

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE  
A KONTROLY LÉČIV**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Využití plynové chromatografie v kontrole léčiv II

Hradec Králové 2008

Klára Špalová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Klára Špalová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, PharmDr. Radimovi Kučerovi Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování i sepisování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě během sepisování diplomové práce ochotně pouštěli ke svým počítačům.

## Obsah

1	ÚVOD	4
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Definice a rozdělení chromatografických metod	7
2.2	Historie plynové chromatografie	9
2.3	Definice a princip plynové chromatografie	10
2.4	Obecná teorie chromatografického děje	11
2.5	Kvalitativní a kvantitativní analýza chromatogramu	14
2.6	Schéma a popis základních částí plynového chromatografu	16
2.6.1	Zdroj nosného plynu	16
2.6.2	Regulátory tlaku a průtoku	16
2.6.3	Injektor	16
2.6.4	Kolona	17
2.6.5	Detektory	18
2.6.6	Řídící jednotka	20
2.7	Stabilitní zkoušky	21
2.7.1	Stresové zkoušky	21
2.7.2	Zrychlené stabilitní testy	23
2.7.3	Dlouhodobé stabilitní testy	24
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Použitý chromatografický materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie	28
4.2	Průběh testování	29
4.2.1	Odběry vzorků	29
4.2.2	Příprava roztoků	29
4.2.3	Stresové podmínky	30
4.2.4	Chromatografické podmínky	30
4.3	Fyzikálně chemické vlastnosti 1,3-butandiolu	31
4.4	Využití 1,3-butandiolu	32
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	33
5.1	Výsledky a průběh stresových zkoušek	34
5.1.1	Porovnání vzniku degradačních produktů	34
5.1.2	Úbytek 1,3-butandiolu	49
6	ZÁVĚR	50
7	LITERATURA	52

# 1 ÚVOD

Plynová chromatografie je jednou z nejranějších separačních metod. Přes nejnovější vývoj v analytické chemii zůstává plynová chromatografie jednou z nejčastěji používaných analytických technik. Žádná jiná analytická metoda nedokáže zkombinovat takovou rozlišovací schopnost s rychlostí analýzy a její citlivostí. V analýze léčiv má plynová chromatografie své nezastupitelné místo vedle ostatních analytických metod. Využívá se především v analýze plynných látek a látek těkavých, které lze zahřáním převést do plynného stavu, aniž dojde k jejich rozkladu.

Stabilitní studie jsou nezbytnou součástí vývoje léčivého přípravku. Před každým vývojem léčiva musí být známy vlastnosti účinné látky i látek pomocných. Jen tak je možné předcházet interakcím látek mezi sebou či snížení jakosti způsobené nevhodným obalovým materiálem.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující oddělení jednotlivých složek analyzované směsi a zároveň jejich kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít<sup>1</sup>.

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi, přičemž mobilní fáze postupně jednotlivé složky směsi vymývá (eluuje) z fáze stacionární. Předpokladem nestejněměrného rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich nestejná schopnost difundovat do nich<sup>2</sup>.

### Chromatografické metody lze dělit podle:

- podstaty separačního procesu
- použité techniky
- způsobu vyvíjení (uspořádání kolony)
- skupenství nepohyblivé a pohyblivé fáze<sup>1</sup>

#### Dělení podle podstaty separačního procesu

- Adsorpční chromatografie
- Rozdělovací chromatografie
- Iontově výměnná chromatografie
- Gelová chromatografie
- Afinitní chromatografie

#### Dělení podle pracovní techniky

- Frontální chromatografie
- Vytěšňovací chromatografie

- Eluční chromatografie

#### Podle fázi

- Kapalinová
- Plynová

#### Podle uspořádání aparatury

- Sloupcová (kolonová)
- V plošném uspořádání papírová  
- tenkovrstvá<sup>1</sup>



## 2.2 Historie plynové chromatografie

Pojem chromatografie a chromatogram použil jako první na přelomu 19. a 20. století ruský chemik a botanik Cvet, když pomocí skleněné kolonky naplněné uhličitánem vápenatým dokázal rozdělit pigmenty chloroplastů (proto chromatografie). Z jeho prací vychází celý obor chromatografie. V roce 1909 využili Cvetovy pokusy čeští autoři Stoklasa, Brdlik a Ernest. Po nich využili principu chromatografie až 1931 Kuhn se svými pracovníky jako separační metodu založenou na sorbci a desorbci za nízkých teplot.

Roku 1941 tuto metodu rozvinul Hesse do oblasti látek v plynném stavu a učinil první krok pro použití chromatografie v systému plyn-pevná látka. Zásadní význam má pak práce dvojice Martin a Synge (též 1941), ve které autoři vycházejí ze skutečnosti, že separační izoterma je lineární v širším koncentračním rozmezí mezi dvěma kapalinami, než mezi kapalinou a tuhou fází. Tato myšlenka vedla k realizaci chromatografie v systému kapalina-kapalina. V této práci zároveň upozorňují, že mobilní fáze nemusí být pouze kapalina, ale i pára. Význam a dosah této práce byl v r. 1952 oceněn udělením Nobelovy ceny oběma autorům. V témže roce Martin a James zveřejnili práci, ukazující praktické důsledky úvah a rozsáhlé možnosti sledování těkavých látek metodou chromatografie plyn – kapalina<sup>3,4</sup>.

## 2.3 Definice a princip plynové chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi fyzikálně chemické metody využívané k dělení směsí látek, jakož i pro jejich kvalitativní i kvantitativní stanovení. Je to separační metoda založená na rozdílu distribuce látek mezi nosným plynem – mobilní fází a stacionární fází, kterou v tomto případě může být kapalina ukotvená na stěny kapiláry, inertní částice impregnované kapalinou či pevná látka v náplňové koloně. Podle druhu stacionární fáze rozlišujeme dva základní typy plynové chromatografie: adsorpční plynovou chromatografii, kde stacionární fází je pevná látka, a rozdělovací plynovou chromatografii, kde stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči či na vnitřním povrchu kapiláry.

### **2.3.1.1 Adsorpční plynová chromatografie**

U adsorpční plynové chromatografie dochází k dělení látky na základě rozdílné adsorpční schopnosti jednotlivých látek ve směsi. Po adsorpci molekul látek na aktivních centrech adsorbentu dochází průběžně k ustalování rovnováhy mezi koncentrací látky v plynné fázi a koncentrací látky navázané na adsorbentu. Látka, která se adsorbuje pevněji, prochází kolonou pomaleji, než látky adsorbující se slaběji. Látka která se neadsorbuje vůbec, vychází z kolony jako první.

### **2.3.1.2 Rozdělovací plynová chromatografie**

Základem rozdělovací plynové chromatografie je rozdělování látek mezi pohyblivou a nepohyblivou fází. Pohyblivou fází je v tomto případě nosný plyn a nepohyblivou kapalina zakotvená na pevném nosiči či na vnitřním povrchu kapiláry. Závislost koncentrace látky v mobilní a stacionární fází vyjadřuje rozdělovací izoterma, která je ve většině případů u rozdělovací plynové chromatografie lineární. Jde zde o rozdílnou rozpustnost látek v plynném stavu při průchodu kapalným prostředím. Látky, které se lépe rozpouštějí v kapalně fázi, procházejí kolonou pomaleji než ty co se rozpouštějí hůře či vůbec<sup>2, 3, 5, 6, 7</sup>.

## 2.4 Obecná teorie chromatografického děje

Hlavní kvalitativní charakteristikou plynové chromatografie je retenční čas chromatografického píku a kvantitativní charakteristikou je jeho plocha či výška. Molekuly analyzované látky se za rovnovážného stavu rozdělí mezi obě fáze v poměru koncentrací, který je dán distribuční konstantou  $K_D$

$$K_D = \frac{c_s}{c_M}$$

$c_s$  – koncentrace analytu ve stacionární fázi

$c_M$  – koncentrace analytu v mobilní fázi

K opakovanému ustavení rovnovážného stavu dochází v důsledku unášení analytu nacházejícího se v mobilní fázi nad nový, analytem dosud neobsazený díl stacionární fáze. Tento transportní děj analytu od počátku ke konci kolony je určen lineární rychlostí  $u$  mobilní fáze v koloně, [ $\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ ]. Kolonou mající délku  $L$  [cm], potom projde mobilní fáze od počátku ke konci kolony v čase  $t_M$ , označovaným jako mrtvý čas.

$$t_M = \frac{L}{u}$$

Obdobně čas setrvání analytu v koloně, tj. v mobilní fázi, pohybujícího se průměrnou lineární rychlostí  $\tilde{u}$  se označuje jako retenční čas analytu  $t_R$  a je určen rovnicí:

$$t_R = \frac{L}{\tilde{u}}$$

Vztah mezi průměrnou lineární rychlostí analytu a mobilní fází odpovídá poměru množství analytu v mobilní fázi ( $V_M$  je objem mobilní fáze analytu) vzhledem k jeho celkovému množství v mobilní a stacionární fázi ( $V_S$  je objem stacionární fáze analytu).

$$\tilde{u} = u \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \frac{1}{1 + \frac{c_S V_S}{c_M V_M}} = u \frac{1}{1 + K_D \frac{V_S}{V_M}} = u \frac{1}{1 + k'}$$

Poměr součinu rozdělovacího koeficientu s objemem solutu ve stacionární fázi k objemu analytu v mobilní fázi se označuje jako kapacitní poměr  $k'$ . Poměr objemů mobilní a stacionární fáze se označuje jako fázový poměr  $\beta$ .

$$k' = K_D \frac{V_S}{V_M} = \frac{K_D}{\beta}$$

Dosadíme-li do rovnice vyjadřující průměrnou lineární rychlost vztahy pro mrtvý a retenční čas získáme následující rovnici.

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \cdot \frac{1}{1 + k'}$$

Její úpravou pak:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Tato rovnice je klíčovou chromatografickou rovnicí popisující vztah mezi rozdělovacím koeficientem a měřitelným retenčním chováním analytu a mobilní fáze. Získaná hodnota  $t_R'$  se označuje jako čistý retenční čas a vyjadřuje setrvání analytu

v separačním systému. Pohyb analytu v separačním systému je převážně určen migrací vyvolanou mobilní fází, nosným plynem, avšak vedle migrace se analyt pohybuje i difúzí a to jak v mobilní, tak i ve stacionární fázi. Zatímco migrační pohyb odpovídá směru tlakového spádu, je difúzní pohyb na tlakovém spádu nezávislý a působí ve všech směrech. Tento neorganizovaný pohyb vede k rozšíření zóny analytu v separačním systému a vzrůstá s dobou setrvání analytu v separačním systému. Analyty opouštějící separační systém mají tedy konečnou šířku píků (elučních zón)  $w$ , která vzrůstá s retenčním časem.

Délka separačního systému  $L$  je rozdělitelná na větší počet úseků, označovaných jako teoretická patra  $N$ , odpovídajících počtu ustavení rovnováhy. Délka separačního systému  $L$  a počet teoretický pater  $N$  dává výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  (HETP). Výškový ekvivalent teoretického patra je úměrný šířce eluční zóny analytu. Pro počet teoretických pater platí:

$$N = \frac{L}{H}$$

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Rovnice ukazuje, že čím větší je šířka eluční zóny, tím menší je počet teoretických pater, tzn. tím menší je počet opakovaně ustavených rovnovážných stavů a tím neúčinnější je separační systém<sup>2, 3, 8</sup>.

V plynové chromatografii je předpokladem úspěšné analýzy optimalizace chromatografických podmínek tak, aby separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené až na základní linii<sup>9</sup>.

## 2.5 Kvalitativní a kvantitativní analýza chromatogramu

K analýze chromatografického záznamu slouží chromatografická křivka. Základní kvalitativní charakteristikou v chromatografii je retenční (eluční) čas  $t_R$ , tedy čas od nástřiku vzorku do systému po maximum příslušného chromatografického píku. Důkazem totožnosti je shoda  $t_R$  chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s  $t_R$  píku standardu. Plocha píku, případně jeho výška, je úměrná koncentraci dané látky. Samotné určení obsahu látky ve vzorku se provádí z ploch píků vzorku a standardu. Lze použít metodu vnitřního nebo vnějšího standardu, metodu standardního přídavku, metodu kalibrační křivky nebo metodu vnitřní normalizace<sup>9, 10</sup>.

### 2.5.1.1 Metoda vnějšího standardu

V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku, v druhém pak vnější standard, a poté porovnáváme oba chromatogramy. Jako vnější standard se používá látka odpovídající kvality, nejčastěji některá z analyzovaných složek. Koncentrace jednotlivých stanovovaných látek směsi se pak vypočítá z poměru plochy (příp. výšky) píku této látky a plochy píku vnějšího standardu<sup>9</sup>.

### 2.5.1.2 Metoda vnitřního standardu

Základem je přídavek přesně známého množství standardu (jiné látky s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi) do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném zhomogenizování se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda je méně časově náročná a zároveň přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti hodnocených píků, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch<sup>9</sup>.

### 2.5.1.3 Metoda standardního přídavku

Metoda standardního přídavku se používá, pokud mezi signálem a koncentrací platí přímá úměra, tedy pokud mezi signálem a koncentrací je lineární závislost a roztok, v němž je nulová koncentrace stanovované látky, dává nulový signál.

Do dvou odměrných baněk stejného objemu připravíme roztoky tak, že do obou dáme stejné známé dávky vzorku a do jedné z nich přidáme známé množství látky, kterou chceme ve vzorku stanovovat, a baňky doplníme po značku. Proměříme signály obou roztoků a dosadíme do vzorce:

$$c_x = \frac{S_x}{S - S_x} c_s$$

$C_x$  – koncentrace vzorku

$C_s$  – koncentrace standardního přídavku

$S_x$  – signál vzorku

$S$  – signál vzorku se standardním přídavkem<sup>11, 12</sup>

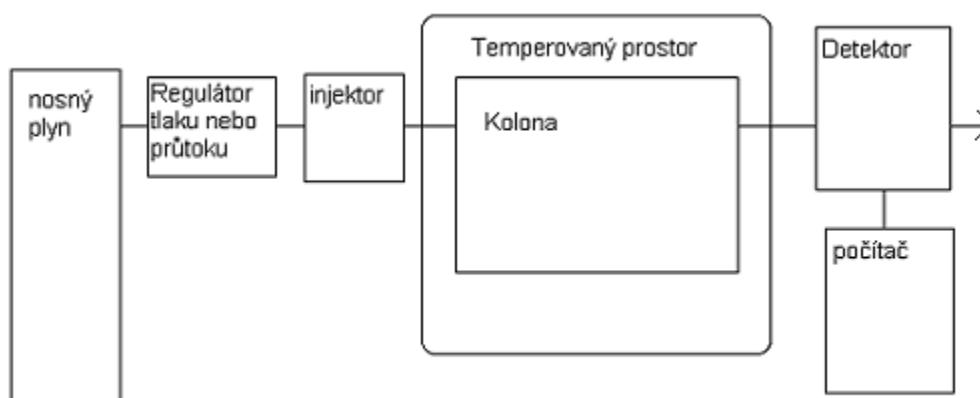
### 2.5.1.4 Metoda kalibrační křivky

Připraví se tzv. standardní roztoky - roztoky se známými rostoucími koncentracemi stanovované látky. Postupně nastříkneme roztoky na kolonu a proměříme píky odpovídající těmto roztokům a tak dostaneme dvojice hodnot plocha píku – koncentrace. Naměřené hodnoty vyneseme do grafu. Na svislou osu (y) vynášíme hodnoty ploch píku a na osu vodorovnou (x) vynášíme koncentrace  $c$ , tj. vynášíme závislost plochy píku na koncentraci. Nalezené body proložíme regresí. Po nalezení kalibrační závislosti vyneseme plochu píku vzorku do grafu a na vodorovné ose odečteme odpovídající koncentraci stanovované látky v roztoku vzorku<sup>11</sup>.

### 2.5.1.5 Metoda vnitřní normalizace

Pro použití metody vnitřní normalizace je předpoklad stejné závislosti odezvy na obsahu pro všechny složky analyzované směsi. Při analýze se změří plochy všech píků na chromatogramu a obsah se vyhodnotí jako procento plochy píku sledované látky ze součtu ploch všech píků chromatogramu<sup>12</sup>.

## 2.6 Schéma a popis základních částí plynového chromatografu



Obr. 1. schéma plynového chromatografu

### 2.6.1 Zdroj nosného plynu

V plynové chromatografii je mobilní fáze představována nosným plynem. Zdrojem nosného plynu jsou většinou tlakové lahve. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium, argon. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu. Před vstupem na kolonu je nutné plyn zbavit příměsí vody a dalších nečistot<sup>3, 9, 13</sup>.

### 2.6.2 Regulátory tlaku a průtoku

Jedná se o regulační zařízení, které slouží k ovládní průtoku a tlaku nosného plynu. Umožňuje nastavení průtoku nosného plynu, tlaku na koloně a splitovacího poměru. Je-li použit regulátor průtoku, je tlak proměnnou veličinou a nastaví se automaticky tak, aby průtok kolonou byl konstantní. V případě regulátoru tlaku je tomu naopak<sup>7, 13</sup>.

### 2.6.3 Injektor

Injektor je zařízení, kde se aplikuje vzorek to kolony. Injektor je vyhříván na zvolenou teplotu, aby po aplikaci vzorku došlo okamžitě k jeho odpaření. Injektor musí



splňovat následující požadavky: vzorek vstupující na kolonu musí mít co nejmenší objem; nesmí dojít k rozkladu vzorku v injektoru během odpaření; nesmí docházet k diskriminaci komponent vzorku a signál rozpouštědla nesmí ovlivňovat plochu signálu analytu.

Součástí injektoru je skleněná vložka (liner), ve které dochází k odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem a ve které se také zachytí netekavé látky.

Septum odděluje prostor injektoru od vnějšího prostoru; přes septum se pomocí injekční stříkačky s jehlou provádí nástřik vzorku<sup>7, 9, 13</sup>.

#### **2.6.4 Kolona**

Kolona je umístěna v prostoru, která je temperována na určitou teplotu. Teplota je důležitá proměnná v plynové chromatografii. Pokud je teplota kolony během analýzy vzorku konstantní, jedná se o isotermální analýzu. Naproti tomu pro analýzu vzorku multikomponentních směsí látek s rozdílnými body varu je vhodné použít teplotního gradientu. To znamená, že se bude měnit teplota kolony během analýzy podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je zlepšení tvaru chromatografických píku (zúžení signálu, vyšší citlivost) a výrazné zkrácení doby analýzy.

V plynové chromatografii se používají kolony náplňové nebo kapilární. Náplňové kolony jsou trubice ze skla či oceli o délce 0,5-5m a vnitřním průměru 2-5mm naplněné granulovaným adsorbentem nebo nosičem se zakotvenou kapalnou stacionární fází. Kapilární kolony jsou tenké kapiláry ze skla anebo nerezové oceli o délce 10-100m o vnitřním průměru 0,1-0,5mm jejichž vnitřní stěna je potažena kapalnou stacionární fází<sup>3, 9, 13</sup>.

### 2.6.5 Detektory

Detektory slouží k záznamu látek vycházejících z kolony. Volba detektoru významně ovlivní selektivitu i citlivost stanovení, a proto jsou na detektory kladeny velké nároky:

- vysoká citlivost (dle definice změna signálu detektoru při jednotkové změně koncentrace analytu)
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- dobré dynamické vlastnosti (signál detektoru by měl být věrným obrazem časové funkce koncentrace analytu ve vzorku, protože zkreslení koncentračního profilu, rozšíření a deformace zón zhoršují citlivost a spolehlivost měření a rozdělení látek, které bylo dosaženo na koloně)
- malá citlivost ke změnám tlaku a rychlosti průtoku mobilní fáze<sup>1, 14</sup>.

Detektory lze rozdělit na selektivní a univerzální. U selektivních je signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v eluátu, u univerzálních pak některé celkové vlastnosti eluátu, a to jak detekované látky, tak i složek mobilní fáze<sup>3, 9</sup>.

#### 2.6.5.1 Tepelně vodivostní detektor

Principem měření na tepelně vodivostním detektoru je rozdíl mezi tepelnou vodivostí nosného plynu a analyzované látky. Výhodou teplotně vodivostního detektoru je, že signál poskytují všechny látky a jde o detektor nedestrukčního typu. Je důležité aby nosný plyn měl odlišnou tepelnou vodivost než analyzovaná látka, proto se dává přednost vodíku a heliu před dusíkem<sup>3, 9</sup>.

#### 2.6.5.2 Detektory ionizační

##### Hmotnostní spektrometr

Principem hmotnostní spektrometrie je ionizace neutrálního atomu či molekuly za vzniku iontů a jejich regmentů. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) se v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separují podle poměru hmotnosti a náboje

a záznam tvoří hmotnostní spektrum (četnost iontů vztažená k poměru hmotnost/počet nábojů. Výhodou je jeho vysoká citlivost a možnost i kvalitativního hodnocení analyzované směsi. Nevýhodou je relativní finanční náročnost<sup>9</sup>.

#### Detektor elektronového záchytu

Při použití detektoru elektronového záchytu je základem ionizace nosného plynu  $\beta$  zářením za vzniku ionizačního proudu, tj. konstantního proudu pomalých elektronů. Elektrony jsou zachyceny elektronegativními atomy nebo skupinami. Detektor elektronového záchytu je selektivní pro elektronegativní atomy, např. halogeny a elektronegativní skupiny, např. nitroskupiny<sup>3, 9</sup>.

#### Plamenoionizační detektor

Detekce pomocí plamenoionizačního detektoru je založena na složité chemiionizační reakci organických látek v kyslíkovodíkovém plameni. Při ní jsou z organických látek uvolňovány ionty, které jsou následně detekovány. Tento detektor je univerzální pro organické látky a atomy kyslíku a dusíku výsledný signál zvyšují<sup>7, 9, 15</sup>.

#### Termoionizační detektor

V termoionizačním detektoru dochází k ionizaci organických látek v kyslíkovodíkovém plameni vedeném přes prsteneček solí alkalických zemin. Jde o modulaci plamenoionizačního detektoru a je selektivní pro látky obsahující ve své molekule dusík a fosfor<sup>7, 9</sup>.

#### Fotoionizační detektor

Ve fotoionizačním detektoru je organická látka ionizována proudem fotonů a následně je detekováno množství uvolněných elektronů<sup>3, 7, 9</sup>.

#### **2.6.5.3 Plamenofotometrický detektor**

V plamenofotometrickém detektoru jsou kyslíkovodíkovým plamenem aktivovány organické látky obsahující síru nebo fosfor. Tyto látky po aktivaci emitují záření, které je detekováno<sup>3</sup>.

### **2.6.6 Řídící jednotka**

V plynové chromatografii se dnes používají ke zpracování dat z plynového chromatografu výhradně počítače se speciálním softwarem, který zároveň ovládá celý systém.

## 2.7 Stabilitní zkoušky

Stabilitní studie ukazují chování látek či léčiva za daných podmínek v čase a provází lék po celou dobu vývoje. Stabilitní studie se provádí u účinných i pomocných látek a dále u všech uvažovaných lékových forem s novou látkou. Stabilitní studie jsou součástí registračního řízení i poregistračního sledování nového léku. Výsledky stabilitní studie ukazují rizika interakcí jednotlivých látek (účinných i pomocných) mezi sebou a citlivost přípravku na vlivy prostředí. Na základě těchto studií se určují podmínky pro obalové materiály, pro léčivo i podmínky pro skladování. Rovněž jakákoli změna doby použitelnosti musí být stabilitními studii podložena.

Stabilitní studie se snaží napodobit podmínky při běžném skladování, včetně teploty, vlhkosti.

Záměrem stabilitních zkoušek je poskytnout informace o tom, jak se kvalita léčivé látky nebo léku mění s časem pod vlivem různých činitelů, jako jsou teplota, vlhkost, světlo, pH či oxidační činidla. Stabilitní testy můžeme rozdělit dle podmínek zátěže na stresové, zrychlené a dlouhodobé<sup>16, 17, 18</sup>.

### 2.7.1 **Stresové zkoušky**

Stresové zkoušky se používají k identifikaci pravděpodobných degradačních produktů, mechanismů degradace a ověření vhodnosti metody pro analýzu rozkladných produktů. Povaha a trvání stresových zkoušek je variabilní a závislá na vlastnostech zkoušené látky. Většinou nepřesahuje 3 měsíce.

Při těchto testech se sleduje:

- vliv zvýšené teploty (50°C, 60°C, 70°C)
- vliv vlhkosti (např. 75% vzdušné vlhkosti nebo více)
- vnímavost k hydrolyze v rámci širokého rozmezí hodnot pH
- vliv vzdušného kyslíku (oxidace)
- vliv světla (fotostabilita)<sup>19</sup>

### 2.7.1.1 Hodnocení vlivu teploty

Testy vlivu teploty na stabilitu vycházejí z Arrheniovy rovnice - kvantitativní vztah teploty a času

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$$

k - specifická rychlostní konstanta

A - frekvenční faktor - údaj související s prostorovou orientací molekul

E<sub>A</sub> - aktivační energie

T - teplota v kelvinech

R- univerzální plynová konstanta

Z ní plyne, že zvýšení teploty o 10 stupňů zdvojnásobí reakční rychlost na dvojnásobek a tudíž zkrátí dobu reakce na polovinu. Z toho vyplývá, že stabilitní studie prováděná při 70 stupních po dobu 6ti týdnů odpovídá skladování při pokojové teplotě po dobu dvou let<sup>19, 20</sup>.

### 2.7.1.2 Hodnocení vlivu pH

Stresové zkoušky v kyselém/zásaditém prostředí jsou zaměřené na rozklad léčiva na rozkladné produkty při vystavení těmto podmínkám. Funkční skupiny náchylné ke kyselé/bazické hydrolyze jsou amidy (laktámy), estery (laktony), carbamáty, imidy, iminy, alkoholické skupiny a arylaminy

Acidobazické reakce by měly probíhat za pokojové teploty a bez přítomnosti světla. Jestliže však za pokojové teploty nedochází k degradaci léčivé látky, je možné teplotu zvýšit<sup>19</sup>.

### 2.7.1.3 Oxidativní stresové zkoušky

Testují stabilitu léčiva vůči oxidačním činidlům včetně vzdušného kyslíku. Funkční skupiny náchylné vůči oxidačním reakcím jsou například skupiny obsahující heteroatom (dusík, síru), karbonylové sloučeniny.

K oxidativním studiím se nejčastěji používá peroxid vodíku nebo molekulární kyslík. Výhodou peroxidu je jeho snazší dostupnost a použitelnost, nevýhodou pak menší reprezentativnost získaných degradačních produktů ve vztahu k reakcím při běžných skladovacích podmínkách a velmi obtížné odstranění peroxidu ze vzorku. U oxidativních zkoušek za přítomnosti molekulového kyslíku se používají katalyzátory (iniciátorů radikálové reakce). Reakce pak probíhá řetězově<sup>19, 21</sup>.

#### **2.7.1.4 Hodnocení fotostability**

Hodnotí vliv UV a VIS záření na stabilitu léčiva. Pokud molekula obsahuje vazbu či skupinu schopnou absorbovat záření tak, že elektron přejde do excitovaného stavu (tzv. chromofor) je náchylná k fotodegradaci. Záření též může iniciovat radikálovou autooxidaci. Místa molekuly náchylné k fotodegradaci jsou karbonylové a nitroaromatické funkční skupiny, oxidy dusíku a síry, konjugované dvojné vazby C=C a slabé vazby C-H a O-H<sup>19, 22</sup>.

U stresových zkoušek se v předem stanovených intervalech odebírají vzorky, u nichž se následně zjišťuje procentuální úbytek stanovované látky a přírůstek, někdy i totožnost vznikajících degradačních produktů. Dle ICH je degradační produkt definován jako chemická změna v molekule léčiva způsobená časem a/nebo vnějšími vlivy, například světlem, teplotou, pH, vodou a podobně<sup>16, 17, 23</sup>.

#### **2.7.2 Zrychlené stabilitní testy**

Zrychlené stabilitní testy probíhají v podmínkách asi o 15°C vyšších než je předpokládaná teplota uchovávání, v našich podmínkách se rozumí 40°C a 75% relativní vlhkost vzduchu pro běžně uchovávaná léčiva, a trvají cca 6 měsíců. Tato zkouška se nazývá zkouška vlhkým teplem. Zkoušení za těchto podmínek je však náročné a proto se může použít jednodušší zrychlený test při 30°C a 60% relativní vlhkosti po dobu jednoho roku. Zkouška je ovlivněna i danou lékovou formou. Pro masti a aerosoly v tlakových obalech je maximální přijatelná teplota 35°C a pro čípky pouze 30°C<sup>16, 17, 23, 24, 25</sup>.

### **2.7.3 Dlouhodobé stabilitní testy**

Probíhají za normální teploty a vlhkosti, a tudíž v podstatě přesně zachycují chování látky či léčiva. Jejich trvání se odvíjí od předpokládané doby trvanlivosti přípravku. Dlouhodobé testy jsou důležité pro ověření doby použitelnosti získané při zkrácených testech. V našich podmínkách se používají testy při 25°C a 60% relativní vlhkosti vzduchu. U dlouhodobých stabilitních testů se hodnotí vzorky nejčastěji po 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 měsících a dále jednou za rok <sup>16, 17, 23, 24, 25</sup>.



## **3 CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo:

- zhodnotit vliv různých podmínek na stabilitu 1,3-butandiolu,
- charakterizovat případně vzniklé degradační produkty pomocí retenčního času
- vytipovat podmínky, za kterých dochází k degradaci struktury

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### 4.1 Použitý chromatografický materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie

##### Chromatografická kolona:

Supelcowax-10 fused silica capillary column: 30m×0.52 mm, 0.5 µm film thickness, Supelco Inc., ČR

##### Přístroje:

Shimadzu gas Chromatograf GC-2010, Japonsko

Shimadzu GC solution chromatography data system, Japonsko

Vakuová sušárna, Výroba přístrojů Brandýs nad Labem, ČR

UV lampa Camag, Švýcarsko

Analytické váhy AND, Japonsko

##### Pomůcky:

Odměrné baňky 100 ml

Odměrná baňka 500 ml

Pipeta 5 ml

##### Chemikálie:

1,3-butandiol Sigma Aldrich, ČR

Propylenglykol Sigma Aldrich, ČR

Methanol Lichrosolv Merck, ČR

Peroxid vodíku Balex, ČR

HCl Lachner- Neratovice, ČR

NaOH Lachner- Neratovice, ČR

## 4.2 Průběh testování

Sledovali jsme vliv teploty, pH, UV záření a přidavku peroxidu vodíku na stabilitu 1,3-butandiolu. Zkoušky jsme prováděli ve čtyřech částech:

Vliv teploty a vliv teploty za přítomnosti vody

Vliv UV záření a vliv UV záření v přítomnosti vody

Vliv vysokého a nízkého pH

Vliv přítomnosti 3% peroxidu vodíku

### 4.2.1 Odběry vzorků

Během každého testu jsme odebrali 9 vzorků. Vzorky jsme odebírali na začátku testování a následně po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách. Z každého jsme připravili dvě navážky, které jsme naředili.

### 4.2.2 Příprava roztoků

V každé části jsme připravovali vnitřní standard propylenglykolu. Vnitřní standard jsme připravili přesným navážením asi 9,0000g propylenglykolu a dolitím methanolem na 500 ml.

Pro každou část jsme si též připravovali dva standardní roztoky 1,3-butandiolu přibližně přesným navážením 0,0700 g 1,3-butandiolu, přidáním 5 ml vnitřního standardu a dolitím methanolem do 100ml.

Pro zjišťování vlivu teploty a UV záření jsme používali čistý 1,3-butandiol. Z něj jsme v určenou dobu odebírali vzorky a navažovali jsme přibližně přesně 0,0700 g. V ostatních případech jsme použili 50% roztok 1,3-butandiolu s látkou nastavující požadované podmínky (voda, 1M HCl, 1M NaOH, 3% peroxid vodíku) a tudíž jsme navažovali dvojnásobek – přibližně přesně 0,1400 g. K naváženému vzorku jsme vždy přidali 5 ml vnitřního standardu a dolili methanolem do 100 ml. U zjišťování vlivu vysokého a nízkého pH jsme před dolitím roztok vzorku zneutralizovali.

### 4.2.3 Stresové podmínky

Vzhledem k nízké reaktivitě 1,3-butandiolu jsme všechny zkoušky mimo citlivosti na UV záření prováděli při 70°C. Citlivost na UV záření jsme zkoušeli pod UV lampou při 254 nm za zamezení přístupu denního světla zatemněním a za laboratorní teploty.

### 4.2.4 Chromatografické podmínky

#### Injektor

Teplota	250°C
Nosný plyn	vodík 5.0
Rychlost nosného plynu	150 cm/min.
Průtok kolonou	19,63 ml/min.
Split	1:3

#### Kolona:

Teplotní program:

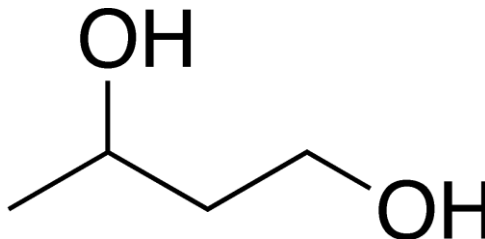
°C/min.	Teplota [°C]	Čas [min.]
----	100	4,5
5	150	2
10	200	10

#### Detektor:

vodík/syntetický vzduch	40/400 ml/min.
Teplota:	300°C
Make-up plyn	dusík 5.0 (30 ml/min.)

### 4.3 Fyzikálně chemické vlastnosti 1,3-butandiolu

Vzorec:



$M_r$ : 90,123

#### racemická směs

$\rho$  1,0053

$n_D^{20}$  1,441

$n_D^{25}$  1,439

$t_f$   $-50^\circ\text{C}$

$t_v$   $207,5^\circ\text{C}$

#### D(+)

$t_v$   $204^\circ\text{C}$

$\rho$  1,0053

$[\alpha]^{22}$   $+18,5$  (4% ethanolický roztok)

#### D(-)

$t_v$   $107^\circ\text{C}$

$\rho$  1,005

$[\alpha]^{22}$   $-18,5$  (4% ethanolický roztok)

1,3-butandiol je čirá, bezbarvá, hydroskopická, viskozní kapalina se slabou charakteristickou chutí, téměř bez zápachu. Je neomezeně mísitelný s vodou, ethanolem

a acetonem. Částečně je rozpustná v éteru a nerozpustná v alifatických uhlovodících, benzenu, tetrachlormethanu a olejích. Rozpouští většinu silic a syntetických aroma.

1,3-BD podléhá reakcím typickým pro alifatické alkoholy. Kvůli konfiguraci třetího uhlíkového atomu jsou jeho deriváty stabilnější než podobných glykolů, což může vést k důležitým a užitečným rozdílům ve vlastnostech výsledných produktů<sup>26, 27, 28</sup>.

#### 4.4 Využití 1,3-butandiolu

Největší využití má 1,3-butandiol jako meziprodukt ve výrobě polyesterových změkčovadel. Tyto jsou ceněné pro svou kompatibilitu s širokým spektrem polymerů a pro stabilitu výsledného materiálu.

Další důležité použití má 1,3-butandiol ve výrobě nenasycených polyesterových meziproduktů. Ty jsou pak odolné vůči vodě a jsou flexibilní i odolné vůči nárazu.

1,3-butandiol se též užívá k výrobě nasycených polyesterů pro polyuretanové potahy, kde dodává výslednému materiálu vyšší flexibilitu.

1,3-butandiol je výborné zvlhčovaadlo, obzvláště v porovnání s ostatními glykoly. Dokáže přijímat vzdušnou vlhkost a udržovat ji v rozmezí 20-25%. Je též důležitým vlhčivem ve zvířecí potravě, tabáku a kosmetice. V té zabraňuje vysoušení formulace a krystalizaci složek nerozpustných ve vehikulu. Též zvyšuje odolnost vůči vzdušné vlhkosti.

Další použití 1,3-butandiol zahrnuje výrobu surfaktantů a barviv.

Ve farmacii se 1,3-butandiol používá jako tekutá složka pro výrobu perorálních lékových forem.

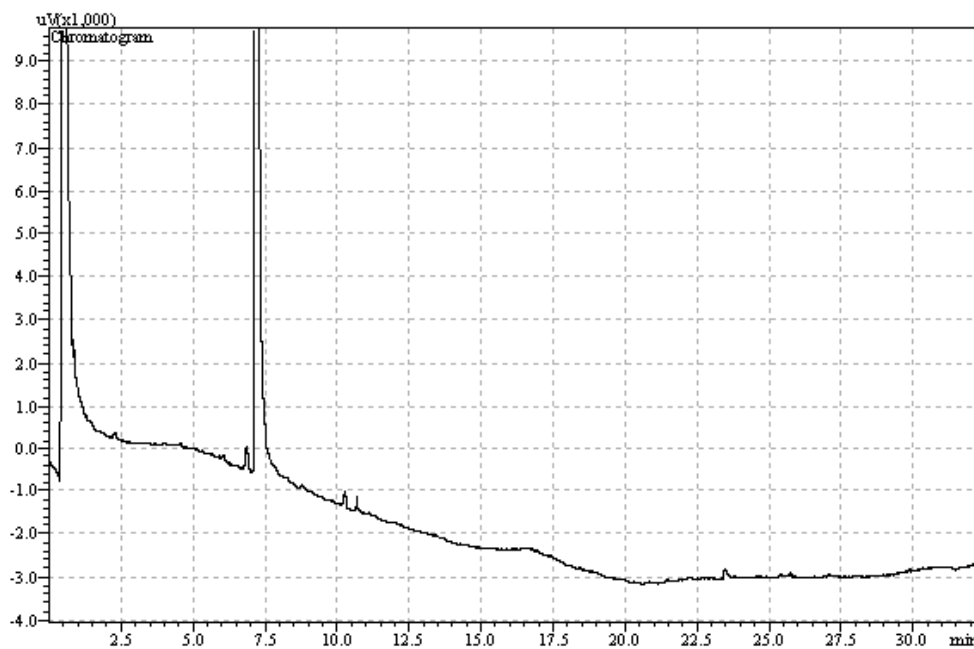
Požadavky na 1,3-butandiol jsou uvedeny v FCD (Food Chemical Codex)<sup>28</sup>.



## **5 VÝSLEDKY A DISKUSE**

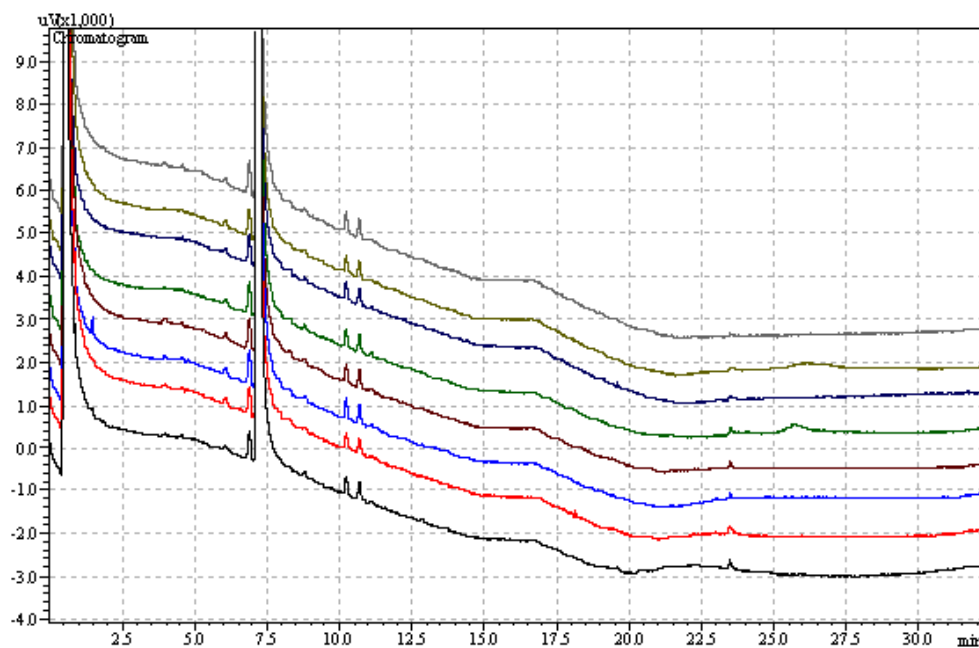
## 5.1 Výsledky a průběh stresových zkoušek

### 5.1.1 Porovnání vzniku degradačních produktů



Obr. 1: Chromatogram vzorku na začátku. Kromě píku 1,3-butandiolu s retenčním časem 7,2 zde jsou patrné ještě píky nečistot s retenčními časy 6,9; 10,3 a 10,7.

### 5.1.1.1 Vliv zvýšené teploty

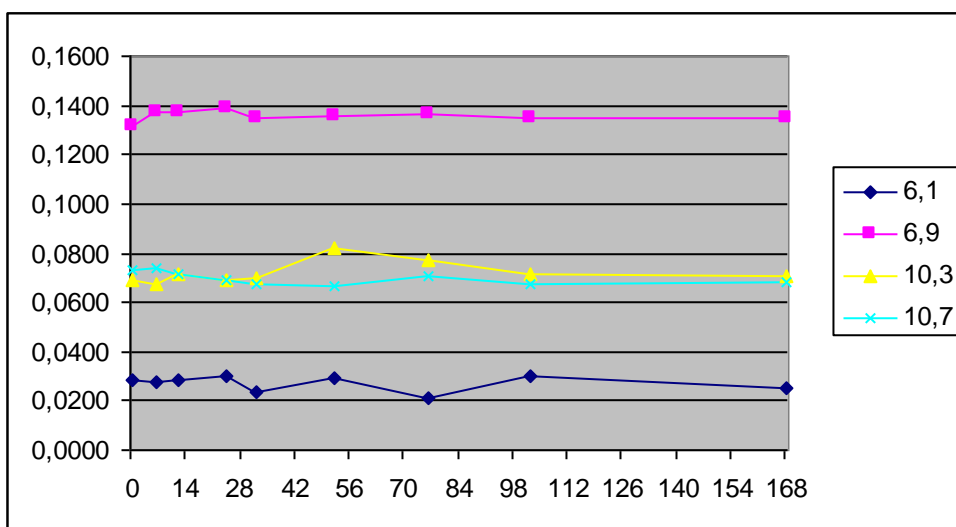


*Obr. 2: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu za vyšší teploty. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.*

Na chromatogramech jsme kromě píku 1,3-butandiolu s retenčním časem 7,2 sledovali ještě píky s retenčními časem 6,1; 6,9; 10,3 a 10,7. Tyto píky během týdenního testování stability za zvýšené teploty nevykazovaly zřetelný nárůst. Za těchto podmínek jsme na chromatogramu nezaznamenali žádné další píky degradačních produktů.

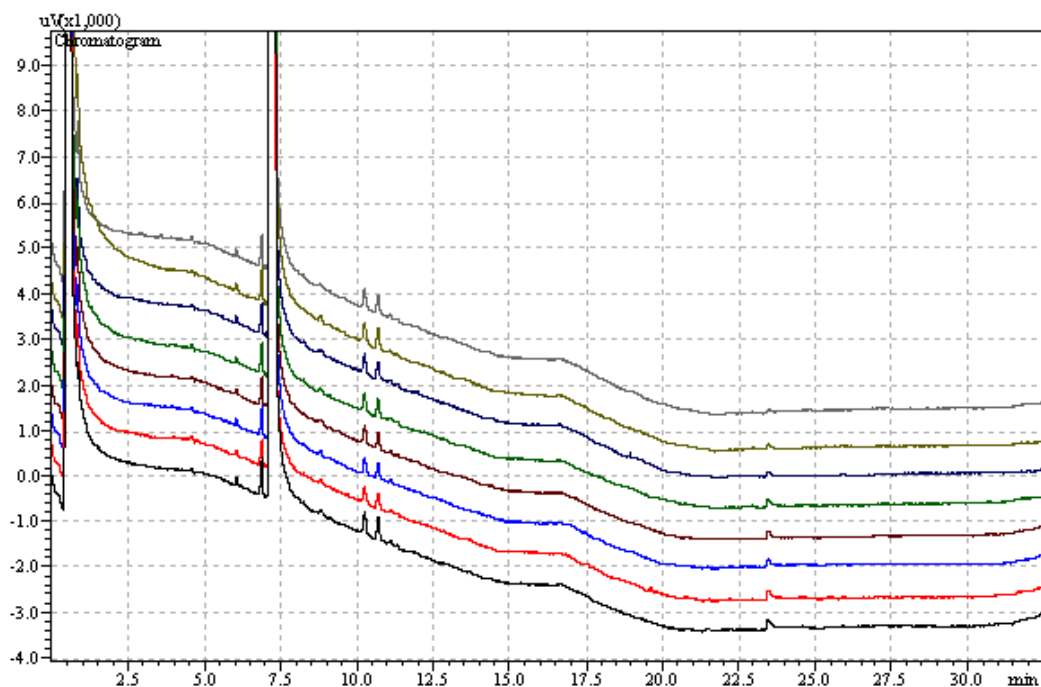
retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0283	0,1320	0,0686	0,0734
6h	0,0277	0,1373	0,0674	0,0741
12h	0,0288	0,1370	0,0714	0,0718
24h	0,0304	0,1390	0,0687	0,0687
32h	0,0232	0,1348	0,0696	0,0672
52h	0,0291	0,1354	0,0821	0,0669
76h	0,0208	0,1364	0,0773	0,0708
102h	0,0299	0,1348	0,0718	0,0676
168h	0,0252	0,1348	0,0705	0,0681

Tab. 1: *Percentuální vztah plochy píků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability při zvýšené teplotě*



Graf 1: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při zvýšené teplotě*

### 5.1.1.2 Vliv teploty za přítomnosti vody

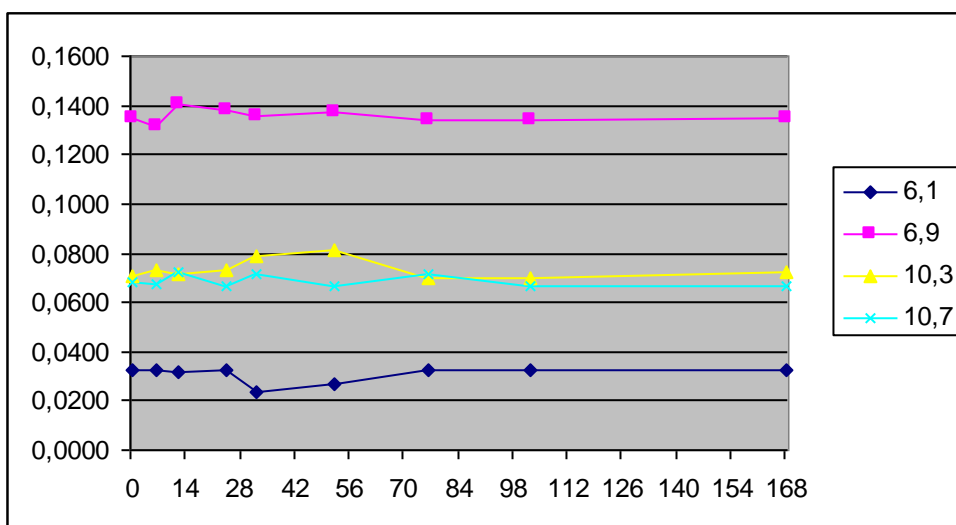


Obr. 3: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu za vyšší teploty v přítomnosti vody. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

Stejně jako v bezvodém vzorku ani za zvýšené teploty v přítomnosti vody nebyl u píků s retenčními časy 6,1; 6,9; 10,3 a 10,7 během týdne zřetelný nárůst a žádné nové píky degradačních produktů jsme na chromatogramu nezaznamenali.

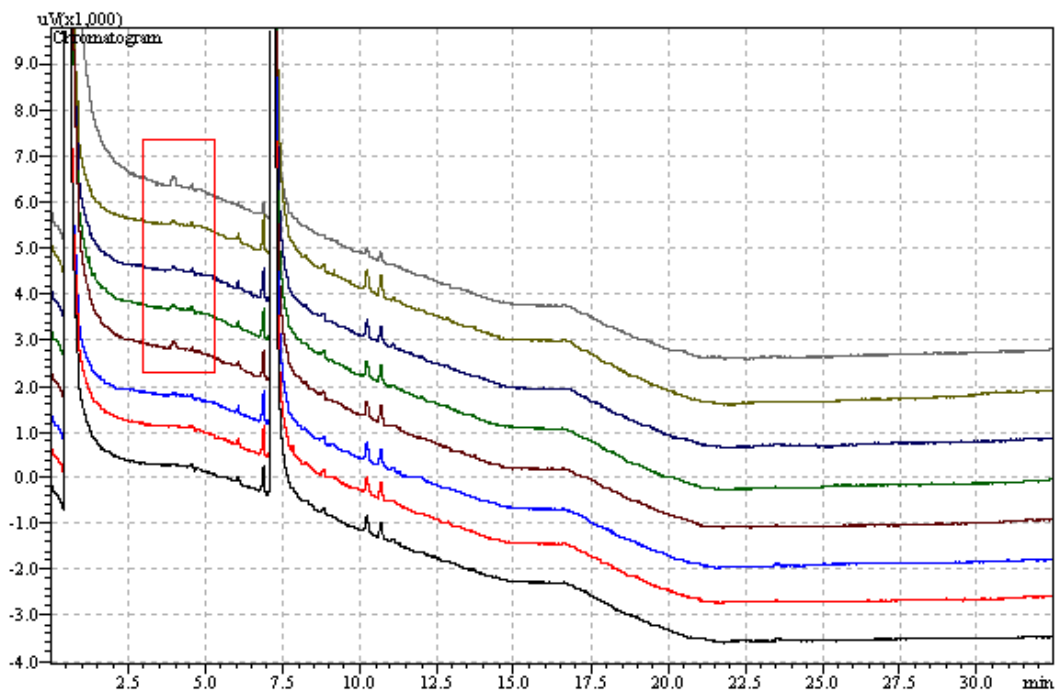
retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0325	0,1352	0,0707	0,0681
6h	0,0322	0,1312	0,0729	0,0672
12h	0,0314	0,1407	0,0713	0,0726
24h	0,0325	0,1383	0,0735	0,0663
32h	0,0235	0,1353	0,0784	0,0717
52h	0,0268	0,1374	0,0812	0,0668
76h	0,0323	0,1336	0,0697	0,0714
102h	0,0325	0,1337	0,0700	0,0666
168h	0,0324	0,1345	0,0726	0,0663

Tab. 2: *Percentuální vztah plochy píků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability při zvýšené teplotě za přítomnosti vody.*



Graf 2: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při zvýšené teplotě za přítomnosti vody.*

### 5.1.1.3 Vliv UV záření

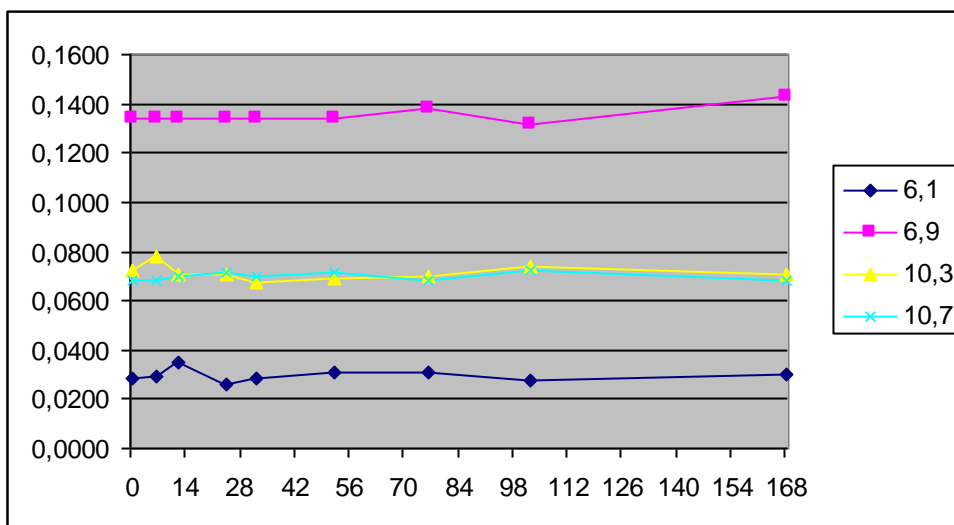


Obr. 4: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu při působení UV záření. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

Ze sledovaných píků je při působení UV záření pouze u píku s retenčním časem 6,9 možno usuzovat na mírný nárůst, ale pro potvrzení by bylo potřeba delšího hodnocení. Nové degradační produkty jsme zaznamenali v rozmezí retenčních časů 3,5-5 min, u žádného z nich však není během týdne výrazný nárůst.

retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0283	0,1341	0,0719	0,0685
6h	0,0290	0,1343	0,0782	0,0684
12h	0,0353	0,1337	0,0705	0,0695
24h	0,0259	0,1341	0,0707	0,0715
32h	0,0282	0,1338	0,0678	0,0697
52h	0,0306	0,1339	0,0689	0,0713
76h	0,0310	0,1378	0,0696	0,0682
102h	0,0276	0,1315	0,0743	0,0721
168h	0,0301	0,1430	0,0707	0,0685

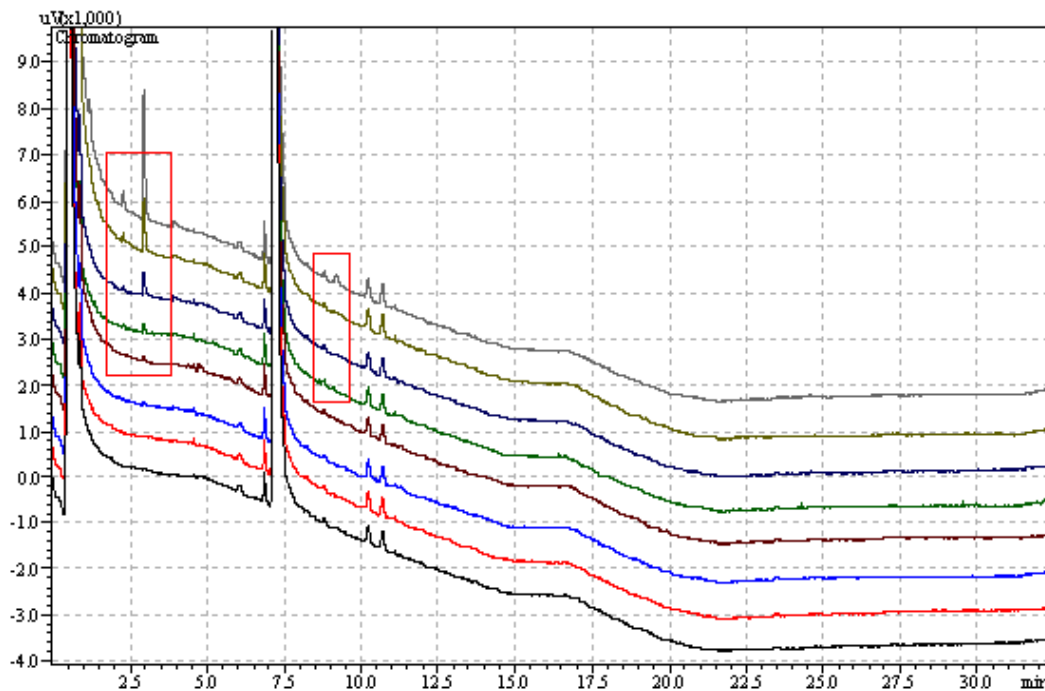
Tab. 3: *Percentuální vztah plochy piků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability při působení UV záření.*



Graf 3: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při působení UV záření*



#### 5.1.1.4 Vliv UV záření za přítomnosti vody

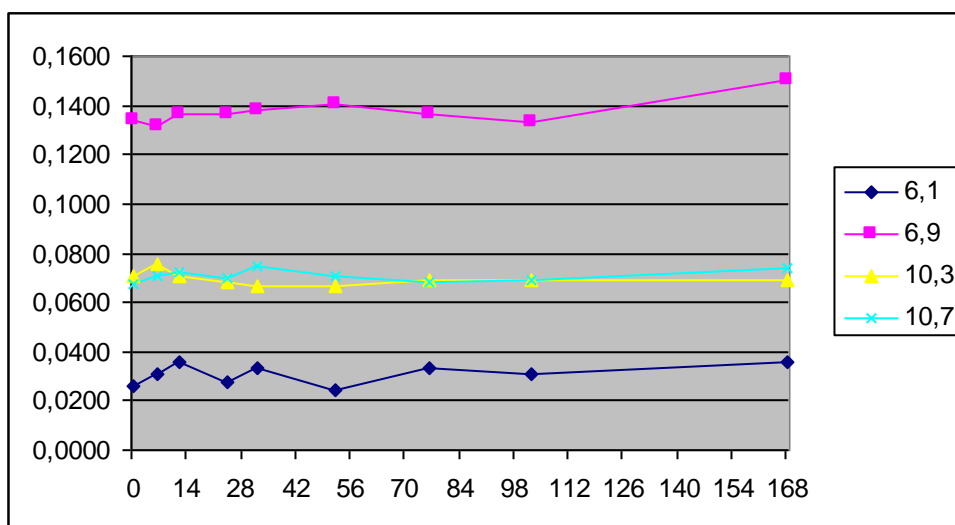


Obr. 5: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu při působení UV záření v přítomnosti vody. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

Oproti bezvodému vzorku při působení UV záření v přítomnosti vody jsme pozorovali větší množství degradačních produktů i jejich nárůst. Ze sledovaných píků byl mírný nárůst u látky s retenčním časem 6,9, ale především jsme zaznamenali nové píky degradačních produktů v rozmezí retenčních časů 2,3-3,0 a s retenčními časy okolo 8 minut. Zejména u látky s retenčním časem 2,9 jsme viděli na chromatogramech výrazný nárůst.

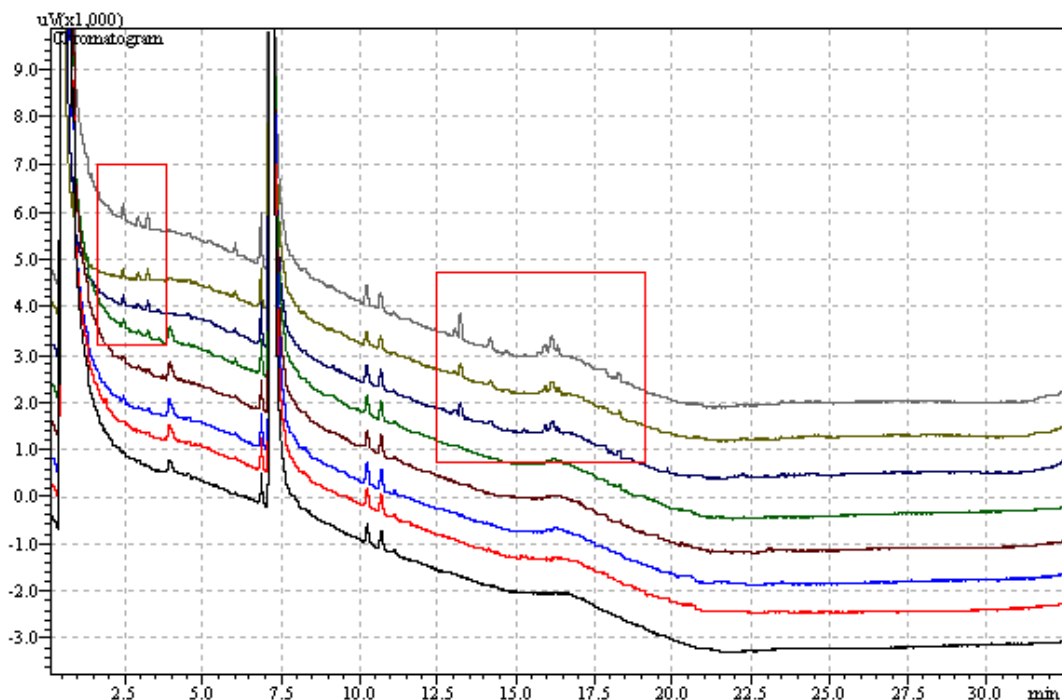
retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0259	0,1344	0,0709	0,0677
6h	0,0306	0,1319	0,0758	0,0704
12h	0,0357	0,1365	0,0704	0,0726
24h	0,0273	0,1365	0,0683	0,0696
32h	0,0335	0,1381	0,0669	0,0750
52h	0,0247	0,1409	0,0665	0,0706
76h	0,0333	0,1366	0,0691	0,0686
102h	0,0305	0,1334	0,0693	0,0688
168h	0,0360	0,1505	0,0687	0,0738

Tab. 4: *Percentuální vztah plochy piků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability při působení UV záření v přítomnosti vody.*



Graf 4: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při působení UV záření v přítomnosti vody.*

### 5.1.1.5 Vliv nízkého pH

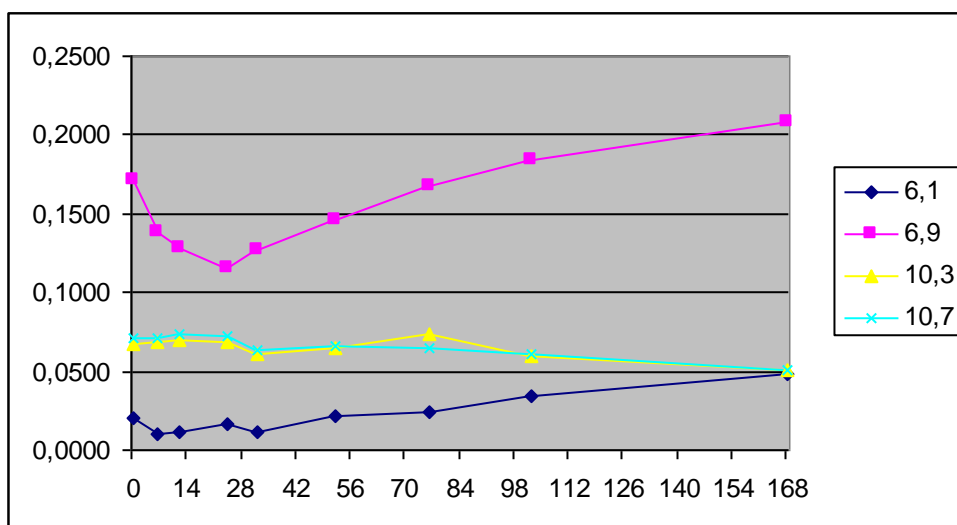


Obr. 6: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu za nízkého pH. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

U zkoušky stability v kyselém pH jsme nepozorovali výrazný nárůst žádného píku jako v případě působení UV záření v přítomnosti vody, ale se zaznamenali jsme větší množství malých píků degradačních produktů. Ze sledovaných píků jsme pozorovali mírný nárůst velikosti píku u látek s retenčními časy 6,1 a 6,9. Nové píky degradačních produktů jsme pak našli v rozmezí retenčních časů 2,3-4,0 a 12,5-19,0.

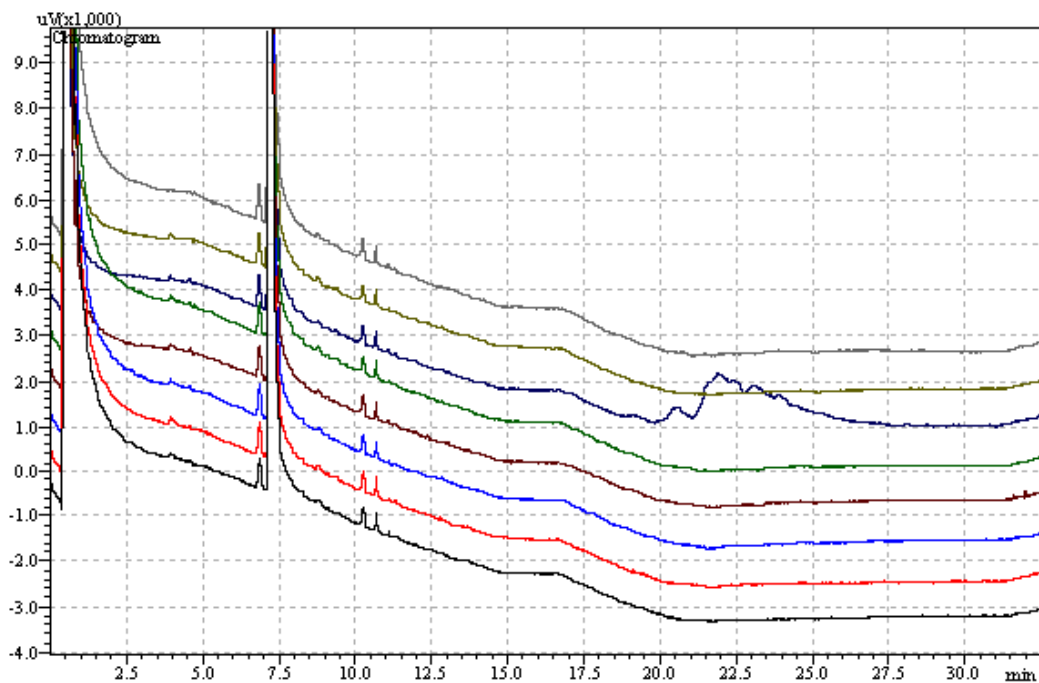
retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0198	0,1714	0,0678	0,0709
6h	0,0105	0,1386	0,0680	0,0708
12h	0,0120	0,1279	0,0692	0,0731
24h	0,0165	0,1154	0,0686	0,0725
32h	0,0115	0,1273	0,0605	0,0636
52h	0,0219	0,1457	0,0642	0,0657
76h	0,0245	0,1674	0,0741	0,0650
102h	0,0340	0,1844	0,0593	0,0604
168h	0,0482	0,2078	0,0506	0,0507

Tab. 5: Percentuální vztah plochy piků degradačních produktů k ploše piku 1,3-butandiolu u testu stability při nízkém pH.



Graf 5: Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při nízkém pH.

### 5.1.1.6 Vliv vysokého pH

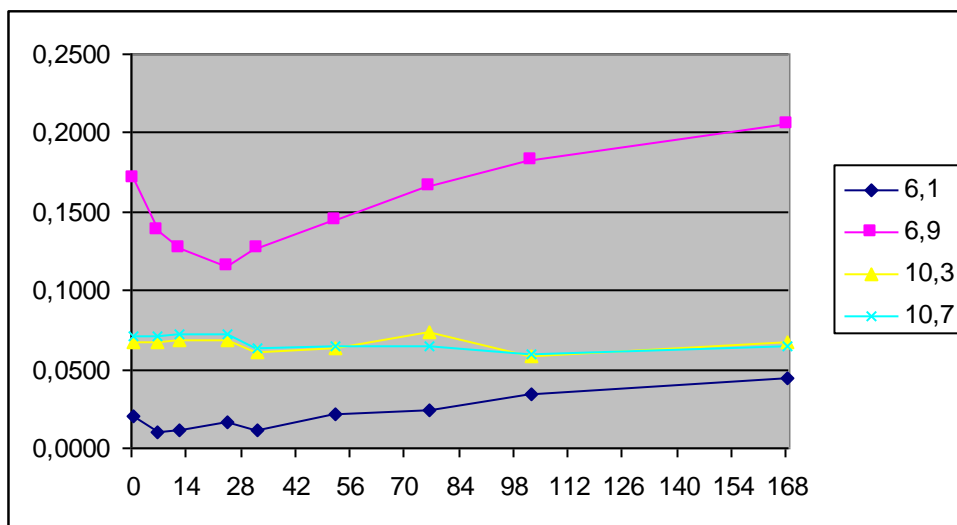


Obr. 7: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu za vysokého pH. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

Při hodnocení stability při vysokém pH jsme po 24 hodinách u testovaného 1,3-Butandiol pozorovali zbarvení dohněda a v průběhu času se intenzita zbarvení zvyšovala, avšak nové degradační produkty se na chromatogramu neukázaly. Pozorovali jsme pouze mírný nárůst píků s retenčními časy 6,1 a 6,9.

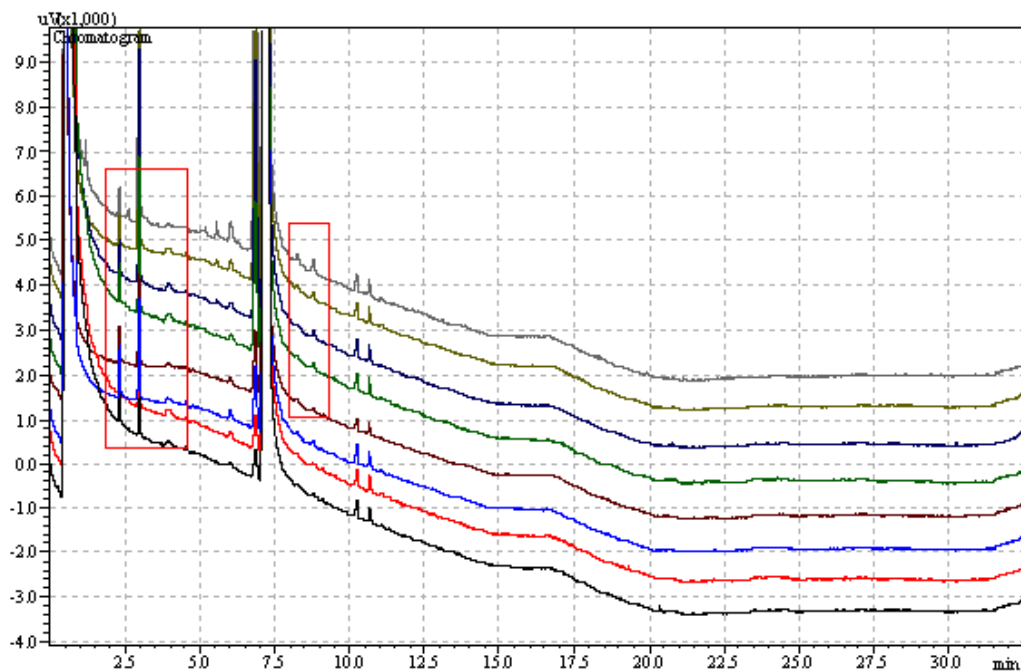
Retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0197	0,1707	0,0675	0,0706
6h	0,0104	0,1381	0,0678	0,0705
12h	0,0120	0,1274	0,0690	0,0729
24h	0,0165	0,1149	0,0683	0,0722
32h	0,0114	0,1267	0,0603	0,0634
52h	0,0218	0,1449	0,0638	0,0653
76h	0,0243	0,1663	0,0736	0,0646
102h	0,0338	0,1831	0,0588	0,0600
168h	0,0441	0,2050	0,0675	0,0646

Tab. 6: *Percentuální vztah plochy piků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability při vyšším pH.*



Graf 6: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability při vyšším pH.*

### 5.1.1.7 Vliv oxidačního činidla

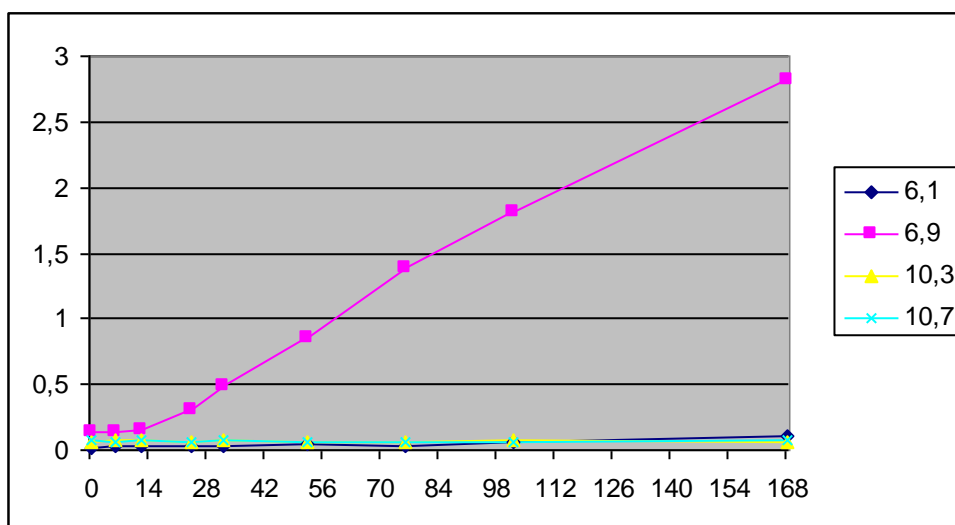


Obr. 8: Porovnání chromatogramů jednotlivých odběrů vzorků u testu stability 1,3-butandiolu za přítomnosti oxidačního činidla. Od spodu odběry po 6, 12, 24, 32, 52, 76, 102 a 168 hodinách.

V hodnocení vzorku testovaného na stabilitu v přítomnosti oxidačního činidla jsme pozorovali výrazný nárůst několika degradačních produktů. Ze sledovaných to byly píky s retenčními časy 6,1 a především 6,9. Další degradační produkty jsme zaznamenali v rozmezí retenčních časů 2,3-5,0 a 8,0-9,0, z nichž nejvýraznější nárůst byl u píky s retenčním časem 3,0.

retenční časy	6,1	6,9	10,3	10,7
0h	0,0217	0,136	0,0663	0,0727
6h	0,0291	0,1368	0,0708	0,0668
12h	0,0313	0,1571	0,07	0,0716
24h	0,0354	0,3068	0,0682	0,0656
32h	0,0273	0,4929	0,0706	0,0688
52h	0,0413	0,8555	0,0642	0,0663
76h	0,0365	1,3914	0,0666	0,0655
102h	0,0539	1,8197	0,0687	0,0678
168h	0,1033	2,8242	0,063	0,0697

Tab. 7: *Percentuální vztah plochy píků degradačních produktů k ploše píku 1,3-butandiolu u testu stability za přítomnosti oxidačního činidla.*



Graf 7: *Znázornění nárůstu degradačních produktů u testu stability za přítomnosti oxidačního činidla.*



### 5.1.2 Úbytek 1,3-butandiolu

stresové podmínky	% koncentrace 1,3-butandiolu na začátku testu	% koncentrace 1,3-butandiolu na konci testu	procentuální úbytek 1,3-butandiolu během testu
teplota	99,67	99,65	0,02
teplota+voda	99,66	99,66	-0,01
UV záření	99,66	99,53	0,13
UV záření+voda	99,66	99,18	0,48
nízké pH	99,59	99,06	0,53
vysoké pH	99,68	99,69	-0,01
oxidační činidlo	99,48	95,98	3,49

Tab. 8: *Procentuální úbytky 1,3-butandiolu během týdenního hodnocení různých stresových zkoušek.*

Působení teploty a vlhkého tepla stejně tak jako vysoké pH nevedly k pozorovatelnému úbytku 1,3-butandiolu. Mírný úbytek jsme pozorovali u nízkého pH a při působení UV záření samostatně i v přítomnosti vody. Nejvýraznější úbytek 1,3-butandiolu byl ve vzorku v přítomnosti oxidačního činidla (3% peroxidu vodíku).

## **6 ZÁVĚR**

Provedenými stresovými zkouškami jsme zjistili, že struktura 1,3-butandiolu je v celku stabilní. 1,3-butandiol není citlivý na vyšší teploty. Pozorovatelný úbytek 1,3 butandiolu byl při použití UV záření, u něhož dále platí, že přítomnost vody degradaci 1,3-butandiolu urychluje. U kyselé hydrolýzy bylo možné sledovat zejména velkou rozmanitost degradačních produktů. Nejvyšší pokles obsahu 1,3-butandiolu i nárůst degradačních produktů byl pozorován v prostředí s oxidačním činidlem. Ze zkoušek vyplývá, že 1,3butandiol je náchylný k oxidaci, která může být způsobena oxidačními činidly - včetně vzdušného kyslíku nebo vlivem UV, a ke kyselé hydrolýze.

Během stresových zkoušek vznikalo větší množství degradačních produktů. Na všech chromatogramech se objevují píky v retenčních časech 10,3 a 10,7, které se v průběhu testování nemění a píky s retenčními časy 6,0 a 6,9 které za některých podmínek narůstají.

Za různých podmínek se též objevuje látka s retenčním časem 3,0. Tato látka má nejvýraznější nárůst při působení UV záření na 1,3-butandiol ve vodném roztoku a při přítomnosti oxidačního činidla. Při vystavení 1,3 butandiolu účinkům oxidačního činidla též výrazně narůstá pík degradačního produktu s retenčním časem 6,9.

## **7 LITERATURA**

- 
- <sup>1</sup> Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
- <sup>2</sup> Mikeš, O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- <sup>3</sup> Smolková, E, Feltl, L: Plynová chromatografie, In: Smolková, E, Feltl, L: Analýza látek v plynném stavu, SNTL, Praha 1991
- <sup>4</sup> Smolková-Koulemansová, E.: Chem.Listy 97 (2003) 134-139.
- <sup>5</sup> Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada, Praha 2005
- <sup>6</sup> Nemeč, R: Chromatografické laboratorní metody. In: Bilyk, I., Nemeč, R.: Vybrané laboratorní metody, Avicenum, Praha 1988
- <sup>7</sup> Grob Grob, R., L., Barry, E., F.: Modern practice of gas chromatography 4th ed., Wiley-Interscience, New Jersey 2004
- <sup>8</sup> Ševčík, J., G., K., Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <[http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn\\_chrom.pdf](http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf)>
- <sup>9</sup> Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- <sup>10</sup> Beňo, P., Truplová, E., Ostrovská, V., Stankovičová, M.: Stabilita léčiv a liekov, VEDA, Bratislava 2003
- <sup>11</sup> Synek, V., Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/8Kalibrace.doc>>
- <sup>12</sup> Matějka, P., Fakulta analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.vscht.cz/anl/matejka/i/ACH2-5-sepa2.pdf>>
- <sup>13</sup> Literák, J., katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>
- <sup>14</sup> Novák, J.: Teorie chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- <sup>15</sup> Library4science [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.chromatography-online.org/GC/Detectors/Flame-Ionization/rs37.html>>
- <sup>16</sup> Chalabala, M. et al.: Technologie léků, GALEN, Praha 2001
- <sup>17</sup> The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [online] 2005 [cit. 2008-05-08] dostupné na <[http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q1A\(R2\)](http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q1A(R2))>
- <sup>18</sup> U.S. Food and Drug Administration [online] 1990 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/Guideline5.htm>>
- <sup>19</sup> Ahuja, S., Scypinski, S., (Eds.): Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego 2001

- 
- <sup>20</sup> Ahuja, S.: Impurities Evaluation of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York 1998
- <sup>21</sup> Bordwell, F. G., Cheby, J., Ji, G., Satish, A., V., and Zhang, X. J. Am. Chem. Soc. 113:9790-9795, 1991
- <sup>22</sup> Allen, J. M. Basic principles of drug photostability testing. Presented at the Photostability 1999 Conference, Washington, DC 1999
- <sup>23</sup> International Conference on Harmonisation of technical requirements of pharmaceuticals for human use (ICH): Q1A(R<sub>2</sub>) – Stability testing of new drug substances and products, Feb. 2003
- <sup>24</sup> WHO: Quality assurance of Pharmaceuticals: Guideline for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms, Volume 1, Geneva 1007, s.48
- <sup>25</sup> REG-83- Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, Věstník SÚKL 8/2005
- <sup>26</sup> Vohlídal, J., a kol: Chemické tabulky, Polygrafia, Praha 1988
- <sup>27</sup> Vohlídal, J., Julák, A., Škulík, K.: Chemické a analytické tabulky, Grada, Praha 1999
- <sup>28</sup> Institut of medicine of the national academies: Food Chemical Codex 5, 2004