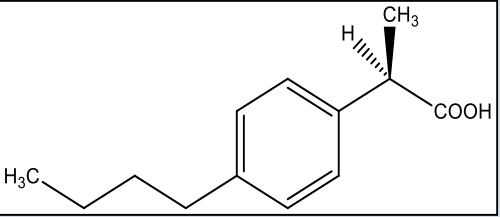
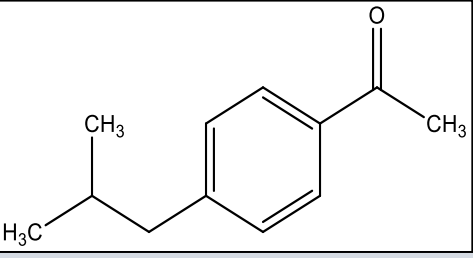
Žádné jiné oficiální lékopisné metody na stanovení nečistoty F nejsou k dispozici. V literatuře jsem dohledala ještě jednu metodu pro hodnocení nečistoty F. P. Kalafut a spol. se zabývali vývojem a validací HPLC metody pro stanovení nečistoty F na uhlíkem potažené zirkoniové stacionární fázi s ohledem na evropský lékopis. Jako detektor byl použit fluorescenční detektor. Požadovaná separace analytů byla do 25 minut. (62)

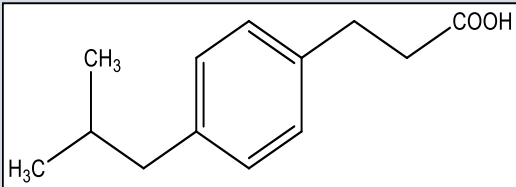
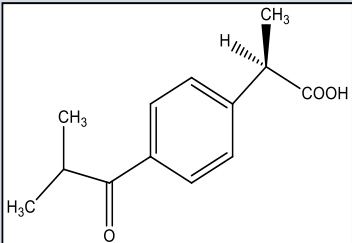
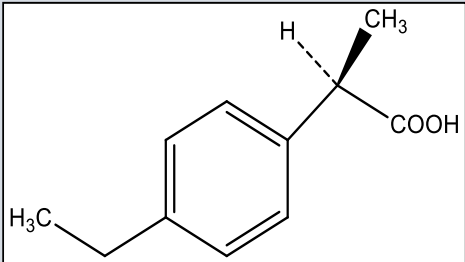
Z důvodu časové náročnosti úpravy vzorku před analýzou dle evropského lékopisu, jsme se rozhodli v experimentální části práce vyvinout jednoduchou GC metodu pro stanovení vybraných nečistot B, E, F a J ve vzorku s ibuprofenem. Nečistoty B, E, F a J byly vybrány z důvodů – nečistota E a J jsou rozkladné produkty ibuprofenu a nečistota B a F jsou polohové izomery ibuprofenu.



Obrázek 27 Derivatizace nečistoty F (62)

2.7.6 Popis nečistot ibuprofenu používaných v experimentální části práce  
 V Tabulce 3 jsou uvedeny základní informace o ibuprofenu a jeho nečistotách, které byly použity v experimentální části práce. Nečistoty E a J jsou rozkladné produkty ibuprofenu a nečistoty A, B a F jsou polohové izomery ibuprofenu. U ibuprofenu a nečistot je uvedena molekulová hmotnost a log (P). Tyto hodnoty byly zjištěny z programu ChemDraw.

Ibuprofen		
název: 2-(4-isobutylfenyl)propanová kyselina		
Molekulová hmotnost		206,28 g/mol
Log (P)		3,75
Teplota varu		400,2 °C
Nečistota A		
název: kyselina (2RS)-2-(3-isobutylfenyl)propanová		
zkratka: 2, 3' derivát ibuprofenu		
Molekulová hmotnost		206,28 g/mol
Log (P)		3,75
Teplota varu	400,2 °C	
Nečistota B		
název: kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propanová		
Molekulová hmotnost		206,13 g/mol
Log (P)		3,27
Teplota varu		399,9 °C
Nečistota E		
název: 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on		
zkratka: IBF		
Molekulová hmotnost		176,12 g/mol
Log (P)		3
Teplota varu	286,10 °C	

Nečistota F	
název: kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová	
Molekulová hmotnost	206,13 g/mol
Log (P)	3,6
Teplota varu	400,6 °C
	
Nečistota J	
název: (2RS)-2-[4-(2- zkratka: BOPA	
Molekulová hmotnost	220,26 g/mol
Log (P)	2,63
Teplota varu	454,1 °C
	
Nečistota N	
název: kyselina (2RS)-2-(4-ethylfenyl)propanová	
Molekulová hmotnost	178,10 g/mol
Log (P)	3,01
Teplota varu	354,86 °C
	

Tabulka 3 Ibuprofen a jeho nečistoty používané v experimentální části práce

### 3 Cíl práce

Cílem rigorózní práce bylo otestovat možnost využití stacionární fáze na bázi iontových kapalin pro dostatečně citlivou GC analýzu ibuprofenu a jeho vybraných nečistot B, E, F, J. Nečistoty B a F představují polohové izomery ibuprofenu a nečistoty E a J jsou jeho degradační produkty. Dále bylo cílem popsat vliv vybraných experimentálních podmínek na derivatizaci analytů pomocí chloroformiátů.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a metody

#### 4.1.1 Chemikálie

ethanol, acetonitril, pyridin – Sigma Aldrich, Česká republika

isobutylalkohol (IbOH)- Reachim, Ruská federace

heptafluorobutan-1 – ol 98 %, Sigma Aldrich, Česká republika.

ethylchloroformiát (ECF)- Sigma Aldrich, Česká republika

isobutylchloroformiát (ICF)- Sigma Aldrich, Česká republika

heptafluorobutylchloroformiát (HFBCF) - Aneclab, Česká republika

ibuprofen (IBU) – Sigma Aldrich, St. Louis, USA

nečistota A = kyselina (2RS)-2-(3-isobutylfenyl)propanová = 2, 3'derivát ibuprofenu - Sigma Aldrich

nečistota B = kyselina (2RS)-2-(4-isobutylfenyl)propanová -EDQM, Štrasburg, Francie

nečistota E = IBF = 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on – Lancaster, UK

nečistota F = kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová - EDQM, Štrasburg, Francie

nečistota J = BOPA = (2RS)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová kyselina – USP, Sigma Aldrich

ibuprofen pro identifikace píků CRL - EDQM, Štrasburg, Francie

#### 4.1.2 Příklad

plynový chromatograf Shimadzu Gas Chromatograph, GC-2010, Japonsko

hmotnostní spektrometr Shimadzu- GCMS-QP2010 Plus, Japonsko

vortex - Velp Scientifica, Itálie

ultrazvuková lázeň - K 10, Kraitex, Slovenská republika

analytické váhy, Sartorius, Česká republika

#### 4.1.3 Počítačové programy

GCMS solution Version 2.70, Shimadzu Corporation

ChemDraw Professional 17.1, PerkinElmer

#### 4.1.4 Pomůcky

laboratorní sklo, mikropipety, vialky pro GC

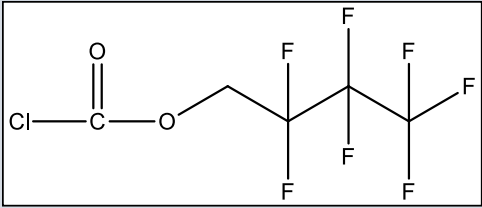
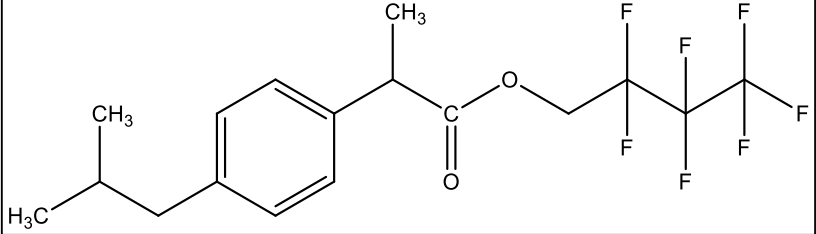
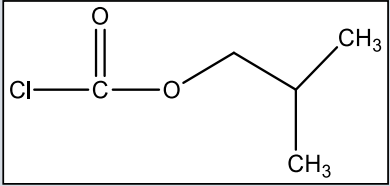
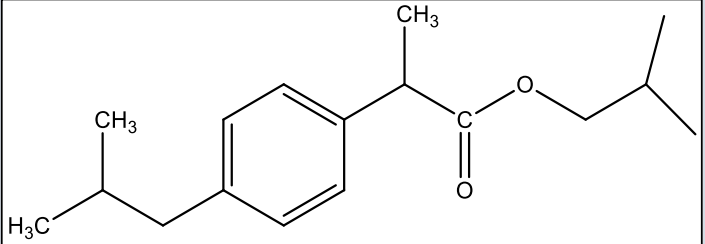
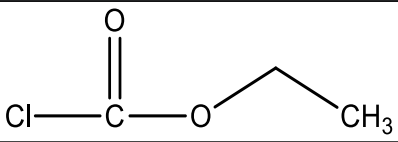
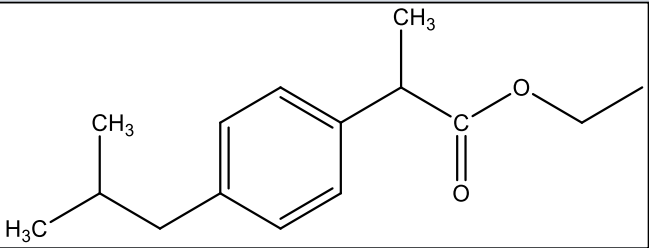
kolona: SLB - IL - 100, Sigma-Aldrich, Česká republika- technická data testované kolony jsou uvedena v Tabulce 4

Testovaná kolona					
Název kolony	Stacionární fáze	Délka (m)	Průměr (mm)	Vrstva SF (μm)	Maximální teplota (°C)
SLB - IL - 100	1,9-di(3-vinylimidazolium)nonan bis(trifluoromethanesulfonyl)imid	30	0,25	0,2	230

Tabulka 4 Technická data testované kolony

## 4.2 Derivatizační činidla

V experimentální části práce byla použita tři derivatizační činidla - heptafluorobutylchloroformiát, isobutylchloroformiát a ethylchloroformiát. K reakci byly přidány příslušné alkoholy se stejnou alkylovou skupinou jako u příslušného chloroformiátu - heptafluorbutan-1-ol, isobutylalkohol a ethanol. Základní informace k jednotlivým derivatizačním činidlům jsou uvedeny v Tabulce 5 Dále jsou uvedeny produkty derivatizace alkylchloroformiátů s ibuprofenem. Hodnoty teploty varu a log P byly zjištěny pomocí programu ChemDraw.

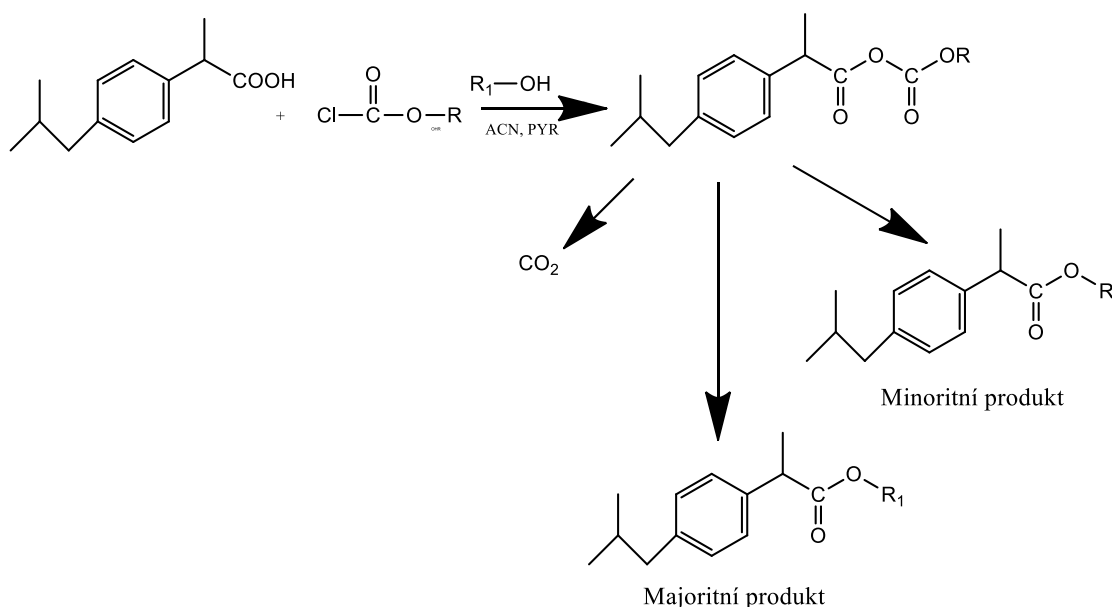
Heptafluorobutylchloroformiát		
zkratka: HFBCF		
Molekulová hmotnost	262,52 g/mol	
Sumární vzorec	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> ClF <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	
Teplota varu	105 - 107 °C	
Derivatizovaný ibuprofen		
388 g/mol		
Teplota varu	389,6 °C	
Log P	6,2	
Isobutylchloroformiát		
zkratka: ICF		
Molekulová hmotnost	136,58 g/mol	
Sumární vzorec	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>2</sub>	
Teplota varu	128,8 °C	
Derivatizovaný ibuprofen		
262 g/mol		
Teplota varu	403,97 °C	
Log P	5,24	
Ethylchloroformiát		
zkratka: ECF		
Molekulová hmotnost	108,52 g/mol	
Sumární vzorec	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ClO <sub>2</sub>	
Teplota varu	93 °C	
Derivatizovaný ibuprofen		
234 g/mol		
Teplota varu	358,65 °C	
Log P	4,35	

Tabulka 5 Derivatizační činidla a produkty derivatizace ibuprofenu



## 4.3 Příprava vzorku

Ibuprofen/nečistota ibuprofenu reaguje s derivatizačním činidlem (isobutylchloroformiát, ethylchloroformiát, heptafluorochloroformiát) za přítomnosti příslušného alkoholu (isobutanol, ethanol, heptafluorobutan-1-ol) a katalyzátoru/rozpouštědla (pyridin v acetonitrilu). Obecný princip reakce je popsán v kapitole 2.5.1 Obrázek 19. Při reakci vzniká nejprve anhydrid a následně ester. Pokud je při reakci použit odpovídající alkohol tzv. má stejný alkyl (např. ethanol - ethylchloroformiát) tak majoritní a minoritní produkt bude stejný (Obrázek 28).(48) Výjimku tvoří nečistota E, která nepodléhá derivatizaci, protože neobsahuje karboxylovou funkční skupinu.



Obrázek 28 Reakční schéma derivatizace ibuprofenu (Převzato a upraveno (48))

Příprava vzorků probíhala v digestoři za použití ochranných nitrilových rukavic.

### 4.3.1 Porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100

Byly připraveny tři vzorky. Navážka vzorku ibuprofenu (1 mg) byla rozpuštěna v 1 ml ACN. Poté se přidalo 90  $\mu$ l PYR, dále pak 45  $\mu$ l alkoholu (EtOH nebo IbOH nebo HFBOH), následně pak 45  $\mu$ l odpovídajícího derivatizačního činidla (ECF nebo ICF nebo HFBCF). Po přidání derivatizačního činidla byly vzorky vloženy do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.2 Vliv změny teploty v nástřikovém prostoru na množství nezderivatizovaného ibuprofenu

Navážka vzorku ibuprofenu 1 mg byla rozpuštěna v 1 ml ACN. Poté se přidalo do vialky 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l HFBOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla HFBCF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.3 Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni

Byly připraveny tři identické vzorky. Navážka vzorku ibuprofenu 0,1 mg byla rozpuštěna v 1 ml ACN, poté se odebralo 100  $\mu$ l rozpuštěného IBU do vialky a přidalo 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l EtOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla ECF. Následně se tři připravené vzorky vložily do ultrazvukové lázně po dobu 1 min / 5 min nebo 8 min.

#### 4.3.4 Vliv množství alkoholu na derivatizaci ibuprofenu ECF

Byly připraveny dva vzorky. Navážka vzorku ibuprofenu 0,1 mg byla rozpuštěna v 1 ml ACN, poté se odebralo do vialky 100  $\mu$ l IBU a přidalo 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l nebo 100  $\mu$ l EtOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla ECF. Následně se dva připravené vzorky vložily do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.5 Vliv rozpouštědla na derivatizaci ibuprofenu ECF

Byly připraveny dva vzorky. Navážka vzorku ibuprofenu 0,1 mg byla rozpuštěna v 1 ml ACN nebo chloroformu, poté se odebralo 100  $\mu$ l IBU a přidalo 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l EtOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla ECF. Následně se dva připravené vzorky vložily do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.6 Derivatizace lékopisné směsi k identifikaci píků nečistot ibuprofenu

100  $\mu$ l lékopisné směsi (nečistoty ibuprofenu A, J, N) (15  $\mu$ g/ml v ACN) se přidalo k 900  $\mu$ l ACN, 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l EtOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.7 Derivatizace nečistot ibuprofenu v koncentraci odpovídající limitu 0,1 % pomocí ECF

Navážka vzorku ibuprofenu 1 mg byla rozpuštěna v 1ml ACN. Následně se přidaly nečistoty B, E, F, J o koncentraci 0,1 % ibuprofenu (ze zásobních roztoků nečistot E, F a J 1 mg/ml se odebral 1 µl, zásobní roztok nečistoty B 0,6 mg/ml odebralo se 1,7 µl). Poté se přidalo 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.8 Validační parametr – linearita

Bylo připraveno 5 vzorků se vzrůstající koncentrací ibuprofenu 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml. Ibuprofen byl rozpuštěn v ACN. Poté bylo přidáno 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

##### Postup pro přípravu vzorku – linearita ibuprofenu v závislosti na velikosti nástřiku:

Do vialky bylo přidáno 1 ml IBU (1 µg/ml v ACN), 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.9 Validační parametr – linearita u nečistot - směs ibuprofenu v koncentraci odpovídající 40- 120 % povoleného obsahu nečistot.

Bylo připraveno 6 vzorků s koncentrací nečistot ibuprofenu od 0,4 µg/ml – 1,42 µg/ml (40-120 % povoleného obsahu nečistot ve vzorku). Limit pro nečistoty E a J odpovídá 0,15 % a pro nečistoty B a F 0,1 %.

Do vialky byl přidán 1ml IBU o koncentraci 1 mg/ml, množství přidanych nečistot je uvedeno v Tabulce 6. Dále bylo přidáno 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

Zásobní roztoky pro nečistotu E, J a F byly o koncentraci 1 mg/ml. Pro nečistotu B byl zásobní roztok o koncentraci 0,6 mg/ml.

##### Příprava vzorku pro porovnání odezvy detektoru:

Pro porovnání odezvy detektoru na analyt o koncentraci 1 µg/ml byly použity vzorky č.3 nečistoty B a F (1 µg/ml) – Tabulka 6. Dále byly připraveny vzorky ibuprofenu, nečistoty E a nečistoty J o koncentraci 1 µg/ml. Příprava vzorků byla následující – Do vialky se přidal 1 µl IBU/E/J (zásobní roztok 1 mg/ml v ACN) a 999 µl ACN. Dále bylo

přidáno 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

Vzorek č.	Koncentrace %	E (0,15 %)	J (0,15 %)	B (0,1 %)	F (0,1 %)
č.1	140%	2,1 µl	2,1 µl	2,38 µl	1,4 µl
č.2	120%	1,8 µl	1,8 µl	2,04 µl	1,2 µl
č.3	100%	1,5 µl	1,5 µl	1,7 µl	1 µl
č.4	80%	1,2 µl	1,2 µl	1,36 µl	0,8 µl
č.5	60%	0,9 µl	0,9 µl	1,02 µl	0,6 µl
č.6	40%	0,6 µl	0,6 µl	0,68 µl	0,4 µl

*Tabulka 6 Souhrnná tabulka k přípravě vzorků v limitu 40-140 % nečistot*

#### 4.3.10 Validační parametr – opakovatelnost

Bylo připraveno šest identických vzorků. Navážka ibuprofenu 1 mg byla rozpuštěna v 1ml ACN, nečistoty F a B o koncentraci odpovídající 0,1 % ibuprofenu (ze zásobního roztoku nečistoty F 1 mg/ml se odebral 1 µl, ze zásobního roztoku nečistoty B 0,6 mg/ml se odebralo 1,7 µl), nečistoty J a E o koncentraci odpovídající 0,15 % ibuprofenu (ze zásobního roztoku 1 mg/ml se odebral 1,5 µl), 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

#### 4.3.11 Validační parametr – limit detekce a kvantifikace

Pro výpočet limitu detekce a kvantifikace nečistot ibuprofenu byly použity chromatogramy nečistot B, E, F a J, jejichž postup přípravy vzorku je uveden níže.

1. Vzorek nečistoty B – Ze zásobního roztoku nečistoty B 0,6 mg/ml se odebralo 1,7 µl a doplnilo se ACN do 1ml. Poté se přidalo 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.
2. Vzorek nečistoty E – Ze zásobního roztoku nečistoty E 1 mg/ml se odebralo 1 µl a doplnilo se ACN do 1ml. Poté se přidalo 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.
3. Vzorek nečistoty F – Ze zásobního roztoku nečistoty F 1 mg/ml se odebralo 1 µl a doplnilo se ACN do 1ml. Poté se přidalo 90 µl PYR, 45 µl EtOH, 45 µl derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

4. Vzorek nečistoty J – Ze zásobního roztoku nečistoty J 1 mg/ml se odebralo 1  $\mu$ l a doplnilo se ACN do 1ml. Poté se přidalo 90  $\mu$ l PYR, 45  $\mu$ l EtOH, 45  $\mu$ l derivatizačního činidla ECF. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100

Na koloně SLB-IL-100 byly analyzovány tři vzorky, které se lišily použitým derivatizačním činidlem. Příprava vzorku je popsána v kapitole 4.3.1. Hmotnostní detektor pracoval v režimu FULL SCAN ( $m/z$  100 – 500).

Chromatografické podmínky jsou uvedeny v Tabulce 7.

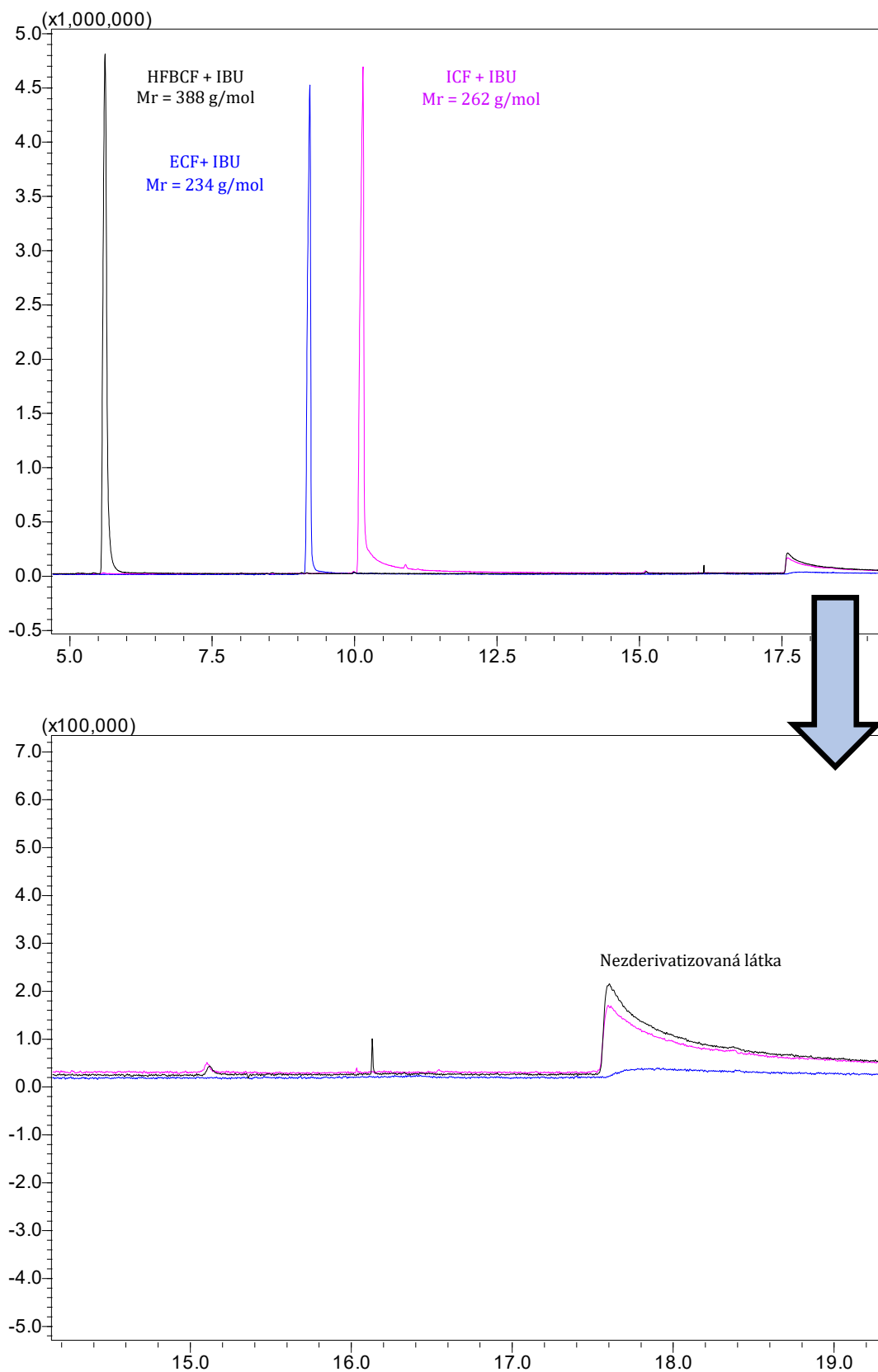
Chromatografické podmínky			
Teplota kolony (°C)	Teplota v nástřikovém prostoru (°C)	Split	Průtok kolonou (ml/min)
110	140	10	1
Gradientová metoda			
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)	
-	110	0	
5	200	3	

Tabulka 7 Chromatografické podmínky – porovnání jednotlivých derivatizačních činidel na koloně SLB-IL-100

Při porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100 (Obrázek 29) je vidět, že nejrychlejší analýza ibuprofenu byla při použití heptafluorobutylchloroformiátu. Pořadí eluovaných látek ovlivňuje teplota varu analytu, polarita a mezimolekulární interakce (kapitola 2.3.4).

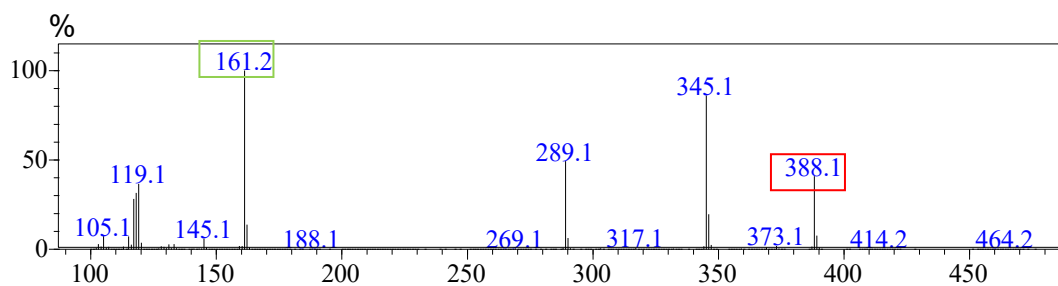
U ibuprofenu derivatizovaného HFBCF a ICF můžeme pozorovat zůstatek nezderivatizované látky.

Na Obrázku 30 můžeme vidět hmotnostní spektra jednotlivých derivátů ibuprofenu. Ve spektrech je červeně označen molekulární ion příslušného derivátu. Hlavní fragment 161, který můžeme vidět u všech hmotnostních spekter, vzniká odštěpením derivatizované karboxylové skupiny (Obrázek 31).

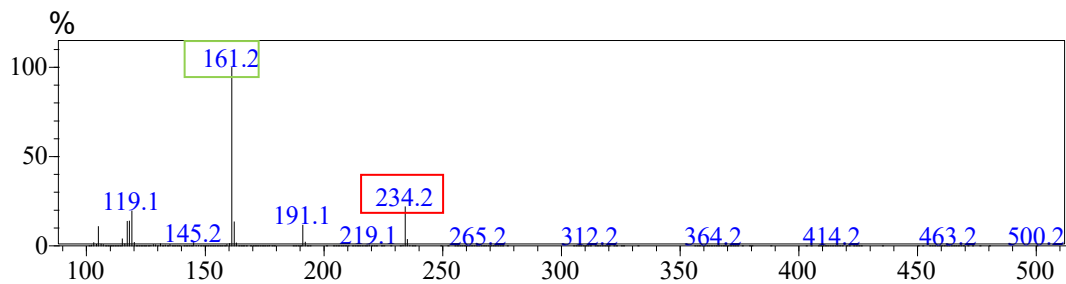


Obrázek 29 Porovnání chromatografického chování jednotlivých derivátů na koloně SLB-IL 100

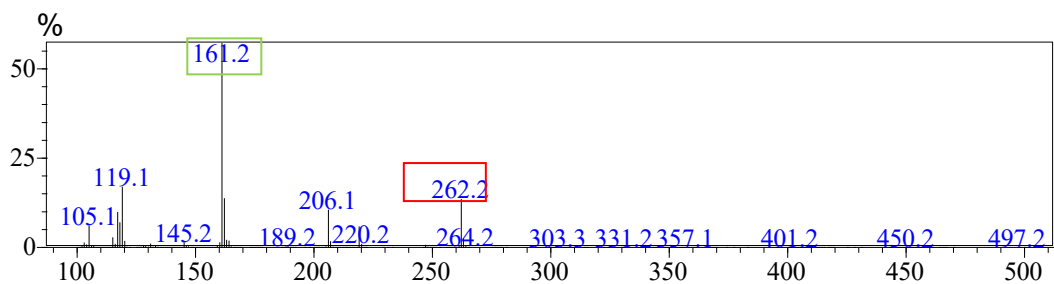
a) Derivatizovaný ibuprofen heptafluorobutylchloroformiátem:



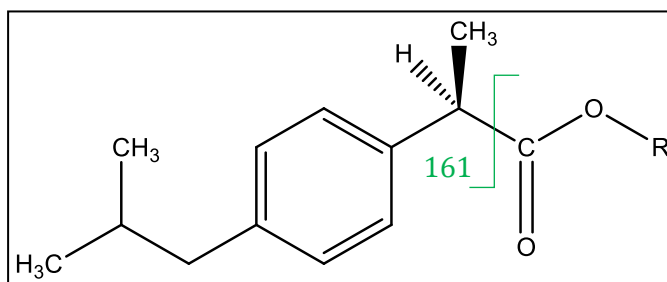
b) Derivatizovaný ibuprofen ethylchloroformiátem:



c) Derivatizovaný ibuprofen isobutylchloroformiátem:



Obrázek 30 Hmotnostní spektra derivátů ibuprofenu



Obrázek 31 Vznik fragmentu 161



## 5.2 Vliv změny teploty v nástřikovém prostoru na množství nezderivatizovaného ibuprofenu

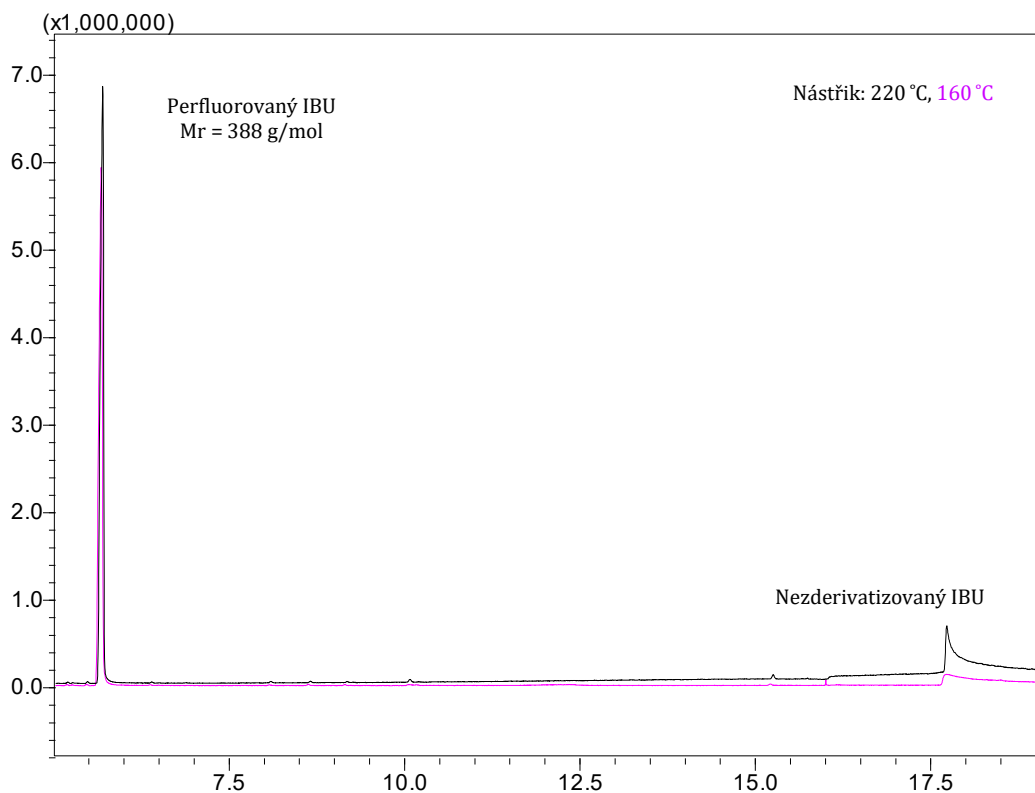
Předchozí výsledky nás vedly k vyzkoušení změn teplot v nástřikovém prostoru. Domnívaly jsme se, že dochází v nástřikovém prostoru k odštěpení derivatizačního činidla od ibuprofenu. Proto byly chromatografické podmínky upraveny dle Tabulky 8. Složení vzorku je popsáno v kapitole 4.3.2.

Chromatografické podmínky			
Metoda 1.			
Teplota kolony (°C)	Teplota v nástřikovém prostoru (°C)	Split	Průtok kolonou (ml/min)
110	220	10	1
Metoda 2.			
Teplota kolony (°C)	Teplota v nástřikovém prostoru (°C)	Split	Průtok kolonou (ml/min)
110	160	10	1
Gradientová metoda			
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)	
-	110	0	
5	200	3	

Tabulka 8 Chromatografické podmínky – vliv změny teploty v nástřikovém prostoru na množství nezderivatizovaného ibuprofenu

Při snížené teplotě v nástřiku na 160 °C se snižuje množství nezderivatizovaného ibuprofenu, tím se nám potvrdila naše domněnka, že dochází v nástřikovém prostoru k odštěpení derivatizačního činidla od ibuprofenu (Obrázek 32).

Vzhledem ke zjištěným výsledkům jsme se rozhodli v další analýze pokračovat s ethylchloroformiátem jako derivatizačním činidlem.



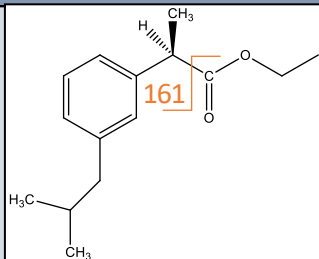
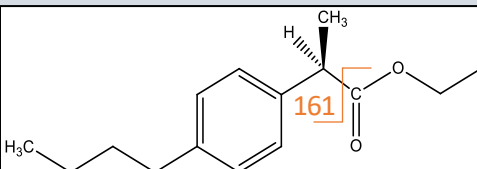
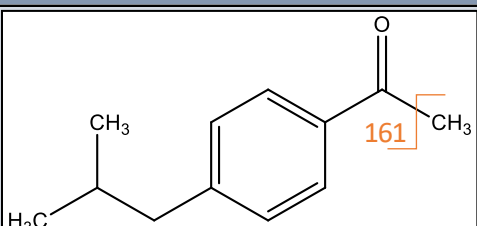
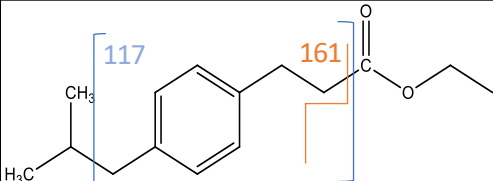
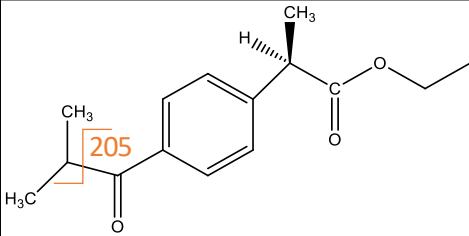
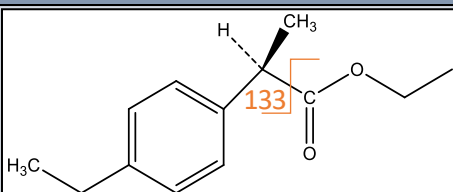
Obrázek 32 Vliv změny teploty na množství nezderivatizovaného ibuprofenu

### 5.3 Vlastnosti a fragmenty nečistot ibuprofenu

Následující tabulka (Tabulka 9) nám ukazuje struktury nečistot ibuprofenu po derivatizaci ECF. Nečistota E nepodléhá derivatizaci z důvodu chybějící COOH skupiny. Dále jsou v tabulce uvedeny hlavní fragmenty analytů. Hodnoty teploty varu a log P byly zjištěny pomocí programu ChemDraw.

Mezi nejčastější fragmenty ibuprofenu a jeho nečistot patří fragment 161, který vzniká odštěpením derivatizované karboxylové skupiny. Obdobně vzniká i fragment 133 u nečistoty N. Fragment 117 u nečistoty F vzniká po odštěpení derivatizované karboxylové skupiny a následně se odštěpuje z isobutylu skupina tří uhlíků.

Chromatogramy jednotlivých nečistot jsou uvedeny v kapitolách 5.8 a 5.9 Obrázek 40 a Obrázek 42.

Nečistota A		
Molekulová hmotnost der.	234 g/mol	
Teplota varu	358,65 °C	
Log (P) der.	4,35	
m/z hlavního fragmentu	161	
Nečistota B		
Molekulová hmotnost der.	234,33 g/mol	
Teplota varu	359,09 °C	
Log (P)	4,44	
m/z hlavního fragmentu	161	
Nečistota E		
Molekulová hmotnost der.	176,12 g/mol	
Teplota varu	286,10 °C	
Log (P)	3	
m/z hlavního fragmentu	161	
Nečistota F		
Molekulová hmotnost der.	234,16 g/mol	
Teplota varu	381,85 °C	
Log (P)	4,62	
m/z hlavního fragmentu	117	
m/z vedlejšího fragmentu	161	
Nečistota J		
Molekulová hmotnost der.	248,14 g/mol	
Teplota varu	411,85 °C	
Log (P)	3,24	
m/z hlavního fragmentu	205	
Nečistota N		
Molekulová hmotnost der.	206,13 g/mol	
Teplota varu	313,33 °C	
Log (P)	3,61	
m/z hlavního fragmentu	133	

Tabulka 9 Přehled vlastností a hlavních fragmentů nečistot ibuprofenu

## 5.4 Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni

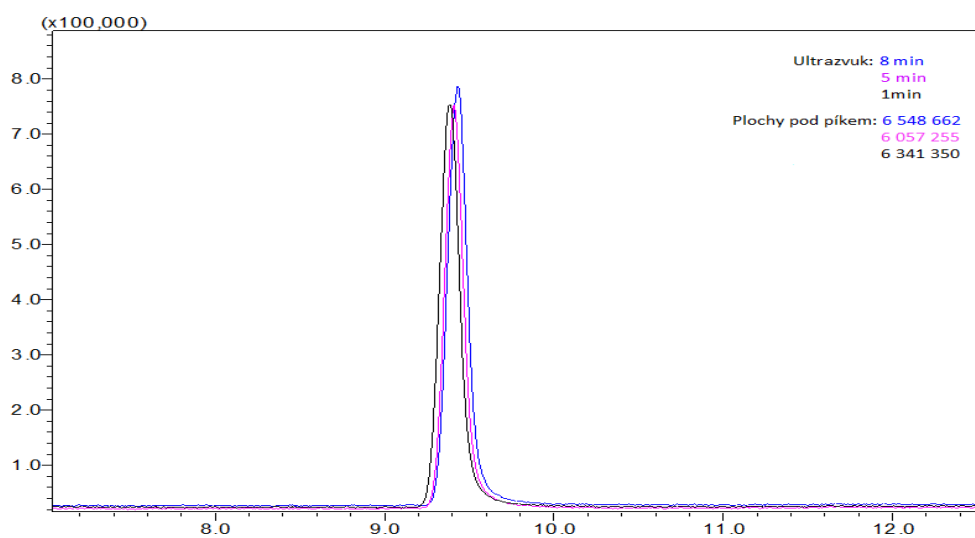
Sonikace vzorku v ultrazvukové lázni byla nedílnou součástí experimentální práce. Ultrazvuk může působit fyzikálně-chemicky (emulgace, homogenizace, extrakce a urychlení rozpouštění) a dále může ovlivňovat rychlost a průběh chemických reakcí, tvorbu volných radikálů, urychlení oxidace a katalyzátorových procesů.(63)

Byly upraveny chromatografické podmínky (Tabulka 10). Složení vzorku je popsáno v kapitole 4.3.3. Po přidání derivatizačního činidla byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně po dobu 1 min, 5 min nebo 8 min a následně se sledoval vliv doby sonikace na derivatizaci ibuprofenu (Obrázek 33).

Chromatografické podmínky			
Teplota kolony (°C)	Teplota v nástřikovém prostoru (°C)	Split	Průtok kolonou (ml/min)
110	140	10	1
Gradientová metoda			
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)	
-	110	11	
25	250	5	

Tabulka 10 Chromatografické podmínky – Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni.

Při porovnávání ploch píků ibuprofenu bylo zjištěno, že prodloužení doby sonikace vzorku v ultrazvukové lázni z 1 minuty na více minut významně neovlivnil výtěžek derivatizační reakce při použité ECF. Proto jsme v dalších experimentech nechávali vzorek v ultrazvukové lázni po dobu 1 minuty.

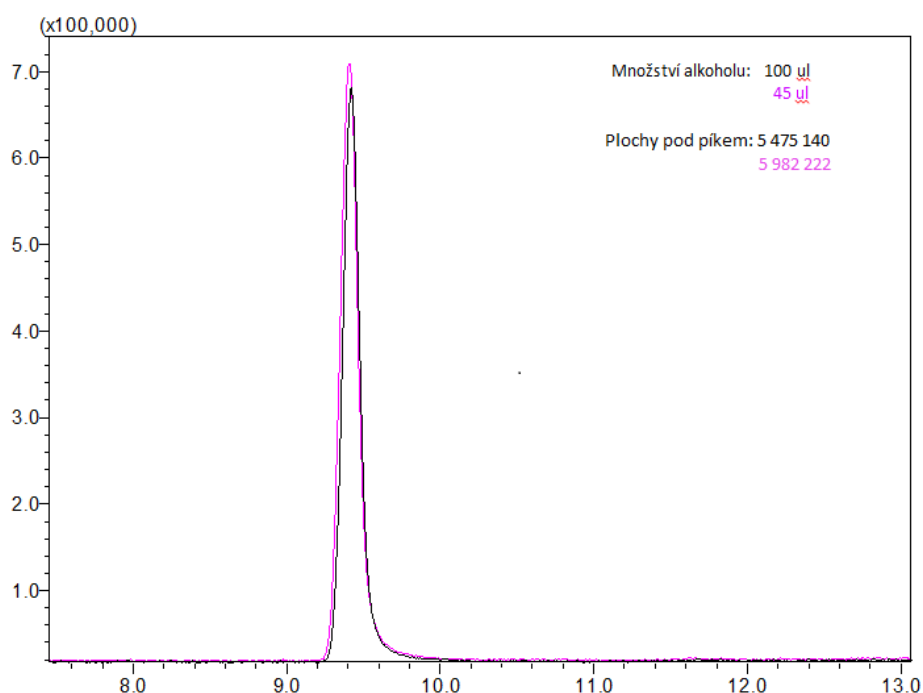


Obrázek 33 Derivatizace ibuprofenu v závislosti na setrvání vzorku v ultrazvukové lázni.

## 5.5 Vliv množství alkoholu na derivatizaci ibuprofenu ECF

Při optimalizaci podmínek derivatizace jsme se také zaměřili na složení reakčního média. Přesný poměr složek v reakčním médiu je esenciální (47)(48). Složení vzorku je popsáno v kapitole 4.3.4.

Chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.4 Tabulka 10. Při porovnávání ploch píků ibuprofenu bylo zjištěno, že zvýšené množství alkoholu v reakčním médiu nemá zásadní vliv na účinnost derivatizace ibuprofenu (Obrázek 34).

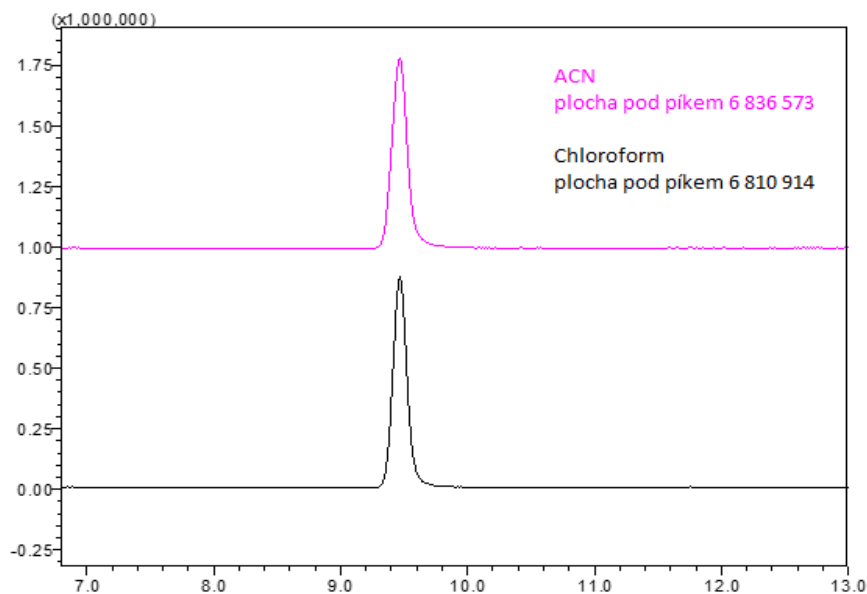


Obrázek 34 Vliv množství alkoholu na derivatizaci ibuprofenu ECF

## 5.6 Vliv rozpouštědla na derivatizaci ibuprofenu ethylchloroformiátem

Rozpouštědlo je jedno ze tří složek reakčního média (Kapitola 2.5). Zaměřili jsme se proto na vliv rozpouštědla na rozpustnost ibuprofenu a následnou derivatizaci. Vybrali jsme dvě rozpouštědla – chloroform a acetonitril. K tomuto výběru jsme dospěli na základě práce P. Huška a P. Šimka (48). Odborný článek se věnoval mimo jiné esterifikaci ve vodném/nevodném prostředí. Právě chloroform v kombinaci s pyridinem a acetonitril v kombinaci s pyridinem je zde doporučován jako vhodné reakční médium. Složení vzorku je popsáno v kapitole 4.3.5. Chromatografické

podmínky byly stejné jako v kapitole 5.4 Tabulka 10. Porovnáním ploch píků ibuprofenu bylo zjištěno, že volba rozpouštědla ACN/chloroform nehraje významnou roli v následné derivatizaci a separaci ibuprofenu na koloně SLB-IL-100 (Obrázek 35).



Obrázek 35 Vliv rozpouštědla na derivatizaci ibuprofenu ECF

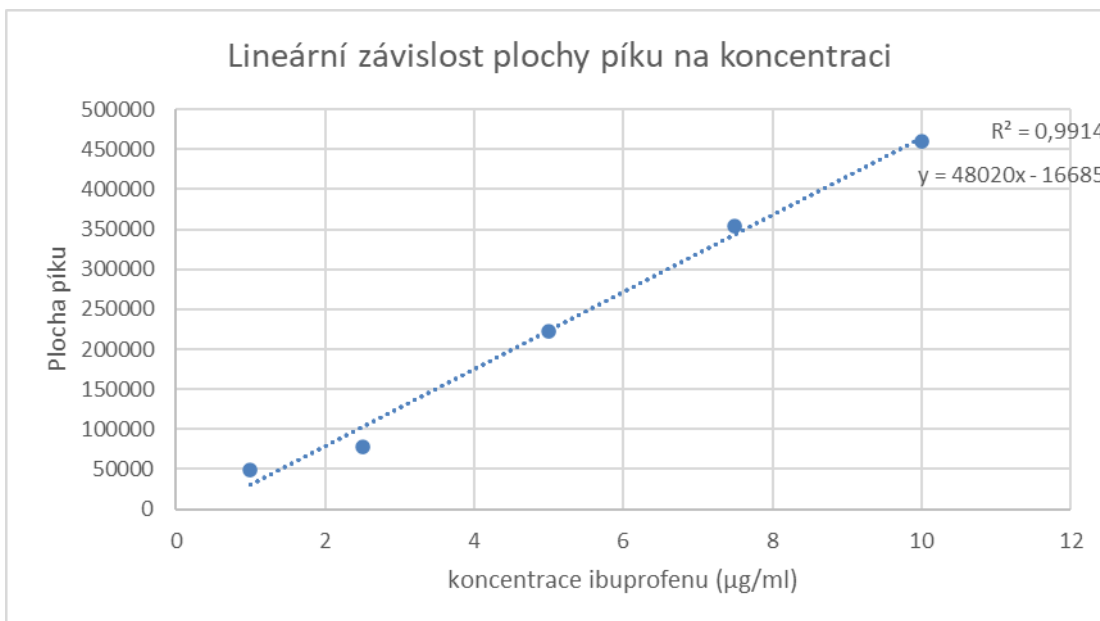
## 5.7 Linearita odezvy ibuprofenu v závislosti na koncentraci a nástřiku vzorku

K stanovení linearity bylo připraveno pět vzorů se vzrůstající koncentrací ibuprofenu (1–5  $\mu\text{g/ml}$ ). Dále byla změřena závislost plochy píku ibuprofenu (1  $\mu\text{g/ml}$ ) na množství nástřiku. Složení vzorků je popsáno v kapitole 4.3.8. Chromatografické podmínky se od předchozí metody lišily počáteční teplotou 110  $^{\circ}\text{C}$ , která přecházela do gradientové metody až po 15 minutách oproti původním 11 minutám. Prodloužil se tím retenční čas analytu (Tabulka 11).

Chromatografické podmínky			
Teplota kolony ( $^{\circ}\text{C}$ )	Teplota v nástřikovém prostoru ( $^{\circ}\text{C}$ )	Split	Průtok kolonou (ml/min)
110	140	10	1
Gradientová metoda			
Gradient $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas (min.)	
-	110	15	
25	250	5	

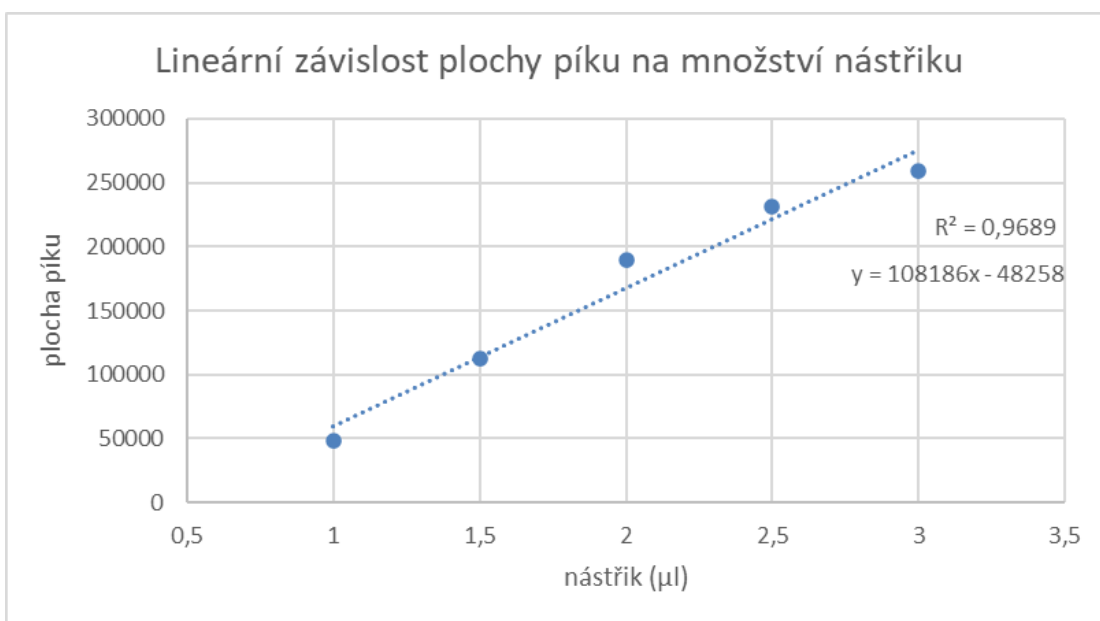
Tabulka 11 Chromatografické podmínky měření

Měřením jsme zjistili, že odezva detektoru byla v daném koncentračním rozmezí lineární ( $R^2$  0,9914), viz Obrázek 36



Obrázek 36 Lineární závislost plochy píku na koncentraci ibuprofenu

Závislost plochy píku na množství nástřiku výrazně neovlivňuje linearitu viz Obrázek 37. Výsledná hodnota  $R^2$  je 0,9689.



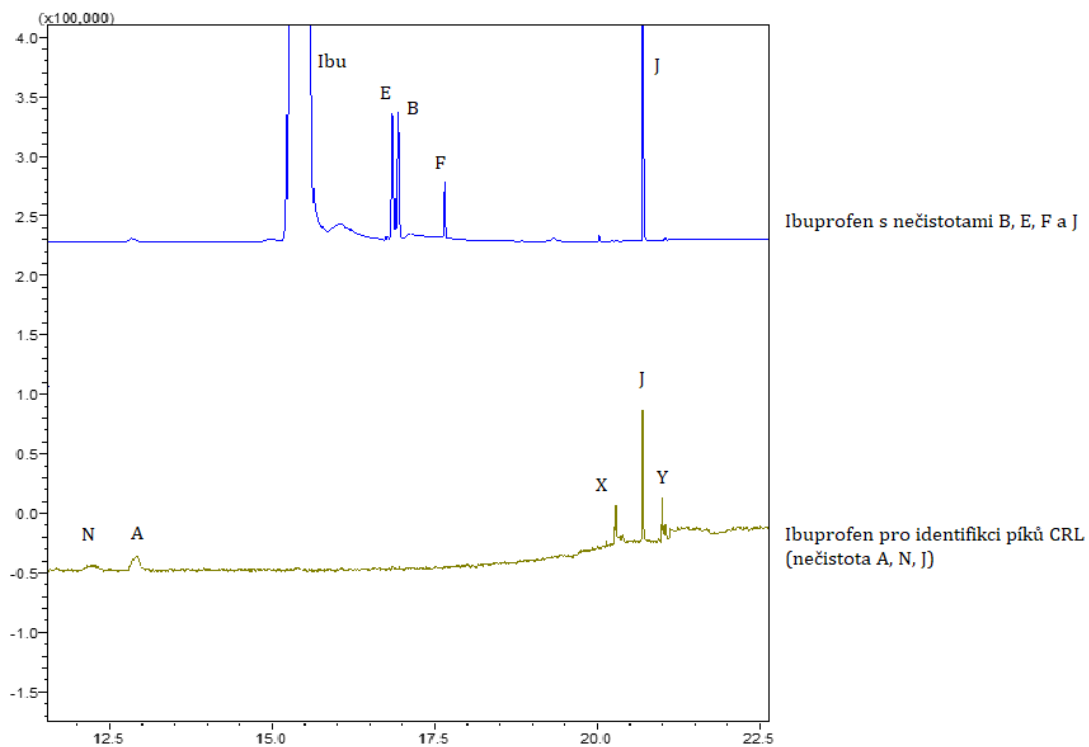
Obrázek 37 Linearita ibuprofenu v závislosti na množství nástřiku

## 5.8 Derivatizace lékopisné směsi k identifikaci píků nečistot ibuprofenu

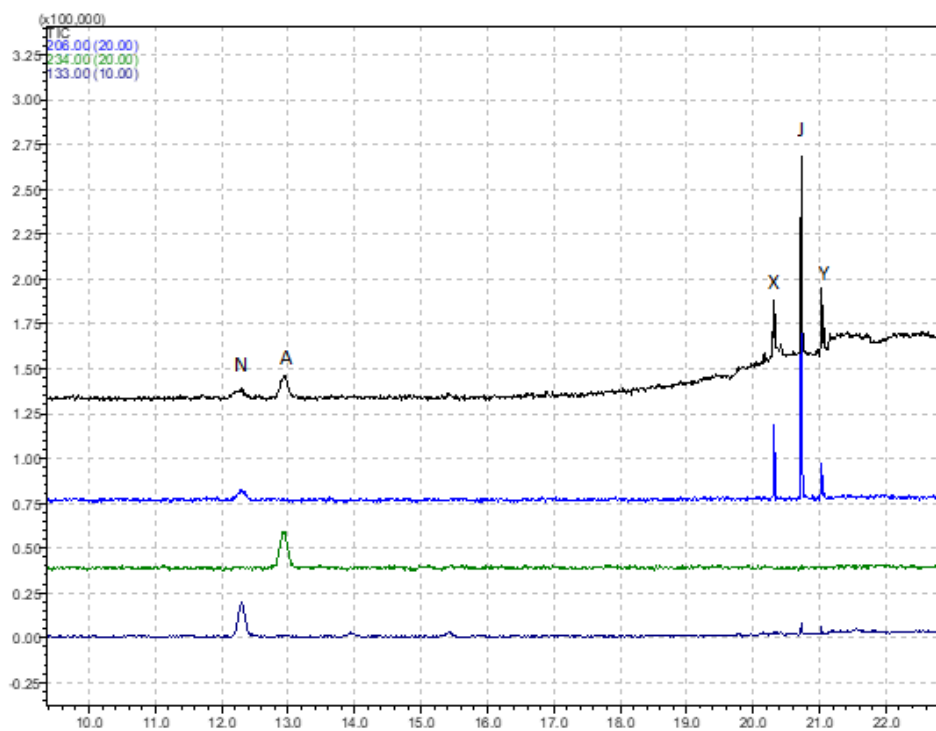
Naším cílem bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodu, díky které bude možné stanovit vybrané nečistoty ibuprofenu. Nečistoty B a F představují polohové izomery ibuprofenu a nečistoty E a J jsou jeho degradační produkty. V českém lékopise se ke stanovení specifikovaných nečistot používá kapalinová chromatografie.(56) Součástí zkoušky je i identifikace nečistot s *ibuprofenem pro identifikace píků CRL* (nečistoty A, J, N). V našem případě jsme použili *ibuprofen pro identifikaci píků CRL* z důvodu, abychom zjistili, jestli nedochází ke koeluci nečistot A a N s námi vybranými nečistotami B, E F a J. Dále jsme si ověřili identifikaci nečistoty J (Obrázek 38). K analýze byl připraven vzorek, jehož složení je popsáno v kapitole 4.3.6. Chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.7 Tabulka 11

Vzorek byl měřen ve FULLSCANU a následně byly získány hodnoty m/z pro měření v režimu SIM 206 (molekulární iont nečistoty A), 234 (derivatizovaná nečistota A), 133 (fragment bez derivatizované karboxylové skupiny nečistoty N). Jak můžeme vidět na Obrázku 39 nečistota N je na koloně SLB-IL 100 zadržována nejkratší dobu, následuje nečistota A a nakonec nečistoty J. Retence je nejspíš ovlivněna teplotou varu jednotlivých nečistot. Derivatizovaná nečistota N 315,85 °C < nečistota A 357,85 °C < nečistota J 411,85 °C. Také jsou separovány neznámé látky, u kterých je v hmotnostním spektru nejčastější fragment 205, 130 a 147. Hmotnostní spektra jednotlivých analytů jsou uvedené s popisky níže (Obrázek 40).



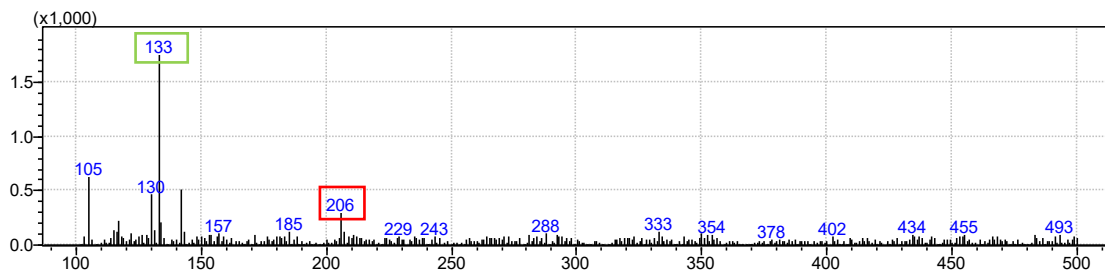


Obrázek 38 Chromatogram k porovnání separace nečistot A, B, E, F, J a N

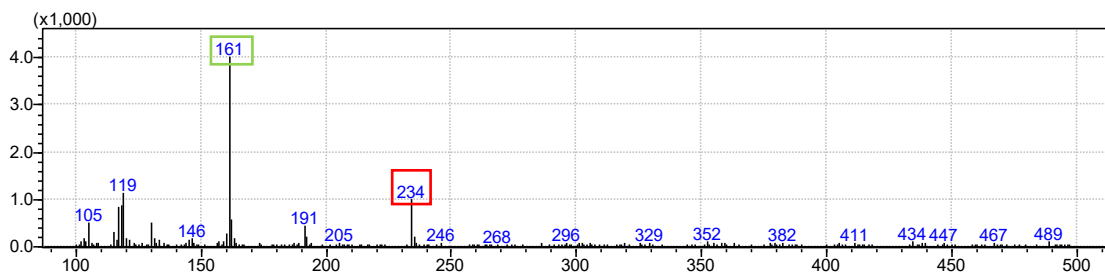


Obrázek 39 Derivatizace lékopisné směsi k identifikaci píků nečistot ibuprofenu (N – nečistota N, A – nečistota A, X – neznámá nečistota, J – nečistota J, Y – neznámá nečistota)

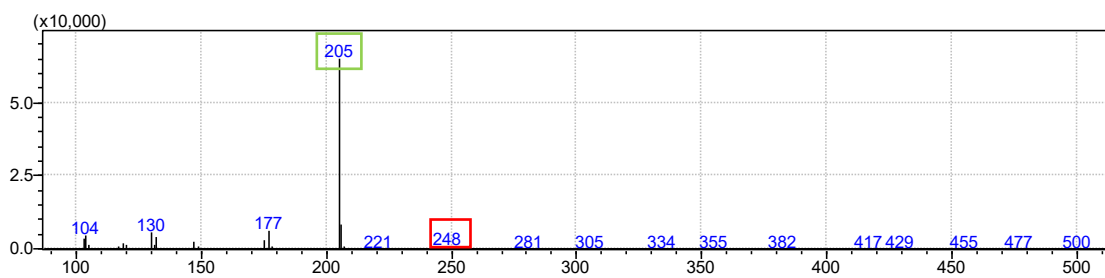
a) Hmotnostní spektrum nečistoty N:



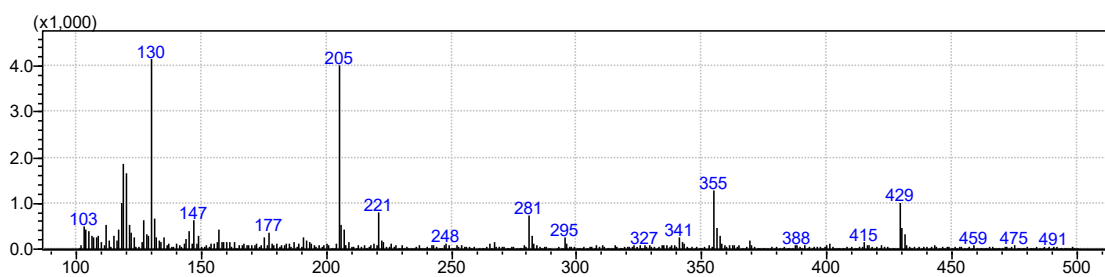
b) Hmotnostní spektrum nečistoty A:



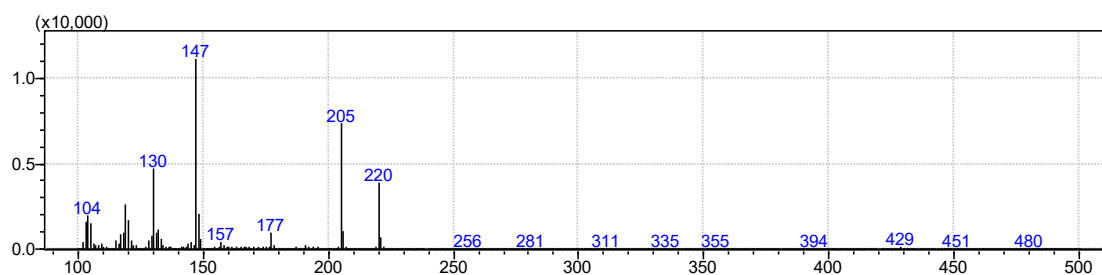
c) Hmotnostní spektrum nečistoty J:



d) Hmotnostní spektrum neznámé látky X:



e) Hmotnostní spektrum neznámé látky Y:



Obrázek 40 Hmotnostní spektra nečistot ibuprofenu – A, N, J a neznámých látek X a Y. zelené označení – hlavní fragment, červené označení – derivatizovaná nečistota

## 5.9 Derivatizace nečistot ibuprofenu v koncentraci odpovídající limitu 0,1 % pomocí ECF

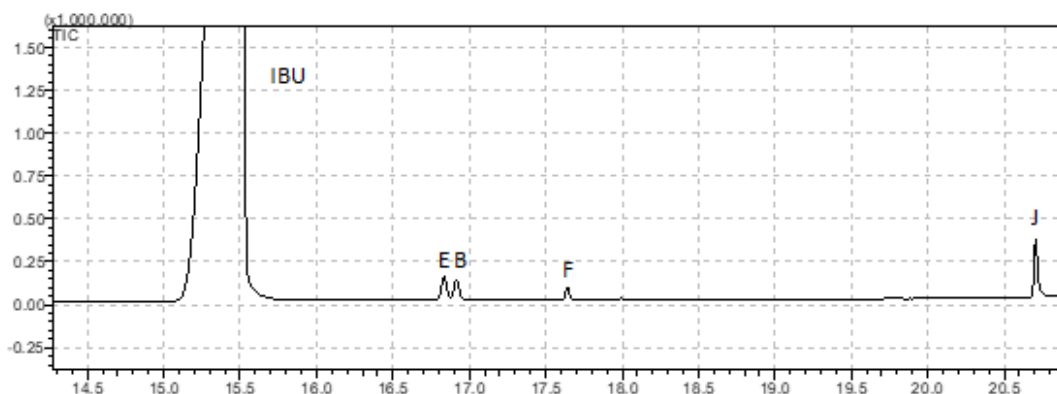
Na koloně SLB-IL-100 byl separován vzorek nečistot ibuprofenu v limitu 0,1 % (dle Lékopisu limit pro nečistotu F). K analýze byl připraven vzorek, jehož složení je popsáno v kapitole 4.3.7. Jediná nečistota E nepodléhá derivatizaci z důvodu chybějící karboxylové funkční skupiny. Chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.7 Tabulka 11. Na Obrázku 41 můžeme vidět, že jednotlivé látky eluují v pořadí: ibuprofen, nečistota E, nečistota B, nečistota F a nečistota J. Na separaci nečistot mají vliv mezimolekulární interakce, teplota varu a polarita analytu. Pokud bychom porovnávali eluci dle teploty varu derivatizovaných nečistot (Tabulka 12). Měla by být eluovaná jako první nečistota E. Na separaci nečistoty E bude mít nejspíš vliv interakce karboxylové skupiny se stacionární fází, popřípadě fenomén teplotního efektu (kdy jsou některé interakce zeslabeny vzrůstající teplotou). (12)

	E	IBU	B	F	J
log (p)	3	4,35	4,44	4,62	3,24
teplota varu	286 °C	358,65 °C	359,09 °C	381,85 °C	411,85 °C

Tabulka 12 Hodnoty log P a teploty varu eluovaných látek zjištěny pomocí programu ChemDraw

Výhodou této metody je separace nečistot do 21 minut. Nevýhodou metody je blízká retence nečistot E a B. V porovnání s lékopisnými metodami (kapalinová a plynová chromatografie) je příprava vzorku jednodušší, rychlejší a doba separace kratší. U HPLC lékopisné metody je nejdelší doba separace nečistoty B a to přibližně 23 minut (u naší

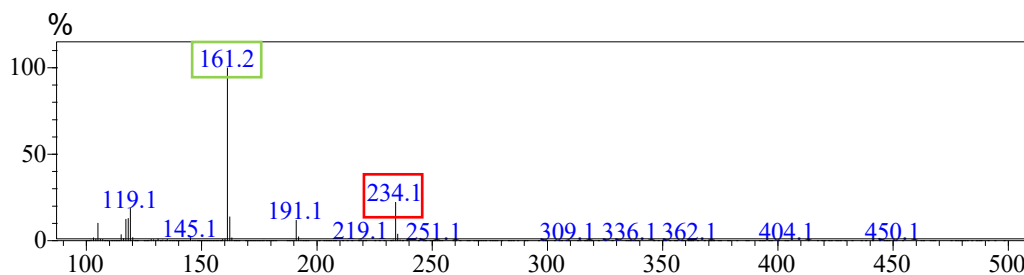
metody 16,9 minut). V porovnání s lékopisnou metodou dochází také k lepší separaci nečistoty B od ibuprofenu. U GC lékopisné metody je předepsaná doba analýzy 34 minut. Tato doba odpovídá dvojnásobku retenčního času nečistoty F. (56)



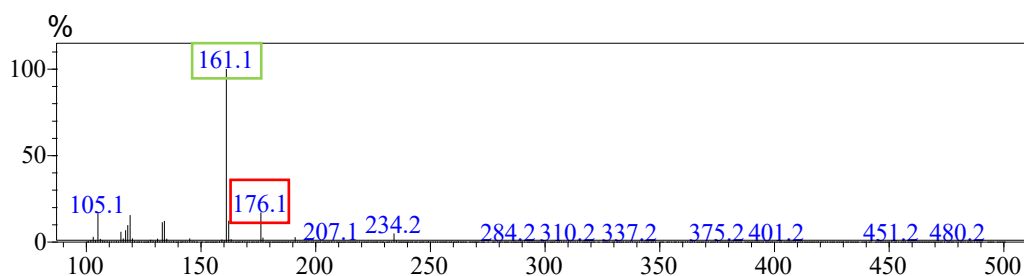
Obrázek 41 Derivatizace nečistot ibuprofenu ethylchloroformiátem v limitu 0,1%

Na Obrázku 42 jsou uvedeny hmotnostní spektra jednotlivých látek. Zeleně jsou uvedeny hlavní fragmenty a červeně fragmenty derivatizované nečistoty ibuprofenu (kromě nečistoty E, u které nedochází k derivatizaci. V červeném rámečku je uveden molekulární iont)

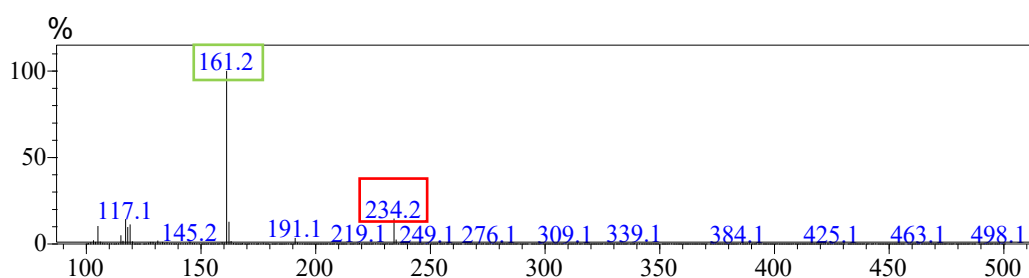
a) Hmotnostní spektrum ibuprofenu:



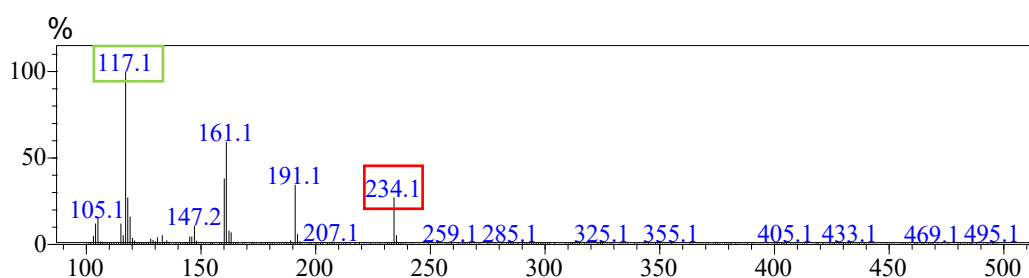
b) Hmotnostní spektrum nečistoty E



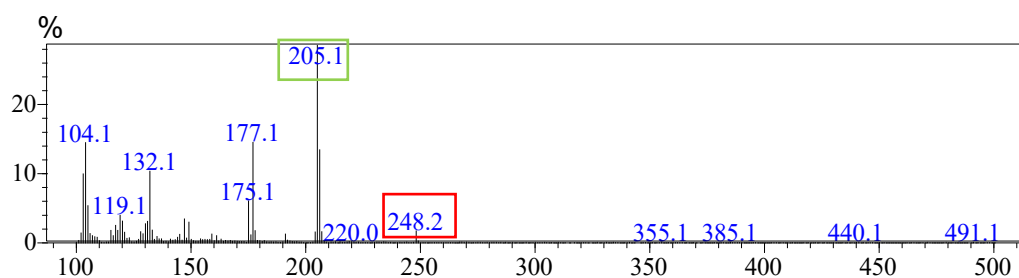
c) Hmotnostní spektrum nečistoty B



d) Hmotnostní spektrum nečistoty F



e) Hmotnostní spektrum nečistoty J



Obrázek 42 Hmotnostní spektra analyzovaných látek

## 5.10 Vybrané validační parametry

Validace metody znamená prokázání toho, že použitý postup je vhodný pro zamýšlené použití. V experimentální práci jsme se zaměřili na linearitu, opakovatelnost, správnost a limit detekce a kvantifikace. (1)

### 5.10.1 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat odezvu, které je přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně z pěti různých koncentrací.(1)

Linearita byla hodnocen na základě závislosti plochy píků nečistot E, B, F, J na koncentraci. Vzorky byly připraveny i s přidavkem ibuprofenu, který byl v koncentraci 1 mg/ml. Obsah nečistot v roztoku na úrovni 0,1 % (nečistota B,

nečistota F) a 0,15 % (nečistota E a J) částečně odpovídá lékopisnému limitu nečistot. Lékopis uvádí povolené množství specifických nečistot (A, J a N) 0,15 %, nespecifikovaných nečistot 0,05 % a 0,1 % pro nečistotu F. (56)

Celkem bylo připraveno 6 vzorků s koncentrací nečistot B, E, F a J v rozmezí 40-120 % povoleného obsahu nečistot. Každý vzorek byl analyzován celkem třikrát.

Složení jednotlivých vzorků je popsáno v kapitole 4.3.9. Chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.7 Tabulka 11

Nečistota	B	E	F	J
Korelační faktor	0,9971	0,9955	0,9997	0,9963
Rovnice příjímek	$y = 67940x + 1369$	$y = 35448x + 48080$	$y = 31527x - 12670$	$y = 152804x + 138621$
Koncentrační rozmezí $\mu\text{g/ml}$	0,6-1,4	0,6-2,1	0,8-1,4	0,6-2,1

Tabulka 13 Výsledky z měření linearity rozsahu metody

Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 13. Nečistota B má lineární rozsah v limitu 60-140 % (0,6-1,4  $\mu\text{g/ml}$ ), nečistota E 40-140 % (0,6-2,1  $\mu\text{g/ml}$ ), nečistota F 80-140 % (0,8-1,4  $\mu\text{g/ml}$ ) a nečistota J 40-140 % (0,6-2,1  $\mu\text{g/ml}$ ). Z měření vyplývá, že metodu lze použít pro limitní test nečistot ibuprofenu.

#### 5.10.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost hodnotí opakovatelnost navrženého pracovního postupu, který se provede jedním pracovníkem se stejnými činidly na stejném přístroji. (1)

K vyhodnocení opakovatelnosti měření bylo připraveno šest identických vzorků, jejichž složení je popsáno v kapitole 4.3.10. Chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.7 Tabulka 11. Každý vzorek byl měřen třikrát.

V Tabulce 14 jsou uvedeny průměrné hodnoty ploch pod píkem analytů a spočteny relativní směrodatné odchylky měření.

	Průměr plochy pod píkem nečistoty E	Průměr plochy pod píkem nečistoty B	Průměr plochy pod píkem nečistoty F	Průměr plochy pod píkem nečistoty J
vz1	139851	138619,67	40788	539836
vz2	171447,67	136290,33	36412,33	800926
vz3	159574	164156	41734,67	567031,33
vz4	185104	158408	48028,67	713053
vz5	160057,67	147398	46652,67	702117,33
vz6	149300	161459	42717,33	740004
průměr	160889,1	151055,2	42722,3	677161,3
směr.odch.	15982,3	11999,6	4198,5	102141,8
rel.směr.odch.	9,9	7,9	9,8	15,1

Tabulka 14 Opakovatelnost derivatizačního postupu s využitím ECF sledovaných nečistot a ibuprofenu o koncentraci 0,1% (pro nečistoty B a F) a 0,15% (pro nečistoty E a J)

Přesnost metody pro nečistoty ibuprofenu se pohybuje v rozmezí 7,9 – 15,1 %. Nejvyšší hodnota relativní směrodatné odchylky je u nečistoty J a to 15,1 %. V Tabulce 14 můžeme vidět, že právě u vzorků vz1 a vz6 je rozdíl plochy pod píkem značný. Je to dáno nejspíše nástřikem vzorku. Pro snížení variability by mohl posloužit vhodný vnitřní standard. Dále byla porovnána odezva detektoru pro stejné koncentrace nečistot a ibuprofenu (1 µg/ml). Spočítané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 15. Bylo zjištěno, že největší odezvu detektoru má nečistota J a následují analyty v tomto pořadí: E>B>F>IBU.

	IBU	F	B	E	J
Plocha pod píkem u koncentrace 1 µg/ml	9332	18857	69309	83528	291425
Odezvový faktor vůči ibuprofenu		2,02	7,43	8,95	31,23

*Tabulka 15 Porovnání odezvy detektoru pro stejnou koncentraci nečistot a ibuprofenu (1 µg/ml) a odezvový faktor jednotlivých nečistot vůči ibuprofenu*

### 5.10.3 Správnost metody

Správnost metody (recovery) nám vyjadřuje míru shody mezi nalezenou a skutečnou hodnotou. (1)

Pro výpočet správnosti metody byly použity průměrné hodnoty ploch pod píkem jednotlivých nečistot z Tabulky 14 a tyto hodnoty byly dosazeny do rovnice příjímek (Tabulka 13). Výsledné koncentrace byly porovnány se skutečnými koncentracemi analytu. Bylo zjištěno, že plochy pod píkem stejných koncentrací jsou vyšší v porovnání s plochou analytu z měření linearitu. Vzorky byly měřeny v různé dny, a proto plocha píků byla nejspíš ovlivněna rozdílnou ionizací. Toto vysvětlení je podpořeno i uspokojivými výsledky z testu opakovatelnosti. Pro porovnání měření mezi jednotlivými dny by bylo vhodné použít vnitřní standard, který by rozdíl v ionizaci kompenzoval. Na základě těchto hodnot správnost metody nelze posoudit.

### 5.10.4 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce (LOD) vyjadřuje citlivost metody. Určuje nejnižší detekovatelnou koncentraci látky. Limit detekce se vypočítá jako koncentrace analyzované látky, kdy poměr signálu k šumu má hodnotu 3. (1)

Pro výpočet limitu detekce a kvantifikace nečistot ibuprofenu byly použity chromatogramy nečistot B, E, F, J, jejichž postup přípravy vzorku je uveden výše jako v kapitole 4.3.11. Chromatografické podmínky měření jsou uvedeny v kapitole 5.7

Tabulka 11. Výsledné chromatogramy byly v režimu SIM pro dominantní fragmenty nečistot (kapitola 5.3). Výsledné LOD u nečistot jsou uvedeny v Tabulce 16.

Limit kvantifikace (LOQ) také vyjadřuje citlivost metody. Určuje nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Limit kvantifikace se vypočítá jako koncentrace analyzované látky, kdy poměr signálu k šumu má hodnotu 10. (1) Výsledné LOD u nečistot jsou uvedeny v Tabulce 16.

Pro snížení limitu detekce a kvantifikace by bylo k zvážení použití vyšší navážky ibuprofenu nebo zdvojnásobit nástřik.

	B	E	F	J
LOD	0,24 µg/ml	0,29 µg/ml	0,33 µg/ml	0,17 µg/ml
LOQ	0,78 µg/ml	0,97 µg/ml	1,1 µg/ml	0,58 µg/ml

Tabulka 16 Vypočítané LOD a LOQ pro nečistoty ibuprofenu B, E, F a J



## 6 Závěr

V první části experimentální práce jsme se zaměřili na volbu vhodného derivatizačního činidla. Ibuprofen byl derivatizován pomocí alkylchloroformiátu (isobutylchloroformiát, ethylchloroformiát, heptafluorochloroformiát). Nejkratší doba separace derivatizovaného ibuprofenu byla u heptafluorochloroformiátu, dále isobutylchloroformiátu a nakonec ethylchloroformiátu. V porovnání s ostatními derivatizačními činidly byl ibuprofen derivatizovaný beze zbytku pouze za použití ethylchloroformiátu. Z tohoto důvodu bylo použití heptafluorochloroformiátu a isobutylchloroformiátu v dalších experimentech vyloučeno.

Stacionární fáze na bázi iontové kapaliny 1,9-di(3-vinyl-imidazolium)nonan bis(trifluormethyl)sulfonyl imidu má dostatečnou selektivitu pro separaci nečistot ibuprofenu po derivatizaci ethylchloroformiátem. Nečistoty ibuprofenu byly separovány do 21 minut. Dále bylo zjištěno, že za daných podmínek lze separovat kromě nečistot B, E, F a J i nečistoty A a N.

Dále byly zkoušeny modifikace derivatizačního postupu (48). Byl testován vliv následujících parametrů na derivatizaci: množství přidaného alkoholu, rozpouštědlo ibuprofenu a setrvání vzorku v ultrazvukové lázni na derivatizaci. Pokud bylo množství alkoholu vyšší, došlo spíše ke snížení výtěžnosti derivatizace. Rozpouštědlo ibuprofenu a prodloužení doby vzorku v ultrazvukové lázni nemělo na derivatizaci a následnou analýzu vliv.

Při stanovení správnosti metody bylo zjištěno, že se nejspíš liší ionizace analytu u vzorků, které byly měřeny v rozdílné dny. Proto by bylo vhodné pro porovnání výsledků použití vnitřního standardu.

Přesnost metody pro nečistoty ibuprofenu, která se vyjadřuje relativní směrodatnou odchylkou, byla v rozmezí z 7,9 – 15,1 %. Metoda je lineární pro nečistoty v rozsahu koncentrací B 0,6-1,4 µg/ml, E 0,6-2,1 µg/ml, F 0,8- 1,4 µg/ml a J 0,6-2,1 µg/ml. Limit kvantifikace nečistot ibuprofenu byl následující – B 0,78 µg/ml, E 0,97 µg/ml, F 1,1 µg/ml a J 0,58 µg/ml.

U metody derivatizace nečistot ibuprofenu by bylo vhodné zvýšit navážku ibuprofenu. Snížil by se tím limit detekce a kvantifikace. Metoda je rychlá a nenáročná ve srovnání s lékopisnou metodou ke stanovení nečistoty F. Její výhodou je také současné stanovení degradačních produktů (E, J) i polohových izomerů ibuprofenu (A, B, F).

## 7 Seznam obrázků a tabulek

OBRÁZEK 1 PLYNOVÝ CHROMATOGRAM (PŘEVZATO A UPRAVENO (3)) .....	3
OBRÁZEK 2 INJEKTOR ((PŘEVZATO A UPRAVENO (7)) .....	5
OBRÁZEK 3 TYPY KAPILÁRNÍCH KOLON (PŘEVZATO A UPRAVENO (3)).....	6
OBRÁZEK 4 POLYSILOXANOVÁ SF (12).....	7
OBRÁZEK 5 POLYETHYLENGLYKOVÁ SF (12) .....	7
OBRÁZEK 6 ZÁKLADNÍ ČÁSTI HMOVNOSTNÍHO SPEKTROMETRU (4).....	10
OBRÁZEK 7 PŘÍKLAD HMOVNOSTNÍHO SPEKTRA DERIVATIZOVANÉHO IBUPROFENU Z EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE (OSA X-M/Z, OSA Y-INTENZITA SIGNÁLU) .....	11
OBRÁZEK 8 HMOVNOSTNÍ ANALYZÁTOR – KVADRUPÓL (PŘEVZATO A UPRAVENO)(23).....	13
OBRÁZEK 9 BĚŽNĚ POUŽÍVANÉ KATIONTY V IONTOVÝCH KAPALINÁCH (PŘEVZATO A UPRAVENO(34)) .....	16
OBRÁZEK 10 BĚŽNĚ POUŽÍVANÉ ANIONTY V IONTOVÝCH KAPALINÁCH (PŘEVZATO A UPRAVENO(34)) .....	17
OBRÁZEK 11 CHEMICKÁ STRUKTURA A HODNOTA CELKOVÉ POLARITY VYBRANÝCH KOMERČNĚ DOSTUPNÝCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍ GC (POLARITA VYPOČTENÁ NA ZÁKLADĚ CELKOVÝCH HODNOT POLARITY REF. (41) .....	20
OBRÁZEK 12 FENOMÉN TEPLOTNÍHO EFEKTU U SLB-IL 100(12) .....	21
OBRÁZEK 13 CHEMICKÁ STRUKTURA SLB-IL100 (41) .....	23
OBRÁZEK 14 OBECNÁ CHEMICKÁ REAKCE S DERIVATIZAČNÍM ČINIDLEM (42) .....	24
OBRÁZEK 15 SCHÉMA CHEMICKÉ REAKCE – SILYLACE (X= CHLORID)(44).....	24
OBRÁZEK 16 OBECNÁ ALKYLČNÍ REAKCE (X= HALOGEN, ALKYL OVÝ SKUPINA R, H= DALŠÍ ALKYL OVÁ SKUPINA R).....	25
OBRÁZEK 17 PŘÍKLAD CHEMICKÉ REAKCE - ACYLACE.....	26
OBRÁZEK 18 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ STRUKTURA ALKYLCHLOROFORMIÁTU .....	26
OBRÁZEK 19 REAKČNÍ SCHÉMA CHEMICKÉ REAKCE ALKYLCHLOROFORMIÁTU (48).....	27
OBRÁZEK 20 ROZDĚLENÍ NSAID DLE CHEMICKÉ STRUKTURY (53) .....	28
OBRÁZEK 21 CHEMICKÝ VZOREC IBUPROFENU (56) .....	30
OBRÁZEK 22 SYNTÉZA IBUPROFENU PRVNÍ METODOU (57) .....	31
OBRÁZEK 23 SYNTÉZA IBUPROFENU DRUHOU METODOU (57) .....	31
OBRÁZEK 24 SYNTÉZA IBUPROFENU TŘETÍ METODOU (57) .....	31
OBRÁZEK 25 SYNTÉZA IBUPROFENU ČTVRTOU METODOU (57).....	32
OBRÁZEK 26 SYNTÉZA IBUPROFENU PÁTOU METODOU (57) .....	32
OBRÁZEK 27 DERIVATIZACE NEČISTOTY F (62) .....	34
OBRÁZEK 28 REAKČNÍ SCHÉMA DERIVATIZACE IBUPROFENU (PŘEVZATO A UPRAVENO (48)) .....	41
OBRÁZEK 29 POROVNÁNÍ CHROMATOGRAFICKÉHO CHOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH DERIVÁTŮ NA KOLONĚ SLB-IL 100 .....	47
OBRÁZEK 30 HMOVNOSTNÍ SPEKTRA DERIVÁTŮ IBUPROFENU.....	48
OBRÁZEK 31 VZNIK FRAGMENTU 161 .....	48
OBRÁZEK 32 VLIV ZMĚNY TEPLoty NA MNOŽSTVÍ NEZDERIVATIZOVANÉHO IBUPROFENU .....	50
OBRÁZEK 33 DERIVATIZACE IBUPROFENU V ZÁVISLOSTI NA SETRVÁNÍ VZORKU V ULTRA ZVUKOVÉ LÁZNI. ....	52
OBRÁZEK 34 VLIV MNOŽSTVÍ ALKOHOLU NA DERIVATIZACI IBUPROFENU ECF .....	53
OBRÁZEK 35 VLIV ROZPOUŠTĚDLA NA DERIVATIZACI IBUPROFENU ECF .....	54
OBRÁZEK 36 LINEÁRNÍ ZÁVISLOST PLOCHY PÍKU NA KONCENTRACI IBUPROFENU.....	55

OBRÁZEK 37 LINEARITA IBUPROFENU V ZÁVISLOSTI NA MNOŽSTVÍ NÁSTRĪKU .....	55
OBRÁZEK 38 CHROMATOGRAM K POROVNÁNÍ SEPARACE NEČISTOT A, B, E, F, J A N .....	57
OBRÁZEK 39 DERIVATIZACE LÉKOPISNÉ SMĚSI K IDENTIFIKACI PÍKŮ NEČISTOT IBUPROFENU (N – NEČISTOTA N, A – NEČISTOTA A, X – NEZNÁMÁ NEČISTOTA, J – NEČISTOTA J, Y – NEZNÁMÁ NEČISTOTA) .....	57
OBRÁZEK 40 HMO TNOSTNÍ SPEKTRA NEČISTOT IBUPROFENU – A, N, J A NEZNÁMÝCH LÁTEK X A Y. ZELENÉ OZNAČENÍ – HLAVNÍ FRAGMENT, ČERVENÉ OZNAČENÍ – DERIVATIZOVANÁ NEČISTOTA .....	59
OBRÁZEK 41 DERIVATIZACE NEČISTOT IBUPROFENU ETHYLCHLOROFORMIÁTEM V LIMITU 0,1% .....	60
OBRÁZEK 42 HMO TNOSTNÍ SPEKTRA ANALYZOVANÝCH LÁTEK .....	61
TABULKA 1 SPLITOVACÍ POMĚRY DLE PRŮMĚRU KAPILÁRNÍ KOLONY (6) .....	4
TABULKA 2 KOMERČNĚ DOSTUPNÉ KOLONY S IONTOVOU KAPALINOU JAKO SF (12) .....	22
TABULKA 3 IBUPROFEN A JEHO NEČISTOTY POUŽÍVANÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE .....	36
TABULKA 4 TECHNICKÁ DATA TESTOVANÉ KOLONY .....	39
TABULKA 5 DERIVATIZAČNÍ ČINIDLA A PRODUKTY DERIVATIZACE IBUPROFENU .....	40
TABULKA 6 SOUHRNNÁ TABULKA K PŘÍPRAVĚ VZORKŮ V LIMITU 40-140 % NEČISTOT .....	44
TABULKA 7 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY – POROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH DERIVATIZAČNÍCH ČINIDEL NA KOLONĚ SLB-IL-100 .....	46
TABULKA 8 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY – VLIV ZMĚNY TEPLoty V NÁSTRĪKOVÉM PROSTORU NA MNOŽSTVÍ NEZDERIVATIZOVANÉHO IBUPROFENU .....	49
TABULKA 9 PŘEHLED VLASTNOSTÍ A HLAVNÍCH FRAGMENTŮ NEČISTOT IBUPROFENU .....	51
TABULKA 10 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY – DERIVATIZACE IBUPROFENU V ZÁVISLOSTI NA SETRVÁNÍ VZORKU V ULTRAZVUKOVÉ LÁZNI. ....	52
TABULKA 11 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY MĚŘENÍ .....	54
TABULKA 12 HODNOTY LOG P A TEPLoty VARU ELUOVANÝCH LÁTEK ZJIŠTĚNY POMOCÍ PROGRAMU CHEMDRAW .....	59
TABULKA 13 VÝSLEDKY Z MĚŘENÍ LINEARITY ROZSAHU METODY .....	62
TABULKA 14 - OPAKOVATELNOST DERIVATIZAČNÍHO POSTUPU S VYUŽITÍM ECF SLEDOVANÝCH NEČISTOT A IBUPROFENU O KONCENTRACI 0,1% (PRO NEČISTOTY B A F) A 0,15% (PRO NEČISTOTY E A J) .....	62
TABULKA 15 POROVNÁNÍ ODEZVY DETEKTORU PRO STEJNOU KONCENTRACI NEČISTOT A IBUPROFENU (1µg/ML) A ODEZVOVÝ FAKTOR JEDNOTLIVÝCH NEČISTOT VŮČI IBUPROFENU .....	63
TABULKA 16 VYPOČÍTANÉ LOD A LOQ PRO NEČISTOTY IBUPROFENU B, E, F A J .....	64

## 8 Seznam zkratek

ACN – acetonitril

BOPA - (2RS)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová kyselina

BSA - N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid

BSTFA - N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetami

COX - cyklooxygenáza

COX-1 - cyklooxygenáza 1

COX-2 - cyklooxygenáza 2

EAN - ethylammonium nitrát

ECD – electron capture detector

ECF – ethylchloroformiát

FID – flame ionization detector

FT-ICR - orbitrap a iontová cyklotronová rezonance

GLC – plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází

GSC – plynová chromatografie

IBF - 1-(4-isobutylfenyl)ethan-1-on

IbOH – isobutylalkohol

IBU – ibuprofen

ICF – isobutylchloroformiát

IL – iontové kapaliny

IT - sférická iontová past

LIT - lineární iontová past

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

MCF – methylchloroformiát

MeOH – methanol

MSD – mass selective detector

NSAID – nesteroidní antiflogistika

HFBCF – heptafluorobutylchloroformiát

HFBOH– heptafluorobutan-1-ol

PLOT - porous layer open tubular

PYR – pyridin  
QP - kvadрупól  
RCF – alkylchloroformiát  
ROH - alkohol  
SCOT - support-coated open tubular  
SF – stacionární fáze  
TCD – thermal conductivity detector  
TCEP - 1,2,3-tris(2-kyanoethoxypropan)  
TFA – trifluoroacetamid  
TMCS - trimethylchlorosilan  
TMS – trimethylsilyl  
TOF - analyzátor doby letu  
WCOT - wall- coated open tubular

## 9 Citovaná literatura

1. KLIMEŠ, J. *Kontrolně- analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd. B.m.: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
2. HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. Boston: McGraw-Hill, 2000. ISBN 9780072375473.
3. MCNAIR, H. *Introduction to GC - Chromedia* [online]. 2020 [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHonOvmOIIeCzB&subNav=tlpbfDsHonOvmOIIeCzBsB>
4. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 3. vyd. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2003. ISBN 9788086369075.
5. OPEKAR, F a Univerzita KARLOVA. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2010. Učební texty. ISBN 9788024617756.
6. CHASTEEN, T. G. Split / Splitless Gas Chromatography Injection. *Department of Chemistry, Sam Houston State University* [online]. 2000. Dostupné z: [https://www.shsu.edu/~chm\\_tgc/primers/pdf/GC.pdf](https://www.shsu.edu/~chm_tgc/primers/pdf/GC.pdf).
7. BHANOT, D. *Split or Splitless Injection in Capillary Gas Chromatography* [online]. 2014 [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <https://lab-training.com/2014/02/06/benefits-of-split-splitless-injection-in-capillary-gas-chromatography/>
8. POOLE, C. *Gas Chromatography*. Amsterdam: Elsevier Science, 2012. Handbooks in Separation Science. ISBN 9780123855404.
9. *How to Choose a Capillary GC Column | Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/column-selection.html?gclid=Cj0KCQjw6575BRCQARIsAMPksPAdAQc4ZO\\_cCRGxNAZH1Opgm\\_aGxuFckVdiD9ZMqnLwIjSSrJMwDcaAr4cEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/column-selection.html?gclid=Cj0KCQjw6575BRCQARIsAMPksPAdAQc4ZO_cCRGxNAZH1Opgm_aGxuFckVdiD9ZMqnLwIjSSrJMwDcaAr4cEALw_wcB)
10. CAZES, J. *Analytical Instrumentation Handbook*. New York: CRC Press, 2004. ISBN 9780849390395.
11. KUČERA, R. *Plynová chromatografie*. 2015.
12. SIGMA-ALDRICH. *Supelco Ionic Liquid GC Columns - Introduction to the Technology* [online]. 2014. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/1/ionic\\_liquid\\_gc\\_columns.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/1/ionic_liquid_gc_columns.pdf)
13. LLOYD, D. Detectors used in Gas chromatography. *Delloyd's Lab-Tech Chemistry* [online]. 2000 [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/detectors.html>
14. *Plynová chromatografie s tepelně vodivostním detektorem (GC-TCD)* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gc-with-thermal-conductivity-detector-gc-tcd-analytical-laboratories.aspx?itemId=651A80DACEBF49F4993E7C447B42808E>

15. *The Linde group - Tepelně vodivostní detektor* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <https://www.linde-gas.cz/cs/index.html?files=tcm:0979-15733,tcm:979-15733,tcm:79-15733>
16. CHUDOBA, J. *Interpretace MS spekter - Centrální laboratoře VŠCHT Praha* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <https://clab.vscht.cz/ms/interpretace-ms>
17. PAVIA, D L, G M LAMPMAN, G S KRIZ a J A VYVYAN. *Introduction to Spectroscopy*. 5. vyd. Stamford: Cengage Learning, 2014. ISBN 9781285460123.
18. GREAVES, J. a J. ROBOZ. *Mass spectrometry for the novice*. Spojené státy americké: Boca Raton, 2014. ISBN 978-1-4200-9418-3.
19. *Introduction: What is Mass ? : SHIMADZU (Shimadzu Corporation)* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <https://www.shimadzu.com/an/gcms/support/fundamentals/what.html>
20. MILATA, V a P SEGL'A. *Spektrálne metódy v chémii*. B.m.: Slovenská technická univerzita, 2004. Edícia vysokoškolských učebníc / Slovenská technická univerzita. Fakulta chemickej a potravinárskej technológie. ISBN 9788022720496.
21. GAUGLITZ, G a T VO-DINH. *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: Wiley, 2006. ISBN 9783527605026.
22. KOVAŘÍKOVÁ, P. a J. STARIAT. *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie* [online]. 2013. Dostupné z: doi:CZ.1.07./2.2.00/28.0194
23. KORNIENKO, O., P. REILLY, W. B. WHITTEN a J. M. RAMSEY. Micro ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 1999, **13**(1), 50–53. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19990115)13:1<50::AID-RCM449>3.0.CO;2-K
24. HOLČAPEK, M. *Hmotnostní analyzátory. Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice*. 2015.
25. BOHÁČ, M. a A. INGENDOH. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací a její využití jako nejflexibilnější hmotnostě spektrometrické metody v proteomice. *Chemické listy*. 2005, **99**, 943–951.
26. CHUDOBA, J. *Hmotnostní spektrometrie* [online]. [vid. 2020-08-19]. Dostupné z: [chemistry.ujep.cz](http://chemistry.ujep.cz)
27. HARVEY, D J. GAS CHROMATOGRAPHY | Mass Spectrometry. In: Paul WORSFOLD, Alan TOWNSHEND a Colin B T - *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* POOLE, ed. [online]. Oxford: Elsevier, 2005, s. 106–116. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00223-5>
28. EGOROVA, K. S., E. G. GORDEEV a V. P. ANANIKOV. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chemical Reviews* [online]. 2017, **117**(10), 7132–7189. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00562
29. WELTON, T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chemical Reviews* [online]. 1999, **99**(8), 2071–2083 [vid. 2020-08-03]. ISSN 00092665. Dostupné z: doi:10.1021/cr980032t
30. PRODIUS, D. a A. V. MUDRING. Rare earth metal-containing ionic liquids. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2018, **363**, 1–16. ISSN 00108545.

- Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2018.02.004
31. HANUŠEK, J. Iontové kapaliny - nový směr v zelené chemii. *Chemické listy*. 2005, **99**, 263–294.
  32. ČERNÁ, I., P. KLUSOŇ, M. DROBEK, T. CAJTHAML a L. BARTEK. Iontové kapaliny - Úvahy o jejich využití v homogenní asymetrické katalýze. *Chemické Listy*. 2007, **101**(12), 994–1001. ISSN 00092770.
  33. MARSH, K. N., J. A. BOXALL a R. LICHTENTHALER. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. In: *Fluid Phase Equilibria* [online]. 2004. ISSN 03783812. Dostupné z: doi:10.1016/j.fluid.2004.02.003
  34. ZHANG, M., A. K. MALLIK, M. TAKAFUJI, H. IHARA a H. QIU. Versatile ligands for high-performance liquid chromatography: An overview of ionic liquid-functionalized stationary phases. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **887**, 1–16. ISSN 18734324. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.04.022
  35. MACFARLANE, D. R., M. KAR a J. M. PRINGLE. *An Introduction to Ionic Liquids*. Germany: John Wiley & Sons, 2017. ISBN 978-3-527-34002-6.
  36. WANG, B., L. QIN, T. MU, Z. XUE a G. GAO. Are Ionic Liquids Chemically Stable? *Chemical Reviews* [online]. 2017, **117**(10), 7113–7131. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00594
  37. LIAW, Horng Jang, Shih Kai HUANG, Hao Ying CHEN a Sheng Nan LIU. Reason for ionic liquids to be combustible. In: *Procedia Engineering* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, 2012, s. 502–506. ISSN 18777058. Dostupné z: doi:10.1016/j.proeng.2012.08.193
  38. KRUPČÍK, J., R. GOROVENKO a I. ŠPÁNIK. On the use of ionic liquid capillary columns for analysis of aromatic hydrocarbons in low-boiling petrochemical products by one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, **1301**, 225–236. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.05.075
  39. YAO, C. a J. ANDERSON. Retention characteristics of organic compounds on molten salt and ionic liquid-based gas chromatography stationary phases. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(10), 1658–1712 [vid. 2020-08-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.12.001
  40. ŽITKA, J. a Z. PIENTKA. Iontové kapaliny a jejich polymerní analogy: Nové membránové materiály. *Chemické Listy*. 2017, **111**(3), 192–196. ISSN 12137103.
  41. NAN, H. a J. ANDERSON. Ionic liquid stationary phases for multidimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2018, **105**, 367–379.
  42. ČERNÁ, K., Š. DUŠKOVÁ, J. MRÁZ, L. ŘIMNÁČOVÁ a P. ŠIMEK. Chemické derivatizace s alkyl - chlorformiáty a jejich využití v hygieně. *Konzultační den SZÚ* [online]. 2013. Dostupné z: [www.szu.cz/uploads/Vzdelavaci\\_akce/CHPPL/KD130919/6\\_Cerna.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Vzdelavaci_akce/CHPPL/KD130919/6_Cerna.pdf)
  43. MICHEL, F. Derivatization of polar compounds for GC. *Sigma-Aldrich.Com* [online]. 2010. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/promo\\_NOT\\_INDEXED/General\\_Information/1/gc-06-derivatization-gc.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General_Information/1/gc-06-derivatization-gc.pdf)
  44. ŠIMEK, P. a P. HUŠEK. Vysokoúčinné separace aminokyselin a příbuzných látek. *VŠCHT* [online]. [vid. 2020-08-03]. Dostupné



- z: <https://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Simek-Husek.pdf>
45. Derivatization Reagents. *Sigma-Aldrich.Com* [online]. 2011 [vid. 2020-08-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization Rgts brochure.pdf>
  46. SELLERS, K. a Restek CORPORATION. Why Derivatize ? Improve GC Separations with Contact your Restek [online]. 2010, 2–3. Dostupné z: <http://www.restek.com/pdfs/CFTS1269.pdf>
  47. CITOVÁ, I., R. SLADKOVSKÝ a P. SOLICH. Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, **573–574**, 231–241. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2006.04.077
  48. HUŠEK, P. a P. ŠIMEK. Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 2006, **2**(1). Dostupné z: doi:10.2174/157341206775474007
  49. DETTMER-WILDE, Katja a Werner ENGEWALD. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference* [online]. 2014. ISBN 978-3-642-54639-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-54640-2
  50. PAVELKA, K. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Grada, 2005. ISBN 9788024704593.
  51. DOSEDĚL, M. Nežádoucí účinky a lékové interakce nesteroidních antiflogistik a jejich management pohledem farmaceuta. *Praktické lékárenství*. 2014, **10**(3), 90–94. ISSN 1801-2434.
  52. LINCOVÁ, D a H FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007. ISBN 9788072623730.
  53. DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum, 2013. Učební texty. ISBN 9788024623825.
  54. RAINSFORD, K. D. *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. Philadelphia: Taylor and Francis, 1999. ISBN 9780748406944.
  55. RAINSFORD, K D. *Ibuprofen: Discovery, Development and Therapeutics*. Germany: Wiley, 2015. ISBN 9781118743607.
  56. *Český lékopis 2017*. Praha: Grada, 2017. ISBN 859-404-924-045-6.
  57. BRITAIN, H G. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. San Diego: Elsevier Science, 2001. ISSN. ISBN 9780080861234.
  58. CAVIGLIOLI, G., P. VALERIA, P. BRUNELLA, C. SERGIO, A. ATTILIA a B. GAETANO. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, **30**(3). ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(02)00400-4
  59. RUGGERI, G., G. GHIGO, V. MAURINO, C. MINERO a D. VIONE. Photochemical transformation of ibuprofen into harmful 4-isobutylacetophenone: Pathways, kinetics, and significance for surface waters. *Water Research* [online]. 2013, **47**(16), 6109–6121. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2013.07.031
  60. *The European pharmacopoeia*. Ninth edit. B.m.: Published in accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia / Council of Europe, 2016. ISBN 9789287181275.
  61. MINISTRY, Health. *The British Pharmacopoeia*. London: Stationery Office, 2004.

62. KALAFUT, P., R. KUČERA, J. KLIMEŠ a J. SOCHOR. An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **49**(5), 1150–1156. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.02.015
63. ŠTENGL, V. a J. ŠUBRT. Výkonový ultrazvuk a jeho aplikace. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**, 324–327. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2128/2128>