

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Małgorzata Starek

**DENSYTOMETRYCZNA OCENA JAKOŚCI
WYBRANYCH
LEKÓW PRZECIWBÓLOWYCH**

Praca Doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



1816035580

Promotor

dr hab. Jan Krzek

Kraków 2003

Składam serdeczne podziękowania
Panu Doc. Dr hab. Janowi Krzekowi
za okazaną pomoc oraz rady i wskazówki,
niezwykle przydatne podczas realizacji podjętych badań
i w nadaniu pracy ostatecznego kształtu
Oraz Panu Prof. dr hab. Włodzimierzowi Rzesutko
za wsparcie, opiekę i życzliwość

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. METODY ANALITYCZNE STOSOWANE W OCENIE CZYSTOŚCI LEKÓW	11
1.1.1. <i>Metody chromatograficzne</i>	12
1.1.2. <i>Metody elektroforetyczne</i>	30
1.1.3. <i>Metody spektrofotometryczne</i>	31
1.1.4. <i>Inne metody analityczne</i>	35
1.2. CHARAKTERYSTYKA CHEMICZNA ORAZ METODY OCENY JAKOŚCI WYBRANYCH LEKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWBÓLOWYM I PRZECIWPALNYM .	36
2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	48
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	51
3.1. APARATURA	51
3.2. ODCZYNNIKI.....	52
3.3. SUBSTANCJE PORÓWNAWCZE	53
3.4. PREPARATY UŻYWANE DO BADAŃ	53
3.5. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE	57
3.5.1. <i>Badania wstępne</i>	57
3.5.1.1. Przygotowanie prób do badania ^1H NMR	58
3.5.1.2. Walidacja metody oraz statystyczna ocena wyników	59

3.5.2. <i>Leki zawierające w składzie diklofenak sodu</i>	63
3.5.2.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego	63
3.5.2.2. Wyniki badań	64
3.5.2.2.1. Wykonanie badania	70
3.5.2.2.2. Badanie trwałości diklofenaku w roztworach	75
3.5.3. <i>Leki zawierające w składzie indometacynę</i>	88
3.5.3.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego	88
3.5.3.2. Wyniki badań	89
3.5.3.2.1. Wykonanie badania	95
3.5.3.2.2. Badanie trwałości indometacyny w roztworach	98
3.5.4. <i>Leki zawierające w składzie naproksen</i>	108
3.5.4.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego	108
3.5.4.2. Wyniki badań	108
3.5.4.2.1. Wykonanie badania	111
3.5.4.2.2. Badanie trwałości naproksenu w roztworach	113
3.5.5. <i>Leki zawierające w składzie tramadol</i>	122
3.5.5.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego	122
3.5.5.2. Wyniki badań	123
3.5.5.2.1. Wykonanie badania	132
3.5.5.2.2. Badanie trwałości tramadolu w roztworach	134
4. DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ	146
5. WNIOSKI	159
6. PIŚMIENNICTWO	160

Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy

GLP – Zasady Dobrej Praktyki Laboratoryjnej

ICH – Międzynarodowa Konferencja Harmonizacji Wymagań dla Leków

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

^1H NMR – spektroskopia protonowego magnetycznego rezonansu
jądrowego

AAS – atomowa spektrometria absorpcyjna

AES – atomowa spektrometria emisyjna

GC – chromatografia gazowa

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

HPTLC – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa

LC – chromatografia cieczowa

HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa

RP-HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa z odwróconą
fazą

UV-Vis – zakres promieniowania elektromagnetycznego: nadfiolet – część
widzialna

MS – spektrometria mas

CZE – kapilarna elektroforeza strefowa

WAP – wstrzykowa analiza przepływowa

R_f – współczynnik retencji

NSLP – niesteroidowe leki przeciwbólne

\bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna

S – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku

S_x – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej

$\mu = \mu_{95\%}$ - przedział ufności średniej arytmetycznej
przy prawdopodobieństwie 95 %

RSD (w_z) – współczynnik zmienności

DL – granica wykrywalności

QL – granica oznaczalności

a, b – współczynniki kierunkowe prostej

k – współczynnik korelacji

P – pole powierzchni piku

c – stężenie

AU – jednostki umowne

w/w – stosunek wagowo-wagowy

v/v – stosunek objętościowo-objętościowy

w/v – stosunek wagowo-objętościowy

FP – Farmakopea Polska

FEur – Farmakopea Europejska

BP – Farmakopea Brytyjska

USP – Farmakopea Amerykańska

s. – numer serii

tab. – tabletki

amp., ini. – ampułka

kaps. – kapsułka

zan., z. – zanieczyszczenie

1. Wstęp

Nowocześnie rozumiana kontrola leków to system złożony, analizujący i oceniający wszystkie etapy rozwoju leku – począwszy od syntezy związku chemicznego, przez uznanie go za lek na podstawie wielodyscyplinarnych badań, dystrybucję i ordynowanie, aż do stałego monitorowania jego skuteczności terapeutycznej i działań niepożądanych.

Kierunki badawcze we współczesnej analizie leków obejmują:

- kontrolę procesów syntezy;
- oznaczanie tożsamości i zawartości, badanie trwałości, ocenę czystości, itp. w gotowych preparatach farmaceutycznych;
- badania toksykologiczne substancji leczniczej oraz ewentualnych zanieczyszczeń;
- śledzenie losów leku oraz jego metabolitów w organizmie;
- monitorowanie leków.

Badania te zmierzają w kierunku poprawy jakości leku, dając gwarancje bezpieczeństwa jego stosowania oraz skuteczności działania. Kontrola jakości jest szczególnie istotna przy wprowadzaniu do lecznictwa nowych preparatów.

Mając na uwadze ten problem wprowadzono w przemyśle farmaceutycznym zasady GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej) oraz wytyczne ICH (Międzynarodowej Konferencji Harmonizacji Wymagań dla Leków).

Prowadzone w wielu krajach badania nad jakością leków dostarczają argumentów do prowadzenia przez producentów stałego nadzoru nad lekiem [2, 3, 4, 5, 6, 9, 44, 83, 107, 138, 139].

Z punktu widzenia oceny jakości i wartości terapeutycznej substancji czynnej i postaci leku podstawowymi elementami oceny gotowych

preparatów są: czystość i tożsamość składnika czynnego, zawartość – jednorodność, trwałość chemiczna i fizyczna, dostępność biologiczna, przydatność, kontrola jakości. W analitycznej ocenie tych kryteriów wykorzystuje się metody klasyczne oraz instrumentalne, o wyborze których decyduje ich przydatność do rodzaju wykonywanych badań. Mogą to być zarówno metody jakościowe, półilościowe lub ilościowe, pozwalające na ocenę jakości surowca farmaceutycznego lub leku, gwarantując bezpieczne ich zastosowanie w leczeniu. Wymagania dla metod analitycznych stosowanych do kontroli jakości zostały określone w wytycznych ICH.

W odniesieniu do określenia czystości leku pojawia się problem sprecyzowania dopuszczalnych poziomów zanieczyszczeń. Dotyczy on zarówno jednoznacznej definicji pojęcia zanieczyszczenia i jego bezpiecznego poziomu, jak i często braku odpowiednich roztworów wzorcowych poszczególnych zanieczyszczeń.

ICH zajęła stanowisko w sprawie definicji pojęcia zanieczyszczenia uznając, że: „zanieczyszczeniami są wszystkie składniki substancji farmaceutycznej o innej budowie chemicznej niż substancja właściwa”, dokonując jednocześnie podziału zanieczyszczeń na trzy kategorie, które obejmują zanieczyszczenia organiczne, nieorganiczne i substancje lotne. Wytyczne ICH wprowadziły także pojęcie „profilu zanieczyszczenia”, tj. wykazu wszystkich zanieczyszczeń, jakie mogą pojawić się w danej substancji w trakcie jej procesu syntezy lub w wyniku degradacji surowca.

Warunkiem dopuszczenia związku chemicznego do leczenia jest określenie jego czystości, to jest rodzaju i poziomu zanieczyszczeń, które można podzielić na:

- zanieczyszczenia przypadkowe – są wprowadzone przez zanieczyszczenie substancji czynnej. Nie są rezultatem jej produkcji ani rozkładu i dlatego trudno je zidentyfikować;
- zanieczyszczenia toksyczne – wykazują pewną nieplanowaną aktywność biologiczną. Mogą pochodzić z syntezy lub rozkładu substancji leczniczej i należy określić ich zawartość wg monografii farmakopealnych lub norm producentów;
- składniki współistniejące – są to m. in. izomery geometryczne i optyczne czy mieszaniny antybiotyków. Jeżeli nie stanowią zagrożenia swoim działaniem nie trzeba ich traktować jako zanieczyszczenia;
- zanieczyszczenia sygnalizacyjne – mogą pochodzić z procesu produkcji lub z rozkładu leku i należy je zidentyfikować i oznaczyć ilościowo, gdyż dane te dostarczają informacji o stosowanej metodzie produkcji;
- zanieczyszczenia zwykłe – są to związki nieaktywne, pochodzące z syntezy lub rozkładu substancji. Ich obecność stwierdza się w oparciu o istniejące monografie. Zawartość tych związków ustalono maksymalnie na 2.0 %, chyba, że w szczegółowej monografii podano inaczej;
- zanieczyszczenia procesowe – są to zidentyfikowane lub niezidentyfikowane związki, wyłączając wodę, substancje pokrewne substancji leczniczej, związki nieorganiczne, rozpuszczalniki;
- lotne zanieczyszczenia organiczne – poprodukcyjne pozostałości rozpuszczalników.

Określenie poziomu zanieczyszczeń powinno uwzględniać bezpieczeństwo pacjenta i podawać:

- dla zanieczyszczeń organicznych poziomy:
 - każdego zidentyfikowanego zanieczyszczenia określanego indywidualnie;
 - każdego niezidentyfikowanego zanieczyszczenia określanego indywidualnie i występującego w ilości 0.1 % lub więcej;
 - każdego zanieczyszczenia szkodliwego występującego w ilości poniżej 0.1 %;
- poziom pozostałości rozpuszczalników lotnych;
- poziom zanieczyszczeń nieorganicznych.

Ocena profilu zanieczyszczeń substancji leczniczej może się okazać przydatna do kontroli stabilności i prawidłowości procesu produkcyjnego, a także ewentualnych zmian do niego wprowadzanych.

Podsumowując można stwierdzić, że wprowadzenie zasad ICH oraz reguł określanych przez międzynarodowe farmakopee ujednoliciło sposób oceny jakości leków. Wprowadzono kwalifikację procesu określenia biologicznego bezpieczeństwa danego zanieczyszczenia na ustalonym poziomie. Określono konieczność oceny czystości gotowych preparatów farmaceutycznych przez analizę produktów rozkładu, powstałych z substancji czynnej. Wprowadzono także podanie dokładnych informacji w opisie zanieczyszczenia i ustalenie jego granicznej zawartości.

Obecne możliwości technologiczne i analityczne umożliwiają realizację tych wymagań, przez co wprowadzane do obrotu leki są bezpieczne i najwyższej jakości.

1.1. Metody analityczne stosowane w ocenie czystości leków.

Zarówno surowiec jak i preparat farmaceutyczny nie są praktycznie nigdy substancjami analitycznie jednorodnymi. Możliwości badania ewentualnych zanieczyszczeń zależą od istnienia technicznych postępowań pozwalających na ich izolację, identyfikację i oznaczanie ilościowe.

Metody analityczne stosowane w analizie leków są zróżnicowane i cały czas udoskonalane [22, 30, 138, 168, 174, 181, 182]. Badania podążają w kierunku poszukiwania coraz to nowych, bardziej doskonałych sposobów oceny jakości leków, które będą mogły spełniać oczekiwania zarówno producentów leków, jak i kontroli jakości.

Postęp chemii analitycznej w zakresie instrumentalizacji metod analizy chemicznej znajduje odzwierciedlenie w ich wykorzystaniu w monografiach farmakopealnych i normach producentów. Stałe miejsce w tych przepisach zajmują metody chromatograficzne (HPLC, GC, TLC), spektrofotometrii w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego (UV – Vis), spektrofotometrii atomowej (AAS), spektrofotometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy spektrofotometrii mas (MS) [2, 3, 4, 5]. Zróżnicowanie to uwarunkowane jest wieloma względami. Przede wszystkim wspomnianą już dostępnością wysokiej klasy aparatury pomiarowej, a także potrzebą ciągłej modyfikacji opracowań pod kątem dokładnej oceny leków w aspekcie tak czystości, jak i tożsamości, zawartości i badań stabilności.

Często zarówno w surowcach, jak i w gotowych preparatach farmaceutycznych poza substancją czynną obecne są zanieczyszczenia, mogące pochodzić z procesu produkcyjnego albo z rozkładu składników czynnych bądź pomocniczych. W wielu przypadkach pojawia się dodatkowy problem w postaci istnienia substancji czynnej w formach

izomerycznych, mogących się różnić między sobą tak budową czy działaniem farmakologicznym, jak i toksycznością [15, 18, 19, 31, 86, 111, 137, 192]. Poza tym w różnych postaciach leków występują substancje pomocnicze (wprowadzane dla uzyskania pożądanej postaci leku), nośniki, środki konserwujące i mogące pochodzić z nich dodatkowe substancje, które jako zanieczyszczenia także mogą posiadać wpływ na wyniki uzyskiwanych oznaczeń i nie pozostają bez znaczenia w kontroli jakości preparatów farmaceutycznych.

Metoda analityczna zastosowana do badań zanieczyszczeń powinna umożliwiać ich oznaczenie na poziomie minimum 0.1 %, co jest wymaganiem zawartym w dokumentach ICH i wytycznych Komisji FEur. Stosowane metody muszą więc pozwolić na wykrycie zanieczyszczeń na poziomie co najmniej 0.05 %, co warunkuje pewność oznaczeń w żądanym zakresie.

Surowiec farmaceutyczny wraz z obecnymi w nim zanieczyszczeniami stanowi mieszaninę, którą w dalszych badaniach należałoby rozdzielić. Jest to problem o tyle trudny, że większość zanieczyszczeń ma chemicznie podobny charakter, jak sama substancja czynna. Wtedy warunki identyfikacji są bardzo utrudnione.

Przedstawione trudności ściśle wiążą się z oceną jakości leków i są uzasadnieniem do uaktualniania i szerokiego stosowania metod rozdzielczych do ich analizy.

1.1.1. Metody chromatograficzne

Chromatografia jest techniką znaną od początku XX wieku. Po okresie niedoceniaenia stała się obecnie jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej.

Pozycję tą zapewnia jej możliwość wykrywania substancji w próbce i jej oznaczania na bardzo niskim poziomie. W połączeniu z innymi metodami analizy (np. spektrometrią mas) w dużym stopniu spełnia wymagania stawiane uniwersalnej metodzie analitycznej, umożliwiającej rozwiązywanie wielu problemów.

Metody chromatograficzne są także najczęściej stosowanymi technikami rozdziału zanieczyszczeń od substancji leczniczej, pozwalającymi na jednoczesną identyfikację oraz określenie ich poziomów [196].

Chromatografia cieczowa (LC, HPLC)

W kontroli czystości leków bardzo ważną rolę odgrywa metoda HPLC. Obejmuje ona procesy rozdziału, w których fazą ruchomą jest ciecz przepływająca pod wysokim ciśnieniem przez fazę nieruchomą, osadzoną na kolumnie. Właściwie przebiegający proces HPLC uzależniony jest od prawidłowego doboru elementów, które stanowią system, czyli : fazy nieruchomej (kolumny), fazy ruchomej, pompy, dozownika, termostatu, detektora.

Fazy ruchome (pojedyncze rozpuszczalniki lub kilkuskładnikowe mieszaniny) wywierają decydujący wpływ na zdolność rozdzielczą układu. Przy ich wyborze należy uwzględnić rodzaj i skład rozdzielanej mieszaniny, rodzaj zastosowanego wypełnienia kolumny czy rodzaj detektora. Należy także zwrócić uwagę na siłę elucyjną eluentu. Im oddziaływanie cząsteczek eluentu z powierzchnią fazy nieruchomej są silniejsze tym łatwiej wypierają one z tej powierzchni cząsteczki chromatografowanej substancji. Jest to więc związane z siłą oddziaływania cząsteczek eluentu z powierzchnią adsorbentu, czyli z rodzajem fazy stacjonarnej. Przy adsorbentach polarnych siła elucji zależy od polarności

cząsteczek eluentu. Im siła ta jest większa, tym większa jest polarność rozpuszczalnika. W przypadku adsorbentów nie polarnych siła elucji wzrasta ze wzrostem rozmiarów nie polarnych fragmentów cząsteczek rozpuszczalników. Miarą mocy elucyjnej rozpuszczalników, czyli miarą ich zdolności wymywania substancji z kolumny są indeksy polarności (szeregi eluotropowe).

Inną ważną cechą rozpuszczalników jest ich lepkość. Ma ona wpływ na wysokość ciśnienia wymaganego do wywołania potrzebnego przepływu fazy ruchomej przez kolumnę. Ciśnienie to jest liniową funkcją lepkości, czyli należy stosować eluenty o małej lepkości.

Na wymianę jonów, czyli na efekt rozdzielania składników znaczny wpływ ma pH zastosowanej fazy ruchomej. Najczęściej stosuje się wodne roztwory buforowe o pH zależnym od rodzaju próbki i zastosowanej fazy nieruchomej. Od typu zastosowanej fazy stacjonarnej zależy natomiast to, czy podstawą procesu chromatograficznego będzie adsorpcja, podział międzyfazowy, wymiana jonowa czy sączenie molekularne. Jako wypełnienia kolumn do HPLC stosuje się różne modyfikacje na bazie krzemionki lub żywic porowatych, zmieniając wielkość ziaren oraz polarność stosowanych faz. Drobnodziarniste wypełnienia zapewniają krótką drogę dyfuzji cząsteczek chromatografowanych substancji do wnętrza ziaren i dzięki temu przy większych prędkościach przepływu fazy ruchomej można uzyskać wysoką sprawność kolumny.

Szczególnie istotne znaczenie mają te zmiany przy rozdziale izomerów optycznych, gdzie cały mechanizm opiera się na enancjoselektywności, tj. chiralna faza stacjonarna silniej wiąże jeden z enancjomerów [22, 59, 144]. Często stosuje się także odwrócone fazy [42, 178, 200] w poszukiwaniu jak najlepszych warunków rozdziału.

Dobór detektora w LC zależy od właściwości próbki. Najpopularniejsze są detektory fotometryczne absorpcji w nadfiolecie (UV) lub w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV – Vis), z płynną regulacją długości fali światła (190 – 600 nm) [21, 39, 48, 60, 77, 108, 132, 165, 191]. Po zatrzymaniu przepływu fazy ruchomej detektor umożliwia rejestrację widma absorpcji substancji i ustalenie długości fali przy maksimum absorbancji.

Coraz popularniejsze stają się także detektory z matrycą fotodiodową (DAD – diode array detector). Światło lampy deuterowej jest tutaj skupiane przez układ optyczny w komórce przepływowej, w której część światła jest absorbowana przez znajdującą się tam substancję wymytą z kolumny. Następnie promień światła rozszczepiony na siatce dyfrakcyjnej pada na matrycę diodową, której każda fotodioda jest czuła na światło w wąskim zakresie długości fali. Równoczesna rejestracja prądów z tych fotodiod umożliwia rejestrację całego widma absorpcji analizowanego związku, podczas przechodzenia przez detektor. Widmo to może być przedstawione w trójwymiarowym układzie współrzędnych – czas retencji / długość fali / absorbancja. Detektor ten umożliwia stwierdzenie, czy pik eluowany z kolumny odpowiada jednej substancji, czy w jednym pikcie mieści się więcej składników.

Poza opisanymi stosuje się także detektory spektrofluorymetryczne [76], podczerwieni [47], spektrofotometrii mas [65, 130], elektrochemiczne [46, 72, 104, 110], GC [28, 170] czy TLC [116].

Wszechstronność metody HPLC stanowi podstawę do wykorzystywania jej w analizie złożonych mieszanin różnych substancji i preparatów farmaceutycznych, zarówno do oznaczania zawartości składników, jak i do oceny czystości leków.

Analiza jakościowa polega na identyfikacji pików odpowiadających poszczególnym składnikom próbki przez porównanie wielkości retencyjnych (czasów retencji próbki i wzorca) lub przez zastosowanie detektorów jakościowych, np. spektrometru mas. Natomiast analiza ilościowa oparta jest na badaniu zależności pola powierzchni piku lub jego wysokości od stężenia danego składnika w próbce. Na wyniki wpływa jakość zastosowanej aparatury oraz stałość warunków prowadzenia analizy.

Chromatografia gazowa (GC)

Chromatografia gazowa to szybka i skuteczna metoda rozdzielania mieszanin związków lotnych. Posiada jednak ograniczone zastosowania do substancji, które w warunkach oznaczania mają postać gazów lub par. Z tego też względu w badaniu czystości substancji leczniczych znalazła ona zastosowanie przede wszystkim do kontroli pozostałości rozpuszczalników.

Najważniejszym elementem w procesie rozdziału w GC jest kolumna chromatograficzna. Rodzaj kolumny, a szczególnie jej wypełnienia ma decydujący wpływ na jakość rozdzielania składników i w efekcie na wynik analizy. Zastosowanie faz ciekłych osadzonych na odpowiednim nośniku dało duże możliwości w porównaniu do kolumn wypełnionych adsorbentami, w analizie niektórych leków, np. badanie pozostałości dimetyloaniliny czy octanu etylu [3]. Aktualnie najczęściej stosowane są kolumny kapilarne. Pozwalają one skrócić czas analizy i uzyskiwać lepsze efekty rozdzielania niż na dotychczas stosowanych kolumnach pakowanych. Dobór odpowiedniej temperatury w procesie chromatograficznym zależy od temperatury wrzenia (lotności) składników

rozdzielanej mieszaniny i od rodzaju zastosowanego wypełnienia kolumny. Podwyższanie temperatury zasadniczo pogarsza rozdział, natomiast jej obniżanie – polepsza warunki rozdziału, jednocześnie zbyt niska temperatura kolumny może powodować poszerzenie i niesymetryczność otrzymywanych pików.

Istotnym elementem chromatografu gazowego jest także detektor. Reaguje on na różnice właściwości fizykochemicznych gazu nośnego i gazu zawierającego substancje eluowane z kolumny. Powinien charakteryzować się dużą czułością, wykrywalnością, odtwarzalnością i stabilnością linii podstawowej, czyli sygnału otrzymywanego przy przepływie przez detektor samego gazu nośnego. Detektory są termostatowane i temperatura detektora nie powinna być niższa od temperatury kolumny, tak, aby substancja opuszczająca kolumnę nie ulegała w detektorze kondensacji.

Metodą chromatografii gazowej można dokonać zarówno analizy jakościowej, jak i ilościowej rozdzielanych substancji [12, 113, 162, 167, 175]. Analizę jakościową można wykonać przez porównanie wielkości retencyjnych pików identyfikowanych substancji na chromatogramie lub poprzez identyfikację innymi metodami analizy chemicznej lub fizykochemicznej, jak np. GC-MS. Natomiast o ilości substancji w mieszaninie można wnioskować na podstawie wielkości otrzymanego piku; wysokość i powierzchnia piku są wielkościami proporcjonalnymi do ilości oznaczanego składnika.

Chromatografia gazowa jest bardzo dobrą metodą rozdziału substancji, jednakże nie dającą jednoznacznych informacji o składzie rozdzielanej mieszaniny. Sprzężenie jej np. ze spektrometrią mas (GC-MS) spowodowało powstanie jednej z aktualnie najskuteczniejszych metod

analizy jakościowej i równocześnie strukturalnej związków organicznych, stosowanej szczególnie w analizie śladów [116, 172, 186].

W metodzie GC – MS chromatograf gazowy służy do rozdzielania mieszaniny na poszczególne składniki, które opuszczając kolumnę są przenoszone do spektrometru mas. Tutaj zachodzi jonizacja cząsteczek analizowanych substancji i ich rozpad na fragmenty charakterystyczne dla tych substancji. Te elementy, charakteryzujące się właściwym dla nich stosunkiem masy do ładunku, są rozdzielane w polu elektrostatycznym i magnetycznym na fragmenty. Po rozdzieleniu składników mieszaniny i otrzymaniu ich widm masowych możliwa jest identyfikacja poszczególnych substancji. Najczęściej wykonuje się to przez porównanie otrzymanych widm masowych z widmami zachowanymi w komputerze.

Często analizowane związki nie spełniają warunku lotności (np. cukry, aminokwasy, steroidy). Przeprowadza się wtedy ich derywatyzację, czyli przekształcenie w odpowiednie pochodne o zwiększonej lotności i jako takie pobiera do oznaczeń metodą GC [9].

Ostatnio coraz częściej zalecanym sposobem zastosowania chromatografii gazowej, przede wszystkim do oznaczania pozostałości rozpuszczalników m. in. w lekach jest technika „head-space”. Polega ona na analizie gazu (pary) pozostającego w równowadze termodynamicznej nad trudno lotną cieczą lub ciałem stałym w układzie zamkniętym [127]. Podstawę stanowi tutaj zależność ciśnienia cząstkowego składnika w fazie gazowej od jego stężenia w ciekłej mieszaninie.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

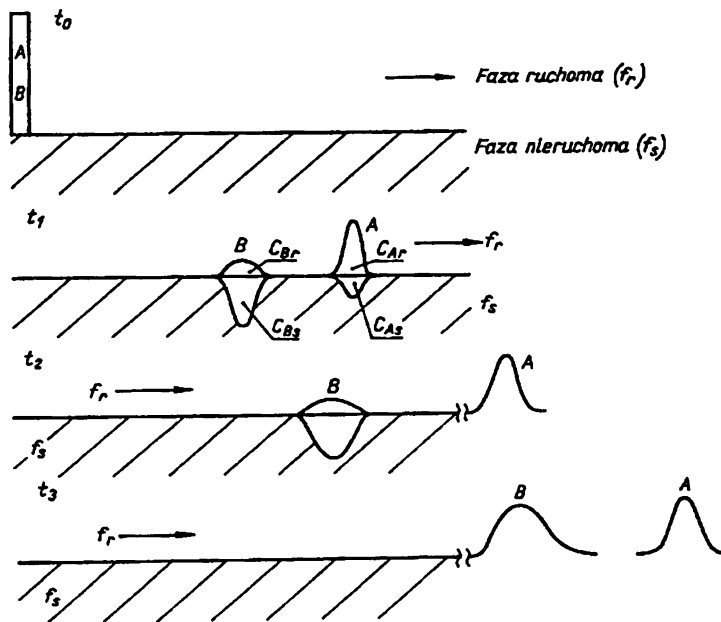
Metody chromatografii cienkowarstwowej należą do grupy najczęściej stosowanych metod analizy, szczególnie farmaceutycznej.

Ich główne zalety to: możliwość różnorodnej detekcji badanej substancji, odzyskiwanie związków po rechromatografii, wykonywanie oznaczeń często bez wstępnego oczyszczania próbek oraz łatwy sposób wykonania analizy. Instrumentalizacja tych metod zwłaszcza w odniesieniu do detekcji stwarza nowe możliwości ich wykorzystania do analizy jakościowej oraz ilościowej. Dzięki temu znajdują one szerokie zastosowanie do potwierdzania tożsamości, oznaczania zawartości substancji czynnych oraz do badań czystości leków.

Metody TLC obejmują wszystkie procesy chromatograficzne, w których rozdział następuje z wykorzystaniem płytek szklanych, aluminiowych lub z tworzywa sztucznego, pokrytych jednolitą warstwą fazy nieruchomej. Optymalizacja warunków chromatograficznych [118] dotyczy doboru fazy stacjonarnej i fazy ruchomej (rodzaj, szybkość przepływu), sposobu rozwijania chromatogramów i temperatury.

Ze względu na sposób rozwijania chromatogramów można wybrać metodę: wstępującą, horyzontalną (liniową), cyrkularną, wielokrotną albo z rozwijaniem gradientowym (krokami) lub dwukierunkowym.

Należy doświadczalnie ustalić także długość rozwijania chromatogramów, temperaturę, ciśnienie, szybkość rozwijania oraz objętość nanoszonej próby, aby uzyskane plamki były zwarte. Składniki próbki poruszają się w układzie chromatograficznym tylko wtedy, gdy znajdują się w fazie ruchomej. Składniki wykazujące większe powinowactwo do fazy stacjonarnej poruszają się wolniej niż te, które mają większe powinowactwo do fazy ruchomej.



Rysunek 1. Schemat rozdziłu chromatograficznego substancji A i B między fazę ruchomą i stacjonarną (t_0 – czas wprowadzenia mieszaniny do układu chromatograficznego; t_1 , t_2 – wybrane czasy z przebiegu rozdziłu; t_3 – czas zakończenia rozdziłu; C – stężenie składnika (A lub B) w fazie ruchomej (f_r) lub nieruchomej (f_s))

Składnik A rozpuszcza się w fazie nieruchomej lub absorbuje się na niej słabiej niż składnik B, czyli cząsteczki tych składników dzielą się między obie fazy w różnych stosunkach, wyrażanych jako stałe podziału:

$$\text{dla A: } K_A = \frac{c_{As}}{c_{Ar}} \quad \text{dla B: } K_B = \frac{c_{Bs}}{c_{Br}}$$

Podczas rozwijania następuje ciągłe ustalanie się równowagi dynamicznej z wielokrotnym przechodzeniem cząsteczek substancji z jednej fazy do drugiej. Rozdział składników jest możliwy, gdy stałe podziału są różne ($K_A \neq K_B$). Otrzymany pik składnika B jest szerszy niż składnika A, co może być związane z rozmyciem dyfuzyjnym składnika B, który dłużej przebywał w układzie chromatograficznym.

Ułamek cząsteczek substancji w fazie ruchomej określa współczynnik R_F :

$$R_f = \frac{1}{1+k} \quad \text{gdzie: } k - \text{współczynnik retencji, określony jako:}$$

$$k = \frac{\text{ilosc substancji w fazie nieruchomej}}{\text{ilosc substancji w fazie ruchomej}}$$

Wartość współczynnika R_F praktycznie wyznacza się bezpośrednio z chromatogramów jako:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

gdzie: a – droga przebyta przez substancję analizowaną;

b – droga przebyta przez fazę ruchomą.

Im większa różnica między współczynnikami R_f substancji, tym większa jest selektywność i lepszy rozdział. Wpływ na ten proces ma struktura i właściwości fizykochemiczne substancji oznaczanych, skład fazy ruchomej, jej pH, skład fazy stacjonarnej, temperatura, nasycenie komory oraz technika rozwijania.

Budowa chemiczna substancji oznaczanej powoduje, że określone typy związków różnie ulegają adsorpcji na powierzchni stałych adsorbentów [174]. Szczególną rolę pełni tu rodzaj wiązań chemicznych, który decyduje czy dana substancja będzie ulegała silniejszej czy słabszej adsorpcji w zależności od użytych adsorbentów. Jest to szczególnie istotne w analizie mieszaniny wieloskładnikowej, gdzie tworzą się wiązania (szczególnie wodorowe) między cząsteczkami substancji rozdzielanych i rozpuszczalnika oraz między cząsteczkami substancji rozdzielanych, rozpuszczalnika i grupami powierzchniowymi adsorbentu.

Na wartość współczynnika R_f główny wpływ ma polarność fazy ruchomej. Polarny rozpuszczalnik ma tendencje do gromadzenia się w fazie zaadsorbowanej. Do rozwijania chromatogramów stosuje się więc

pojedyncze rozpuszczalniki lub częściej, ich mieszaniny. Podstawowym warunkiem jest fakt, aby nie reagowały one ani z substancją oznaczaną, ani z fazą stacjonarną, co mogłoby dawać dodatkowe plamy. Doboru odpowiedniej fazy ruchomej dokonuje się więc doświadczalnie, w warunkach oznaczania próbki.

Wybierając rodzaj fazy stacjonarnej można wybrać technikę adsorpcyjną, podziałową, jonowymienną lub sitowo – molekularną.

Podział stosowanych adsorbentów:

1. według budowy chemicznej powierzchni adsorbentu, m. in. : żel krzemionkowy, tlenek glinu, celuloza, poliamid (żywice organiczne), chiralne (np. β -cyklodekstryna), czy odwrócone (RP; żel krzemionkowy związany podstawnikami alkilowymi i fenyłowymi).

2. według polarności substancji, które ulegają na nich adsorpcji:

- polarne (adsorpcja substancji polarnych i słabo polarnych; tlenki metali);
- słabo polarne (adsorpcja substancji polarnych);
- nie polarne (adsorpcja substancji nie polarnych; węgle aktywne; modyfikowana krzemionka).

3. według pH powierzchni adsorbentu:

- kwaśne (adsorpcja substancji zasadowych; żel krzemionkowy);
- zasadowe (adsorpcja substancji kwasowych; tlenek glinu);
- neutralne (siarczany metali).

4. według wielkości powierzchni właściwej i wielkości porów (związane z energią powierzchniową adsorbentu, czyli z energią adsorpcji cząsteczek substancji na tych powierzchniach).

5. według typu oddziaływań między adsorbentem a cząsteczkami substancji rozdzielanych.

6. według chemicznych własności:

- niespecyficzne (neutralne) – na ich powierzchni brak ugrupowań elektrodonorowych i elektroakceptorowych, ani wiązań typu π – stosowane do chromatografowania związków nie polarnych i średnio polarnych, które ulegają silnej adsorpcji z roztworów zawierających wodę;
- specyficzne (+) – na ich powierzchni są polarne grupy funkcyjne, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z grupami funkcyjnymi substancji oznaczanych – stosowane do rozdziału związków polarnych;
- specyficzne (-) – powstałe przez chemiczną modyfikację nośników, np. żelu krzemionkowego szeroko porowatego.

Sprawność w TLC można także poprawić stosując adsorbenty z jak najmniejszą średnicą ziaren (płytki HPTLC – high performance thin layer chromatography). Opory przepływu fazy ruchomej na płytkach wysokosprawnych są większe i przepływ tej fazy jest tutaj wolniejszy. Rozdzielanie składników jest czasami jednak lepsze, wystarczy także krótsza droga rozwijania chromatogramu, co daje mniejsze dyfuzyjne rozmycie plamek oraz możliwość obniżenia poziomu wykrywalności.

Najczęściej stosowanym w TLC adsorbentem jest żel krzemionkowy. Zdolność adsorbowania się cząsteczek substancji oznaczanej na powierzchni tego żelu zależy m. in. od ich polarności. Najslabiej adsorbują się związki nie polarne (np. węglowodory nasycone), co uwidacznia się w większych wartościach R_f w stosunku do związków polarnych. Wielkość adsorpcji rośnie ze wzrostem liczby wiązań podwójnych i polarnych grup funkcyjnych występujących w substancji chromatografowanej. Obecność polarnych grup funkcyjnych w cząsteczce zwiększa powinowactwo adsorpcyjne i efekt ten rośnie w kolejności:

$-Cl < -H < -OCH_3 < -NO_2 < -NH_2 < -OH < -CONH_2 < -COOH$. Jeżeli w cząsteczce jest więcej grup funkcyjnych to powinowactwo adsorpcyjne jest sumą oddziaływań każdej z nich, gdyż adsorpcja zależy od położenia grup w cząsteczce. Cząsteczki substancji adsorbowanej przyczepiają się za pomocą swoich grup polarnych (poprzez tworzenie wiązań wodorowych). Cząsteczki substancji badanej porywane przez fazę ruchomą są rozmieszczane między ziarnami adsorbentu. W związku z różną prędkością cieczy, w zależności od odległości od ścianek kanalików w adsorbencie, cząsteczki te mogą być nierówno przesunięte do dalszych warstw adsorbentu. Cząsteczki oznaczanej substancji znajdujące się w dalszej części pasma startują wcześniej i nakładają się na położone wyżej. Dodatkowa szybkość migracji fazy ruchomej w czasie rozwijania maleje. Wiąże się z tym zjawisko rozmycia pasma. W celu jego uniknięcia trzeba stosować adsorbenty o możliwie małych średnicach ziaren, kulistym kształcie i jednorodnych wymiarach kanalików.

Analizując zależności w metodzie TLC nasuwa się wniosek, że ma ona jeszcze bardzo duże możliwości rozwoju w wielu kierunkach, tj.

- konstrukcji nowych typów komór chromatograficznych (mniejsze zużycie rozpuszczalników; rozwijanie pod ciśnieniem);
- doskonalenia aparatury pomiarowej (zwiększanie czułości i dokładności; możliwości oznaczeń ilościowych);
- wprowadzania nowych adsorbentów w postaci gotowych płytek (lepsza selektywność);
- nowych metod detekcji.

W celu zwiększenia selektywności rozdzielania powierzchnie żelu modyfikuje się przez pokrycie np. związkami srebra czy miedzi lub impregnację buforami, w celu uzyskania odpowiedniego pH.

Dla ułatwienia prowadzenia analizy można stosować także płytki pokryte czynnikiem fluoryzującym.

Metodę chromatografii cienkowarstwowej można wykorzystać zarówno do badania tożsamości (analiza jakościowa) i czystości leków, jak i do oznaczania zawartości substancji czynnych i współobecnych (analiza ilościowa).

Zakłada się, że związek badany i jego wzorzec są identyczne wtedy, gdy obydwie substancje wykazują te same wartości R_f , a zmieszane tworzą na rozwiniętym chromatogramie jedną plamę.

W celu sprawdzenia czystości preparatów należy nanieść na tą samą płytkę obok próbek substancji badanej, próbki związku stanowiącego jej zanieczyszczenie. Po rozwinięciu chromatogramu obok plam substancji badanej mogą pojawić się dodatkowe plamy związków będących zanieczyszczeniami. Stopień czystości można określić na podstawie wielkości plamy oraz jej intensywności (obserwacja w świetle nadfioletowym UV lub widzialnym Vis, po wybarwieniu chromatogramu). Z uwagi na fakt, że do identyfikacji i ewentualnych oznaczeń poziomu zanieczyszczeń potrzebne są odpowiednie substancje wzorcowe, które często bywają niedostępne lub koszty ich zakupu są zbyt wysokie w badaniach ilościowych stosuje się metodę normalizacji wewnętrznej. Poszczególne zanieczyszczenia oznacza się przez określenie ich stężenia (w %, w/w) względem sumy powierzchni wszystkich składników, zidentyfikowanych na chromatogramie. Metoda ta pozwala na określenie zarówno ilości pojedynczych zanieczyszczeń, jak również ich sumy.

Procedura oznaczeń ilościowych odbywa się w następujący sposób: z rozwiniętego chromatogramu należy zeszkrobać warstwę adsorbentu zawierającą substancję, którą chcemy oznaczyć, a następnie wyeluować

odpowiednim rozpuszczalnikiem i z tak otrzymanego roztworu wykonać pomiar, np. metodą spektrofotometryczną.

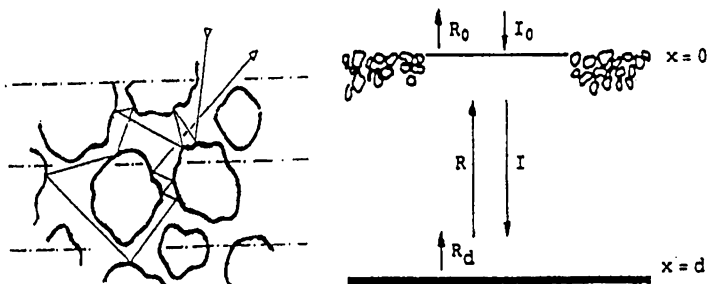
Dzięki rozwojowi aparatury czynności te można ominąć, dokonując oznaczeń ilościowych bezpośrednio. Stosuje się w tym celu densytometrię i skanowanie chromatogramów bezpośrednio z płytek, dokonując pomiarów w zakresie UV – Vis lub wykorzystując pomiary fluorymetryczne. Stosowane densytometry pozwalają także zarejestrować widma absorpcyjne oznaczanych składników bezpośrednio z chromatogramu, a nawet prowadzić obserwacje video-densytometryczne skanowanego chromatogramu.

W metodzie densytometrycznej uzyskanie dokładnych wyników zależy przede wszystkim od zastosowanej aparatury (dobór filtrów, szczeliny, szybkości skanowania) i jakości otrzymanych chromatogramów (sposób przygotowania, rozwijania, ewentualnie wywołania).

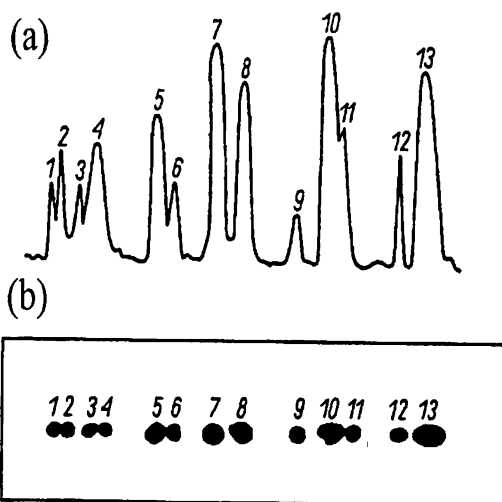
Pomiar densytometryczny ma charakter różnicowy. Światło padające na płytkę chromatograficzną umieszczoną w aparacie jest rozpraszane i odbijane w różnych kierunkach od cząstek w warstwie adsorbentu. Na zjawisko to ma wpływ rodzaj fazy stacjonarnej, jak i jej zmiany w trakcie procesu rozwijania. Z różnicy natężenia światła padającego na plamkę i rejestrowanego przez fotopowielacz można wnioskować o natężeniu barwy badanej plamki. Jest ona proporcjonalna do ilości substancji. Najwyższą czułość można osiągnąć poprzez pomiar maksimum absorpcji analizowanej substancji. Densytogram powstaje więc w wyniku rejestracji zmian intensywności światła odbitego lub przechodzącego przez płytkę i po elektronicznej obróbce, zapisywaniu ich w postaci pików.

Możliwy jest także pomiar fluorescencji; stosowany wtedy adsorbent charakteryzuje się ściśle określonym natężeniem fluorescencji, a naniesione na płytkę substancje mogą powodować jej osłabienie

lub całkowite wygaszenie, które jest proporcjonalne do stężeń tych substancji.



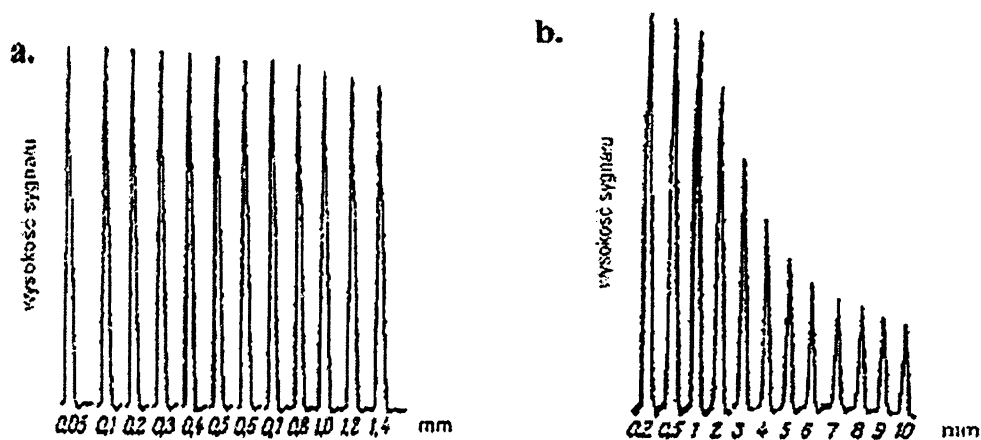
Rysunek 2. Bieg promieni świetlnych w warstwie adsorbentu (I – natężenie światła w strefie z substancją; I_0 – natężenie światła padającego; R – natężenie światła odbitego od warstwy adsorbentu; R_0 – natężenie światła odbitego; R_d – natężenie światła odbitego w warstwie o skończonej grubości; d – grubość warstwy adsorbentu).



Rysunek 3. Przykładowy densytogram (a) i chromatogram (b) rozdzielonej mieszaniny wieloskładnikowej.

Dany chromatogram można przekształcić w densytogram wiele razy, przy stosowaniu różnych długości fali i różnych parametrach aparaturowych, optymalizując warunki analizy.

Aby uzyskane wyniki były dokładne należy zwrócić uwagę na dobór szerokości i wysokości szczeliny w densytometrze, która może mieć wpływ na kształt i wysokość otrzymanego piku. Dla plamki okrągłej szerokość szczeliny powinna wynosić 120 % jej średnicy, a dla pasma ok. 60 % jej długości. Wysokość sygnału nie zmienia się znacznie w zależności od szerokości szczeliny. Natomiast im większa jest wysokość szczeliny jest mniejsza tym większa jest precyzja pomiaru i wyższy poziom wykrywalności. Zależności te ustala się eksperymentalnie.



Rysunek 4. Zależność wysokości sygnału od a. szerokości; b. wysokości szczeliny w densytometrze.

O sposobie skanowania decyduje także kształt plamek. Gdy są one okrągłe to kierunek skanowania może być dowolny. Natomiast w przypadku plam owalnych należy skanować wzdłuż drogi migracji fazy ruchomej.

Wybór tych parametrów pozwala otrzymać na densytogramie piki dobrze wykształcone, proste i prawidłowe do interpretacji ilościowej. Porównywalność wyników ilościowych w densytometrii uzyskuje się stosując stałą szybkość przesuwania się płytki chromatograficznej względem szczeliny.

Rozwiązaniem problemu prawidłowego i powtarzalnego kształtu plamki stał się automatyczny sposób nanoszenia próbek. Wprowadzone zostały aplikatory do nanoszenia roztworów (w postaci aerozolu) w kształcie punktu lub pasma o zmiennej szerokości. Przyrządy te gwarantują jednorodność plamek i symetrię rejestrowanych pików.

Chromatografię cienkowarstwową połączoną z densytometrią można wykorzystywać do badań ilościowych otrzymując dokładne wyniki, szczególnie metodą porównania z substancjami wzorcowymi. Uzyskiwane po zeskanowaniu chromatogramu dane dla pików obliczane są automatycznie poprzez całkowanie dla początku, punktu maksymalnego i końca pików, wysokości oraz powierzchni pików. Wartości wysokości i powierzchni pików wyrażane są w jednostkach umownych absorbancji AU (Arbitrary Units). Wyniki dla próbek badanych poddaje się obróbce w oparciu o analogiczne dane uzyskane dla odpowiednich substancji wzorcowych. Najczęściej do obliczeń wykorzystuje się wartości powierzchni pików. Wartości wysokości pików mogą fałszować wyniki zwłaszcza, gdy analizowanym pasmom towarzyszy rozmycie.

W ostatnich latach w literaturze ukazało się wiele prac, w których autorzy wykorzystują technikę TLC lub HPTLC, także w połączeniu z innymi metodami, np. HPLC [14, 50, 175] lub MS [29]. Metody te stosowano zarówno do identyfikacji i oznaczania zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych [29, 66, 82, 85, 89, 90, 92, 93, 96, 97, 98, 99, 102, 154], jak i do oznaczania zawartości substancji czynnych w lekach [14, 56, 62, 68, 74, 84, 87, 88, 91, 94, 95, 100, 101, 184, 194] oraz w materiale biologicznym [53, 109, 122, 124, 136, 195].

1.1.2. Metody elektroforetyczne

Coraz większą popularność wśród metod analitycznych zyskują metody wykorzystujące zjawisko ruchliwości cząstek pod wpływem pola elektrycznego w przewodzącym środowisku, umieszczonym w kapilarze.

Terminem kapilarnych metod elektromigracyjnych określa się dużą grupę technik, do której należą m. in. kapilarna elektroforeza strefowa (capillary zone electrophoresis – CZE), żelowa elektroforeza kapilarna (capillary gel electrophoresis – CGE), elektrochromatografia kapilarna (capillary electrochromatography – CEC). Najprostszą i równocześnie najbardziej rozpowszechnioną jest CZE.

Mechanizm rozdzielania elektroforetycznego opiera się na fakcie posiadania przez analizowane próbki związków chemicznych, których cząsteczki mają ładunek ujemny lub dodatni, albo są elektrycznie obojętne. Mogą one mieć różne rozmiary i różną wielkość ładunku. Wpływa to na kierunek i szybkość ich ruchu w polu elektrycznym po wprowadzeniu próbki do kapilary. Rozdzielanie składników mieszanin następuje w kapilarze wypełnionej roztworem buforu (elektrolitem podstawowym jako fazą ruchomą). Jego rodzaj i stężenie wpływa na retencję, kształt otrzymywanych pików oraz jakość ich rozdzielania. Ruch składników próbki jest więc wypadkową ruchu buforu i wpływu na nie przyłożonego pola elektrycznego. Związki posiadające ładunek charakteryzują się różną ruchliwością elektroforetyczną i ulegają rozdzielaniu. Prędkość migracji cząsteczek zależy od natężenia pola elektrycznego, lepkości środowiska, ładunku i rozmiaru rozdzielanych cząstek.

Ważną częścią procedury analitycznej jest wybór sposobu detekcji rozdzielonych składników mieszaniny. Najczęściej stosuje się detektory,

jak w chromatografii cieczowej (UV – Vis), a poza tym detektory fluorescencyjne, elektrochemiczne oraz spektrometry mas.

Metody elektroforetyczne cechuje bardzo dobra rozdzielczość, stosunkowo krótki czas analizy i duża wykrywalność. Ich wszechstronność jest podstawą do wykorzystywania w analizie jakościowej i ilościowej mieszanin różnych związków. Do identyfikacji składników stosuje się albo porównywanie czasów migracji z substancją wzorcową albo odpowiednie detektory np. spektrometr mas. Analiza ilościowa opiera się na zależności wysokości lub powierzchni otrzymanego piku od ilości oznaczanego składnika.

Metody elektroforetyczne stosowano od wielu lat w naukach biomedycznych. Teraz znajdują one szerokie zastosowanie także w kontroli jakości leków [52, 70, 152]. Metody te stosowane są również w analizie związków chiralnych. W tym przypadku do roztworu w kapilarze dodaje się chiralne domieszki (np. cyklodekstryny) i prowadzi analizę.

1.1.3. Metody spektrofotometryczne

W badaniach analitycznych stosuje się całą gamę metod spektroskopowych. Rejestrowanie widm związków chemicznych w nadfiolecie i w zakresie widzialnym jest jedną z podstawowych czynności wykonywanych przy identyfikacji, oznaczaniu zawartości i określaniu struktury związków.

Wybór metody do rozwiązania konkretnego problemu zależy m. in. od struktury i własności badanego układu oraz od rodzaju poszukiwanej informacji. Standardową procedurą jest identyfikacja związków organicznych w oparciu o ich widma absorpcyjne. Spektrofotometria w obszarze widzialnym i w nadfiolecie stosowana jest także

do ilościowego oznaczania substancji prostych oraz do analiz mieszanin kilkuskładnikowych, dla których pasma absorpcyjne są od siebie oddzielone.

Pomimo małej specyficzności klasyczne metody spektrofotometryczne należą do najpopularniejszych metod stosowanych w różnych dziedzinach nauki. Są one przede wszystkim szybkie i tanie oraz opierają się o ogólnie dostępną aparaturę. Metody te stosowane są zarówno do analizy zawartości substancji czynnych w różnych postaciach leków [8, 16, 35, 38, 49, 81, 119, 125, 128, 131, 142, 160, 176, 185], jak i do badań stabilności preparatów farmaceutycznych [7, 11, 190, 199].

Możliwości tych metod zwiększyły się znacząco po wprowadzeniu spektrofotometrii pochodnej [25, 41, 63, 71, 78, 133, 187]. Metodyka tych oznaczeń opiera się na automatycznym różniczkowaniu podstawowych widm absorpcyjnych, w wyniku czego otrzymuje się pochodne odpowiednich rzędów (od I do V). Rejestrowana krzywa pochodna widma przedstawia wartość różniczki absorbancji względem długości fali w funkcji długości fali. Umożliwiło to jednoczesne oznaczanie kilku składników obok siebie w mieszaninie, zwiększyło selektywność oraz czułość metody. Proces ten pozwala lepiej eliminować tło i widma przeszkadzające, a co za tym idzie, lepiej identyfikować związki. Tą metodykę wykorzystuje się szeroko do oznaczania substancji leczniczych w różnych postaciach leku oraz w materiale biologicznym.

Jedną z najmłodszych dziedzin spektroskopii jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance – NMR). Fizyczną podstawę tej metody stanowi zjawisko magnetyzmu jądrowego. Oddziaływanie magnetycznego momentu jądrowego z zewnętrznym polem magnetycznym prowadzi do powstania układu jądrowych poziomów energetycznych. Za pomocą nadajnika wysokiej

częstotliwości można w tym układzie poziomów energetycznych wzbudzać przejścia poszczególnych jąder. Absorbpcję energii obserwuje się jako układ linii spektralnych (tzw. sygnałów rezonansowych). Z nich powstaje widmo. Zarejestrować je można tylko w przypadku jąder, które mają moment magnetyczny, tj. proton ^1H , jądro fluoru ^{19}F , jądra izotopów azotu ^{14}N i ^{15}N oraz jądro izotopu węgla ^{13}C .

Oprócz sygnałów rezonansowych w widmie zarejestrowane są krzywe schodkowe, obrazujące względną powierzchnię sygnałów. Otrzymuje się je za pomocą integratora, wbudowanego w spektrometr.

Protony cząsteczki dają kilka sygnałów rezonansowych. Poszczególne częstotliwości rezonansowe są różne i zależą od chemicznego otoczenia danego jądra. Między sygnałami występuje więc przesunięcie chemiczne σ . Zdefiniowane jest ono równaniem:

$$\sigma = (\Delta \nu / \nu_R) \cdot 10^6$$

gdzie: ν_R – częstotliwość rezonansowa wzorca w polu magnetycznym w danym doświadczeniu;

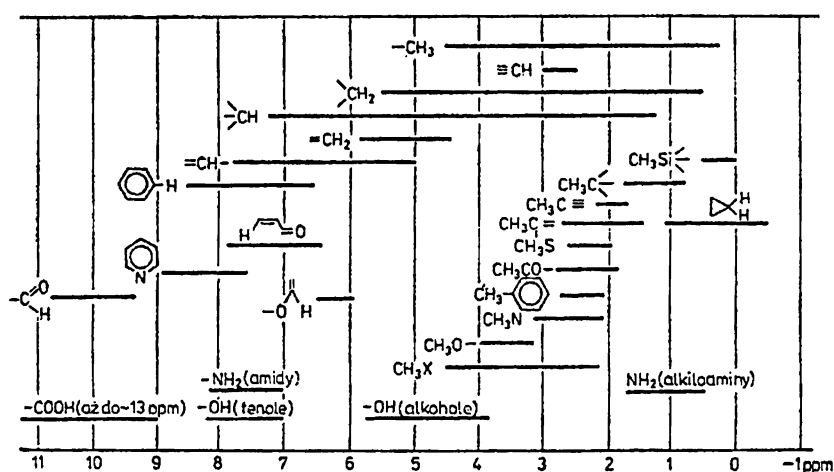
$\Delta \nu$ – różnice częstotliwości rezonansowych wzorca i substancji, dla której mierzy się przesunięcie chemiczne przy stałym natężeniu pola.

Powierzchnia pól pod sygnałami rezonansowymi jest proporcjonalna do liczby protonów dających dany sygnał. Wyznaczyć ją można poprzez integrację.

Nie wszystkie jądra dają proste linie spektralne (singlety). Dla niektórych obserwuje się charakterystyczne rozszczepienia sygnałów (tryplet, kwartet). Przyczyną tego zjawiska jest oddziaływanie jąder pomiędzy sobą tzw. sprzężenie spinowo – spinowe. Jest to magnetyczne oddziaływanie między poszczególnymi protonami przekazywane

nie bezpośrednio poprzez przestrzeń, ale pośrednio – przez elektrony wiązań łączących dane protony. W efekcie pole magnetyczne wokół jądra jest wzmacniane lub osłabiane, czyli zmienia się jego natężenie. Odpowiednio do tego linie rezonansowe oddziałujących ze sobą jąder rozszczepiają się.

Podstawą badań strukturalnych nieznanymi substancjami za pomocą spektroskopii NMR są zależności pomiędzy parametrami widma (przesunięciem chemicznym i rozszczepieniem sygnału), a strukturą cząsteczki, w połączeniu ze względnym natężeniem sygnałów.



Rysunek 5. Skala σ przesunięć chemicznych protonów w niektórych związkach organicznych.

Przesunięcia chemiczne pozwalają rozpoznać otoczenie chemiczne badanego jądra w analizowanej substancji i może służyć do ustalania struktury związków chemicznych.

Integracja widma umożliwia wyciąganie wniosków o względnej liczbie jąder i może służyć do określania składników mieszaniny.

Sprężenie spinowo – spinowe pozwala zbadać, w jakim porządku ułożone są jądra w cząsteczce, ponieważ wielkość tego oddziaływania zależy od liczby i rodzaju wiązań pomiędzy jądrami.

Rozszczepienie (multipletowość) sygnałów rezonansowych oraz rozkład natężenia w obrębie danego multipletu w prostych przypadkach jest związana z liczbą protonów w grupie sąsiedniej.

Możliwości zastosowania spektroskopii NMR mogą być różnorodne, co pozwala wykorzystywać tę technikę m. in. w chemii analitycznej do identyfikacji składników w lekach [54, 157].

1.1.4. Inne metody analityczne

Zyskującą coraz więcej zastosowań w analizie leków jest metoda wstrzykowej analizy przepływowej WAP [36, 67, 75, 114, 141]. Zaletą tej metody względem pozostałych technik jest całkowita automatyzacja analizy. Efekty reakcji ubocznych są znacznie zminimalizowane, co zwiększa czułość i selektywność tej metody. Badana próbka jest wstrzykiwana do strumienia ciekłego nośnika, reagenty dodawane są automatycznie i stopniowo, a reakcje chemiczne zachodzą w ściśle określonych warunkach. Pełna automatyzacja metody zapewnia powtarzalne warunki prowadzonych oznaczeń oraz pozwala uniknąć wielu błędów.

1.2. Charakterystyka chemiczna oraz metody oceny jakości wybranych leków o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym

Stosowane w terapii leki przeciwbólowe dzieli się na dwie grupy:

- opioidowe leki przeciwbólowe;
- nieopiodowe leki przeciwbólowe [34, 198, 202].

Do pierwszej grupy należą intensywnie działające leki o silnym działaniu ośrodkowym, znoszące nawet bardzo silne bóle. Powodują one uzależnienia, a w większych dawkach wywołują stan narkozy. Leki te mają głównie zastosowanie w ostrych stanach pourazowych, czy w chorobach nowotworowych. Należą tu m. in. morfina, kodeina, heroina, itp.

Drugą grupę stanowią niesteroidowe leki przeciwbólowe (NSLP), działające słabiej przeciwbólowo niż leki z pierwszej grupy, ale równocześnie nie wywołujące przyzwyczajień ani narkozy. W odróżnieniu od narkotycznych leków przeciwbólowych działają one także na ośrodek termoregulacyjny, obniżając podwyższoną temperaturę ciała (działanie przeciwgorączkowe). Wiele z tych leków wykazuje także działanie przeciwzapalne.

Poszczególne leki z dużej grupy NSLP pomimo podobnego działania farmakologicznego mają różne zastosowanie lecznicze, ze względu na różnice w sile działania leczniczego, jak i toksycznego. Wszystkie NSLP charakteryzują się wyraźnym pułapem działania przeciwbólowego. Oznacza to, że w dawce leczniczej osiągają maksymalną siłę działania przeciwbólowego, zwiększenie tej dawki nie powoduje nasilenia ich działania, może natomiast spowodować wystąpienie objawów niepożądanych. Leki z tej grupy wywierają podobne działania niepożądane,

choć w różnym stopniu nasilenia. Najczęściej działają niekorzystnie na przewód pokarmowy, wywołując nudności, biegunki, owrzodzenie żołądka i dwunastnicy. Przy dłuższym podawaniu mogą uszkodzić miąższ wątroby i nerek. Mogą także spowodować spadek krzepliwości krwi, wywołać odczyny alergiczne czy astmatyczne. W związku z tym trwają ciągłe poszukiwania nowych, równie skutecznych leków, ale pozbawionych cech niepożądanych.

Omawiane w dalszej pracy niesteroidowe leki przeciwbólowe mają różną budowę chemiczną, wykazują różne właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne oraz różną toksyczność.

Ze względu na strukturę chemiczną można je podzielić na następujące grupy:

- pochodne kwasu salicylowego (np. kwas acetylosalicylowy);
- pochodne aniliny i p-aminofenolu (np. paracetamol);
- pochodne pirazolinonu (np. fenylobutazon, propyfenazon, które cechuje duża toksyczność);
- pochodne kwasu indoloctowego (np. indometacyna);
- pochodne kwasu fenyloctowego (np. diklofenak);
- pochodne kwasu propionowego (np. ibuprofen, naproksen);
- pochodne kwasów enolowych (np. piroksykam).

Należy wspomnieć także o grupie leków klasyfikowanych na pograniczu narkotycznych i nienarkotycznych leków przeciwbólowych, działających analogicznie jak pochodne morfiny, jednocześnie nie powodujące uzależnień, lecz posiadające słabsze działanie przeciwbólowe (np. tramadol).

Niesteroidowe leki przeciwbólowe stanowią grupę preparatów o dużej dostępności i skuteczności. Są zatem bardzo często stosowane przez pacjentów. Duże zapotrzebowanie na te środki powoduje

poszukiwanie coraz to nowych, skuteczniejszych leków oraz nakazuje czuwać nad jakością preparatów, aby było w nich jak najmniej zanieczyszczeń, mogących pochodzić z procesu produkcji, jak również ewentualnych produktów rozkładu substancji czynnych lub pomocniczych. Ścisłe określenie dopuszczalnej zawartości możliwych zanieczyszczeń wymaga ciągłego wprowadzania nowych metod analitycznych, pozwalających na równoczesne oznaczanie obok siebie odpowiednich substancji czynnych oraz ich zanieczyszczeń.

Najpopularniejszym lekiem w grupie NSLP jest kwas acetylosalicylowy (*aspiryna*). Związek ten, podobnie jak większość połączeń estrowych jest chemicznie nietrwały i ulega szybkiemu rozkładowi w warunkach hydrolizy zarówno kwasowej, jak i zasadowej. Produktem reakcji jest przede wszystkim kwas salicylowy. Z tak małą trwałością aspiryny związana jest konieczność zastosowania odpowiednich technologii wytwarzania jego preparatów oraz zapewnienie właściwych warunków przechowywania. Kwas salicylowy nie może być podawany podczas leczenia do wewnątrz organizmu, ze względu na silne działanie drażniące, dlatego też jego obecność jako zanieczyszczenia jest limitowana w preparatach zawierających aspirynę na różnym poziomie w zależności od postaci leków.

Do najczęściej stosowanych metod oznaczania aspiryny oraz jej zanieczyszczeń należą metody spektrofotometryczne [81, 119, 131, 142, 176, 190], także spektrofotometria pochodna [63, 78, 133], spektrofluorymetria [115, 177], metody rozdzielcze, jak: HPLC [39, 77, 112, 143, 187], RP-HPLC [27, 156], GC/MS [186], TLC [50, 62, 184] czy elektroforeza kapilarna [52]. Stosuje się także potencjometrię [179], kulometrię [129], spektroskopię rentgenowską [180] oraz WAP [75, 114].

W obiegu dostępnych jest wiele preparatów złożonych zawierających aspirynę i inne substancje czynne. Często spotykanym lekiem współobecnym jest paracetamol, ale spotkać można także połączenia aspiryny z np. metokarbamolem, witaminą C czy kofeiną.

W lekach zawierających obok aspiryny metokarbamol może występować dodatkowe zanieczyszczenie gwajafenazyną (3-(2-metoksyfenoksy)-1,2-propanodiol), która także była przedmiotem wielu badań z wykorzystaniem różnych technik analitycznych, m. in. spektrofotometrii [41], chromatografii cieczowej [42, 200], GC [162], TLC [82] czy metod miareczkowych [153, 158].

W badaniu zanieczyszczeń aspiryny farmakopee [2, 3, 4, 5] wprowadzają w monografiach surowca i preparatów, reakcje barwne (spektrofotometria w zakresie widzialnym) do oznaczania zawartości kwasu salicylowego i innych produktów rozkładu. Są to odpowiednio reakcje z siarczanem(VI) żelaza(III)-amonowym i heksacyjano-żelazianem(III) potasu. Dopuszczalny poziom zanieczyszczenia kwasem salicylowym ustalony jest na poziomie 0.1 % (w/w) w surowcu kwasu acetylosalicylowego, 0.3 % (w/w) w tabletkach i 3.0 % (w/w) w tabletkach musujących. Natomiast dla pozostałych zanieczyszczeń dopuszczalna granica to 0.1 % (w/w). USP bada zawartość kwasu salicylowego metodą chromatografii cieczowej z zastosowaniem chlorku żelaza(III).

Często stosowaną do oznaczeń kwasu salicylowego jest metoda spektrofotometryczna [49, 128, 190] w różnych warunkach przygotowywania próbki, np. po ekstrakcji układem izopropanol – NaOH 15 % [81] lub przeprowadzając kwas salicylowy w kompleksy z octanem miedzi(II) przy pH \approx 5.5 – 6.0 [160]. Wykorzystywano także metodę spektrofotometrii pochodnej [63, 78], spektrofluorymetrię [11, 177], chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną [73, 143, 183]

i fluorymetryczną [76] oraz metodę HPLC z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej [120] czy układy z odwróconą fazą (RP-HPLC) [27, 117, 156]. Badania czystości prowadzono też metodą TLC, używając płytek TLC G i mieszaniny: n-heptan – chloroform – kwas octowy lodowaty (77 : 20 : 3, v/v/v) jako fazy ruchomej [50]. Opracowano metodykę oznaczania zanieczyszczeń metodą analizy przepływowej [64, 75] oraz WAP z użyciem elektrod enzymatycznych [114], metodami: potencjometryczną [179], kulometryczną [129], przy zastosowaniu spektroskopii rentgenowskiej [180] czy elektroforezy kapilarnej [52].

Obecnie powszechnie w lecznictwie stosowany jest *paracetamol*. Związek ten powstaje w reakcji odalkilowania fenacetyny.

Z procesu produkcji paracetamolu mogą pochodzić opisane w FEur zanieczyszczenia, którymi są p-aminofenol oraz chloroacetanilid, w zależności od produktów wyjściowych używanych w syntezie leku (p-nitrofenol lub 4-chloroacetanilid).

Do metod oznaczania paracetamolu i jego zanieczyszczeń stosuje się przede wszystkim metody spektrofotometryczne [16, 35, 133, 187], spektrofluorymetryczne [189], metody chromatografii cieczowej [40, 41, 60], RP-HPLC [42, 200], chromatografii gazowej [28, 113, 162, 175], TLC [66, 184], metody miareczkowe [135] oraz WAP [36].

W przypadku paracetamolu FEur zaleca badanie metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach TLC HF₂₅₄R z użyciem fazy ruchomej: metanol – 1,1,1-trichloroetan – eter diizopropylowy (1 : 4 : 5, v/v/v) i wizualizacją plam pentacyjanonitrożyżelazianem(III) sodu, na potwierdzenie ewentualnej obecności p-aminofenolu, jako zanieczyszczenia. Ponadto BP zamieszcza dodatkowe metody TLC i LC badania czystości. Badanie metodą chromatografii cienkowarstwowej

wykonuje się na płytkach TLC GF₂₅₄ i przy użyciu fazy ruchomej: chloroform – aceton – toluen – kwas octowy lodowaty (65 : 25 : 10 : 0.5, v/v/v/v). Identyfikację plam przeprowadza się przy $\lambda = 254$ nm porównując czasy retencji dodatkowych pików obecnych na chromatogramach, poza pikiem paracetamolu. Wyszczególniono także badanie metodą TLC wobec wzorca chloroacetanilidu, jako ewentualnego zanieczyszczenia. Natomiast metoda LC dotyczy oznaczania zawartości p-aminofenolu z zastosowaniem odpowiedniej substancji wzorcowej. USP nie podaje monografii dla paracetamolu. Opisane metody znalazły się także w FP. Dopuszczalna zawartość p-aminofenolu wynosi 0.005 % (w/w) w substancji oraz 0.05 % (w/w) w tabletkach.

Badano także zawartość p-aminofenolu dokonując rozdziału na drodze chromatografii cienkowarstwowej stosując fazę ruchomą: eter naftowy – aceton (7 : 3, v/v) [66]. Detekcję prowadzono spektrofotometrycznie w zakresie 380 – 404 nm. Opracowano także metodykę oznaczania substancji czynnych oraz produktów ich rozkładu wykorzystując metodę HPLC [39]. Wiele opracowań dotyczących oznaczania zanieczyszczeń w preparatach paracetamolu znalazło zastosowanie w oznaczeniach aspiryny i produktów jej rozkładu, z uwagi na dużą liczbę preparatów zawierających wymienione składniki obok siebie.

W grupie pochodnych kwasu indolooctowego najbardziej znanym lekiem jest *indometacyna* (kwas 1-(4-chlorobenzoiło)-5-metoksy-2-metylo-1H-indolo-3-octowy).

Indometacyna, należąca do grupy kwasów arylooctowych, łatwo ulega rozkładowi w czasie hydrolizy, prowadzącej do powstania kwasu 4-chlorobenzoesowego i kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego.

Związki te mogą występować w preparatach jako niepożądane zanieczyszczenia.

Do metod oznaczania indometacyny oraz jej zanieczyszczeń wykorzystano metody rozdzielcze, takie jak: HPLC [26, 46, 72, 147, 178, 191, 193], GC [170, 188], TLC [29] czy elektroforezę kapilarną [152]. Często spotykane są także metody spektrofotometryczne [25, 163]. Poza tym stosuje się metody elektrochemiczne, jak polarografię [150] czy woltamperometrię [10].

W monografiach farmakopealnych indometacyny do oznaczania czystości wg FEur zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej z użyciem płytek TLC HF₂₅₄ i fazy ruchomej: eter – benzyna lakowa (7 : 3, v/v) i detekcją przy $\lambda = 254$ nm. Obecność zanieczyszczeń stwierdzono przez porównanie intensywności plam w roztworze podstawowym indometacyny, stosując odpowiednie rozcieńczenia. BP obok analogicznej metody TLC podaje także metodę LC, z zastosowaniem roztworu wzorcowego kwasu 4-chlorobenzoesowego jako zanieczyszczenia. Stopień czystości podaje się jako sumę pól powierzchni pików na chromatogramie roztworu badanego nie większą niż powierzchnia pod pikiem roztworu wzorcowego. USP także podaje metodę LC do kontroli czystości leków. FP nie podaje monografii dla indometacyny.

Identyfikację i oznaczanie indometacyny obok jej zanieczyszczeń prowadzi się przede wszystkim metodą HPLC. Dokonano w ten sposób oznaczania indometacyny obok kwasu 4-chlorobenzoesowego jako zanieczyszczenia we krwi [132] oraz preparatach farmaceutycznych, ustalając stężenie kwasu w granicach od 0.02 % do 0.05 % [105]. Badania produktów rozkładu indometacyny prowadzono także przy zastosowaniu metod chromatografii cienkowarstwowej i gazowej [171]. Identyfikacji

dokonano metodą TLC, używając płytek TLC G i faz ruchomych: A. eter naftowy – kwas octowy lodowaty (4 : 1, v/v), B. chloroform – kwas octowy lodowaty (4 : 1, v/v), C. izopropanol – etanol – woda – amoniak 25 % (10 : 4 : 2 : 1, v/v/v/v) oraz D. n-butanol nasycony amoniakiem 15 %. Oznaczenia ilościowe prowadzono zaś metodą GC. Metodę TLC użyto także do oznaczania indometacyny obok produktów jej hydrolitycznego rozkładu (kwasu 5-metoksy-2-metyloindolo-3-octowego i kwasu 4-chlorobenzoowego) [80]. Zastosowano tu płytki TLC GF₂₅₄ i fazę ruchomą: n-butanol – etanol – bufor amonowy wg Fewster'a (40 : 11 : 19, v/v/v) oraz detekcję spektrofotometryczną przy $\lambda = 320$ nm, po elucji składników z chromatogramów. Opracowano także metodę TLC oznaczania wymienionych substancji z wykorzystaniem techniki NMR, IR oraz spektroskopii mas do identyfikacji głównych zanieczyszczeń [29]. Oznaczanie kwasu 5-metoksy-2-metyloindolo-3-octowego jako zanieczyszczenia przeprowadzono metodą spektrofotometrii pochodnej [25]. Prowadzono także badania stabilności preparatów z indometacyną, wykorzystując do oznaczeń metodę spektrofotometrii w UV [146]. Wyznaczono parametry kinetyczne uzyskane podczas testów trwałości indometacyny w warunkach różnych temperatur i czasu przechowywania. Prowadzono także badania kinetyczne estrów indometacyny, stosując roztwory o różnym pH oraz w różnej temperaturze i prowadząc oznaczenia metodą HPLC [106]. Jako metodę porównawczą zastosowano tutaj miareczkowanie potencjometryczne.

Szeroko stosowanym w lecznictwie lekiem jest *diklofenak*, który jest pochodną kwasu fenylooctowego, solą sodową kwasu o-N-[(2,6-dichlorofenylo)-aminofenylo]octowego.

Preparaty zawierające diklofenak mogą być zanieczyszczone substancjami [3, 4] pochodzącymi z rozkładu leku lub będącymi pozostałościami procesu produkcji leku.

Do oznaczania zawartości zanieczyszczeń oraz diklofenaku jako substancji czynnej często stosowane są metody spektrofotometryczne [7, 8, 16, 35, 69, 169], spektrofluorymetryczne [24, 33] czy fluorescencyjna spektroskopia rentgenowska [155]. Przydatnymi okazały się metody rozdzielcze, takie jak: HPLC [13, 48, 51, 104, 108, 161, 173, 201], GC [164, 167, 172] czy TLC [28, 61]. Spotkać można także metody miareczkowania potencjometrycznego [23] oraz WAP [67, 141].

Zarówno FEur, BP jak i USP zalecają wykonanie badania czystości preparatów zawierających diklofenak metodą chromatografii cieczowej. Farmakopee te podają możliwą obecność czterech [4] lub pięciu [3] zanieczyszczeń. FEur i BP w swoich monografiach opisują dokładną metodę oznaczania zanieczyszczenia 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinonem-2 (oznaczone jako „impurity A”). Sumę pozostałych zanieczyszczeń określa się przez porównanie z polem powierzchni piku otrzymanego dla roztworu diklofenaku. FP nie podaje monografii dla diklofenaku.

W przypadku badania preparatów zawierających diklofenak do oznaczania zanieczyszczeń obok substancji czynnej wykorzystywano metody spektrofotometryczne [38] oraz metodę HPLC [103]. Oznaczenia prowadzono na czystej substancji oraz w różnych postaciach leków. Z wykorzystaniem metody HPLC badano także zawartość diklofenaku i jego metabolitów w płynach ustrojowych [165, 166, 201]. Detekcję prowadzono spektrofotometrycznie w UV lub elektrochemicznie. Wykonano także badania wpływu temperatury na roztwory wodne diklofenaku, używając skaningowej mikroskopii elektronowej, różnicowej skaningowej kalorymetrii i analizy fraktalnej [45]. Obserwowano

także wpływ pH środowiska, temperatury i polarności rozpuszczalników na stabilność diklofenaku [134, 199]. Oznaczenia substancji czynnej obok produktów rozkładu prowadzono metodą spektrofotometryczną przy $\lambda = 280$ nm. Prowadzono też badania trwałości kompleksów diklofenaku z β -cyklodekstryną w roztworach wodnych, oznaczając produkty zachodzących reakcji [32].

Powszechnie stosowanym w leczeniu jest także *naproksen* (kwas 2-(6-metoksynaft-2-yl)propionowy), będący pochodną kwasu propionowego.

Związek ten zawiera w swojej strukturze chemicznej centrum chiralne, występuje więc w postaci dwóch form enancjomerycznych: lewoskrętnej R(-) i prawoskrętnej S(+). Enancjomery S(+), w przypadku tej grupy związków cechują się większą aktywnością przeciwzapalną niż izomery R(-). W preparatach farmaceutycznych naproksen jest stosowany w postaci czystego izomeru S(+).

Do oznaczania naproksenu oraz jego ewentualnych zanieczyszczeń służą przede wszystkim metody rozdzielcze, tj. GC [12], TLC [53], elektroforeza kapilarna [70], a szczególnie HPLC [55, 59, 116, 121, 170]. Stosuje się także metody spektroskopowe [37, 185].

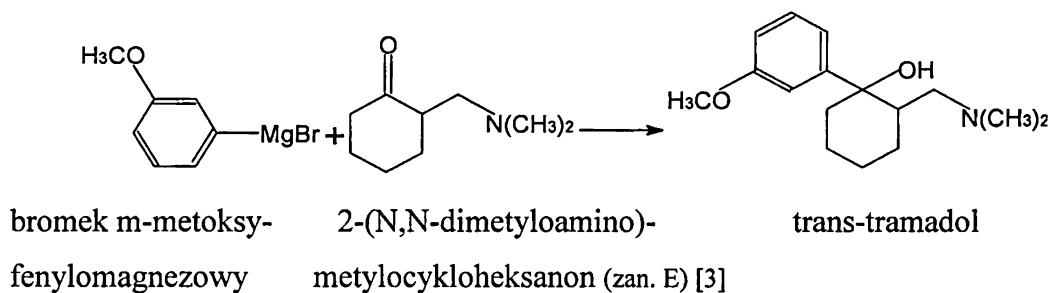
W badaniach zanieczyszczeń naproksenu dostępne farmakopee wprowadzają metodę chromatografii cienkowarstwowej. Do oznaczeń stosuje się płytki TLC GF₂₅₄R i fazę ruchomą: kwas octowy lodowaty – tetrahydrofuran – toluen (1 : 3 : 30, v/v/v). Intensywność plam na otrzymanym chromatogramie porównuje się z intensywnością plamy otrzymanej dla odpowiedniego roztworu substancji czynnej. FP nie podaje monografii dla naproksenu.

Wśród metod badania obecności zanieczyszczeń naproksenu spotyka się przede wszystkim metodę HPLC. Dotyczy ona oznaczania naproksenu, nabumetonu i ich głównych metabolitów obok siebie [121] z zastosowaniem odwróconej fazy stacjonarnej (RP-HPLC). Badano także czystość leków wykorzystując kilka technik analitycznych, jak GC, HPLC, TLC do oznaczeń, w połączeniu z MS i NMR do identyfikacji składników [116]. W związku z występowaniem naproksenu w postaci dwóch form enancjomerów (R(-) i S(+)) opracowano także metody służące do rozdziału izomerów i oznaczania ich obok siebie. Szczególnie przydatną jest tu metoda HPLC [55, 144, 145], HPLC z zastosowaniem chiralnej fazy stacjonarnej [47, 59] i HPLC z detekcją spektrofluorymetryczną [58]. Opisano także metodę rozdziału R(-)- oraz S(+)-naproksenu wykorzystując technikę elektroforezy kapilarnej [70].

Do grupy leków znajdujących się na pograniczu narkotycznych i nienarkotycznych leków przeciwbólowych zalicza się *tramadol* ((1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)cycloheksanol).

Budowa chemiczna tego związku sugeruje istnienie izomerów geometrycznych, z których w lecznictwie znalazł zastosowanie izomer trans-tramadolu.

Preparaty zawierające tramadol mogą zawierać zanieczyszczenia [3] pochodzące z rozkładu substancji czynnej lub też będące pozostałościami procesu produkcji:



Do metod oznaczania zawartości zanieczyszczeń oraz tramadolu jako substancji czynnej zastosowano metody spektrofotometryczne [79], chromatografii cieczowej [123, 126], chromatografii cienkowarstwowej [148, 149] oraz metody elektrochemiczne, jak konduktometria [17] czy potencjometria [17, 57].

W przypadku badania czystości tramadolu dopiero FEur w Suplemencie 4.2 wprowadziła metodę chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania zanieczyszczenia (2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-cykloheksanonu (oznaczone jako „impurity E”). Oznaczenie prowadzi się na płytkach TLC F₂₅₄ przy użyciu fazy ruchomej: amoniak 25 % – izopropanol – toluen (1 : 19 : 80, v/v/v). Otrzymany chromatogram wywołuje się jodyną i porównuje intensywność zabarwienia plam dla roztworu badanego i wzorcowego. W monografii znalazła się także metoda HPLC oznaczania zanieczyszczenia (1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)cykloheksanonu (oznaczone jako „impurity A”) względem roztworu wzorcowego tej substancji. Pozostałe farmakopee nie zamieszczają monografii dla tramadolu.

Piśmiennictwa na temat badania obecności zanieczyszczeń w preparatach zawierających tramadol jest stosunkowo mało. Badano zawartość tramadolu i jego metabolitów we krwi metodą RP-HPLC w połączeniu ze spektrometrią mas (MS/MS) [65]. Opracowano także metodę HPLC do badania stabilności tramadolu w 0.9 % roztworze NaCl i 5 % dekstrozie, w zakresie temperatur od 4° C do 40° C [126]. Ocenę jakości tramadolu prowadzono również metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną w UV, gdzie zastosowano elucje składników z chromatogramów [148, 149].

2. Cel i założenia pracy.

Metody chromatograficzne w monografiach farmakopealnych zajmują szczególne miejsce, zwłaszcza w odniesieniu do badania tożsamości i czystości leków.

W przypadku oznaczania zanieczyszczeń pochodzenia organicznego, wykorzystuje się różne techniki chromatograficzne, tj. TLC, GC i HPLC. Przydatność poszczególnych metod jest różna i tak, do oznaczania ilościowego poziomu zanieczyszczeń zalecane są metody HPLC i GC. Metoda TLC ze względu na wzrokowy sposób detekcji należy do metod półilościowych. Postęp jaki obserwujemy w ostatnich latach w zakresie produkcji nowoczesnej aparatury (m. in. densytometrów) stwarza nowe możliwości wykorzystywania chromatografii cienkowarstwowej w analizie ilościowej, w tym również do oznaczania małych stężeń składników, występujących jako zanieczyszczenia.

Potwierdzeniem przydatności densytometrii do analizy ilościowej są dotychczasowe szeroko prowadzone w naszej Katedrze badania, w których wykazano przydatność metody chromatografii cienkowarstwowej w połączeniu z densytometrią do ilościowej oceny jakości leków, na przykładzie surowców farmakopealnych oraz preparatów farmaceutycznych [82, 96-102].

To połączenie dwóch metod stwarza nowe możliwości w analizie jakościowej, jak również ilościowej i wydaje się, że taka metoda może być w wielu przypadkach alternatywną w stosunku np. do metody HPLC.

W niniejszej pracy postanowiono zatem opracować warunki jednoczesnego oznaczania zanieczyszczeń oraz substancji czynnych w wybranych lekach przeciwbólowych i przeciwzapalnych z zastosowaniem do rozdziału chromatografii cienkowarstwowej oraz detekcji densytometrycznej do identyfikacji i oznaczania ilościowego.

W szczegółowej realizacji podjętego tematu postanowiono:

1. Opracować warunki chromatograficznego rozdziału zanieczyszczeń obok substancji czynnych oraz sposoby identyfikacji składników na chromatogramach.
2. Dokonać walidacji metody oraz ustalić procedury wykonania oznaczeń w różnych postaciach leków.
3. Zbadać wpływ pH środowiska, temperatury i czasu ogrzewania na trwałość badanych leków w roztworach oraz określić strukturę powstających produktów.

Badaniami objęto typowe leki, szeroko stosowane w lecznictwie, które pobrano losowo z obiegu.

W prowadzonych badaniach uwzględniono fakt, że zanieczyszczenia w lekach mogą stanowić pozostałości procesu produkcyjnego, jak również mogą powstawać w trakcie ich przechowywania.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej rozprawie dotyczące oznaczania substancji czynnych i zanieczyszczeń w lekach przeciwbólowych były częściowo przedmiotem wcześniejszych publikacji:

1. Krzek J., Starek M., Kwiecień A. – *Simultaneous determination of guaiamar carbamate and acetylsalicylic acid by a chromatographic – densitometric method* – Acta Polon. Pharm., 55 (6) 429-434, 1998

2. Krzek J., Starek M. – *The effect of acetylsalicylic acid on the stability of methocarbamol in complex drugs* – Acta Polon. Pharm., 56 (5) 369-374, 1999
3. Krzek J., Starek M. – *Densitometric determination of active constituents and impurities in complex analgesic and antipyretic pharmaceuticals* – J. Planar Chromatogr., 12 (Sep/Oct) 356-360, 1999
4. Krzek J., Starek M. – *Simultaneous densitometric determination of indomethacin and its degradation products, 4-chlorbenzoic acid and 5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid, in pharmaceutical preparations* – J. AOAC Inter., 84 (6) 1703-1707, 2001
5. Krzek J., Starek M., Stożek T. – *Ocena stabilności kwasu acetylosalicylowego w tabletkach* – Farm. Pol., 57 (21) 974-978, 2001
6. Krzek J., Starek M. – *Densitometric determination of diclofenac, 1-(2,6-dichlorphenyl)indolin-2-one and indolin-2-one in pharmaceutical preparations and model solutions* – J. Pharm. Biomed. Anal., 28, 227-243, 2002

W niniejszej rozprawie ograniczono się do wybranych leków nowszej generacji, dlatego też pochodne kwasu acetylosalicylowego i paracetamolu nie zostały opisane w części badań własnych.

3. Część doświadczalna

3.1. Aparatura

- densytometr TLC-Scanner 3 z oprogramowaniem Cats 4, produkcji Camag (Muthenz, Szwajcaria);
- aplikator do nanoszenia próbek – Linomat IV, produkcji Camag (jw.) oraz AS 30 firmy Desaga (Niemcy);
- komputer PC Pentium MMX, 16 MB RAM (Taiwan) z drukarką HP LaserJet 6L (USA);
- skaner SNAPSCANe50 (Agfa);
- komory chromatograficzne (Sigma Aldrich);
- płytki chromatograficzne firmy Merck (Darmstadt, Niemcy):
 - * TLC aluminium sheets silica gel 60; Art. Nr 1.05553;
 - * TLC aluminium sheets silica gel 60 WF₂₅₄S; Art. Nr 16484;
 - * HPTLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄; Art. Nr 1.05548;
 - * TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄; Art. Nr 1.05554;
- spektrometr NMR Mercury-VX 300 MHz, firmy Varian (USA) [widma ¹H NMR wykonano w Pracowni Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Collegium Medicum UJ];
- lampa UV – Original Hanau Fluotest (Heraeus, W. Germany);
- filtr millipore, Bedford, MA 01730, o rozmiarze porów 0,45 μM;
- chromatograf cieczowy La Chrom (Merck-Hitachi) z detektorem DAD, automatycznym dozowaniem prób, pompą A typu L-7100, z oprogramowaniem D-7000HSM [badania przeprowadzono w Laboratorium Kontroli Jakości Leków];
- kolumna chromatograficzna o wymiarach 250 × 4 mm z wypełnieniem: oktadecylosilan związany chemicznie

na powierzchni krzemionki bezpostaciowej (Lichrospher 100 RP-18);

- mikrostrzykawkki (Hamilton Comp., USA) o pojemności 100 μl , 10 μl , 25 μl ;
- waga analityczna typ AT 261 (Mettler, Toledo), dokładność 0.01 mg;
- pipety automatyczne LabMate;
- programy komputerowe stosowane przy opracowywaniu wyników: MS Word 2000; Statistica Ver.5 '97; Corel DRAW! Ver. 4.0; Agfa ScanWise 1.40; Adobe Photoshop 6.0 CE.

3.2. Odczynniki

- metanol - GR ACS (Merck);
- izopropanol – do IR, UV, HPLC (POCH Gliwice, Polska);
- amoniak 25 % - cz.d.a. (Zakłady Azotowe Tarnów, Polska);
- chloroform – cz.d.a. (Chempur Piekary Śląskie, Polska);
- kwas octowy lodowaty – cz.d.a. (Odczynniki Sp. z o.o. Lublin, Polska);
- etanol – cz.d.a. (POCH Gliwice, Polska);
- toluen – cz.d.a. (POCH Gliwice, Polska);
- cykloheksan – cz.d.a. (POCH Gliwice, Polska);
- kwas solny 35 % (POCH Gliwice, Polska);
- kwas fosforowy(V) - gęstość $1 \text{ dm}^3 = 1.41 \text{ kg}$ (Merck);
- fosforan(V) diwodorosodu – cz.d.a. (POCH Gliwice, Polska);
- chloroform (CDCl_3) – do wzorcowania sygnałów w $^1\text{H NMR}$;
- wodorotlenek sodu – cz.d.a. (POCH Gliwice, Polska).

3.3. Substancje porównawcze

- indometacyna (C.E.M. CO, Włochy);
- kwas 4-chlorobenzoesowy (Avocado);
- kwas 5-methoxy-2-methlo-3-indoloctowy (Sigma-Aldrich);
- diclofenac (Stada);
- 1-(2,6-dichlorofenylo)indolin-2-on (Polpharma S.A. Starogard Gdański, Polska);
- indolin-2-on (Fluka);
- lidokaina (zgodny z FP V);
- Cytotec (Monsanto, Francja) – o zawartości 200 µg mizoprostolu, s. 848720 Dw. 11.2000;
- kwas S(+)-2-(6-metoksy-2-naftylo)propionowy (naproksen) (Fluka);
- chlorowodorek tramadolu (zgodny z FP V);
- [2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-1-enylo]-N,N-dimetylometanamina (Temmler Pharma);
- (1RS)-[2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-2-enylo]-N,N-dimetylometanamina (Temmler Pharma);
- (2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]cykloheksanon (Temmler Pharma);
- (1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)-cykloheksanol.

3.4. Preparaty używane do badań

- Metindol – iniekcje o zawartości 60 mg indometacyny (Polfa Kraków, Polska)

Nr serii 21093

Data ważności 96.10.15

Nr serii 20993

Data ważności 96.09.15

Nr serii 30299

Data ważności 02.2002

- Metindol – tabletki o zawartości 25 mg indometacyny
(Polfa Warszawa, Polska)
 - Nr serii 01LM0899 Data ważności 2002.08
 - Nr serii 01LM0299 Data ważności 2002.03
- Majamil – tabletki o zawartości 50 mg diklofenaku (Polpharma S.A.
Starogard Gdański, Polska)
 - Nr serii 1150101 Data ważności 012003
- Diclofenac Sodium – tabletki o zawartości 50 mg diklofenaku
(Norton, UK)
 - Nr serii BNCAH43A Data ważności EXP0700
- Rewodina Retard – tabletki o zawartości 100 mg diklofenaku
(AWD, Niemcy)
 - Nr serii 8004.1 Data ważności 11.2000
- Voltaren – iniekcje o zawartości 75 mg diklofenaku (Novartis,
Szwajcaria)
 - Nr serii MFD021999 Data ważności EXP022001
- Olfen – iniekcje o zawartości 75 mg diklofenaku i 20 mg lidokainy
(mepha, Szwajcaria)
 - Nr serii 9901404 Data ważności 11.2003
- Artotec – tabletki o zawartości 50 mg diklofenaku i 200 mg
mizoprostolu (Monsanto, Francja)
 - Nr serii 856720 Data ważności 01.2001
- Dicloratio Retard – kapsułki o zawartości 100 mg diklofenaku
(Ratiopharm, Niemcy)
 - Nr serii 938117 Data ważności 08.2000
- Majamil – tabletki o zawartości 25 mg diklofenaku (Polpharma S.A.
Starogard Gdański, Polska)
 - Nr serii 50898 Data ważności 082000

- Naprosyn – tabletki o zawartości 250 mg naproksenu (KRKA, Słowenia)
Nr serii 8467 Data ważności 0201
- Naprosyn – tabletki o zawartości 250 mg naproksenu (KRKA, Słowenia)
Nr serii 9489 Data ważności 0401
- Apranax – tabletki o zawartości 550 mg naproksenu (Syntex, Szwajcaria)
Nr serii 00233 Data ważności 11/2000
- Apranax – tabletki o zawartości 275 mg naproksenu (Syntex, Szwajcaria)
Nr serii 00102 Data ważności 08/2000
- Aleve – tabletki o zawartości 220 mg naproksenu (Lab. Roche, Francja)
Nr serii 86470 Data ważności 12.2002
- Naproxen – tabletki o zawartości 100 mg naproksenu (Polfa Pabianice, Polska)
Nr serii 10598 Data ważności 01.06.01
- Tramadol – kapsułki o zawartości 50 mg tramadolu (Synteza Sp. z o.o Poznań, Polska)
Nr serii 10598 Data ważności 052001
- Tramal – kapsułki o zawartości 50 mg tramadolu (Polpharma S. A. Starogard Gdański, Polska)
Nr serii 10101 Data ważności 012006
- Top Algic – tabletki o zawartości 100 mg tramadolu (Lab. Hoechst Houde, Francja)
Nr serii 290B Data ważności 12.2002

- Top Algic – kapsułki o zawartości 50 mg tramadolu (Lab. Houde, Francja)

Nr serii 741A

Data ważności 08.2002

- Top Algic – kapsułki o zawartości 50 mg tramadolu (Lab. Houde, Francja)

Nr serii 699B

Data ważności 04.2002

- Tramadol Stada Tropfen – krople o zawartości 100 mg tramadolu (STADAPharm GmbH, Niemcy)

Nr serii 3683

Data ważności 09/2003

- Tramador Losung – krople o zawartości 100 mg tramadolu (Hexal, Niemcy)

Nr serii 92NJ42

Data ważności 04/2003

Wszystkie preparaty użyte do badań pobrano losowo z obiegu [151].

3.5. Wyniki badań i ich omówienie

3.5.1. Badania wstępne

W celu ustalenia warunków identyfikacji i oznaczania ilościowego poszczególnych składników dla każdego leku opracowano sposób wykonania analizy, dokonując doboru odpowiednich faz stacjonarnych i faz ruchomych. Na płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym o rozmiarach 9×18 cm наносzono od 1 do 20 μl odpowiednich roztworów porównawczych oraz badanych. Chromatogramy rozwijano na różną odległość stosując różne fazy ruchome, których skład ustalono doświadczalnie, zwracając uwagę na czas rozwijania oraz lokalizację plam. Do identyfikacji plam na chromatogramach posłużono się detekcją densytometryczną. W tym celu bezpośrednio z chromatogramów rejestrowano widma absorpcji oraz powierzchnie pików dla odpowiednich składników, dokonując wyboru analitycznej długości fali oraz obliczeń współczynników retencji (R_f).

W oparciu o uzyskane wyniki badań opracowano sposób wykonania analizy oraz dokonano walidacji metody. Przydatność metody do oznaczania zanieczyszczeń i substancji czynnych sprawdzono na przykładzie wybranych preparatów farmaceutycznych. Badania wykonano dla różnych postaci leków, tj. tabletki, kapsułki, iniekcje i krople. Do identyfikacji składników wykorzystano wartości współczynników retencji R_f oraz widma absorpcji w zakresie od 200 nm do 400 nm. Zawartość składników obliczono przez porównanie wielkości powierzchni zarejestrowanych pików dla odpowiednich roztworów porównawczych i roztworów badanych leków. Dla każdej próby wykonano

po trzy oznaczenia przyjmując za wynik wartość średnią. W ustalonych warunkach oznaczania nie jest konieczna wstępna ekstrakcja składników z preparatów, gdyż rozdział i opisana metoda detekcji pozwalają wyeliminować wpływ substancji współobecnych na wyniki oznaczeń.

Badania wpływu pH środowiska, czasu ogrzewania i temperatury na stabilność badanych leków w roztworach prowadzono dla odpowiednich odważek leków w roztworach kwasu solnego i wodorotlenku sodu. Dla każdej próbki wykonano po trzy oznaczenia przyjmując za wynik wartość średnią.

Ilościowe oznaczenia składników powstających w trakcie rozkładu leków w roztworach, przeprowadzono w warunkach ustalonych doświadczalnie. Do określenia stężenia poszczególnych składników posłużono się metodą normalizacji wewnętrznej, dokonując obliczeń

wg wzoru:
$$\% i = \frac{X_i}{\sum X}$$

gdzie: % i – stężenie składnika i [%];

x_i – pole powierzchni oznaczanego składnika;

$\sum x$ – suma pól powierzchni pików otrzymanych na chromatogramie.

3.5.1.1. Przygotowanie prób do badania ^1H NMR

W badaniach zmierzających do identyfikacji zanieczyszczeń wykonano widma ^1H NMR. W tym celu z rozwiniętych chromatogramów zdrapano warstwy żelu w miejscach, gdzie zlokalizowano plamy pochodzące od badanej substancji. Żel wymieszano z 0.5 g węgla aktywnego i ostrożnie wytrząsano z 60.0 ml

chloroformu przez ok. 30 minut. Mieszaninę przesączono na sączku G – 4 i roztwór odparowano we wrzącej łaźni wodnej do otrzymania suchej pozostałości. Próbkę analitu rozpuszczono w 2.0 ml metanolu i naniesiono na płytkę w celu sprawdzenia tożsamości substancji. Metanolowy roztwór ponownie odparowano jak wyżej. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w 0.7 ml CDCl_3 i poddano badaniu NMR.

3.5.1.2. Walidacja metody oraz statystyczna ocena wyników

W celu potwierdzenia wiarygodności wyników badań dokonano walidacji opracowanej metody zwracając uwagę przede wszystkim na granice wykrywalności i granice oznaczalności, dokładność (odzysk), precyzję i zakres liniowości [1, 43, 140, 197].

Wykrywalność i oznaczalność

W ustalonych warunkach chromatograficznego rozdzielania uzyskano dobrze wykształcone piki, przy znikomym poziomie szumów, w związku z tym granice wykrywalności i oznaczalności potraktowano wspólnie. W celu ich określenia przygotowano roztwory preparatów o malejących stężeniach poszczególnych składników. Limity określono na podstawie wielkości sygnału rejestrowanych powierzchni pików na chromatogramach, którego wartość była co najmniej czterokrotnie większa w stosunku do powierzchni pików, pochodzących od roztworów preparatów, do których nie dodano badanych składników.

Dokładność

Dokładność metody określono jako procent odzysku analitu dodanego od 80 % do 120 % odpowiednich substancji, w stosunku do preparatów badanych.

Precyzja

Precyzję metody wyrażono jako stopień zgodności pomiędzy wynikami analiz powtarzаныmi wielokrotnie. Badania wykonano dla mieszaniny modelowej, zawierającej oznaczane składniki. Do określenia precyzji posłużono się pomiarami powierzchni pików dla poszczególnych składników. Rozrzut wyników scharakteryzowano poprzez odchylenie standardowe (S), które stanowi zarazem miarę odtwarzalności metody oraz zakres wyników w stosunku do wartości średniej przy prawdopodobieństwie 95 %.

Liniowość

Do badań liniowości przygotowano serię roztworów o różnych stężeniach, obejmujących odpowiednie zakresy stężeń dla badanych składników. W oparciu o uzyskane wyniki sporządzono wykresy zależności otrzymanych powierzchni pików dla odpowiednich składników od stężenia analitu. Miarą liniowości jest krzywa regresji wraz z równaniami prostych oraz wartościami współczynników korelacji.

Ocena statystyczna wyników

Wyniki uzyskiwane w trakcie badań były oceniane statystycznie [140, 181, 182].

Średnia arytmetyczna \bar{x} :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{gdzie: } \sum x_i - \text{suma wartości wszystkich wyników;}$$

i – poszczególny wynik pomiaru;

n – liczba wyników.

Wartość \bar{x} powinna stanowić jak najbliższe przybliżenie wartości rzeczywistej (obliczane po odrzuceniu wyników obciążonych bardzo dużym błędem).

Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku S :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Wartość S służy do oceny wielkości błędu przypadkowego pomiarów.

Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej S_x :

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{lub} \quad S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}}$$

Wartość S_x określa zależność dokładności średniej arytmetycznej od liczby pomiarów. Jest więc miarą powtarzalności wyników.

Przedział ufności średniej arytmetycznej μ :

$$\mu = \bar{x} \pm t \cdot S_x \quad \text{gdzie: } t - \text{współczynnik}$$

Wartość μ przy ustalonym prawdopodobieństwie określa przedział obejmujący średnią arytmetyczną, w którym zawierają się wartości rzeczywiste. Wartość t odczytuje się z Tabeli 1.

Tabela 1

Wybrane wartości współczynników t w zależności od liczby stopni swobody k przy prawdopodobieństwie 95 %.

$k = n - 1$	3	4	5	6	7	8	9	10
t	3.182	2.776	2.571	2.447	2.365	2.306	2.262	2.228

Współczynnik zmienności RSD lub w_z :

$$\text{RSD} = \frac{S}{x_{\text{sr}}} \quad \text{lub} \quad \text{RSD} = \frac{S}{x_{\text{sr}}} \cdot 100[\%]$$

Wartość RSD (w_z) to względna wielkość odchylenia standardowego pojedynczego wyniku, określająca wielkość rozrzutu wyników, czyli charakteryzująca precyzję metody.

Regresja to funkcja wyrażająca charakter i kształt zależności między zmiennymi.

$$y = a \cdot x + b \quad \text{gdzie: } x, y - \text{zmienne;}$$

a, b – współczynniki prostej.

Współczynniki a i b oblicza się metodą najmniejszych kwadratów, według wzorów:

$$a = \frac{n \cdot \sum (x \cdot y) - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad b = \frac{\sum y - a \cdot \sum x}{n}$$

Współczynnik korelacji k jest miarą stopnia zależności między zmiennymi x i y :

$$k = \frac{n \cdot \sum (x \cdot y) - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

k przyjmuje wartości w przedziale: $-1 \leq k \leq 1$. Gdy $k = \pm 1$ wtedy wszystkie punkty leżą na linii prostej; gdy $k = 0$, zmienne nie są zależne liniowo. Czyli im wartość k bliższa jest jedności tym silniejsza jest korelacja między zmiennymi.

3.5.2. Leki zawierające w składzie diklofenak sodu

3.5.2.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego

Analizie poddano preparaty: Majamil, Diclofenac Sodium, Rewodina Retard, Artotec – tabletki, Voltaren, Olfen – iniekcje oraz Dicloratio Retard – kapsułki.

Sporządzono roztwory:

- substancji porównawczych: diklofenak o stężeniu 0.026 % (w/v), 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinon-2 (zanieczyszczenie A) o stężeniu 0.02 % (w/v), indolinon-2 (zanieczyszczenie E) o stężeniu 0.01 % (w/v), lidokaina o stężeniu 0.05 % (w/v) i mizoprostol o stężeniu 0.05 % (w/v).

Roztwory przygotowano w mieszaninie metanol – woda (1 : 1, v/v).

- roztwory z tabletek: sporządzono ze sproszkowanej masy 10 tabletek odważonej z dokładnością do 0.1 mg masy substancji odpowiadającej ok. 20 mg diklofenaku, którą rozpuszczono w mieszaninie metanolu z wodą (1 : 1, v/v) w objętości 20.0 ml. Po wytrząśnięciu roztwór przesączono i użyto do badań.
- roztwory iniekcji: odmierzoną dokładnie objętość roztworu z ampułki, odpowiadającą ok. 20 mg diklofenaku rozcieńczono mieszaniną metanol – woda (1 : 1, v/v) do objętości 20.0 ml.

Oznaczenie prowadzono na płytkach chromatograficznych DC-Alufolien Kieselgel 60 WF₂₅₄S, art. Nr 16484, Merck.

3.5.2.2. Wyniki badań

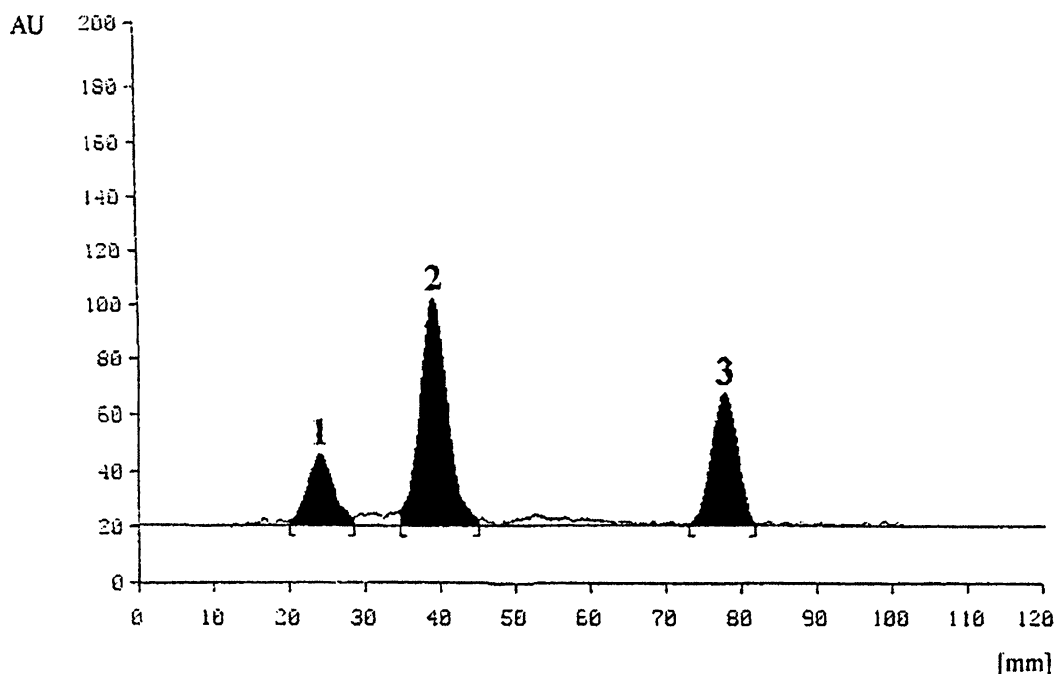
W monografiach farmakopealnych, w części dotyczącej badania czystości diklofenaku [3, 4] podaje się pięć ewentualnych zanieczyszczeń, jednak przedmiotem oznaczania jest 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinon-2 (określany jako „A”). W przeprowadzonych badaniach uwzględniono dodatkowo indolinon-2 (określany jako „E”).

Przy użyciu fazy ruchomej: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v) dokonano rozdziału diklofenaku oraz dwóch dostępnych zanieczyszczeń, zan. A i zan. E. Na chromatogramach otrzymano dobrze wykształcone piki, różniące się wartościami współczynników retencji R_f :

- diklofenak – 0.32
- zanieczyszczenie A – 0.67
- zanieczyszczenie E – 0.21.

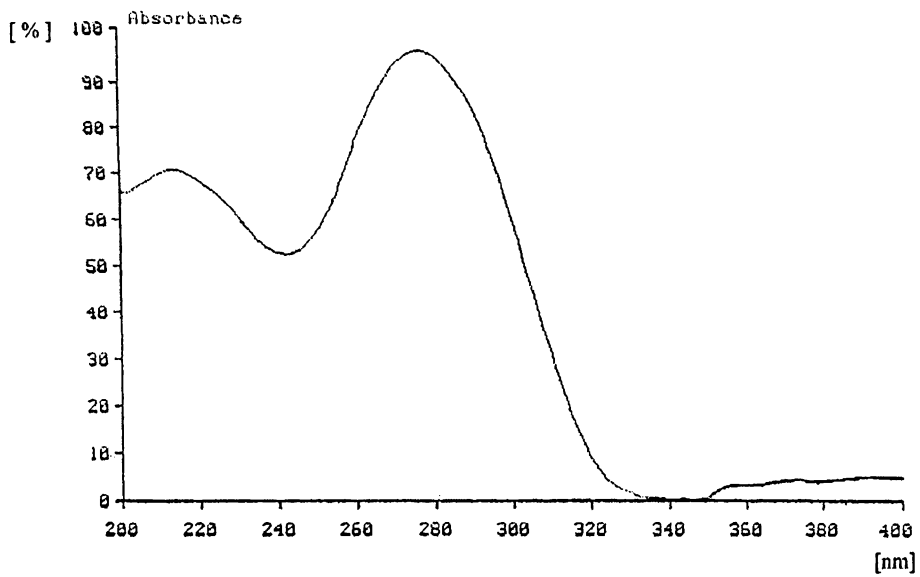
Ponadto w lekach złożonych w podanych warunkach wykazano brak interferencji składników współobecnych z diklofenakiem i zanieczyszczeniami jak wyżej. Dla tych składników określono ich położenie na chromatogramach przez podanie wartości R_f , które wynoszą:

- lidokaina – 0.13
- mizoprostol – 0.00.

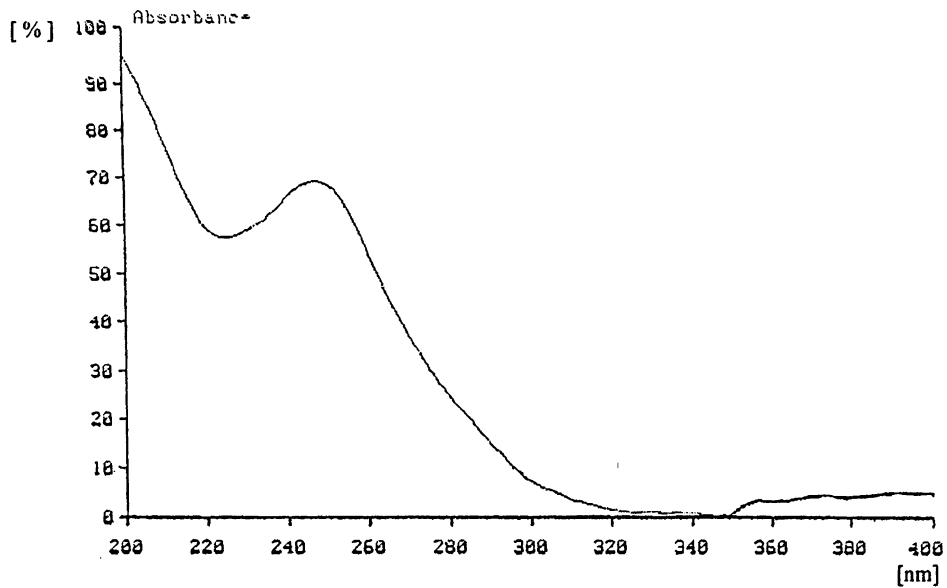


Rysunek 6. Densytogram dla diklofenaku (2), 1-(2,6-dichlorofenylo)-indolinonu-2 (3) i indolinonu-2 (1).

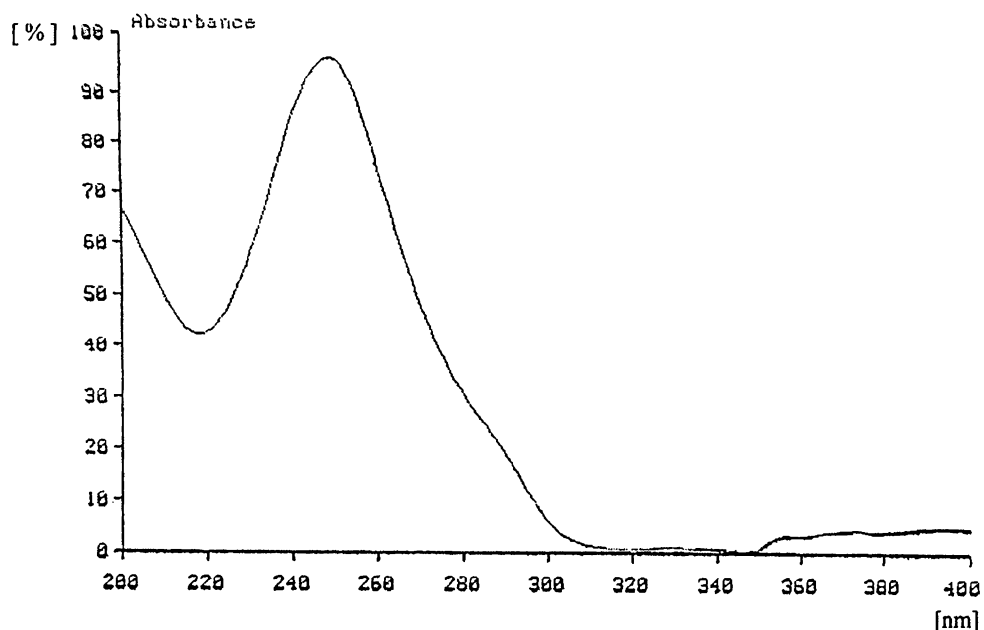
W dalszej części badań przeprowadzono rejestrację widm absorpcji bezpośrednio na chromatogramach oznaczanych składników (Rys. 7, 8, 9), w zakresie od 200 nm do 400 nm, stwierdzając różnice w ich kształcie i maksimach absorpcji. W widmie diklofenaku występowały dwa maksima absorpcji, przy $\lambda = 212$ nm i $\lambda = 278$ nm. Dla zanieczyszczeń stwierdzono istnienie pojedynczych maksimów absorpcji, odpowiednio są to: $\lambda = 248$ nm dla zanieczyszczenia A (Rys. 8) oraz $\lambda = 250$ nm dla zanieczyszczenia E (Rys. 9).



Rysunek 7. Widmo absorpcji diklofenaku.



Rysunek 8. Widmo absorpcji 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinonu-2 (zanieczyszczenie A).



Rysunek 9. Widmo absorpcji indolinonu-2 (zanieczyszczenie E).

W oparciu o uzyskane widma absorpcji do pomiarów wybrano analityczną długość fali $\lambda = 248$ nm, przy której oznaczane składniki posiadają wysokie wartości absorbancji. Przy wybranej długości fali zbadano zależność zmian powierzchni pików od stężenia dla poszczególnych składników (Rys. 10, 11, 12) oraz dokonano pełnej walidacji opracowanej metody (Tabela 2).

Tabela 2

Wyniki walidacji metody.

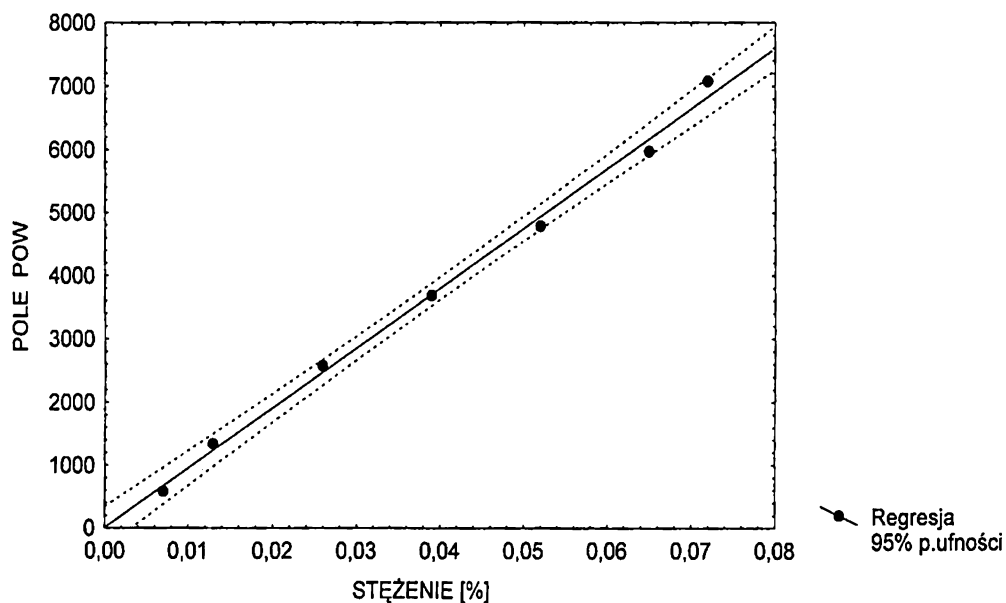
Parametr	Diklofenak	1-(2,6-dichloro-fenylo)- indolinon-2	Indolinon-2
1	2	3	4
λ [nm]	248		
R_f	0.32	0.67	0.21
Wykrywalność i oznaczalność [ng]	0.13	0.20	0.05

cd. Tabeli 2

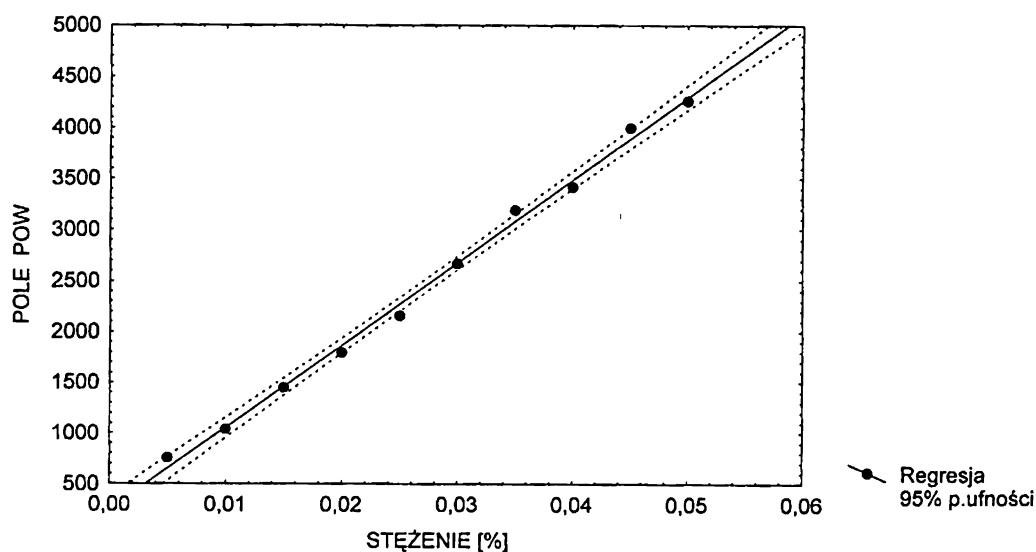
1	2	3	4	
Odzysk [%] (n=3)	100.66 99.37 97.57	91.86 91.39 93.76	92.92 94.22 100.42	
	$\bar{x}_{sr} = 99.20$ RSD = 1.56 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 3.86$	$\bar{x}_{sr} = 92.34$ RSD = 1.35 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 3.10$	$\bar{x}_{sr} = 95.85$ RSD = 4.18 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 9.98$	
	3492.0 3780.1 3704.4 3583.4 3544.9 3678.7	2735.2 2771.2 2740.3 2764.3 2810.3 2718.8	1545.7 1530.3 1486.2 1481.6 1508.9 1587.2	
	$x_{min} = 3492.0$ $x_{max} = 3780.1$ $y = 3630.6 \pm 217.1$	$x_{min} = 2718.8$ $x_{max} = 2810.3$ $y = 2756.7 \pm 64.8$	$x_{min} = 1481.6$ $x_{max} = 1587.2$ $y = 1523.3 \pm 79.8$	
Zakres liniowości [%]	c-0.007 P-584.7 c-0.013 P-1343.5 c-0.026 P-2578.1 c-0.039 P-3690.1 c-0.052 P-4789.7 c-0.065 P-5977.4 c-0.072 P-7081.1	c-0.005 P-756.0 c-0.010 P-1038.0 c-0.015 P-1449.5 c-0.020 P-1794.7 c-0.030 P-2668.8 c-0.040 P-3417.9 c-0.050 P-4263.8	c-0.005 P-681.2 c-0.010 P-1736.4 c-0.020 P-3202.8 c-0.030 P-4751.9 c-0.040 P-5874.2 c-0.050 P-7219.8 c-0.055 P-8599.5	
	0.007 – 0.072	0.005 – 0.050	0.005 – 0.055	
	Równanie prostej $P = a \cdot c + b$	a = 94791 b = 10.258	a = 81007 b = 245.96	a = 148600 b = 122.97
	Współczynnik korelacji	0.9978	0.9979	0.9967

\bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; RSD – współczynnik zmienności [%]; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; x_{min} – wynik najniższy; x_{max} – wynik najwyższy; y – zakres wyników przy prawdopodobieństwie 95 %; S – odchylenie standardowe; c – stężenie [%]; P – pole powierzchni pików; a, b – współczynniki kierunkowe prostej

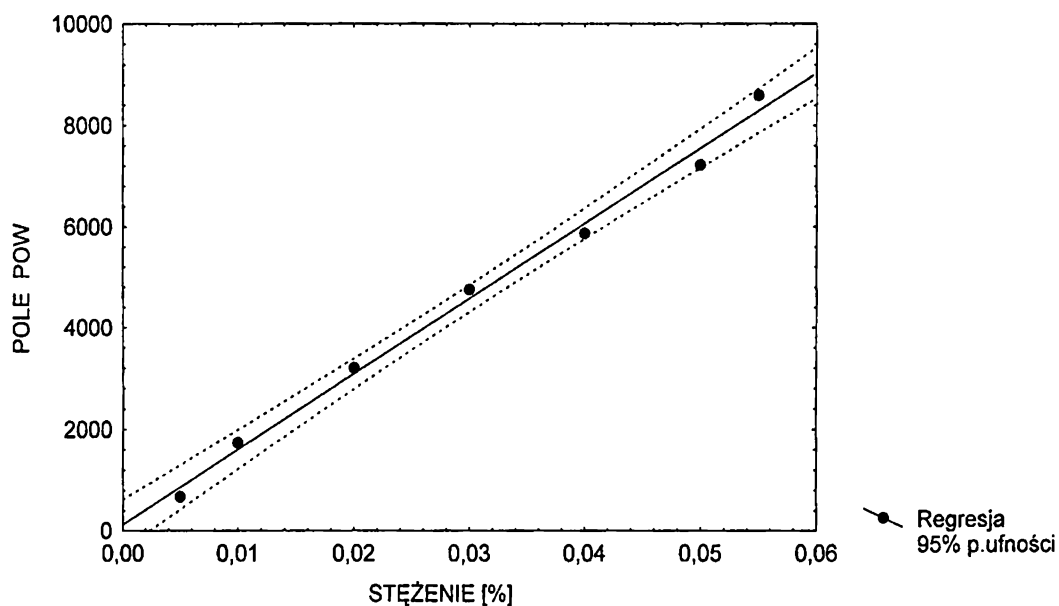
W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono sposób identyfikacji i wykonania oznaczenia poszczególnych składników w różnych postaciach leków.



Rysunek 10. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów diklofenaku.



Rysunek 11. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinonu-2 (zanieczyszczenie A).



Rysunek 12. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów indolinonu-2 (zanieczyszczenie E).

3.5.2.2.1. Wykonanie badania

Na płytce nanoszono w postaci pasma o szerokości 1 cm, roztwory porównawcze w objętości po 4 μl diklofenaku, 4 μl zanieczyszczenia A i 2 μl zanieczyszczenia E oraz roztwory preparatów po 20 μl do oznaczania zanieczyszczeń i po 1 μl do oznaczania diklofenaku. Chromatogramy rozwijano na drodze 12.0 cm stosując jako fazę ruchomą mieszaninę: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v). Chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej, a następnie poddano densytometrycznej rejestracji przy długości fali $\lambda = 248 \text{ nm}$ (Badania wstępne).

W Tabeli 3 nie zamieszczono wyników oznaczeń zanieczyszczeń, ponieważ w opracowanych warunkach wykonania badania nie stwierdzono ich obecności w badanych lekach.

Tabela 3

Wyniki oznaczeń zawartości diklofenaku w badanych lekach wraz z oceną statystyczną.

Preparat Zawartość deklarowana diklofenaku [g/tab., kaps., amp.]	Zawartość oznaczona diklofenaku [g/tab., kaps., amp.]	Ocena statystyczna (n = 7)
Majamil / 0.050	0.0479 0.0532 0.0468 0.0475 0.0482 0.0511 0.0507	$\bar{x}_{sr} = 0.0493$ $S = 0.0023$ $S_x = 0.0009$ $RSD = 4.67$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0022$
Diclofenac Sodium / 0.050	0.0497 0.0516 0.0500 0.0509 0.0517 0.0497 0.0494	$\bar{x}_{sr} = 0.0504$ $S = 0.0010$ $S_x = 0.0004$ $RSD = 1.98$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0010$
Rewodina Retard / 0.100	0.1024 0.1006 0.0985 0.1009 0.0989 0.0973 0.0957	$\bar{x}_{sr} = 0.0992$ $S = 0.0023$ $S_x = 0.0009$ $RSD = 2.32$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0022$
Voltaren / 0.075	0.0766 0.0749 0.0764 0.0739 0.0735 0.0748 0.0791	$\bar{x}_{sr} = 0.0756$ $S = 0.0019$ $S_x = 0.0007$ $RSD = 2.51$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0017$
Olfen / 0.075	0.0740 0.0749 0.0763 0.0760 0.0780 0.0753 0.0743	$\bar{x}_{sr} = 0.0755$ $S = 0.0014$ $S_x = 0.0005$ $RSD = 1.85$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0012$
Artotec / 0.050	0.0479 0.0503 0.0515 0.0526 0.0492 0.0493 0.0489	$\bar{x}_{sr} = 0.0500$ $S = 0.0016$ $S_x = 0.0006$ $RSD = 3.20$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0015$
Dicloratio Retard / 0.100	0.0963 0.1052 0.1000 0.1074 0.1012 0.1010 0.0965	$\bar{x}_{sr} = 0.1011$ $S = 0.0041$ $S_x = 0.0015$ $RSD = 4.06$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0037$
Majamil / 0.025	0.0248 0.0259 0.0240 0.0259 0.0242 0.0244 0.0260	$\bar{x}_{sr} = 0.0250$ $S = 0.0009$ $S_x = 0.0003$ $RSD = 3.60$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0007$

\bar{x}_{sr} - średnia arytmetyczna; S - odchylenie standardowe pojedynczego wyniku;
 S_x - odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; RSD - współczynnik zmienności
 [%]; μ - przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %

W celu potwierdzenia wiarygodności wyników otrzymanych metodą densytometryczną posłużono się metodą HPLC jako porównawczą do oceny czystości badanych leków [4].

Metoda HPLC

Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę: 34 objętości mieszaniny równych ilości roztworu kwasu fosforowego(V) (1 g/l) i roztworu diwodorofosforanu(V) sodu (1.6 g/l) zobojętnionych do pH \approx 2.5 oraz 66 objętości metanolu.

Roztwory porównawcze:

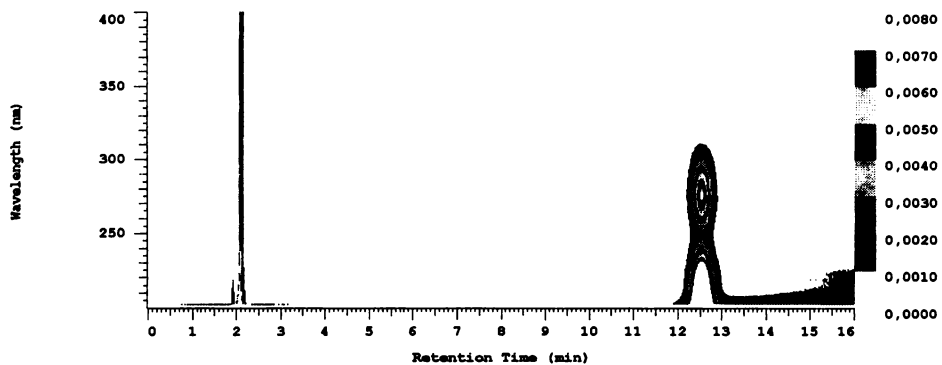
- diklofenaku – 0.005 % (w/v) w fazie ruchomej;
- zanieczyszczenia A – 0.002 % (w/v) w fazie ruchomej.

Roztwór badany:

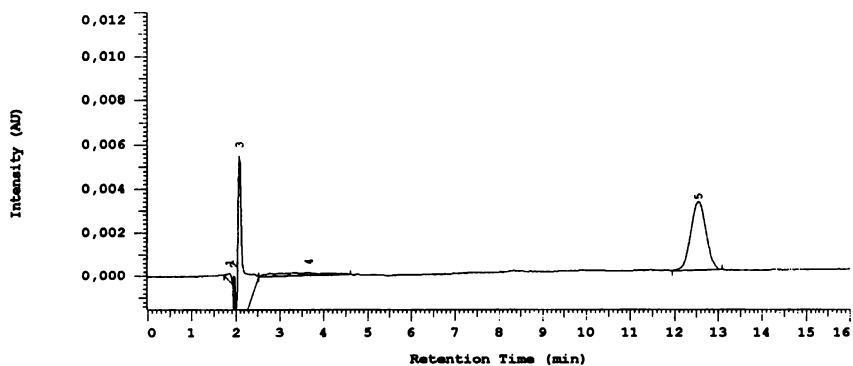
odważoną masę preparatu odpowiadającą 50 mg diklofenaku wytrząsano 30 minut w 70.0 ml fazy ruchomej, a następnie uzupełniono do objętości 100.0 ml tym samym roztworem. Zawiesinę odwirowano, przesączono przez filtr millipore 0.45 μ m i poddano badaniu.

Na kolumnę chromatograficzną wprowadzono kolejno po 20 μ l roztworów porównawczych i odpowiednich roztworów preparatów. Rozdział prowadzono przy prędkości przepływu fazy ruchomej 1.0 ml na minutę. Rejestracji dokonano za pomocą detektora UV przy długości fali $\lambda = 254$ nm.

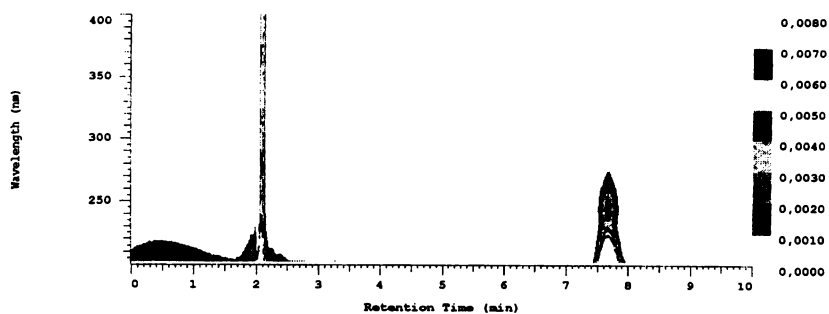
Na otrzymanych chromatogramach (Rys. 13, 14, 15) dokonano identyfikacji poszczególnych pików przez porównanie czasów retencji pików otrzymanych dla roztworów porównawczych i badanych.



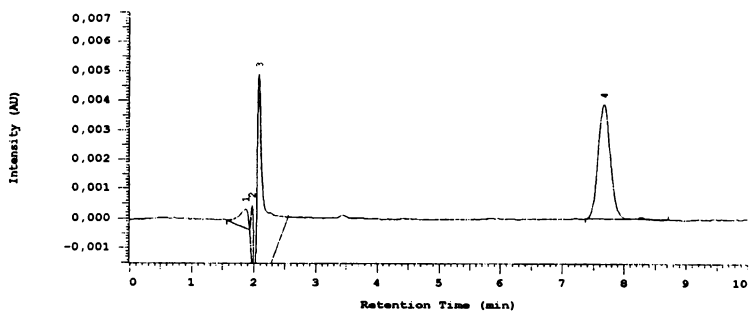
Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 254 nm



Rysunek 13. Chromatogram diklofenaku otrzymany metodą HPLC.



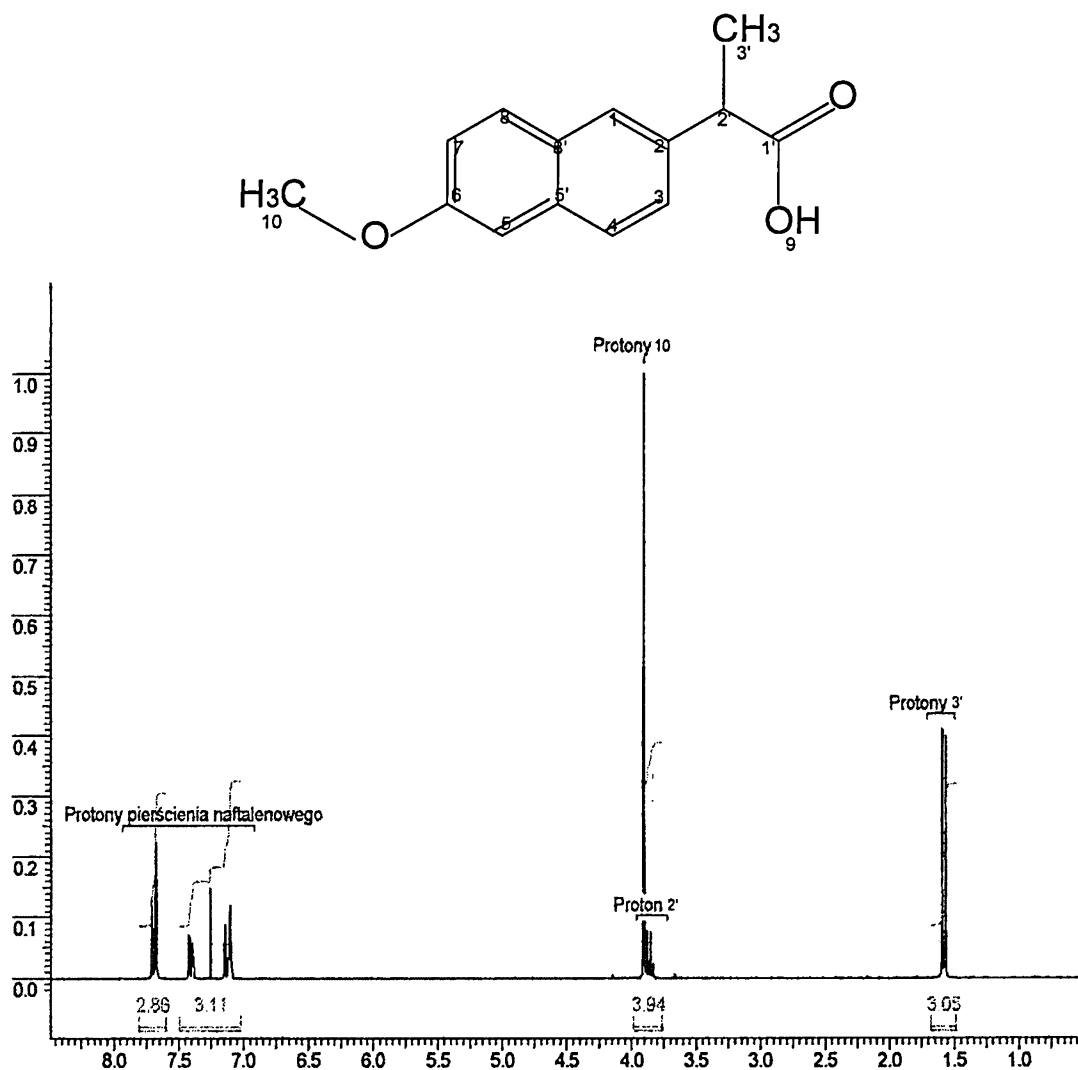
Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 254 nm



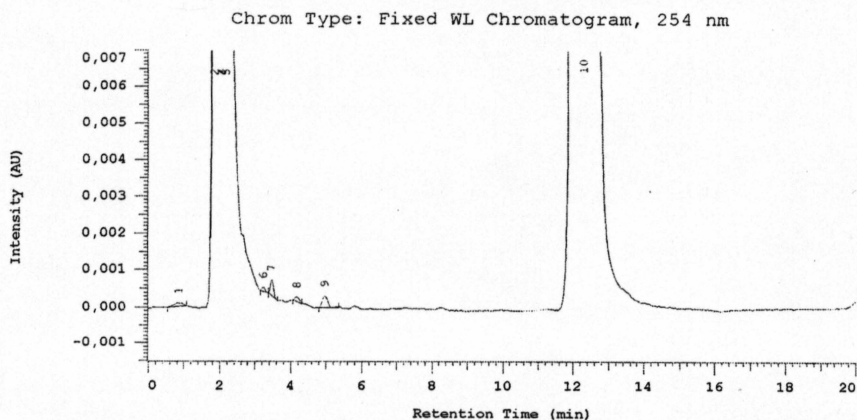
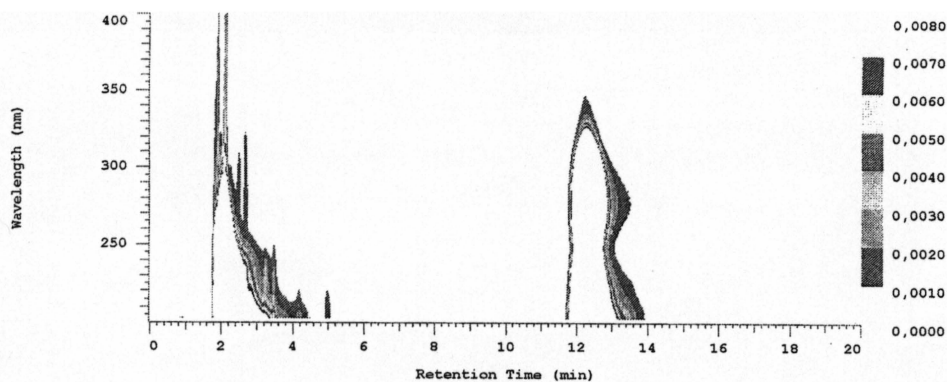
Rysunek 14. Chromatogram 1-(2,6-dichloro-fenyl)indolinonu-2 (zanieczyszczenia A) otrzymany metodą HPLC.

Do identyfikacji zanieczyszczenia wykonano również widma magnetycznego rezonansu jądowego ^1H NMR dla próbek substancji porównawczej naproksenu oraz analitu przygotowanego po elucji z chromatogramów.

Na zarejestrowanych widmach stwierdzono obecność charakterystycznych grup sygnałów pochodzących od protonów, znajdujących się w cząsteczkach naproksenu i substancji X (Rys. 37 i 38).



Rysunek 37. Widmo ^1H NMR substancji porównawczej S(+)-naproksenu.



Rysunek 15. Chromatogram analizowanej próbki otrzymany metodą HPLC.

Chromatogramy przebadanych preparatów (Tab. 3) wyglądały podobnie i na żadnym z nich nie stwierdzono obecności pików o czasie retencji charakterystycznym dla zanieczyszczenia A (ok. 7.7 minuty). Na chromatogramach występował jedynie duży pik o czasie retencji ok. 12.3 minuty, charakterystycznym dla diklofenaku.

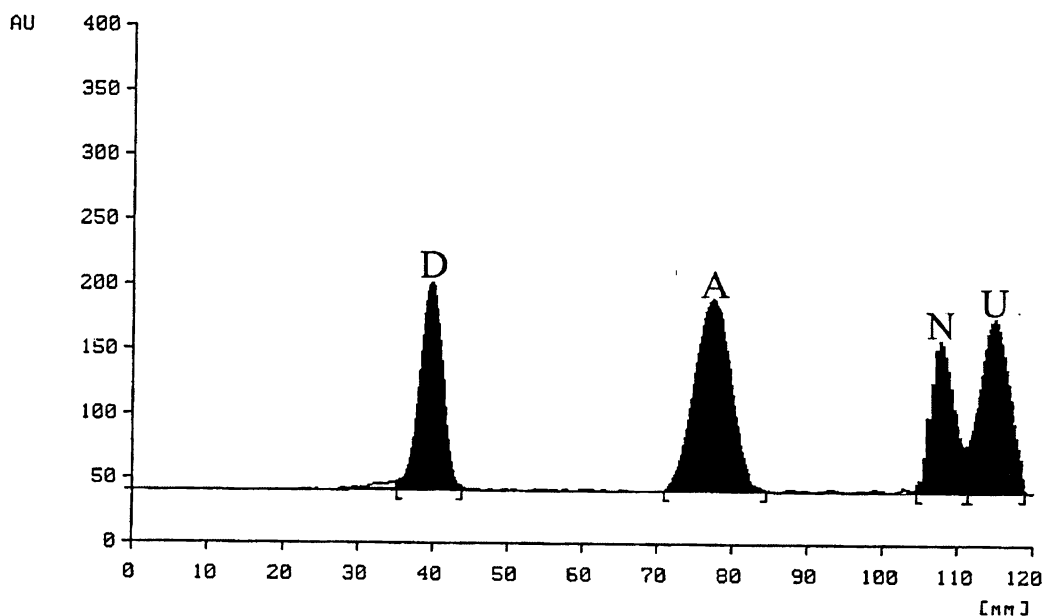
Otrzymane wyniki są więc potwierdzeniem danych otrzymanych opracowaną i opisaną wcześniej metodą, gdzie także nie stwierdzono obecności zanieczyszczeń w poddanych badaniom preparatach.

W dalszej części pracy zbadano wpływ pH środowiska, temperatury oraz czasu inkubacji na trwałość diklofenaku w roztworach.

3.5.2.2.2. Badanie trwałości diklofenaku w roztworach

Badania wpływu odczynu środowiska, czasu ogrzewania i temperatury na stabilność diklofenaku w roztworach przeprowadzono odważając ilość sproszkowanej masy leku, odpowiadającą 20 mg diklofenaku lub pobierając odpowiednią objętość roztworu iniekcji. Po rozpuszczeniu w objętości 20.0 ml kwasu solnego o stężeniu od 1 mol/l do $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l lub 1 mol/l wodorotlenku sodu, otrzymane roztwory inkubowano w temperaturach 22° C, 37° C i 70° C (Tab. 4, 5, 6). Następnie, w ustalonych odstępach czasowych pobierano do badań porcje roztworów, rozcieńczano metanolem w stosunku 1 : 1 (v/v) i prowadzono oznaczenia metodą przedstawioną wcześniej.

Na zarejestrowanych densytogramach (Rys. 16) obserwowano dodatkowe piki, poza pikiem pochodzącym od diklofenaku ($R_f \approx 0.32$) o wartościach $R_f \approx 0.67$ (A), $R_f \approx 0.95$ (N) oraz $R_f \approx 0.99$ (U).



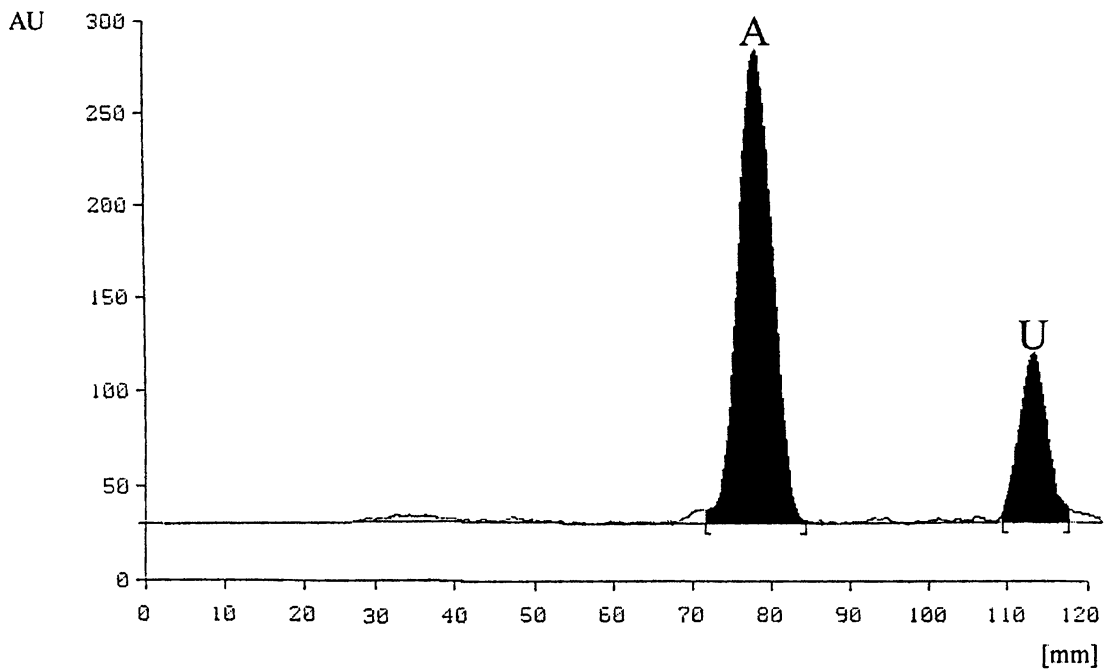
Rysunek 16. Densytogram dla próbki badanej, po jednodniowej inkubacji w temperaturze 37° C (D – diklofenak; A – zanieczyszczenie A; N – składnik N; U – składnik U).

Pik „U” występował na chromatogramach zawsze i jego powierzchnia nie ulegała zmianie niezależnie od stężenia analitu nanoszonego na płytkę oraz drogi rozwijania chromatogramów. Uznano, że pik ten pochodzi od fazy ruchomej i pominięto go w dalszych rozważaniach. Pik „N” pojawiał się na niektórych chromatogramach bezpośrednio po rozpuszczeniu próbki w kwasie solnym i rozcieńczeniu w metanolu. Powierzchnia piku „N” ulegała zmianom w zależności od stężenia kwasu, czasu inkubacji i temperatury. Po dłuższym czasie, w różnych temperaturach (Tab. 4, 5, 6) jego powierzchnia zmniejszała się, aż do zaniku piku na densytogramie. Pik „N” w znacznym stopniu interferował z pikiem „U”, co stanowiło przeszkodę przy jego identyfikacji.

Jednocześnie obok opisanych pików „N” i „U” na densytogramach występował pik oznaczony symbolem „A”. Wielkość powierzchni tego piku ulegała powiększeniu ze wzrostem temperatury i czasu inkubacji prób. Wzrost powierzchni piku „A” był jednocześnie związany ze zmniejszaniem się powierzchni pików diklofenaku oraz składnika „N”, aż do całkowitego ich zaniku. W końcowym efekcie na densytogramach występował tylko pik pochodzący od składnika A oraz fazy ruchomej „U” (Rys. 19).

W celu identyfikacji składnika A wykonano badania jego tożsamości przez określenie wartości współczynnika retencji, rejestrację widma absorpcji oraz badanie $^1\text{H NMR}$.

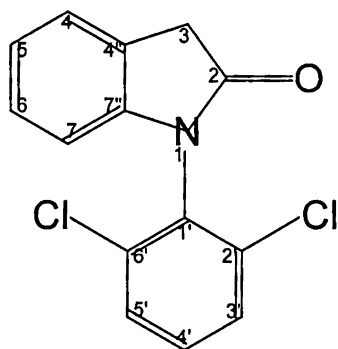
Stwierdzono, że współczynnik retencji R_f dla plamy „A” wynosi 0.66 i można go przyporządkować zanieczyszczeniu A ($R_f \approx 0.67$). Zarejestrowane widmo absorpcji w UV ma podobny przebieg jak analogiczne dla substancji porównawczej, które opisuje także charakterystyczne maksimum absorpcji (Rys. 8).

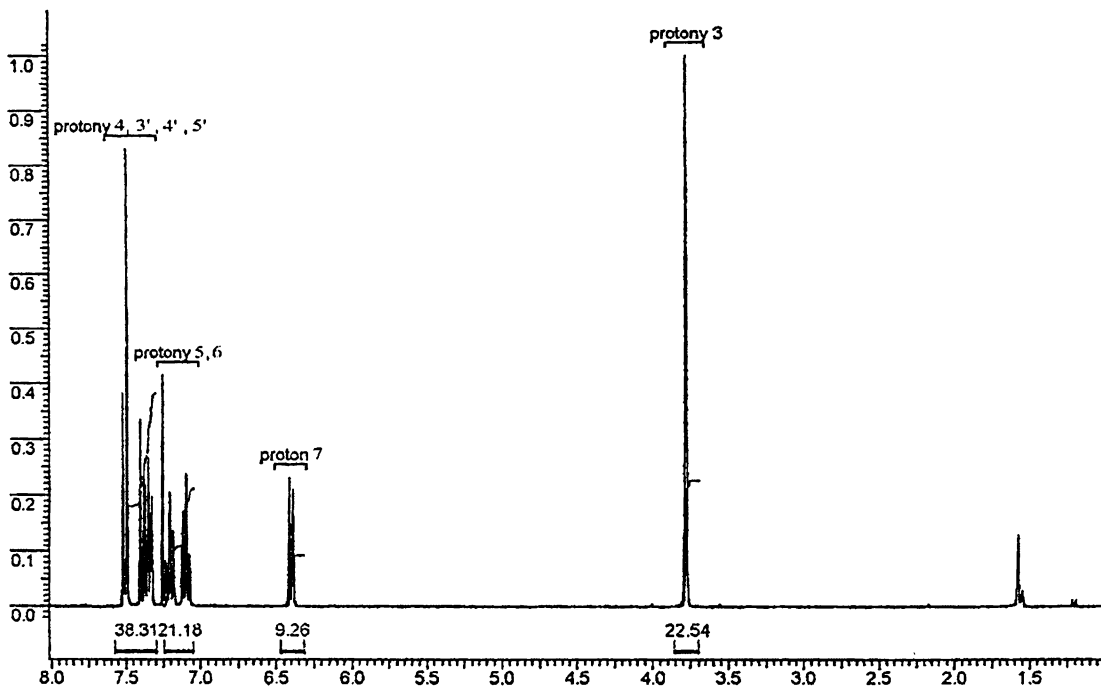


Rysunek 17. Densytogram zanieczyszczenia A, po inkubacji preparatu zawierającego diklofenak. Pik „U” pochodzi od fazy ruchomej.

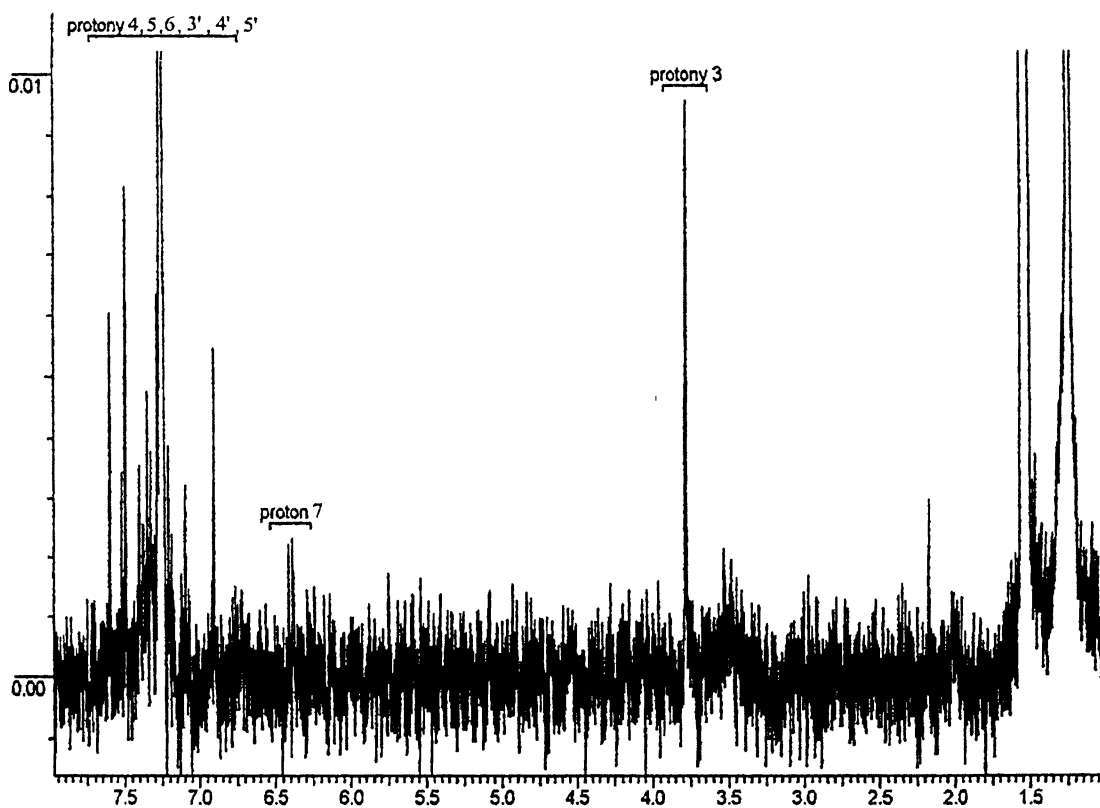
Zarejestrowane widma absorpcji w UV mają podobny przebieg jak analogiczne dla substancji porównawczych, które opisują również charakterystyczne maksima absorpcji.

W kontynuacji badań zmierzających do potwierdzenia tożsamości stwierdzonego zanieczyszczenia wykonano widma magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR. Równocześnie wykonano badanie ^1H NMR substancji wzorcowej zanieczyszczenia A (Rys. 18 i 19).





Rysunek 18. Widmo ^1H NMR substancji wzorcowej 1-(2,6-dichlorofenyl)-indolinonu-2 (zanieczyszczenia A).



Rysunek 19. Widmo ^1H NMR próbki badanej.

Na zarejestrowanych widmach stwierdzono obecność charakterystycznych grup sygnałów pochodzących od protonów, znajdujących się w cząsteczce 1-(2,6-dichlorofenyl)indolinonu-2.

Analiza widma wzorca zanieczyszczenia A wykazała obecność czterech grup sygnałów:

- singlet 2H σ 3.75 ppm – protony grupy CH₂ w pozycji 3;
- dublet 1H σ 6.4 ppm – protony aromatyczne w pozycji 7 (silnie przesłaniane poprzez sąsiedztwo w przestrzeni atomów Cl przyłączonych do sąsiedniego pierścienia aromatycznego);
- multiplet 2H σ 7.0 – 7.25 ppm – protony aromatyczne w pozycjach 5 i 6;
- multiplet 4H σ 7.25 – 7.5 ppm – protony aromatyczne w pozycjach 4, 3', 4' i 5'.

W widmie próbki natomiast zidentyfikowano 3 grupy sygnałów:

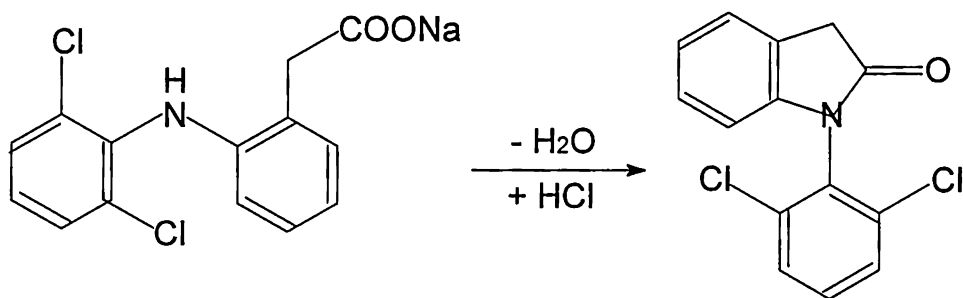
- singlet σ 3.75 ppm – protony CH₂ w pozycji 3;
- dublet 1H σ 6.4 ppm – protony aromatyczne w pozycji 7;
- multiplet σ 7.0 – 7.5 ppm – pozostałe protony pierścieni aromatycznych.

Dokładniejsze przypisanie protonów aromatycznych nie jest możliwe przy użyciu wyłącznie widma 1D.

Pozostałe sygnały występujące na zarejestrowanych widmach pochodzą od tła, tj. pozostałości rozpuszczalników oraz substancji wyeluowanych z płytek chromatograficznych.

Na podstawie otrzymanych wyników można zatem stwierdzić, że widmo próbki odpowiada widmu wzorca, zarówno pod względem liczby grup protonów, przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów, jak i ich multipletowości. W związku z tym przyjęto, że struktura chemiczna związku znajdującego się w próbce pokrywa się ze strukturą wzorca, co pozwala sądzić, że w badanej próbce jest obecne poszukiwane zanieczyszczenie A.

Przeprowadzone badania pozwalają przypuszczać, że rozkład diklofenaku w środowisku kwasu solnego przebiega w kierunku powstawania 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinonu-2 (zan. A), wg schematu:



Diklofenak sodu

zanieczyszczenie A

Ilościowe oznaczenia składników powstających podczas rozkładu diklofenaku w roztworach przeprowadzono w warunkach ustalonych doświadczalnie. Do określenia stężenia poszczególnych składników posłużono się opisaną wcześniej metodą normalizacji wewnętrznej. Wyniki przedstawiono w Tabelach 4, 5, 6.

cd. Tabeli 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Dicloratio	0.020	—	—	100.0	—	—	100.0	5.46	21.25	73.29	5.24	27.55	67.21	11.80	33.70	54.50
Retard	0.010	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	8.25	13.29	78.46
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0
Majamil	1.000	18.30	27.03	54.67	44.99	27.53	27.48	69.26	22.38	8.36	73.23	26.77	—	100.0	—	—
	0.500	10.08	—	89.92	32.00	20.65	47.35	54.62	24.93	20.45	54.67	25.04	20.29	71.09	18.41	10.50
	0.100	3.88	—	96.12	6.18	17.41	76.41	17.13	19.96	62.91	35.54	19.09	45.37	56.10	25.46	18.44
	0.050	—	—	100.0	4.48	2.52	93.00	4.84	13.98	81.18	10.81	22.24	66.95	24.76	31.32	43.92
	0.020	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	5.25	4.08	90.67	9.89	10.78	79.33
	0.010	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0

z. A – zawartość zanieczyszczenia A [%]; z. N – zawartość substancji N [%]; D – zawartość diklofenaku [%]

Tabela 5

Wyniki oznaczeń zawartości diklofenaku oraz powstających zanieczyszczeń dla różnych wartości stężeń HCl w temperaturze 37° C.

Preparat	c HCl [mol/l]	0			1			3			4			9			14 dni		
		z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Olfen	1.000	—	18.13	81.87	47.42	10.40	42.18	62.01	15.90	22.09	64.77	21.21	14.02	94.27	—	5.73	100.0	—	—
	0.500	—	5.25	94.75	29.70	14.10	56.20	58.73	20.35	20.92	47.11	31.96	20.93	79.48	6.26	14.26	87.22	5.93	6.85
	0.100	—	—	100.0	8.73	27.36	63.91	20.61	28.11	51.28	23.33	32.31	44.36	40.04	33.26	26.70	48.76	30.21	21.03
	0.050	—	—	100.0	3.71	12.67	83.62	12.76	35.97	51.27	10.36	39.06	50.58	21.14	37.75	41.11	28.83	37.47	33.70
	0.020	—	—	100.0	—	—	100.0	5.62	18.86	75.52	4.44	22.95	72.61	9.04	38.26	52.70	15.59	40.42	43.99
	0.010	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	—	100.0	7.85	90.60	2.28	12.35	85.37
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	100.0	—	—	100.0
	Dicloratio Retard	1.000	—	—	100.0	58.79	3.09	38.12	79.20	7.21	13.59	88.95	6.97	4.08	76.26	21.06	2.68	72.77	27.23
	0.500	—	—	100.0	42.54	—	57.46	62.37	17.66	19.97	67.75	15.19	17.06	72.99	16.67	10.34	84.92	15.08	—
	0.100	—	—	100.0	9.26	—	90.74	24.84	—	75.16	22.75	41.08	36.17	31.29	35.29	33.42	42.37	35.15	22.48
	0.050	—	—	100.0	—	—	100.0	17.81	—	82.19	18.23	27.62	54.15	24.47	30.41	45.12	36.98	29.13	33.89

cd. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Dicloratio Retard	0.020	—	—	100.0	—	—	100.0	6.64	—	93.36	8.00	15.16	76.84	10.48	13.37	76.15	20.88	19.14	59.98
	0.010	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	1.97	13.07	84.96	3.45	20.54	76.01
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0
Majamil	1.000	18.30	27.03	54.67	37.35	21.94	40.71	61.47	23.66	14.87	68.85	14.19	16.96	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.500	10.08	—	89.92	28.00	18.72	53.28	56.51	14.40	29.09	53.19	16.87	29.94	76.45	8.67	14.88	99.32	—	0.68
	0.100	3.88	—	96.12	6.28	10.84	82.88	19.56	24.61	55.83	20.15	25.33	54.52	30.10	37.17	32.73	45.28	29.98	24.74
	0.050	—	—	100.0	3.13	—	96.87	12.41	11.53	76.06	12.28	22.40	65.32	18.50	29.72	51.78	33.93	27.42	38.65
	0.020	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	—	100.0	5.72	18.95	16.63	16.36	67.01
0.010	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0
0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0

z. A – zawartość zanieczyszczenia A [%]; z. N – zawartość substancji N [%]; D – zawartość diklofenaku [%]

Tabela 6

Wyniki oznaczeń zawartości diklofenaku oraz powstających zanieczyszczeń dla różnych wartości stężeń HCl w temperaturze 70° C.

Preparat	c HCl [mol/l]	0			1			2			3			4 dni		
		z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D	z.A	z.N	D
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Olfen	1.000	—	18.13	81.87	71.19	27.87	0.94	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.500	—	5.25	94.75	65.98	29.06	4.96	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.100	—	—	100.0	52.63	14.13	33.24	72.42	11.25	16.33	81.91	9.62	8.47	95.63	—	4.37
	0.050	—	—	100.0	47.29	14.61	38.10	63.29	13.22	23.49	69.56	10.87	19.57	72.25	12.81	14.94
	0.020	—	—	100.0	27.66	10.87	61.47	50.15	12.04	37.81	56.28	10.79	32.93	63.13	8.19	28.68
Dicloratio Retard	1.000	—	—	100.0	63.03	36.97	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.500	—	—	100.0	72.65	17.59	9.76	73.92	16.30	9.78	96.02	—	3.98	100.0	—	—
	0.100	—	—	100.0	36.68	31.47	31.85	66.74	15.98	17.28	89.95	—	10.05	100.0	—	—
	0.050	—	—	100.0	30.57	24.48	44.95	57.78	9.93	32.29	85.13	—	14.87	100.0	—	—

cd. Tabeli 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Dicloratio	0.020	—	—	100.0	10.42	23.03	66.55	30.41	20.29	49.30	41.10	21.90	37.00	14.32	72.75	12.93
Retard	0.010	—	—	100.0	4.67	13.95	81.38	5.54	14.47	79.99	13.75	17.23	69.02	28.49	20.87	50.64
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	1.37	—	98.63	3.47	3.64	92.89	7.83	4.52	87.65
Majamil	1.000	18.30	27.03	54.67	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.500	10.08	—	89.92	91.12	—	8.88	100.0	—	—	100.0	—	—	100.0	—	—
	0.100	3.88	—	96.12	60.86	23.11	16.03	64.40	21.49	14.11	73.84	12.69	13.47	96.72	—	3.28
	0.050	—	—	100.0	48.77	26.86	24.37	47.66	28.08	24.26	64.31	21.60	14.09	75.63	13.93	10.44
	0.020	—	—	100.0	18.12	9.99	71.89	13.25	14.04	72.71	33.71	9.78	56.51	61.89	7.87	30.24
	0.010	—	—	100.0	9.55	10.78	79.67	11.64	12.92	75.44	12.58	15.33	72.09	15.04	11.19	73.77
	0.001	—	—	100.0	—	—	100.0	0.51	—	99.49	2.43	—	97.57	6.55	5.00	88.45

z. A – zawartość zanieczyszczenia A [%]; z. N – zawartość substancji N [%]; D – zawartość diklofenaku [%]

Wyniki badań potwierdzają, że proces rozkładu diklofenaku zachodzi szybciej w roztworach o większych stężeniach HCl i zależy od czasu inkubacji oraz temperatury. Im temperatura jest wyższa, tym degradacja zachodzi szybciej. Wzrost temperatury do 70° C już po 24 godzinach ogrzewania spowodował całkowity rozkład diklofenaku. Proporcjonalnie do ubytku stężenia diklofenaku w roztworach obserwowano wzrost stężenia zidentyfikowanego zanieczyszczenia A.

Podjęmowano również próby identyfikacji składnika „N”. Niestety jego pełna identyfikacja w warunkach opracowanej metody nie była możliwa, ze względu na stosunkowo małe i zmienne stężenie powstającego produktu oraz obserwowane interferencje płamy tego produktu z plamą dodatkową pojawiającą się na chromatogramie z czołem fazy ruchomej. Omawiane zjawisko występowało bez względu na długość drogi rozwijania chromatogramu.

Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że w opisanych warunkach powstaje pośredni produkt rozkładu diklofenaku, który w etapie końcowym przechodzi w zanieczyszczenie A. Wydaje się, że związkiem tym może być ester metylowy diklofenaku, powstający w środowisku kwasu solnego i metanolu, który używano do rozcieńczeń prób. Potwierdzeniem tej hipotezy wydają się być obserwowane zmiany wzrostu stężenia zanieczyszczenia A przy malejącym stężeniu składnika N, ze wzrostem czasu inkubacji i temperatury.

W roztworach NaOH omawianych powyżej zmian nie obserwowano. W preparatach objętych planem badań nie stwierdzono obecności zanieczyszczenia E.

3.5.3. Leki zawierające w składzie indometacynę

3.5.3.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego

Analizie poddano preparaty Metindol – iniekcje oraz tabletki.

Sporządzono roztwory:

- substancji porównawczych – masy indometacyny, kwasu 4-chlorobenzoowego oraz kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego rozpuszczono w metanolu, w takiej ilości, aby otrzymać roztwory o stężeniach 20 µg/ml;
- roztwory iniekcji – rozcieńczono metanolem do uzyskania stężenia indometacyny 20 µg/ml, pobierając różne objętości roztworu, zależnie od rodzaju oznaczanego składnika (do oznaczania zanieczyszczeń ok. 5-razy większą objętość niż do oznaczania substancji czynnej);
- roztwory z tabletek – sporządzono ze sproszkowanej masy 10 tabletek, odważonej z dokładnością do 0.1 mg masy substancji (ok. 0.1 g), które rozpuszczono w metanolu w objętości 10.0 ml. Po wytrząśnięciu roztwór przesączono i użyto do badań.

Oznaczenie prowadzono na płytkach chromatograficznych TLC, art. Nr 1.05553, Merck.

3.5.3.2. Wyniki badań

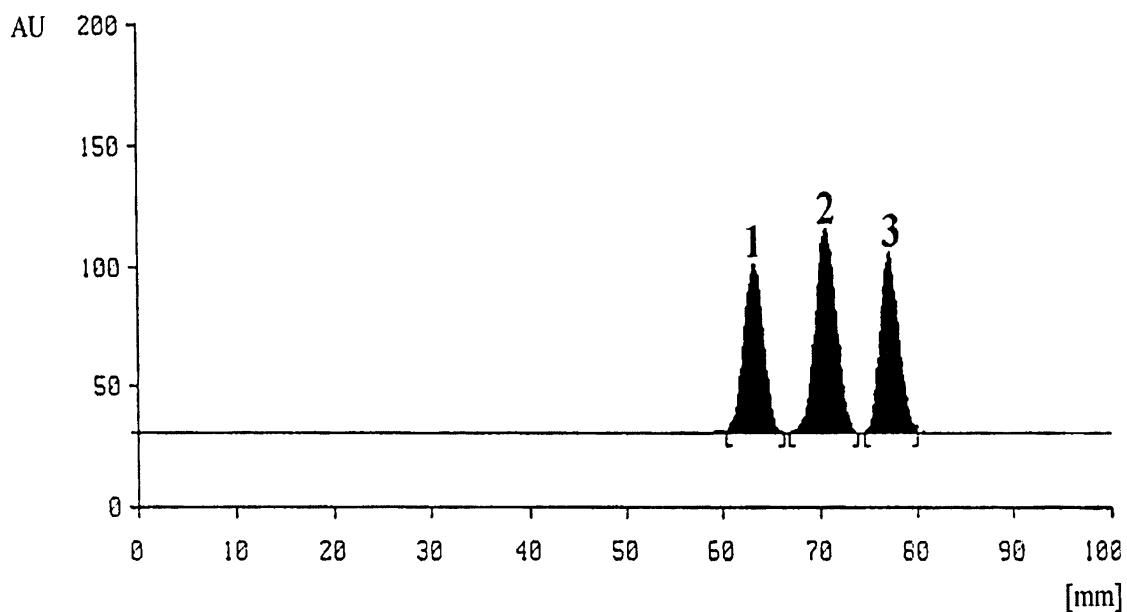
Monografie farmakopealne indometacyny uwzględniają obecność dwóch zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych, którymi są: kwas 4-chlorooctowy i kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy [2, 3].

Przy użyciu fazy ruchomej: izopropanol – amoniak 25 % - woda (8 : 1 : 1, v/v/v) dokonano rozdziału zanieczyszczeń obok indometacyny w preparatach farmaceutycznych, uzyskując na chromatogramach dobrze wykształcone piki, które różniły się wartościami współczynników retencji (R_f):

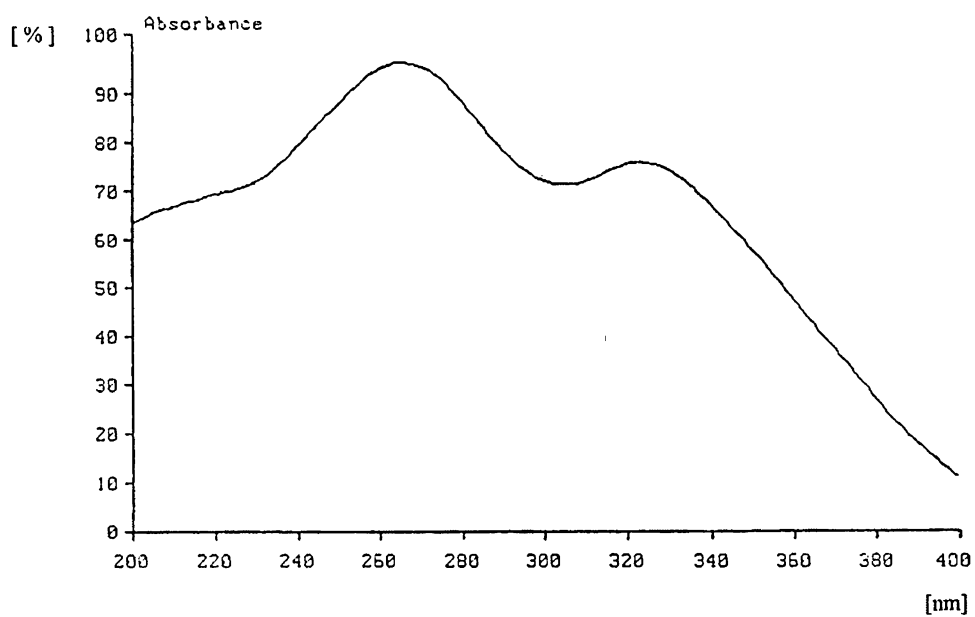
- indometacyna – 0.71
- kwas 4-chlorooctowy – 0.65
- kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy – 0.57.

W dalszej części badań przeprowadzono rejestrację widm absorpcji, bezpośrednio na chromatogramach oznaczanych składników w zakresie od 200 nm do 400 nm (Rys. 21, 22, 23), które wykazują różnice w odniesieniu do ich kształtu i występujących maksimów absorpcji.

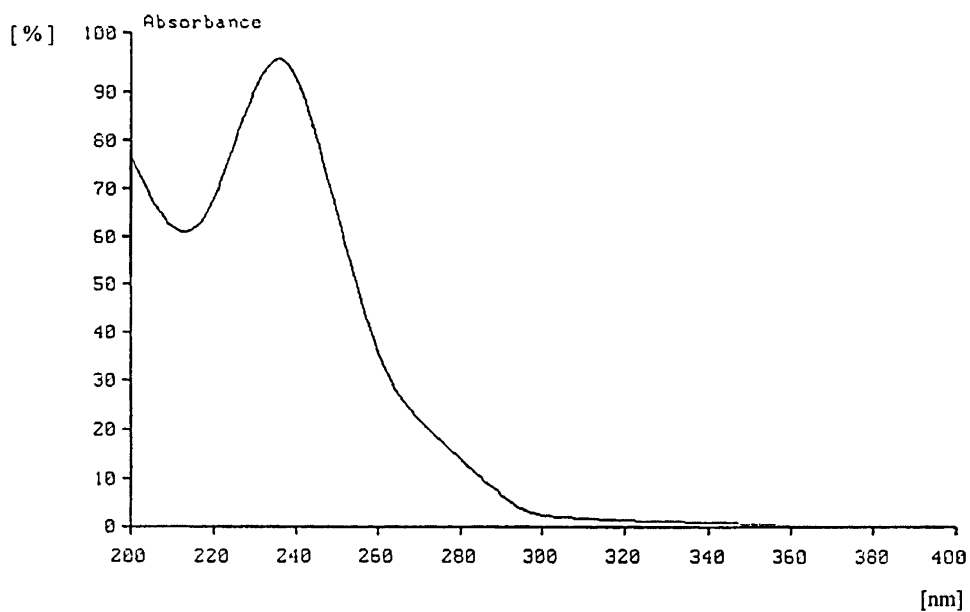
W widmie indometacyny występowały dwa maksima absorpcji przy $\lambda = 268$ nm i $\lambda = 325$ nm. Dla poszczególnych zanieczyszczeń, stwierdzono: dla kwasu 4-chlorobenzoowego (Rys. 22) obecność jednego maksimum absorpcji przy $\lambda = 236$ nm oraz dla kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego (Rys. 23) dwóch dobrze wykształconych maksimów, przy $\lambda = 222$ nm i $\lambda = 292$ nm.



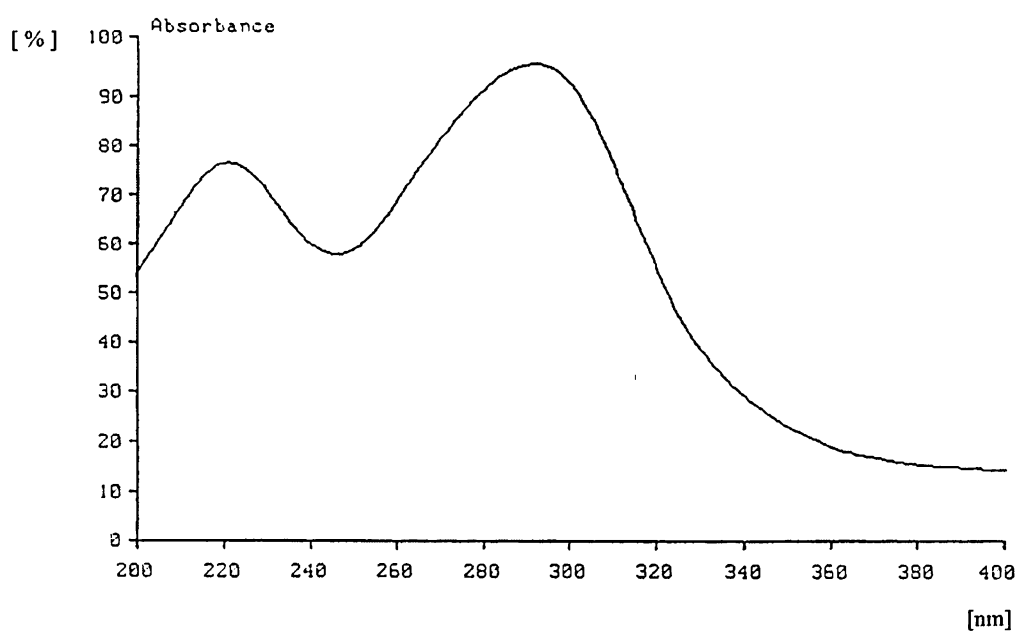
Rysunek 20. Densytogram dla indometacyny (3), kwasu 4-chloro-benzoowego (2) i kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego (1).



Rysunek 21. Widmo absorpcji indometacyny.



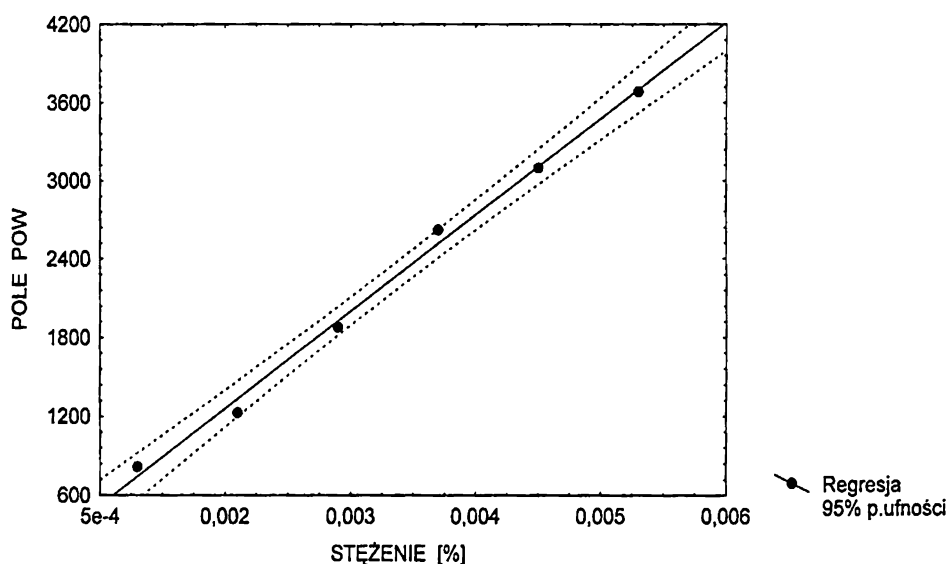
Rysunek 22. Widmo absorpcji kwasu 4-chlorobenzoesowego.



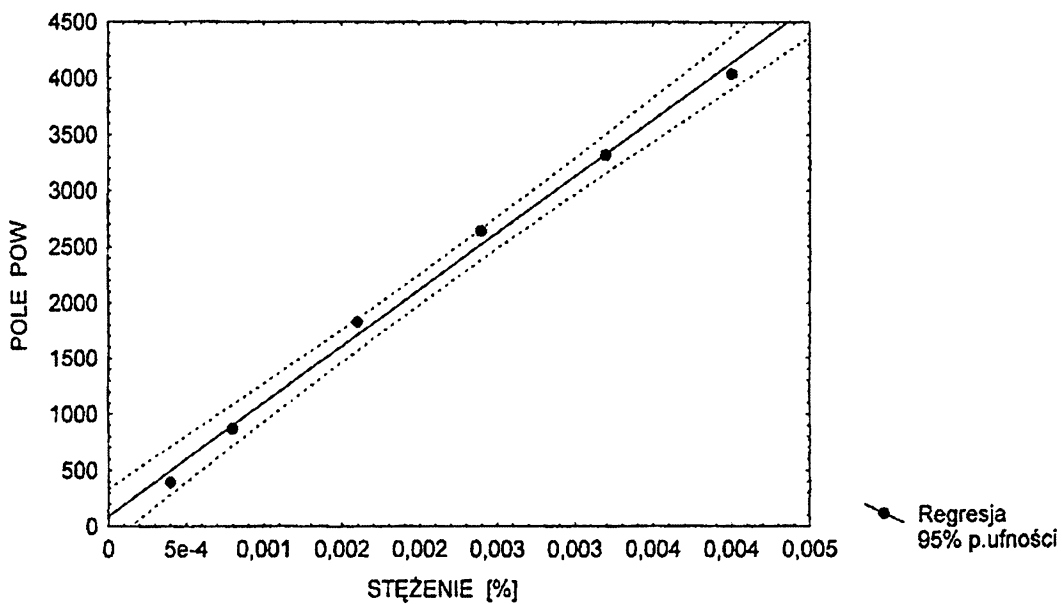
Rysunek 23. Widmo absorpcji kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego.

Otrzymane wyniki pozwoliły dokonać wyboru analitycznych długości fali, którymi posługiwano się w oznaczeniach ilościowych: $\lambda = 230$ nm do oznaczania opisanych zanieczyszczeń oraz $\lambda = 284$ nm do oznaczania indometacyny, przy których oznaczane składniki posiadają wysokie wartości absorbancji.

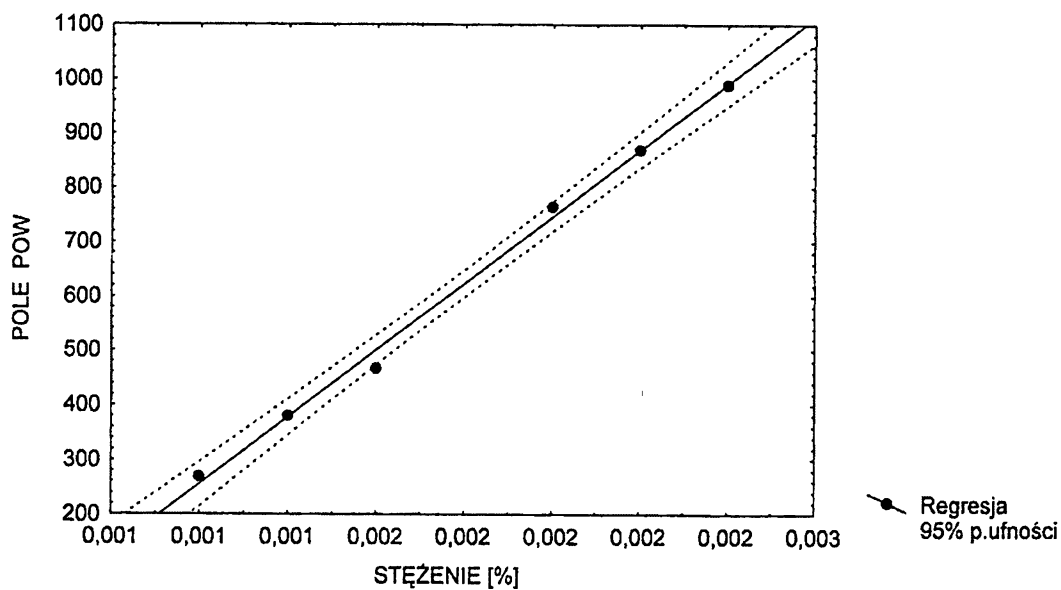
Dalsze badania obejmowały walidację omawianej metody. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 24-26 oraz w Tabeli 7.



Rysunek 24. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów indometacyny.



Rysunek 25. Krzywe zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów kwasu 4-chlorobenzoesowego.



Rysunek 26. Krzywe zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego.

Tabela 7

Wyniki walidacji metody.

Parametr	Indometacyna	Kwas 4-chloro-benzoesowy	Kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy
1	2	3	4
λ [nm]	284	230	
R_f	0.71	0.65	0.57
Wykrywalność i oznaczalność [ng]	20	20	100
Odzysk [%] (n=4)	101.27 98.44 100.78 102.27 $\bar{x}_{sr} = 100.69$ RSD = 1.58 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 2.54$	88.46 93.71 89.48 88.71 $\bar{x}_{sr} = 90.09$ RSD = 2.72 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 3.90$	90.51 93.48 90.62 90.07 $\bar{x}_{sr} = 91.17$ RSD = 1.71 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 2.48$
Precyzja $y = \bar{x}_{sr} \pm 2 \cdot S$ (n=6)	1982.0 2012.2 2079.3 2004.6 2012.1 2010.0 $x_{min} = 1982.0$ $x_{max} = 2079.3$ $y = 2016.7 \pm 65.6$	1579.2 1685.3 1727.3 1640.8 1627.9 1715.1 $x_{min} = 1579.2$ $x_{max} = 1727.3$ $y = 1662.6 \pm 113.5$	849.4 903.9 933.2 852.8 924.3 883.0 $x_{min} = 849.4$ $x_{max} = 933.2$ $y = 891.1 \pm 71.0$
Zakres liniowości [%]	c-0.0008 P-817.2 c-0.0016 P-1231.3 c-0.0024 P-1879.6 c-0.0032 P-2623.3 c-0.0040 P-309.5 c-0.0048 P-3684.9 0.0008 – 0.0048	c-0.0004 P-395.9 c-0.0008 P-870.9 c-0.0016 P-1828.3 c-0.0024 P-2641.0 c-0.0032 P-3321.2 c-0.0040 P-4042.4 0.0004 – 0.0040	c-0.0012 P-269.4 c-0.0014 P-380.2 c-0.0016 P-467.2 c-0.0020 P-765.0 c-0.0022 P-869.8 c-0.0024 P-990.0 0.0012 – 0.0024

cd. Tabeli 7

1	2	3	4
Równanie prostej $P = a \cdot c + b$	$a = 738700$ $b = 154.090$	$a = 1011000$ $b = 93.228$	$a = 614100$ $b = - 481.700$
Współczynnik korelacji	0.9976	0.9976	0.9980

x_{\min} – wynik najniższy; x_{\max} – wynik najwyższy; x_{sr} – średnia arytmetyczna; RSD – współczynnik zmienności [%]; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; S – odchylenie standardowe; y – zakres wyników przy prawdopodobieństwie 95 %; c – stężenie [%]; P – pole powierzchni pików; a, b – współczynniki kierunkowe prostej

W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono warunki identyfikacji i wykonania oznaczenia składników objętych planem badań.

3.5.3.2.1. Wykonanie badania

Na płytki nanoszono w postaci pasma o szerokości 1 cm, roztwory porównawcze w objętości 5 μl indometacyny, 5 μl kwasu 4-chlorobenzoesowego, 10 μl kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego oraz po 10 μl poszczególnych roztworów preparatów. Chromatogramy rozwijano na drodze 10.0 cm stosując jako fazę ruchomą mieszaninę: izopropanol – amoniak 25 % – woda (8 : 1 : 1, v/v/v). Chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej. Densytometryczną rejestrację przeprowadzono przy długości fali $\lambda = 230 \text{ nm}$ i $\lambda = 284 \text{ nm}$ (Badania wstępne). Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 8.

Tabela 8

Wyniki oznaczeń zawartości zanieczyszczeń oraz indometacyny w badanych lekach wraz z oceną statystyczną. Zawartość deklarowana indometacyny wynosi: iniekcje – 60 mg/amp. (2 ml), tabletki – 25 mg/ tabl.

Preparat	Indometacyna [g/amp.lub tab.]	Kwas 4-chlorobenzoesowy [% , w przeliczeniu na indometacynę]		Kwas 5-metoksy-2-metylo- 3-indoloctowy [% , w przeliczeniu na indometacynę]	
		1	2	3	4
Metindol iniekcje s. 21093	0.0511 0.0630	3.95	3.85	0.90	0.95
	0.0633 0.0625	4.15	4.40	0.95	0.95
	0.0542 0.0559	4.15	4.20	1.00	1.10
	0.0592 0.0604	4.00	4.15	0.85	0.90
	$\bar{x}_{sr} = 0.0587$ $S = 0.0045$ $S_x = 0.0016$ $\mu = 0.0587 \pm 0.0038$ RSD = 7.67	$\bar{x}_{sr} = 4.1063$ $S = 0.1700$ $S_x = 0.0601$ $\mu = 4.1063 \pm 0.1421$ RSD = 4.14	$\bar{x}_{sr} = 0.9500$ $S = 0.0756$ $S_x = 0.0267$ $\mu = 0.9500 \pm 0.0632$ RSD = 7.96		
Metindol iniekcje s. 20993	0.0678 0.0711	2.50	2.60	1.15	1.20
	0.0690 0.0711	3.10	3.05	0.90	1.00
	0.0693 0.0687	3.60	1.55	1.35	1.45
	0.0681 0.0681	3.05	3.20	0.90	1.10
	$\bar{x}_{sr} = 0.0692$ $S = 0.0013$ $S_x = 0.0005$ $\mu = 0.0692 \pm 0.0012$ RSD = 1.88	$\bar{x}_{sr} = 2.8313$ $S = 0.6210$ $S_x = 0.2196$ $\mu = 2.8313 \pm 0.5193$ RSD = 21.93	$\bar{x}_{sr} = 1.1313$ $S = 0.1999$ $S_x = 0.0707$ $\mu = 1.1313 \pm 0.1671$ RSD = 17.67		
Metindol iniekcje s. 30299	0.0549 0.0579				
	0.0639 0.0597				
	0.0618 0.0636	—————		—————	
	0.0660 0.0591				
	$\bar{x}_{sr} = 0.0609$ $S = 0.0036$ $S_x = 0.0013$ $\mu = 0.0609 \pm 0.0030$ RSD = 5.91	—————		—————	

cd. Tabeli 8

1	2	3	4
Metindol tabletki s. 01LM0899	0.0212 0.0237 0.0260 0.0240 0.0252 0.0228 0.0271 0.0244	—————	—————
	$\bar{x}_{sr} = 0.0243$ $S = 0.0018$ $S_x = 0.0007$ $\mu = 0.0243 \pm 0.0015$ RSD = 7.41	—————	—————
Metindol tabletki s. 01LM0299	0.0195 0.0197 0.0226 0.0246 0.0262 0.0210 0.0251 0.0245	—————	—————
	$\bar{x}_{sr} = 0.0229$ $S = 0.0026$ $S_x = 0.0009$ $\mu = 0.0229 \pm 0.0022$ RSD = 11.35	—————	—————

s. – numer serii; \bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; S – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; S_x – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; RSD – współczynnik zmienności [%]

W przebadanych lekach zawartość indometacyny była zgodna z deklaracją. Obecność zanieczyszczeń stwierdzono tylko w lekach przeterminowanych. Fakt, że zarówno kwas 4-chlorobenzoesowy, jak i kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy występują tylko w lekach przeterminowanych pozwala przypuszczać, że stwierdzone zanieczyszczenia są produktami rozkładu indometacyny powstającymi w czasie przechowywania leku.

W dalszej części pracy zbadano wpływ pH środowiska, temperatury oraz czasu inkubacji na stabilność indometacyny w roztworach.

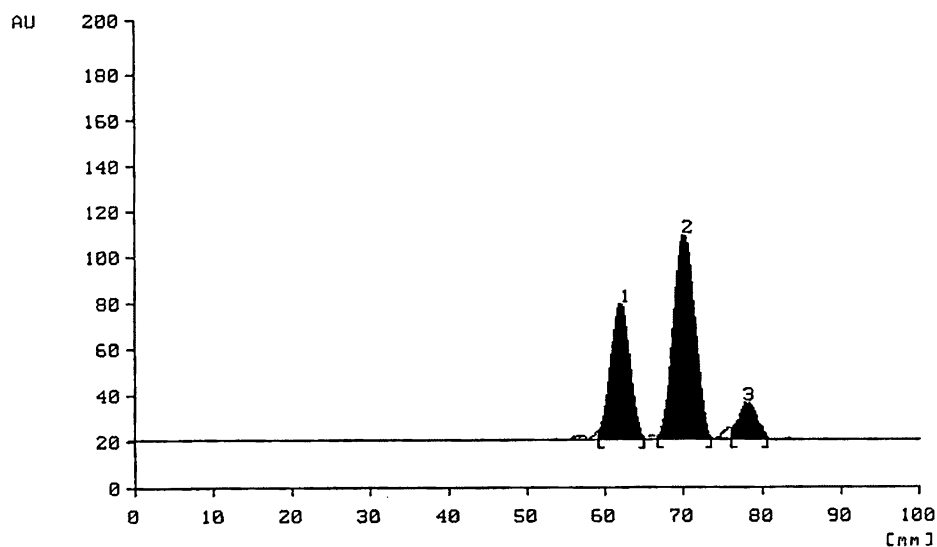
3.5.3.2.2. Badanie trwałości indometacyny w roztworach

Badania wpływu odczynu środowiska, czasu ogrzewania i temperatury na stabilność indometacyny w roztworach przeprowadzono dla odważek leków, zawierających ok. 20 mg indometacyny w 10.0 ml kwasu solnego o stężeniu 1 mol/l oraz wodorotlenku sodu o stężeniach od 1 mol/l do 10^{-3} mol/l. Próbkę ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej w czasie, określonym planem badań (Tab. 9, 10). Przygotowane jak powyżej roztwory próbek w 1 mol/l NaOH inkubowano w temperaturze 22°, 37° i 70° C (Tab. 11). Do oznaczeń chromatograficznych pobierano próbki analitu, które rozcieńczano metanolem. Badania wykonano w warunkach metody przedstawionej wcześniej.

Na zarejestrowanych densytogramach obserwowano dodatkowe piki, poza pikiem pochodzącym od indometacyny (Rys. 27).

W celu identyfikacji zanieczyszczeń wykonano badania pozwalające na określenie ich tożsamości. W tym celu dokonano określenia wartości współczynników retencji, rejestracji widm absorpcji oraz wykonano badanie ^1H NMR. Stwierdzono, że współczynniki retencji R_f dla poszczególnych plam wynoszą 0.56, 0.64 i 0.71. Można je przyporządkować odpowiednim składnikom badanym, którymi są: indometacyna ($R_f \approx 0.71$), kwas 4-chlorobenzoesowy ($R_f \approx 0.65$) oraz kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy ($R_f \approx 0.57$).

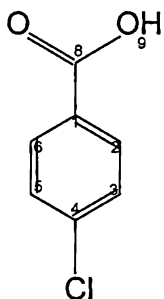
Zarejestrowane widma absorpcji w UV mają podobny przebieg, jak analogiczne dla substancji porównawczych, które opisują również charakterystyczne maksima absorpcji.

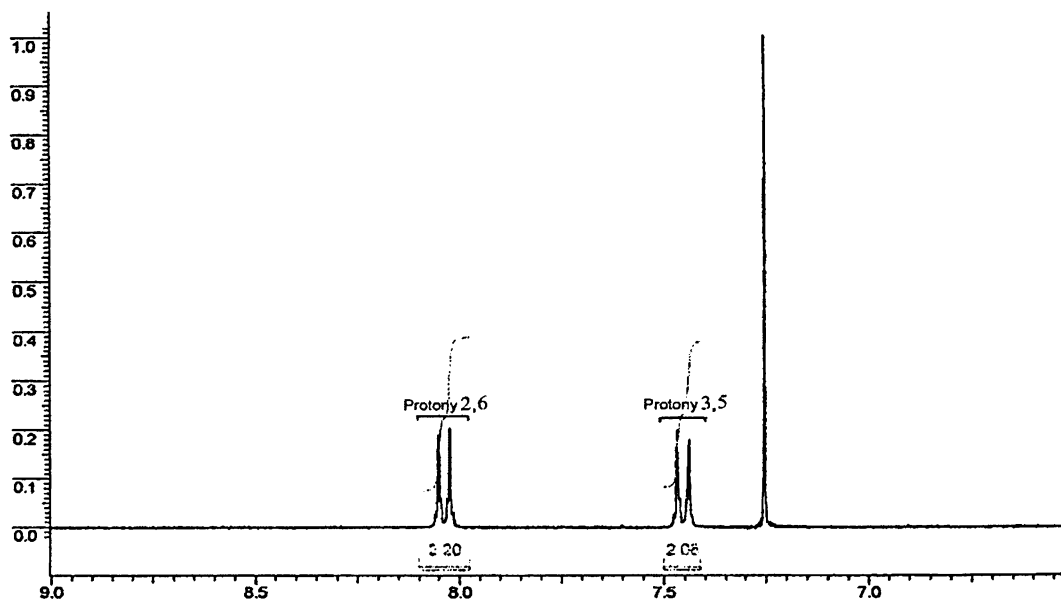


Rysunek 27. Densytogram dla próbki badanej (1 – kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy; 2 – kwas 4-chlorobenzoesowy; 3 – indometacyna).

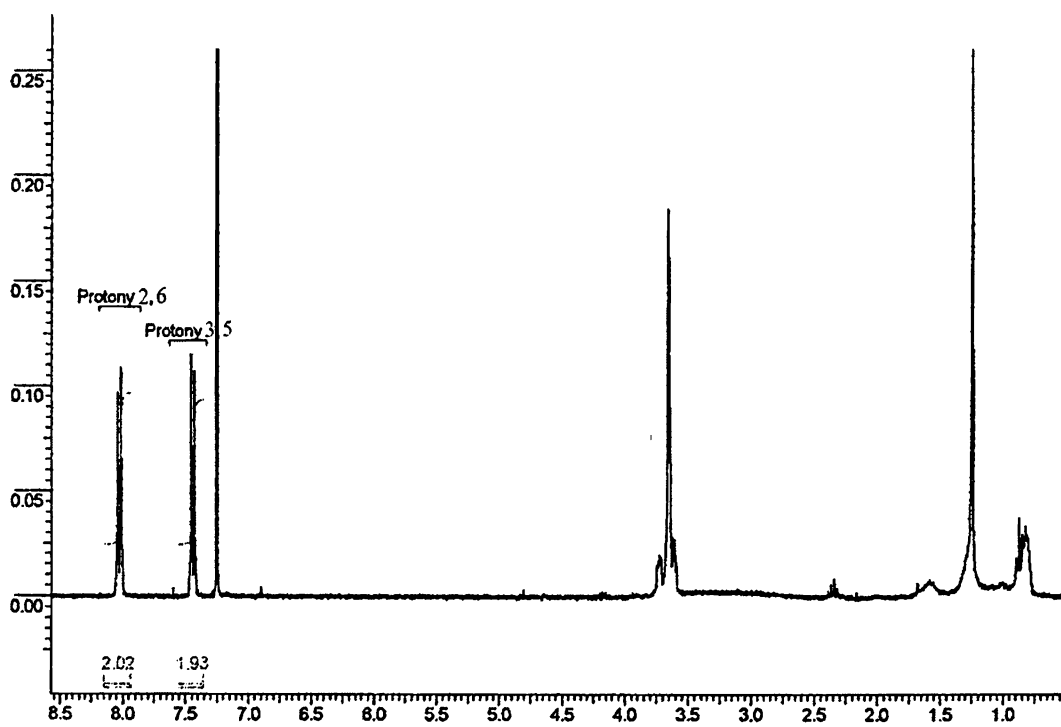
W kontynuacji badań zmierzających do potwierdzenia tożsamości występujących zanieczyszczeń wykonano widma magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR dla prób badanych oraz substancji wzorcowych kwasu 4-chlorobenzoesowego i kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego.

Na zarejestrowanych widmach stwierdzono obecność charakterystycznych grup sygnałów pochodzących od protonów znajdujących się w cząsteczkach związków stanowiących przedmiot badania (Rys. 28 – 31).





Rysunek 28. Widmo ^1H NMR substancji wzorcowej kwasu 4-chlorobenzoesowego.



Rysunek 29. Widmo ^1H NMR próbki badanej.

Po dokonaniu analizy widma wzorca kwasu 4-chlorobenzoesowego stwierdzono obecność 2 grup sygnałów:

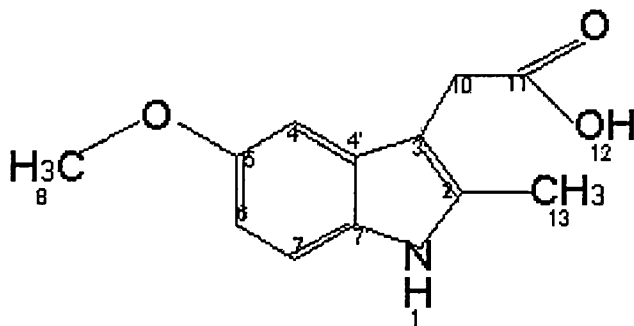
- dublet σ 7.45 ppm – protony aromatyczne w pozycjach 3 i 5;
- dublet σ 8.05 ppm – protony aromatyczne w pozycjach 2 i 6.

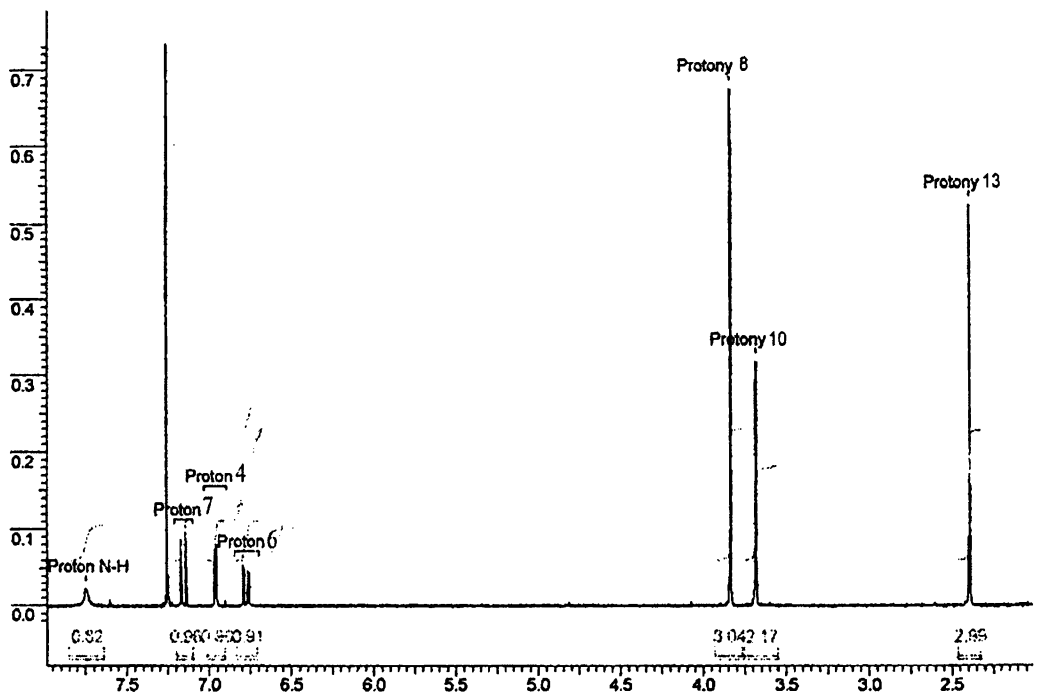
W widmie próbki zidentyfikowano także 2 grupy sygnałów – dublety σ 7.45 i 8.05 ppm – pochodzące od protonów aromatycznych w pozycjach odpowiednio 3 i 5 oraz 2 i 6.

Pozostałe sygnały występujące na zarejestrowanych widmach pochodzą od tła. Mogą je stanowić pozostałości stosowanych rozpuszczalników lub substancje wyeluowane z płytek chromatograficznych.

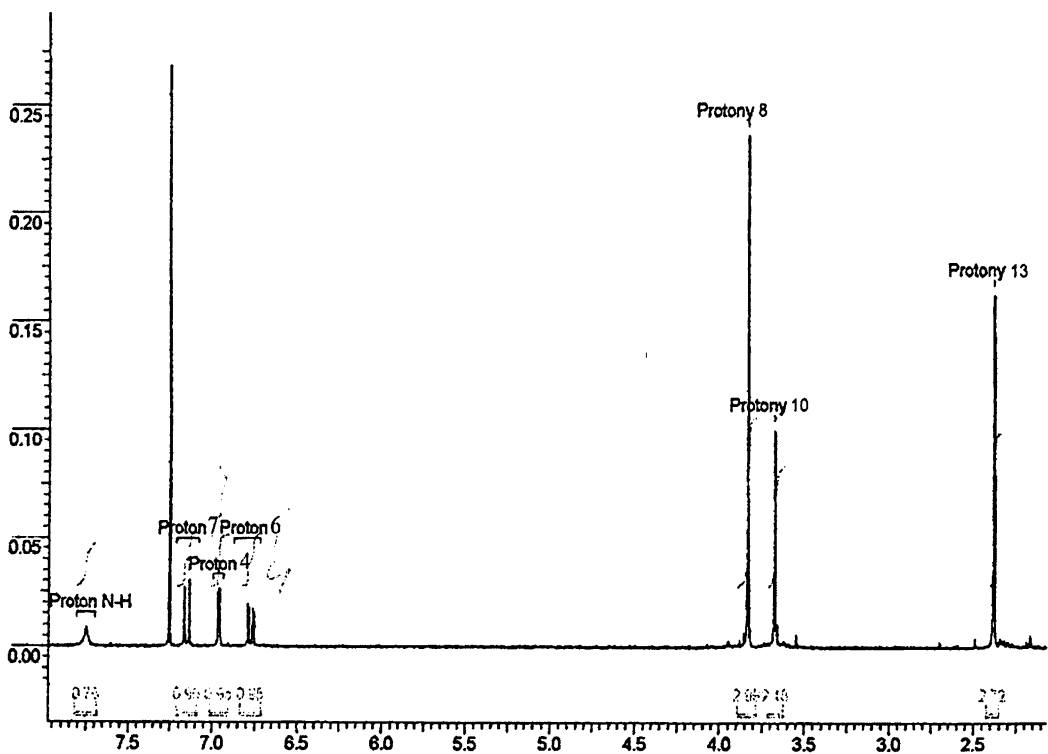
Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że widma próbki i wzorca pokrywają się dokładnie w zakresie protonów aromatycznych. Wskazuje to na obecność kwasu 4-chlorobenzoesowego w badanej próbce.

Zachowując podany wyżej tok postępowania dokonano także analizy widma kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego.





Rysunek 30. Widmo ^1H NMR substancji wzorcowej kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego.



Rysunek 31. Widmo ^1H NMR próbki badanej.

W widmie wzorca stwierdzono obecność 7 grup sygnałów:

- singlet σ 2.38 ppm – protony grupy CH_3 w pozycji 13;
- singlet σ 3.67 ppm – protony grupy CH_2 w pozycji 10;
- singlet σ 3.85 ppm – protony grupy OCH_3 w pozycji 8;
- multiplet σ 6.75 – 6.80 ppm – proton aromatyczny w pozycji 6;
- dublet σ 6.95 – proton aromatyczny w pozycji 4;
- multiplet σ 7.12 – 7.16 ppm – proton aromatyczny w pozycji 7;
- singlet σ 7.75 ppm proton grupy NH w pozycji 1.

W widmie próbki także stwierdzono obecność 7 grup sygnałów pochodzących odpowiednio od protonów grup CH_3 , CH_2 , OCH_3 , NH w pozycjach 13, 10, 8 i 1 oraz protonów aromatycznych w pozycjach 4, 6, 7.

Pozostałe sygnały występujące na zarejestrowanych widmach pochodzą od tła, tj. pozostałości rozpuszczalników lub substancji wyeluowanych z płytek chromatograficznych.

Położenie i multipletowość zidentyfikowanych sygnałów są identyczne jak na widmie zarejestrowanym dla substancji porównawczej, co wskazuje na obecność kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego w badanej próbce.

Dokładniejsze przypisanie protonów aromatycznych nie było możliwe przy użyciu wyłącznie widma ^1D .

Na podstawie otrzymanych wyników można zatem stwierdzić, że w analizowanych próbkach obecne zanieczyszczenia stanowi kwas 4-chlorobenzoesowy i kwas 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowy.

Ilościowe oznaczenia składników powstających podczas rozkładu indometacyny w roztworach przeprowadzono w warunkach ustalonych doświadczalnie. Wyniki badań zebrano w Tabelach 9, 10 i 11. Obliczeń dokonano metodą normalizacji wewnętrznej.

Tabela 9

Wyniki oznaczeń zawartości indometacyny oraz produktów rozkładu podczas ogrzewania w roztworach kwasu solnego, wodorotlenku sodu i w wodzie, w zmiennym czasie inkubacji.

Preparat	Czas ogrzewania [min]	1 mol/l HCl			H ₂ O			1 mol/l NaOH		
		z.M	z.C	I	z.M	z.C	I	z.M	z.C	I
Metindol tab.	0'	—	—	100.00	11.88	—	88.12	28.91	54.99	16.10
	15'	—	—	100.00	6.13	—	93.87	46.00	48.93	5.07
	30'	—	—	100.00	10.03	—	89.97	50.10	45.37	4.53
	45'	—	—	100.00	13.76	—	86.24	53.30	46.70	—
	60'	—	—	100.00	15.07	—	84.93	56.13	43.87	—
	90'	—	—	100.00	16.30	—	83.70	54.59	45.41	—
	120'	—	1.28	98.72	14.92	—	85.08	49.60	50.40	—
	180'	—	6.69	93.31	15.46	—	84.54	47.87	52.13	—
Metindol ini.	0'	—	17.69	82.31	—	—	100.00	39.20	60.80	—
	15'	—	23.77	76.23	—	—	100.00	52.55	47.45	—
	30'	—	29.63	70.37	—	—	100.00	50.13	49.87	—
	45'	—	31.19	68.81	10.89	—	89.11	52.76	47.24	—
	60'	21.93	33.01	45.06	11.16	—	88.84	55.66	44.34	—
	90'	28.74	50.88	20.38	12.86	—	87.14	51.04	48.96	—
	120'	38.17	51.50	10.33	15.04	—	84.96	50.38	49.62	—
	180'	39.24	52.05	8.71	18.33	—	81.67	52.42	47.58	—

z.M – zawartość kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloocetowego [%]; z.C – zawartość kwasu 4-chlorobenzoesowego [%]; I – zawartość indometacyny [%]

Tabela 10

Wyniki oznaczeń zawartości indometacyny oraz produktów rozkładu bezpośrednio po sporządzeniu (0') i po ogrzewaniu 1 h (60') w roztworach NaOH o różnych stężeniach.

Preparat	Stężenie NaOH [mol/l]	Oznaczany składnik [%]					
		z.M		z.C		I	
		0'	60'	0'	60'	0'	60'
Metindol tab.	1	30.05	57.31	54.65	42.69	15.30	—
	0.5	16.55	59.27	59.27	40.73	24.18	—
	0.2	14.51	52.94	58.33	47.06	27.16	—
	0.1	4.25	55.15	57.28	44.85	38.47	—
	0.01	—	6.15	10.89	6.65	89.11	87.20
	0.001	—	—	—	—	100.00	100.00
Metindol ini.	1	35.29	58.43	64.71	41.57	—	—
	0.5	37.46	37.61	62.54	62.39	—	—
	0.2	40.91	34.54	59.09	65.46	—	—
	0.1	42.90	41.85	57.10	58.15	—	—
	0.01	12.80	37.43	5.62	52.14	81.58	10.43
	0.001	—	10.50	—	—	100.00	89.50

z.M – zawartość kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego [%]; z.C – zawartość kwasu 4-chlorobenzoesowego [%]; I – zawartość indometacyny [%]

Tabela 11

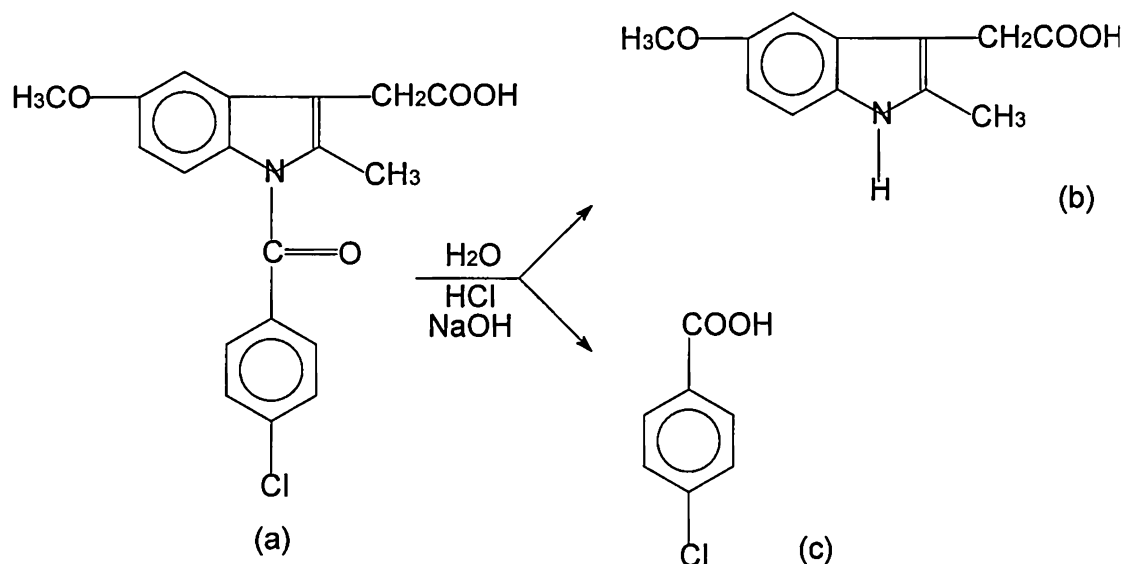
Wyniki oznaczeń zawartości indometacyny oraz produktów rozkładu podczas ogrzewania w roztworach 1 mol/l NaOH w temperaturze 22°, 37° i 70° C.

Temp.	Czas ogrzewania [h]	Metindol – tab.			Metindol – ini.		
		z.M	z.C	I	z.M	z.C	I
22°	0	29.03	54.67	16.30	36.48	63.52	—
	1	41.34	53.73	4.93	38.62	61.38	—
	5	41.69	53.74	4.57	45.28	54.72	—
	21	49.67	50.33	—	38.66	61.34	—
	45	43.43	56.57	—	40.21	59.79	—
	93	38.89	61.11	—	37.03	62.97	—
37°	1	46.43	53.57	—	48.24	51.76	—
	5	52.12	47.88	—	44.24	55.76	—
	22	51.11	48.89	—	39.39	60.61	—
	26	53.35	46.65	—	38.64	61.36	—
	46	48.16	51.84	—	38.98	61.02	—
70°	1	53.25	46.75	—	54.31	45.69	—
	3	49.72	50.28	—	58.40	41.60	—
	5	48.44	51.56	—	57.22	42.78	—
	8	45.18	54.82	—	46.18	53.82	—
	12	37.49	62.51	—	35.04	64.96	—

z.M – zawartość kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego [%]; z.C – zawartość kwasu 4-chlorobenzoesowego [%]; I – zawartość indometacyny [%]

W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono, że indometacyna (a) w roztworach wodnych oraz w środowisku kwasu solnego i roztworze wodorotlenku sodu rozkłada się do kwasu

5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego (b) i kwasu 4-chlorobenzoesowego (c), według schematu:



W badanym przedziale czasowym w przypadku roztworów tabletek nie obserwowano na chromatogramach dodatkowych plam, świadczących o degradacji indometacyny w ciągu 90 minut inkubacji, w przeciwieństwie do roztworów wodnych oraz alkalicznych (Tabela 9). Obecność zanieczyszczenia kwasem 4-chlorobenzoesowym stwierdzono dopiero przy dłuższym ogrzewaniu (120 min), i jego stężenie rosło w miarę upływu czasu ogrzewania próbek.

W roztworach kwasu solnego rozkład indometacyny w iniekcjach następował szybciej w stosunku do roztworów przygotowanych z tabletek i również zależał od czasu ogrzewania. Wydaje się, że odmienne zachowanie indometacyny w roztworach badanych w przypadku tabletek może być związane z wpływem składników pomocniczych na proces rozkładu.

Wyniki zamieszczone w Tabelach 10 i 11 pozwalają na stwierdzenie, że rozkład indometacyny jest zależny od stężenia roztworu NaOH oraz czasu ogrzewania i temperatury.

3.5.4. Leki zawierające w składzie naproksen

3.5.4.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego

Analizie poddano preparaty: Naprosyn, Apranax, Aleve i Naproksen – tabletki.

Sporządzono roztwory:

- substancji porównawczych – naproksen o stężeniu 0.003 % (w/v). Roztwór przygotowano w mieszaninie metanolu z wodą (1 : 1, v/v).
- roztwory z tabletek – sporządzano ze sproszkowanej masy 10 tabletek, odważonej z dokładnością do 0.1 mg masy substancji, odpowiadającej ok. 10 mg naproksenu, które rozpuszczono w mieszaninie metanolu z wodą (1 : 1, v/v) w objętości 20.0 ml. Po wytrząśnięciu roztwór przesączono i użyto do badań (roztwór podstawowy).

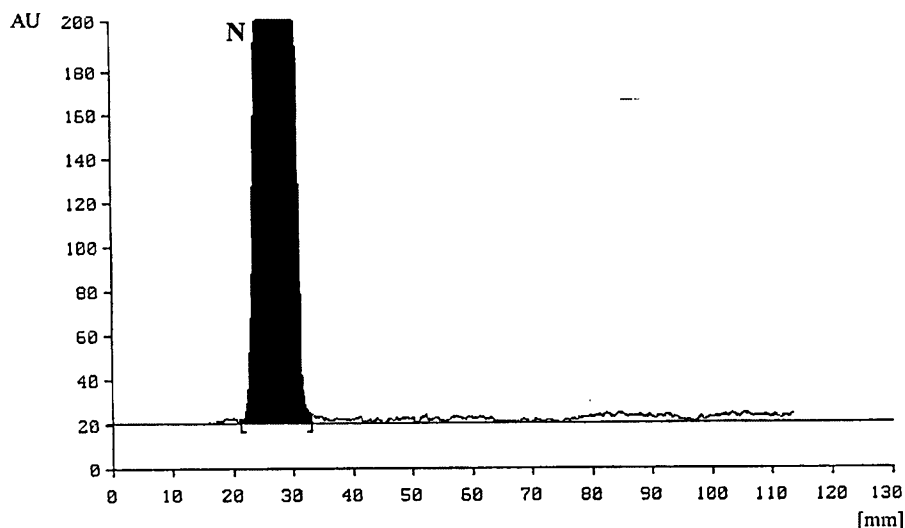
Oznaczenie prowadzono na płytkach chromatograficznych TLC F₁₅₄ art. Nr 1.05554, Merck.

3.5.4.2. Wyniki badań

Monografie farmakopealne dotyczące naproksenu nie określają rodzaju zanieczyszczeń, które mogą występować w substancji, jak również w lekach gotowych.

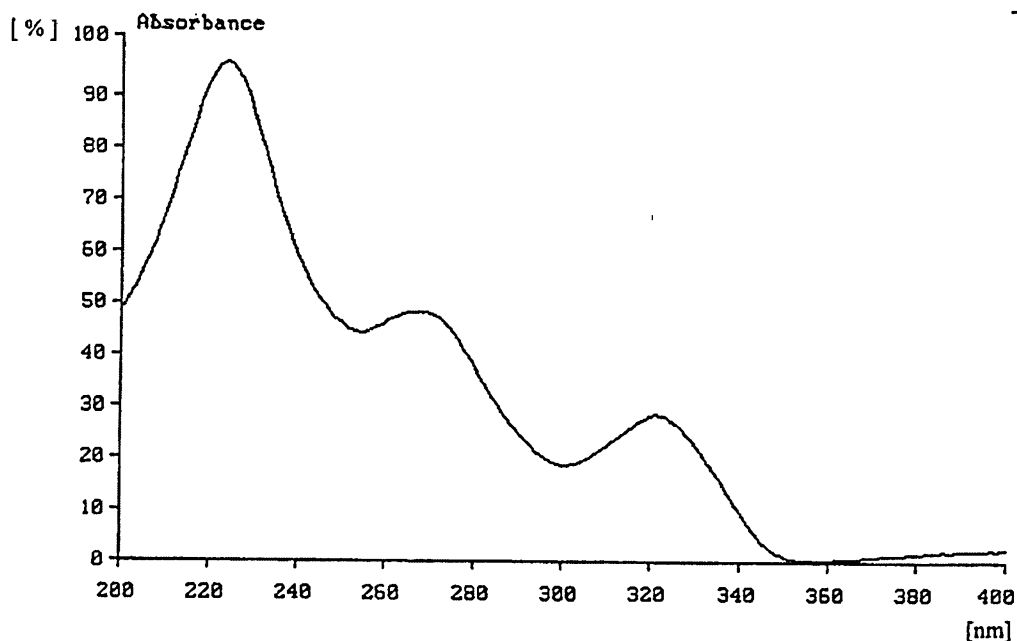
Przy użyciu fazy ruchomej: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v) dokonano oceny leków zawierających w składzie naproksen jako substancję czynną. Na chromatogramach otrzymano

dobrze wykształcony pik o wartości współczynnika $R_f \approx 0.22$, pochodzący od naproksenu.



Rysunek 32. Densytogram dla naproksenu (N).

Zarejestrowane widmo absorpcji dla plamy pochodzącej od naproksenu, w zakresie od 200 do 400 nm wykazało obecność trzech maksimów absorpcji (Rys. 33), przy $\lambda = 223$ nm, $\lambda = 266$ nm i $\lambda = 321$ nm.



Rysunek 33. Widmo absorpcji naproksenu.

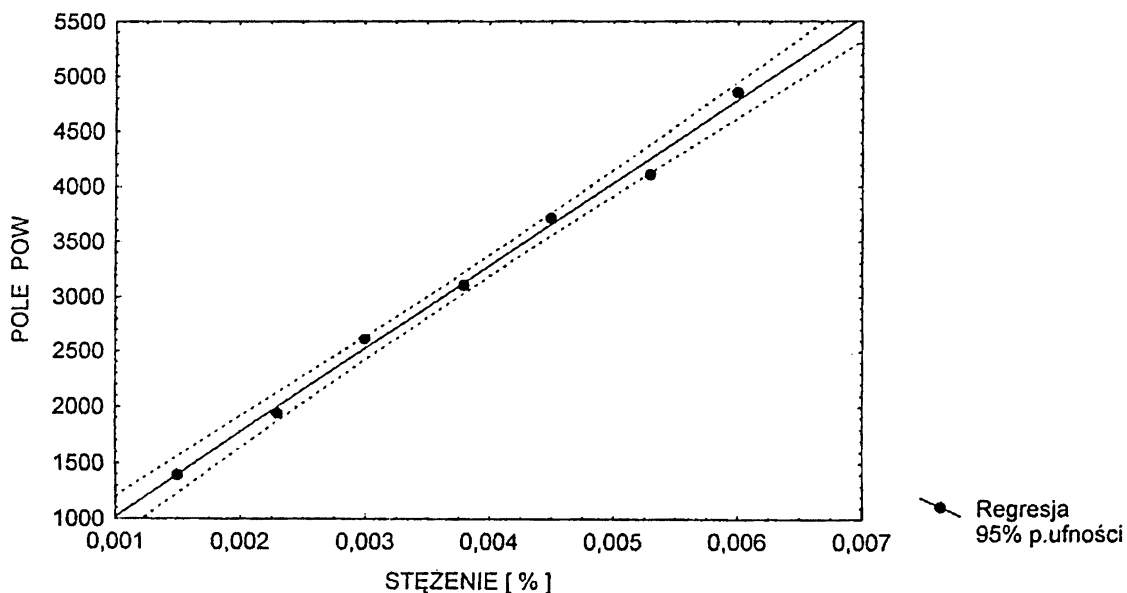
Do oznaczeń naproksenu wybrano analityczną długość fali $\lambda = 223$ nm, przy której wartość absorbancji była wysoka. Przy wybranej długości fali zbadano zależność zmian powierzchni pików od stężenia naproksenu (Rys. 34) oraz dokonano walidacji opracowanej metody (Tabela 12).

Tabela 12

Wyniki walidacji metody.

Parametr	Naprosen			
R_f	0.22			
λ [nm]	223			
Wykrywalność i oznaczalność [ng]	30			
Odzysk [%] (n=4)	91.56	96.02	99.29	94.70
	$\bar{x}_{\text{sr}} = 95.39$			
	RSD = 3.36		$\mu = \bar{x}_{\text{sr}} \pm 5.09$	
Precyzja $y = \bar{x}_{\text{sr}} \pm 2 \cdot S$ (n=6)	2147.8	2213.2	2223.5	
	2193.5	2201.4	2157.9	
	$x_{\text{min}} = 2147.8$		$x_{\text{max}} = 2223.5$	
	$y = 2189.6 \pm 60.7$			
Zakres liniowości [%]	c-0.0015	P-1394.8		
	c-0.0023	P-1945.0		
	c-0.0003	P-2615.1		
	c-0.0038	P-3106.9		
	c-0.0045	P-3717.8		
	c-0.0053	P-4113.6		
	c-0.0060	P-4856.6		
	0.0015 – 0.0060			
Równanie prostej $P = a \cdot c + b$	$a = 752900$			
	$b = 267.66$			
Współczynnik korelacji	0.9977			

\bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; RSD – współczynnik zmienności [%]; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; x_{min} – wynik najniższy; x_{max} – wynik najwyższy; y – zakres wyników przy prawdopodobieństwie 95 %; S – odchylenie standardowe; P – pole powierzchni piku; c – stężenie; a, b – współczynniki kierunkowe prostej



Rysunek 34. Krzywa zależności powierzchni piku od stężenia dla roztworu naproksenu.

W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono warunki identyfikacji i wykonania oznaczenia składników w lekach objętych planem badań.

3.5.4.2.1. Wykonanie badania

Na płytce nanoszono w postaci pasma o szerokości 1 cm, roztwór porównawczy w objętości 4 μl oraz roztwory preparatów w objętości po 20 μl roztworu podstawowego do oznaczania zanieczyszczeń i po 2 μl dziesięciokrotnie rozcieńczonego roztworu podstawowego do oznaczania naproksenu. Chromatogramy rozwijano na drodze 12,5 cm stosując jako fazę ruchomą mieszaninę: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v). Chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej. Rejestrację przeprowadzono densytometrycznie przy długości fali $\lambda = 223 \text{ nm}$ (Badania wstępne). Wyniki badań przedstawiono

w Tabeli 13, w której nie zamieszczono wyników oznaczeń zanieczyszczeń, gdyż w opracowanych warunkach wykonania badania nie stwierdzono ich obecności w objętych badaniami lekach.

Tabela 13

Wyniki oznaczeń zawartości naproksenu w badanych lekach wraz z oceną statystyczną.

Preparat / Deklarowana zawartość naproksenu [g/tab.]	Oznaczona zawartość naproksenu [g/tab.]	Ocena statystyczna (n = 6)
Naprosyn s. 8467 / 0.250	0.2385 0.2483	$\bar{x}_{sr} = 0.2448$ $S = 0.0048$ $S_x = 0.0020$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0051$ RSD = 1.96
	0.2405 0.2508	
	0.2434 0.2474	
Naprosyn s. 9489 / 0.250	0.2357 0.2312	$\bar{x}_{sr} = 0.2450$ $S = 0.0116$ $S_x = 0.0047$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0121$ RSD = 4.73
	0.2429 0.2443	
	0.2634 0.2522	
Apranax / 0.550	0.5241 0.5373	$\bar{x}_{sr} = 0.5382$ $S = 0.0124$ $S_x = 0.0051$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0131$ RSD = 2.30
	0.5273 0.5581	
	0.5368 0.5456	
Apranax / 0.275	0.2559 0.2847	$\bar{x}_{sr} = 0.2725$ $S = 0.0100$ $S_x = 0.0041$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0105$ RSD = 3.67
	0.2666 0.2758	
	0.2777 0.2743	
Aleve / 0.220	0.2215 0.2042	$\bar{x}_{sr} = 0.2166$ $S = 0.0066$ $S_x = 0.0027$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0069$ RSD = 3.05
	0.2184 0.2162	
	0.2166 0.2225	
Naproxen / 0.100	0.0971 0.0959	$\bar{x}_{sr} = 0.0972$ $S = 0.0024$ $S_x = 0.0010$ $\mu = \bar{x} \pm 0.0026$ RSD = 2.47
	0.0988 0.0967	
	0.1008 0.0938	

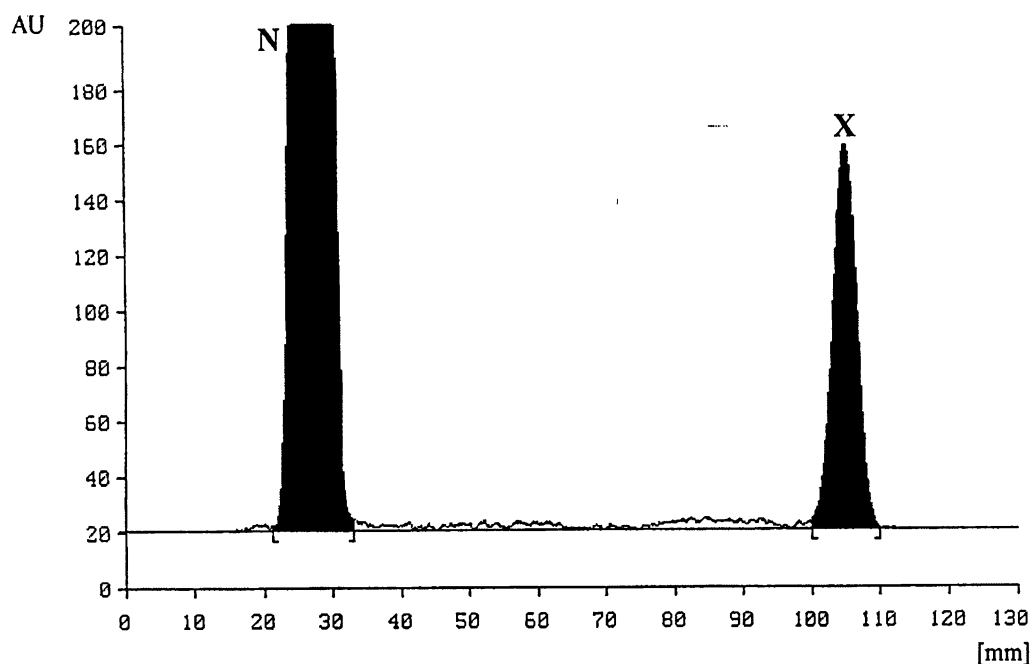
s. – numer serii; \bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; S – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; S_x – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; RSD – współczynnik zmienności [%]

W dalszej części pracy zbadano wpływ pH środowiska, temperatury oraz czasu inkubacji na trwałość naproksenu w roztworach.

3.5.4.2.2. Badanie trwałości naproksenu w roztworach

Badania wpływu pH środowiska, czasu ogrzewania i temperatury na stabilność naproksenu w roztworach prowadzono dla odważek leków, odpowiadających ok. 10 mg naproksenu, rozpuszczonych w 10.0 ml kwasu solnego o stężeniach od 1 mol/l do 10^{-5} mol/l lub 1 mol/l wodorotlenku sodu. Próbkę ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej w czasie, określonym planem badań (Tab. 14, 15, 16). Przygotowane jak wyżej roztwory próbek w 1 mol/l HCl inkubowano w temperaturze 22°, 37° i 70° C (Tab. 17). Do oznaczeń próbki analitu rozcieńczono metanolem w stosunku 1:1 (v/v) i prowadzono oznaczenia w warunkach opracowanej metody.

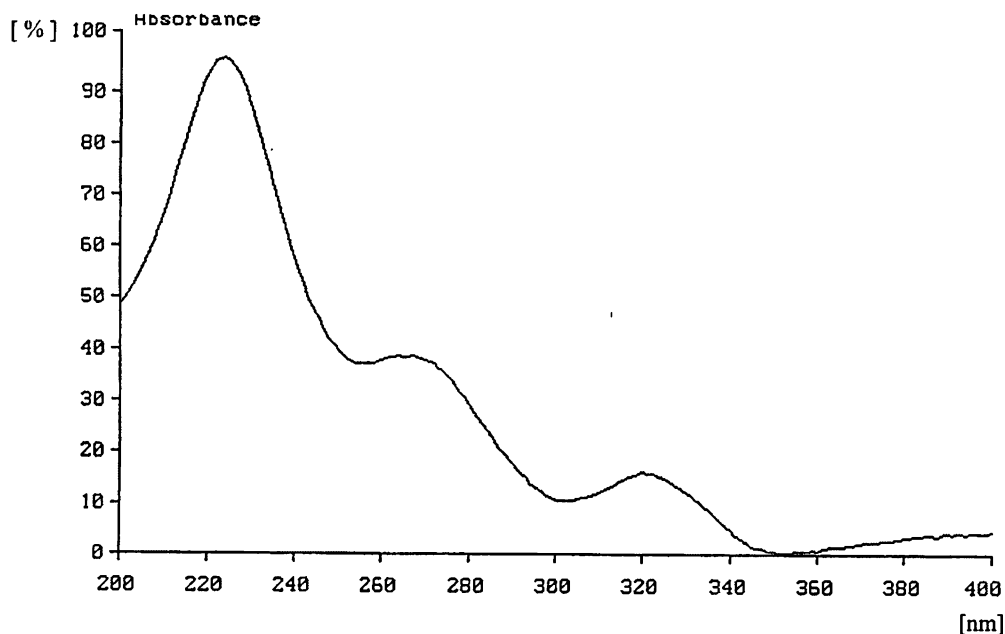
Na zarejestrowanych densytogramach obserwowano dodatkowy pik (X) poza pikiem pochodzącym od naproksenu (N) (Rys. 35).



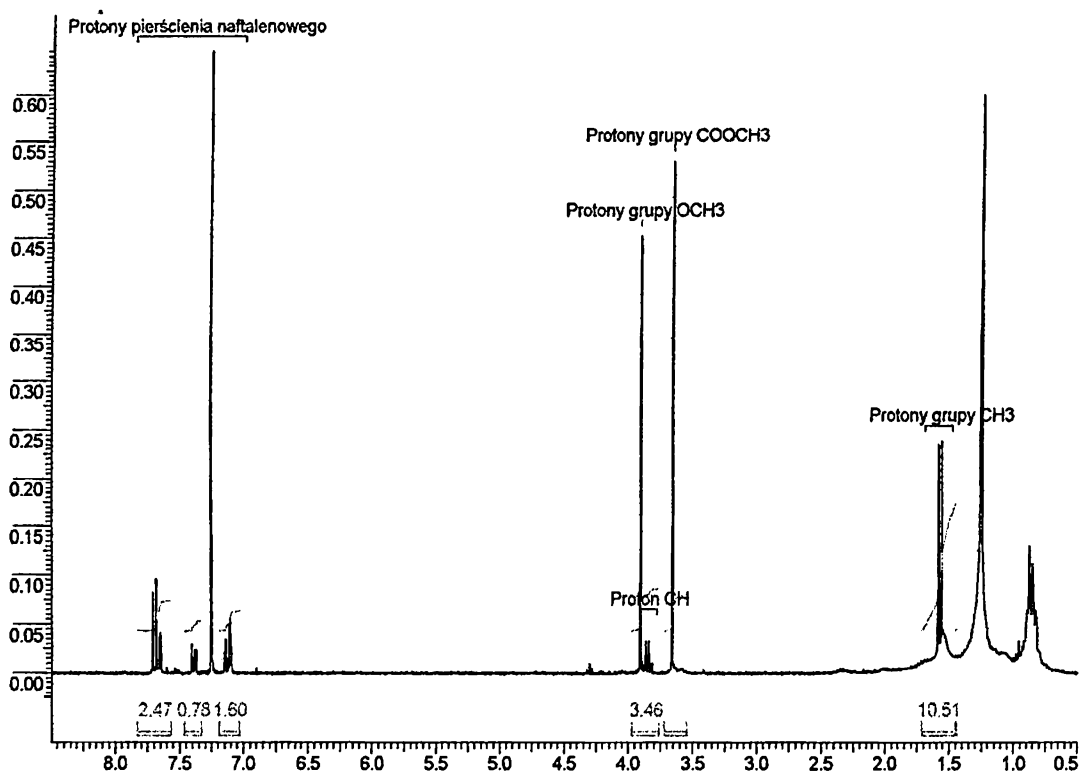
Rysunek 35. Densytogram dla naproksenu (N) oraz zanieczyszczenia (X).

W celu identyfikacji występującej na chromatogramach dodatkowej plamy wykonano badania tożsamości. Dokonano określenia wartości współczynników retencji, rejestracji widm absorpcji oraz wykonano badanie ^1H NMR. Stwierdzono, że współczynniki retencji dla poszczególnych plam wynoszą 0.85 i 0.21. Pik o wartości $R_f \approx 0.22$ jest charakterystyczny dla naproksenu, natomiast drugi pik należy do nieznanego składnika (X), który powstał w warunkach badania.

Zarejestrowane widma absorpcji w UV dla naproksenu w zakresie od 200 nm do 400 nm, mają podobny przebieg jak analogiczne widma dla substancji porównawczej. Widmo absorpcji dla składnika (X) także posiada trzy maksima absorpcji, przy $\lambda = 222$ nm, $\lambda = 267$ nm i $\lambda = 320$ nm (Rys. 36). Można zatem przypuszczać, że jest to związek o podobnej strukturze do naproksenu.



Rysunek 36. Widmo absorpcji substancji X.



Rysunek 38. Widmo ^1H NMR próbki badanej.

Analiza widma substancji porównawczej naproksenu wykazała obecność czterech grup sygnałów:

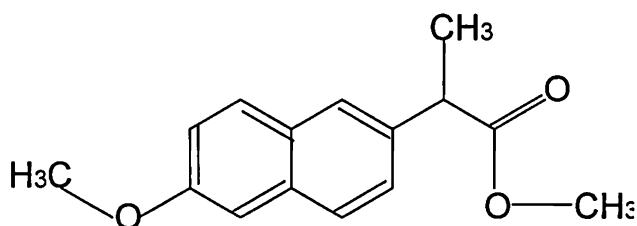
- dublet σ 1.6 ppm – protony grupy CH_3 w pozycji 3’;
- dublet σ 3.85 ppm – proton grupy CH w pozycji 2’;
- singlet σ 3.92 ppm – protony grupy OCH_3 w pozycji 10;
- multiplet σ 7.12-7.75 ppm – protony pierścienia naftalenowego.

W widmie próbki zidentyfikowano natomiast pięć grup sygnałów:

- dublet σ 1.62 ppm – protony grupy CH_3 ;
- singlet σ 3.66 ppm – protony grupy COOCH_3 ;
- dublet σ 3.85 ppm – proton grupy CH;
- singlet σ 3.9 ppm – protony grupy OCH_3 ;
- multiplet σ 7.1-7.73 ppm – protony pierścienia naftalenowego.

Dokładniejsze przypisanie protonów nie było możliwe przy użyciu wyłącznie widma 1D .

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że widmo próbki w dużej części odpowiada widmu wzorca naproksenu, zarówno pod względem liczby grup protonów, przesunięć chemicznych poszczególnych sygnałów, jak i ich multipletowości. Jediną różnicą jest obecność w widmie próbki sygnału σ 3.66 ppm odpowiadającego obecności grupy $COOCH_3$, a mogącego pochodzić od metanolu. Jednakże analiza wartości integracji wskazuje na stechiometryczną ilość dodatkowych protonów grup CH_3 , co może wskazywać na konkretną ich ilość w próbce, a nie przypadkową, mogącą pochodzić od rozpuszczalnika. Można zatem przypuszczać, że substancją X jest ester kwasu 2-(6-metoksynaft-2-yl)propionowego (naproksenu), o wzorze:



Ilościowe oznaczenia składnika powstającego w trakcie rozkładu naproksenu w roztworach przeprowadzono w warunkach ustalonych doświadczalnie.

Badania wykonano w roztworach kwasu solnego o stężeniu 1 mol/l, dla leków objętych planem badań (Tab. 14) oraz w roztworach kwasu solnego o stężeniach, od 1 mol/l do 10^{-5} mol/l (Tab. 15) dla wybranych leków Naprosyn s. 9489 oraz Apranax s.00233.

Zbadano także wpływ czasu inkubacji na rozkład podczas ogrzewania w roztworach 1 mol/l HCl w czasie określonym planem badań na przykładzie wybranych leków (Tab. 16 i 17). Do określenia stężenia

poszczególnych składników posłużono się metodą normalizacji wewnętrznej. Wyniki badań zebrano w Tabelach 14 – 17.

Tabela 14

Wyniki oznaczeń zawartości naproksenu oraz substancji X w preparatach po ogrzewaniu 1 h w 1 mol/l HCl.

Preparat	Zawartość naproksenu [%]	Zawartość X [%]
Naprosyn s. 8467	78.28	21.72
Naprosyn s. 9489	69.75	30.25
Apranax s. 00233	70.41	29.59
Apranax s. 00102	73.11	26.89
Aleve	67.33	32.67
Naproxen	64.83	35.17

Tabela 15

Wyniki oznaczeń zawartości naproksenu oraz substancji X w preparacie Naprosyn (s. 9489) po ogrzewaniu 1 h w roztworach HCl o różnym stężeniu.

Środowisko reakcji	Zawartość naproksenu [%]	Zawartość X [%]
1.0 mol/l	72.86	27.14
0.5 mol/l	74.59	25.41
0.2 mol/l	79.91	20.09
0.1 mol/l	88.07	11.93
0.01 mol/l	98.30	1.70
0.001 mol/l	100.00	—
0.00001 mol/l	100.00	—

Tabela 16

Wyniki oznaczeń zawartości naproksenu oraz substancji X w preparatach po różnym czasie inkubacji w roztworze 1 mol/l HCl.

Czas ogrzewania [min]	Naprosyn		Apranax	
	N	X	N	X
0'	98.10	1.90	97.74	2.26
15'	87.13	12.87	90.83	9.17
30'	81.14	18.86	86.49	13.51
45'	77.41	22.59	80.17	19.83
60'	82.56	17.44	82.29	17.71
75'	88.96	11.04	85.73	14.27
90'	85.08	14.92	89.27	10.73
105'	80.81	19.19	90.69	9.31
120'	77.65	22.35	91.51	8.49
150'	78.66	21.34	91.44	8.56
180'	78.78	21.22	92.03	7.97
240'	68.43	31.37	92.87	7.13

N – zawartość naproksenu [%]; X – zawartość substancji X [%]

Tabela 17

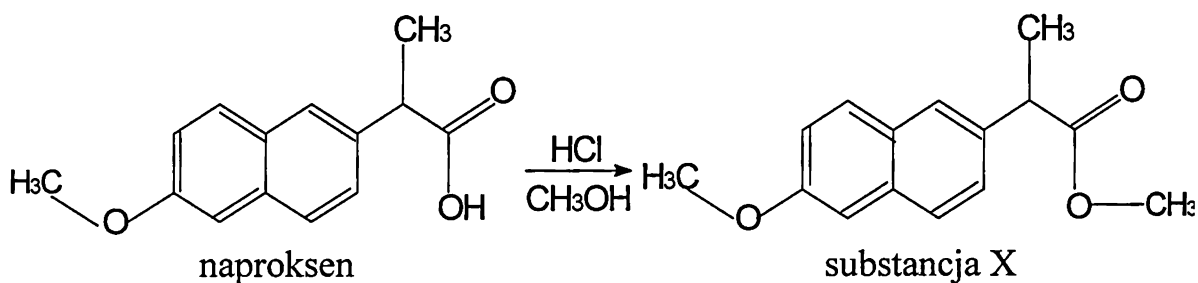
Wyniki oznaczeń zawartości naproksenu oraz substancji X w preparacie Naprosyn (s. 9489) po ogrzewaniu w roztworach 1 mol/l HCl w temperaturze 22° C, 37° C i 70° C.

Temperatura [° C]	Czas ogrzewania [dni]	Zawartość naproksenu [%]	Zawartość X [%]
22	1	84.40	15.60
	3	82.90	17.10
	7	74.68	25.32
	14	81.33	18.67
	16	77.16	22.84
	23	97.03	2.97
37	1	82.60	17.40
	2	65.82	34.18
	4	76.99	23.01
	7	77.60	22.40
	14	81.54	18.46
	16	84.26	15.74
	23	94.31	5.69
70	1	84.53	15.47
	2	100.00	—
	3	100.00	—

Stwierdzono, że rozkład naproksenu w różnych lekach w zależności od stężenia kwasu solnego oraz temperatury i czasu inkubacji, przebiega w kierunku powstawania substancji X. Im większe stężenie kwasu oraz im wyższa temperatura tym obserwowany proces zachodzi szybciej.

Równocześnie można zaobserwować pewne zmiany w kierunku odwrotnym, czyli ponownego zwiększania się stężenia naproksenu. Może to oznaczać odwracalność zachodzącego procesu.

Wyniki badań pozwalają przypuszczać, że naproksen w kwaśnym roztworze metanolem ulega estryfikacji. Przebieg tej reakcji można opisać równaniem:



W roztworze NaOH omawianych powyżej zmian nie obserwowano.

3.5.5. Leki zawierające w składzie tramadol

3.5.5.1. Warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego

Analizie poddano preparaty: Tramadol, Tramal, Top Algic – kapsułki, Top Algic – tabletki oraz Tramadol Stada, Tramador – krople.

Sporządzono roztwory:

- substancji porównawczych – masy chlorowodoru (1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)cykloheksanolu (tramadolu), [2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-1-enylo]-N,N-dimetylometanaminy (zan. A), (1RS)-[2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-2-enylo]-N,N-dimetylometanaminy (zan. B), (2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]cykloheksanonu (zan. C), (1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)cykloheksanolu (zan. **cis-T**) rozpuszczono w mieszaninie metanolu z wodą (1 : 1, v/v) tak, aby otrzymać roztwory o stężeniach ok. 90 µg/ml.
- roztwory z tabletek i kapsułek – sporządzono ze sproszkowanej masy 10 tabletek, odważonej z dokładnością do 0.1 mg masy substancji, odpowiadającej ok. 20 mg tramadolu, które rozpuszczono w mieszaninie metanolu z wodą (1 : 1, v/v) w objętości 20.0 ml. Po wytrząśnięciu roztwór przesączono i użyto do badań (roztwór podstawowy).
- roztwory z kropli – odmierzono ilość kropli, odpowiadającą ok. 20 mg tramadolu i dopełniono mieszaniną metanol – woda (1 : 1, v/v) do objętości 20.0 ml.

Oznaczenie prowadzono na płytkach chromatograficznych HPTLC F₂₅₄, art. Nr 1.05548, Merck.

3.5.5.2. Wyniki badań

Monografie tramadolu [3] dopuszczają obecność pięciu zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych, w tym także postaci izomerycznych substancji czynnej.

Spośród przebadanych faz ruchomych wybrano dwie, w których uzyskano dobrze wykształcone piki, różniące się położeniem plam na chromatogramach. Przy użyciu fazy ruchomej I. chloroform – metanol – kwas octowy lodowaty (9 : 2 : 0.1, v/v/v), uzyskano zadowalający rozdział badanych składników, z wyjątkiem plamy o wartości $R_f \approx 0.91$ (zan. C), która poruszała się zbyt szybko, z frontem fazy ruchomej, a ponadto interferowała z fazą ruchomą, co nie jest korzystne dla potrzeb analizy ilościowej (Rys. 39). Uznano zatem, że przy użyciu podanej wyżej fazy ruchomej można prowadzić oznaczenia ilościowe tramadolu, zanieczyszczeń A, B i cis-T, natomiast do oznaczeń jakościowych można wykorzystać tę fazę ruchomą dla wszystkich badanych składników.

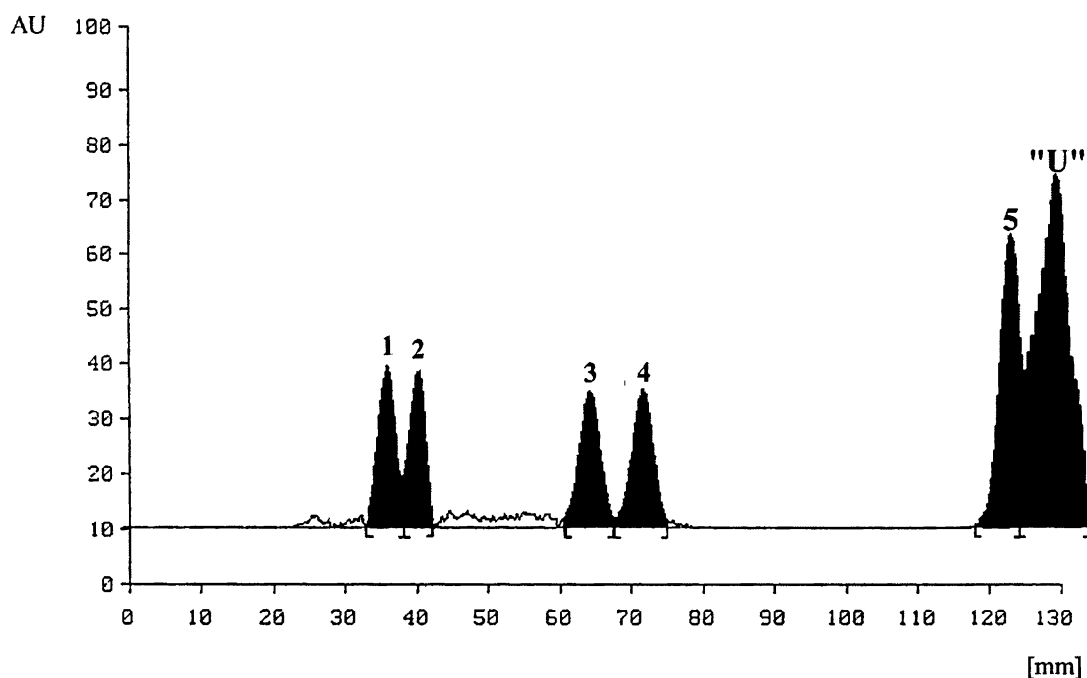
Dalsze badania pozwoliły na dobór innej fazy ruchomej, w której uzyskano dobry rozdział zan. C od pozostałych składników. Zaproponowano zatem fazę ruchomą II. chloroform – toluen – etanol (9 : 8 : 1, v/v/v), w której uzyskano wprawdzie niekorzystne warunki rozdziału tramadolu, zan. A, zan. B i zan. cis-T obok siebie (wartości $R_f \approx 0.10 - 0.15$), jednak ich położenie znacznie różniło się od położenia plamy zan. C ($R_f \approx 0.58$), stąd do oznaczeń ilościowych tego zanieczyszczenia wybrano fazę ruchomą II (Rys. 40).

W Tabeli 18 podano szczegółowe wartości współczynników retencji (R_f) dla poszczególnych składników stanowiących przedmiot badania.

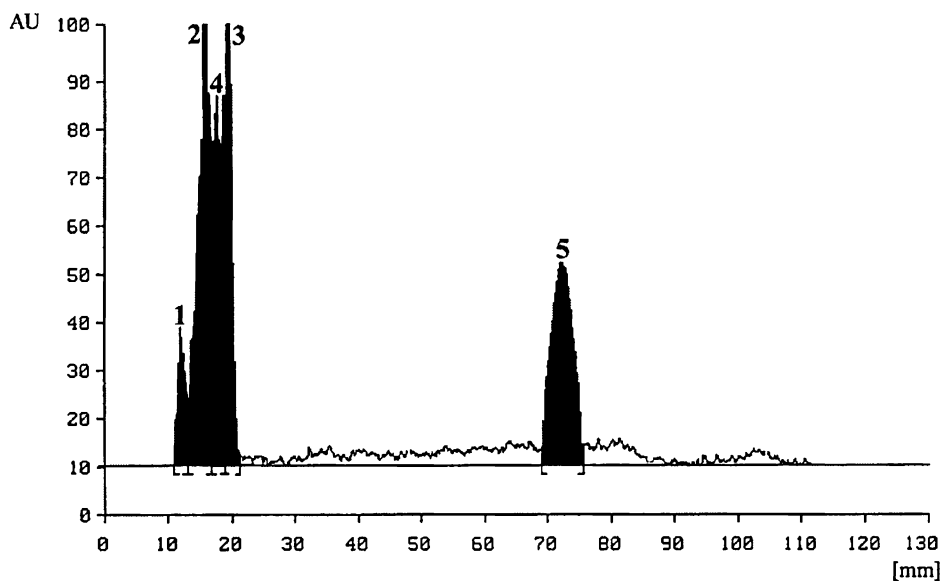
Tabela 18

Wartości współczynników R_f dla zanieczyszczeń oraz tramadolu w stosowanych fazach ruchomych.

Oznaczany składnik	I. chloroform – metanol – kwas octowy (9 : 2 : 0.1, v/v/v)	II. chloroform – toluen – etanol (9 : 8 : 1, v/v/v)
	tramadol	0.34
zan. A	0.61	0.14
zan. B	0.50	0.15
zan. C	0.91	0.58
zan. cis-T	0.29	0.10



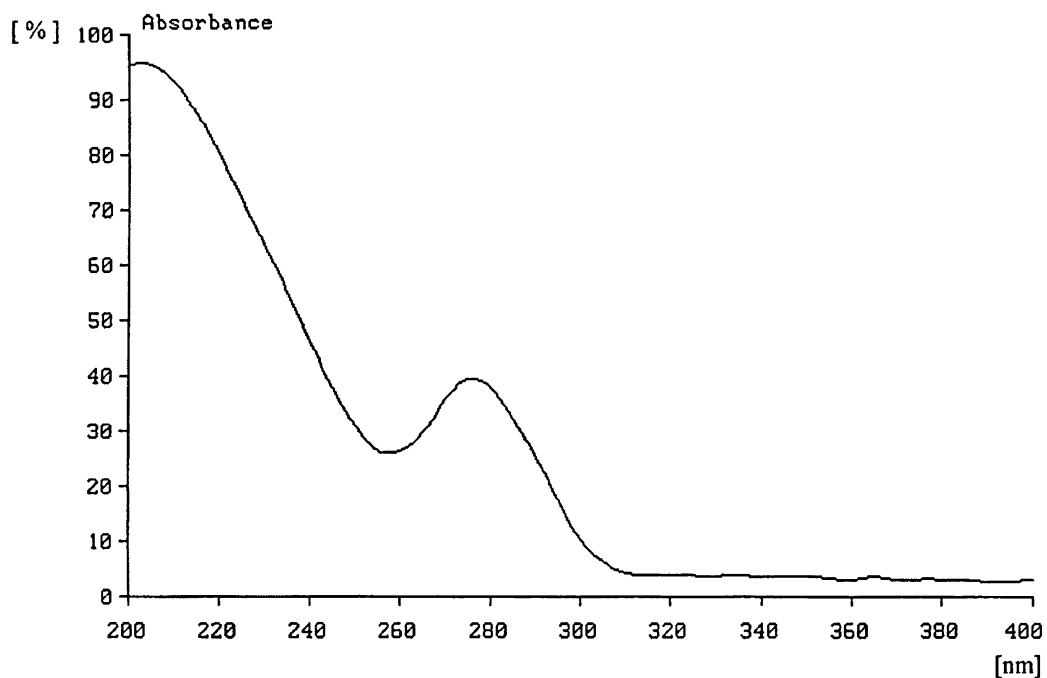
Rysunek 39. Densytogram dla tramadolu (2), zan. A (4), zan. B (3), zan. C (5) i zan. cis-T (1) otrzymany przy użyciu fazy ruchomej I. chloroform – metanol – kwas octowy lodowaty (9 : 2 : 0.1, v/v/v). „U” – czoło fazy ruchomej.



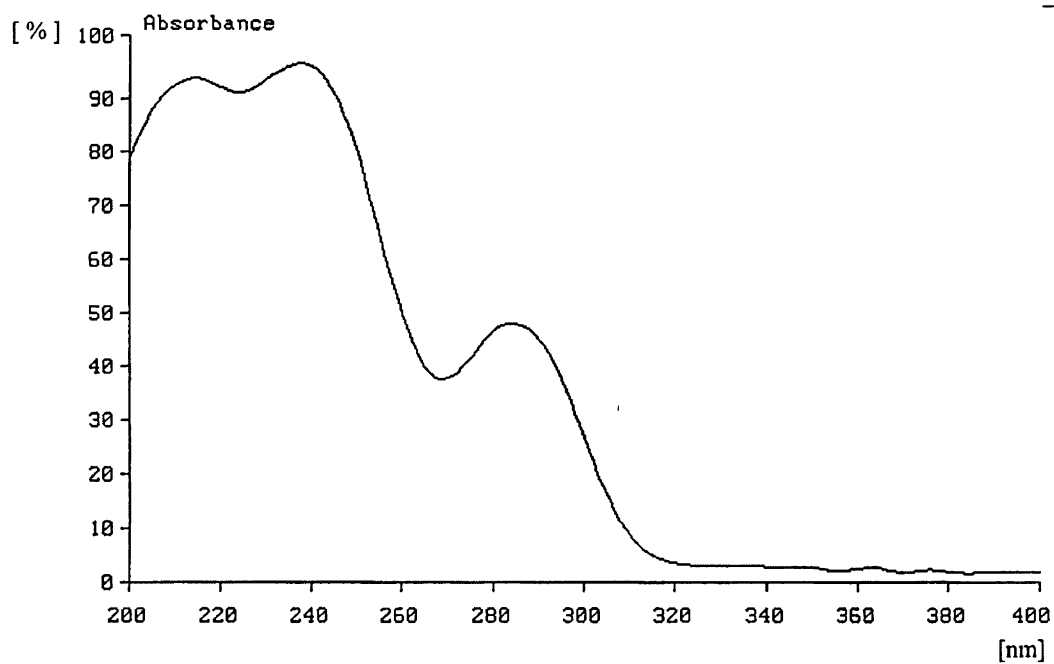
Rysunek 40. Densytogram dla tramadolu (2), zan. A (4), zan. B (3), zan. C (5) i zan. cis-T (1) otrzymany przy użyciu fazy ruchomej II. chloroform – toluen – etanol (9 : 8 : 1, v/v/v).

W dalszej części badań przeprowadzono rejestrację widm absorpcji bezpośrednio na chromatogramach oznaczanych składników w zakresie od 200 nm do 400 nm (Rys. 41 – 45) stwierdzając różnice ich kształtu i występujących maksimum absorpcji.

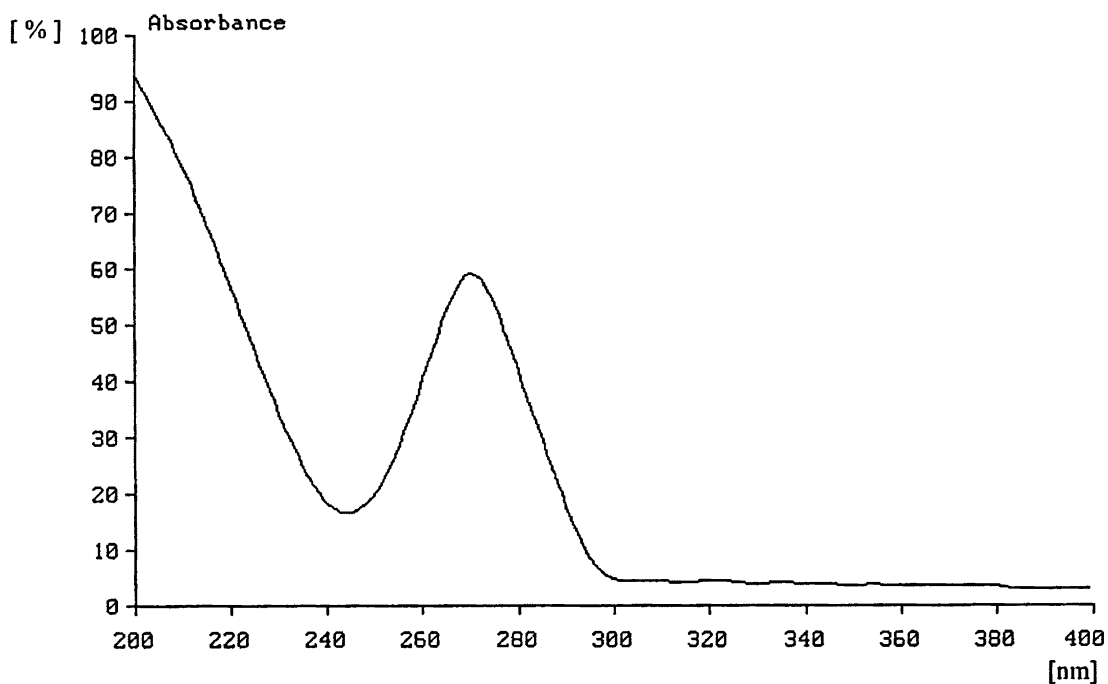
W widmie tramadolu występowało jedno maksimum absorpcji przy $\lambda = 270$ nm. Dla zanieczyszczeń uzyskano wyniki: dla zan. A, zan. C i zan. cis-T obecność pojedynczych maksimum absorpcji, odpowiednio przy $\lambda_{\text{zan. A}} = 275$ nm, $\lambda_{\text{zan. C}} = 270$ nm i $\lambda_{\text{zan. cis-T}} = 272$ nm. Natomiast w widmie zan. B zaobserwowano trzy maksima absorpcji, przy $\lambda = 214$ nm, $\lambda = 238$ nm i $\lambda = 283$ nm.



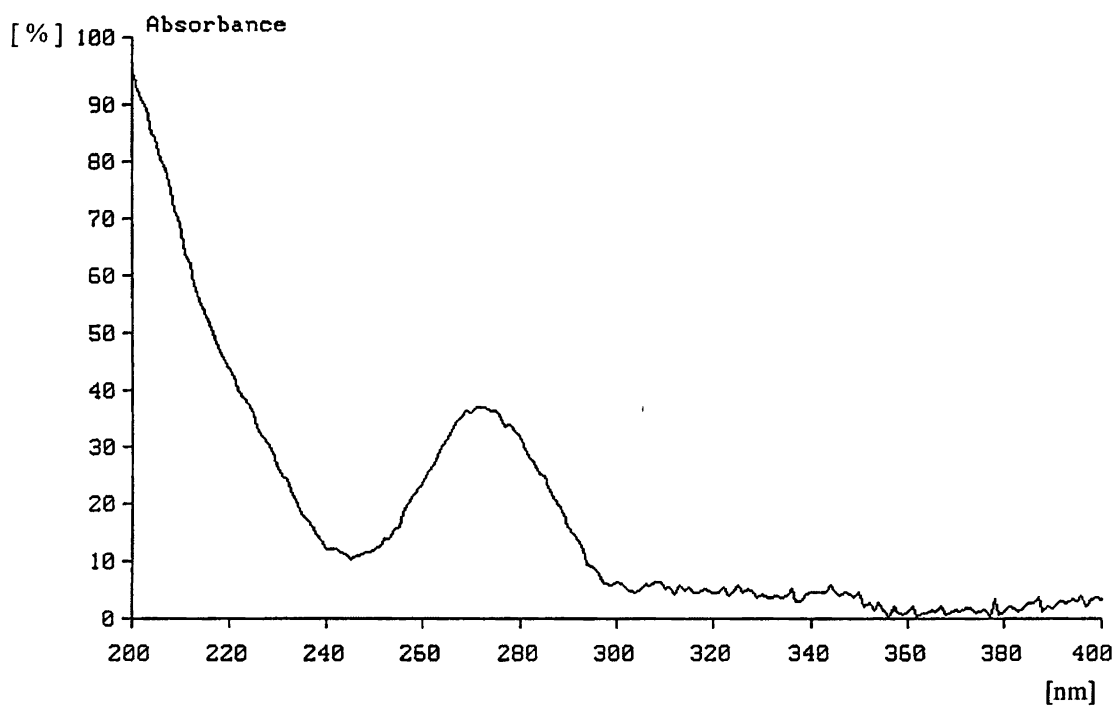
Rysunek 41. Widmo absorpcji zanieczyszczenia A.



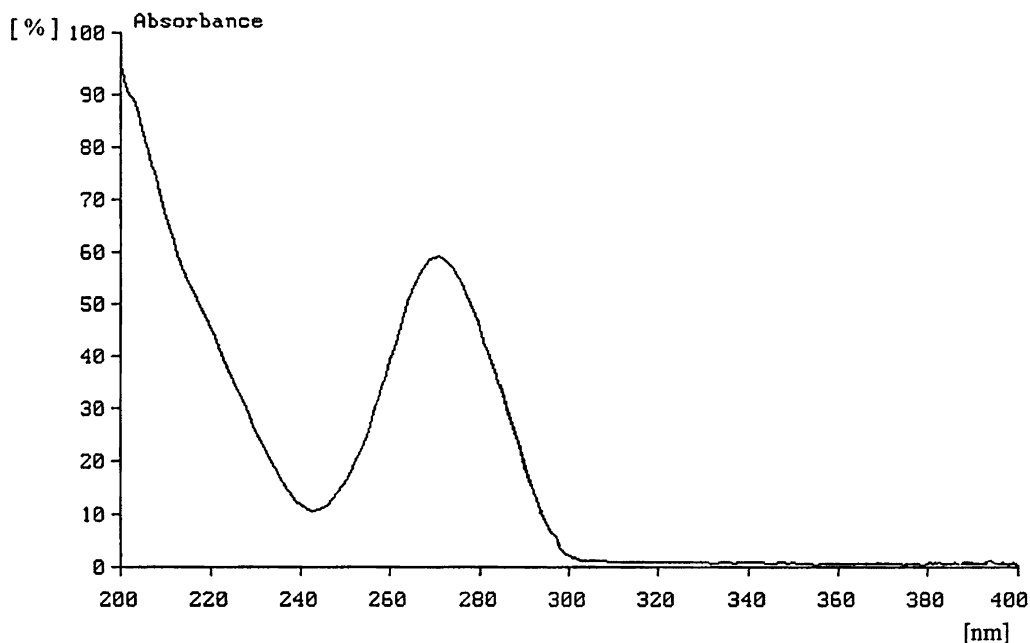
Rysunek 42. Widmo absorpcji zanieczyszczenia B.



Rysunek 43. Widmo absorpcji zanieczyszczenia C.



Rysunek 44. Widmo absorpcji zanieczyszczenia cis-T.



Rysunek 45. Widmo absorpcji tramadolu.

W oparciu o uzyskane wyniki dokonano wyboru analitycznej długości fali $\lambda = 270$ nm do oznaczeń ilościowych, przy której wszystkie oznaczane składniki posiadają wysokie wartości absorbancji. Krzywe zależności powierzchni pików od stężenia dla poszczególnych składników mają przebieg prostoliniowy (Rys. 46-50).

Wyniki przeprowadzonej walidacji metody zebrano w Tabeli 19.

Tabela 19

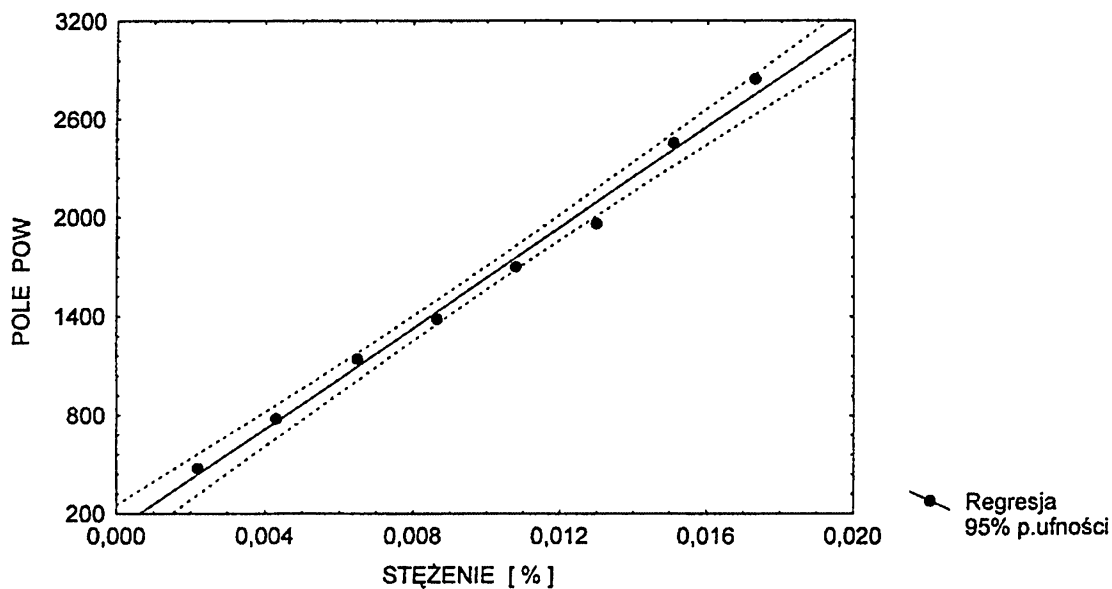
Wyniki walidacji metody.

Parametry	Tramadol	zan. A	zan. B	zan. C	zan. cis-T
1	2	3	4	5	6
R_f	0.34	0.61	0.50	0.58	0.29
λ [nm]	270				
Wykrywalność i oznaczalność [ng]	310	350	260	44	320

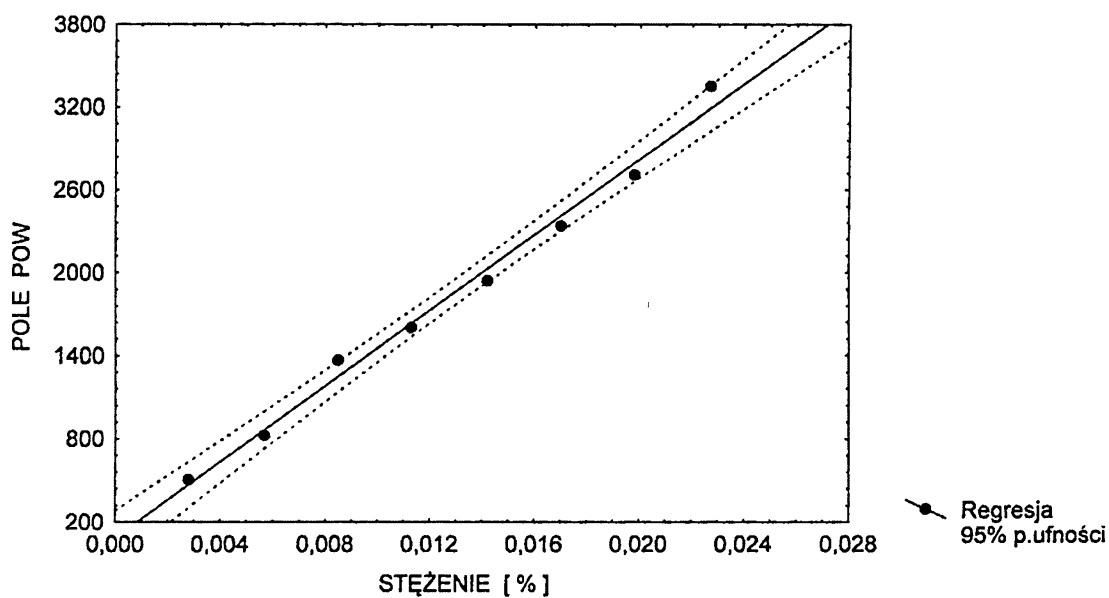
cd. Tabeli 19

1	2		3		4		5		6	
Odzysk [%] (n=4)	96.36	94.98	98.49	97.10	95.51	95.08	97.94	96.12	96.31	92.55
	97.59	96.35	96.71	99.72	96.19	97.59	100.28	104.30	93.38	90.74
	$\bar{x}_{sr} = 96.32$ RSD = 1.11 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 1.70$		$\bar{x}_{sr} = 98.01$ RSD = 1.40 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 2.19$		$\bar{x}_{sr} = 96.09$ RSD = 1.14 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 1.75$		$\bar{x}_{sr} = 99.66$ RSD = 3.54 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 5.62$		$\bar{x}_{sr} = 93.25$ RSD = 2.49 $\mu = \bar{x}_{sr} \pm 3.69$	
Precyzja $y = \bar{x}_{sr} \pm 2 \cdot S$ (n=6)	893.6	946.3	911.9	969.8	817.5	845.1	1487.3	1670.1	868.5	885.7
	995.0	981.7	988.3	957.4	894.8	882.7	1698.4	1587.5	957.1	910.5
	894.3	948.3	918.9	987.9	860.4	863.7	1600.9	1606.8	901.4	917.0
	$x_{min} = 893.6$ $x_{max} = 995.0$ $y = 943.2 \pm 85.1$		$x_{min} = 911.9$ $x_{max} = 988.3$ $y = 955.7 \pm 66.8$		$x_{min} = 817.5$ $x_{max} = 894.8$ $y = 860.7 \pm 54.9$		$x_{min} = 1487.3$ $x_{max} = 1698.4$ $y = 1608.5 \pm 147.2$		$x_{min} = 868.5$ $x_{max} = 957.1$ $y = 906.7 \pm 60.6$	
Zakres liniowości [%]	c-	P-	c-	P-	c-	P-	c-	P-	c-	P-
	0.0022	487.9	0.0022	474.0	0.0028	505.8	0.0044	514.8	0.0027	302.4
	0.0044	737.3	0.0043	780.6	0.0057	828.3	0.0087	1102.7	0.0053	487.7
	0.0066	1293.5	0.0065	1140.4	0.0085	1368.6	0.0131	1564.7	0.0080	750.5
	0.0089	1533.1	0.0087	1383.7	0.0113	1602.7	0.0174	2017.8	0.0106	892.2
	0.0111	1899.0	0.0108	1700.3	0.0142	1942.4	0.0218	2450.1	0.0133	1192.6
	0.0133	2270.2	0.0130	1962.8	0.0170	2341.3	0.0261	2894.9	0.0159	1461.6
	0.0155	2521.2	0.0151	2453.3	0.0198	2709.9	0.0305	3223.0	0.0186	1649.0
	0.0177	3150.1	0.0173	2845.4	0.0227	3351.8	0.0348	3526.2	0.0212	1790.4
	0.0022 – 0.0177		0.0022 – 0.0173		0.0028 – 0.0227		0.0044 – 0.0348		0.0027 – 0.0212	
Równanie prostej $P = a \cdot c + b$	a = 165500 b = 88.53		a = 153000 b = 103.79		a = 136800 b = 86.90		a = 98807 b = 227.62		a = 84562 b = 54.41	
Współczynnik korelacji	0.99502		0.99613		0.99504		0.99610		0.99564	

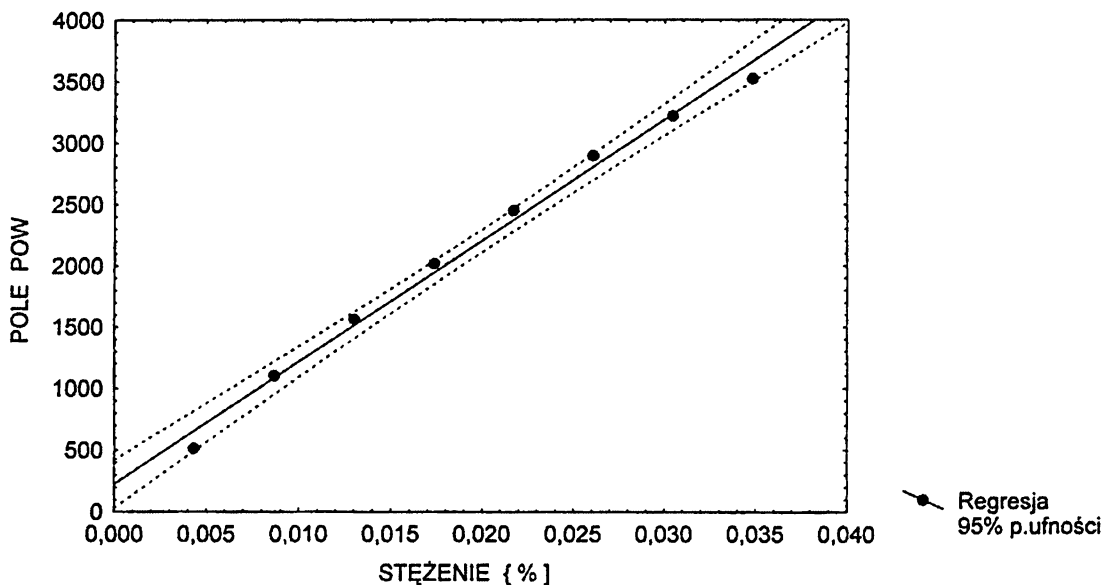
\bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; RSD – współczynnik zmienności [%]; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; x_{min} – wynik najniższy; x_{max} – wynik najwyższy; y – zakres wyników przy prawdopodobieństwie 95 %; S – odchylenie standardowe; P – pole powierzchni pików; c – stężenie; a, b – współczynniki kierunkowe prostej



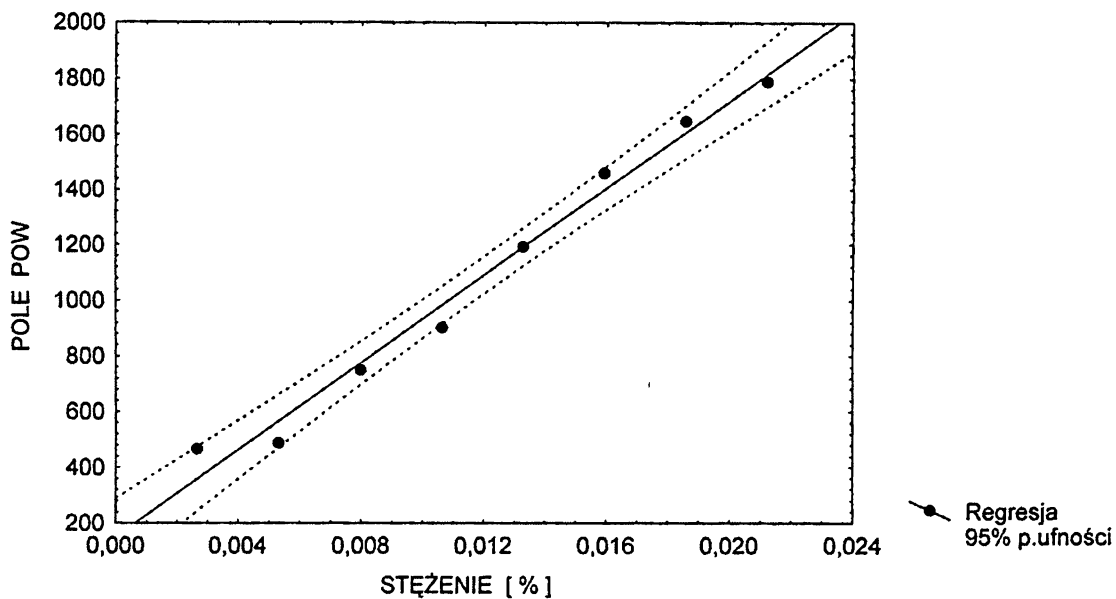
Rysunek 46. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów zanieczyszczenia A.



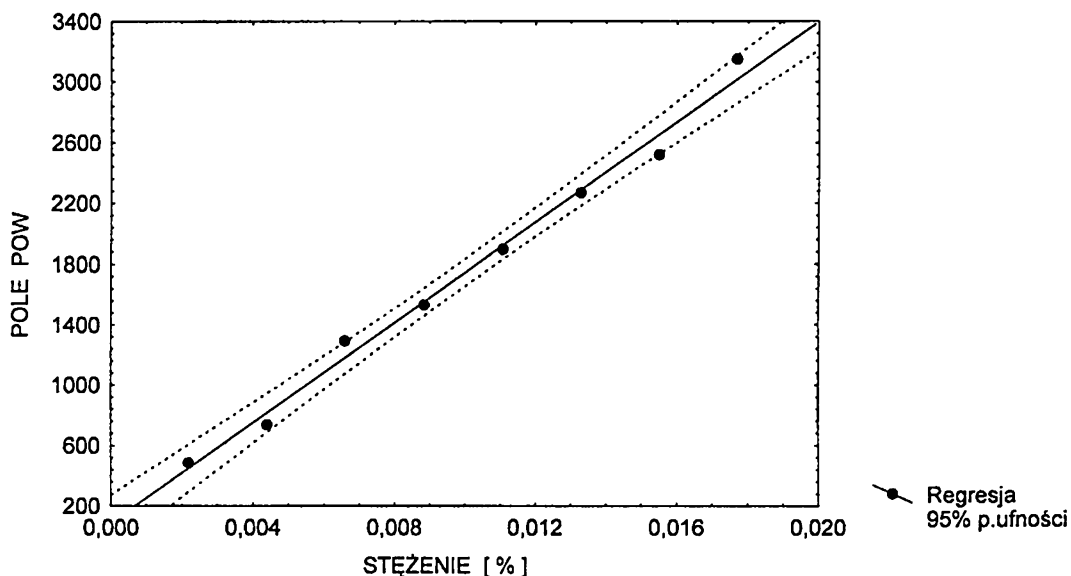
Rysunek 47. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów zanieczyszczenia B.



Rysunek 48. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów zanieczyszczenia C.



Rysunek 49. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów zanieczyszczenia cis-T.



Rysunek 50. Krzywa zależności powierzchni pików od stężenia dla roztworów tramadolu.

Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić warunki identyfikacji oraz sposób wykonania oznaczenia składników objętych planem badań.

3.5.5.2.1. Wykonanie badania

Na płytki nanoszono w postaci pasma o szerokości 1 cm, roztwory porównawcze w objętości 8 μl dla tramadolu, zan. A i zan. cis-T, po 6 μl dla zan. B i zan. C oraz roztwory preparatów w objętości 15 μl roztworu podstawowego do oznaczania zanieczyszczeń i po 8 μl dziesięciokrotnie rozcieńczonego roztworu podstawowego do oznaczania tramadolu. Chromatogramy rozwijano na drodze 13,0 cm stosując jako fazy ruchome mieszaniny: I. chloroform – metanol – kwas octowy lodowaty (9 : 2 : 0,1, v/v/v) do oznaczania tramadolu, zan. A, zan. B i zan. cis-T oraz II. chloroform – toluen – etanol (9 : 8 : 1, v/v/v) do oznaczania zan. C. Chromatogramy wysuszono w temperaturze

pokojujowej, a następnie poddano densytometrycznej rejestracji przy długości fali $\lambda = 270$ nm (Badania wstępne).

Wyniki zamieszczono w Tabeli 20, w której brak jest wyników oznaczeń zanieczyszczeń, gdyż w opracowanych warunkach wykonania badania nie stwierdzono ich obecności w przebadanych preparatach.

Tabela 20

Wyniki oznaczeń zawartości tramadolu w badanych lekach wraz z oceną statystyczną.

Preparat / deklarowana zawartość tramadolu	Oznaczona zawartość tramadolu [mg/tab., kaps. lub 1 ml]	Ocena statystyczna (n = 7)
1	2	3
Tramadol / 50 mg w kaps.	50.12 47.97 48.73 48.43 48.90 50.61 50.42	$\bar{x}_{sr} = 49.31$ $S = 1.0530$ $S_x = 0.3980$ $\mu = 49.31 \pm 0.97$ RSD = 2.14
Tramal / 50 mg w kaps.	49.91 47.98 50.72 51.88 47.56 49.24 49.45	$\bar{x}_{sr} = 49.53$ $S = 1.4976$ $S_x = 0.5660$ $\mu = 49.53 \pm 1.39$ RSD = 3.02
TopAlgic / 100 mg w tabl.	98.16 100.53 101.24 99.33 101.39 101.61 100.52	$\bar{x}_{sr} = 100.40$ $S = 1.2479$ $S_x = 0.4717$ $\mu = 100.40 \pm 1.15$ RSD = 1.24
TopAlgic s. 741A / 50 mg w kaps.	47.89 47.58 49.34 49.59 53.07 51.29 49.96	$\bar{x}_{sr} = 49.82$ $S = 1.9048$ $S_x = 0.7199$ $\mu = 49.82 \pm 1.76$ RSD = 3.82
TopAlgic s. 699B / 50 mg w kaps.	47.97 51.30 48.08 50.04 49.83 53.42 50.71	$\bar{x}_{sr} = 50.19$ $S = 1.8916$ $S_x = 0.7150$ $\mu = 50.19 \pm 1.75$ RSD = 3.77

cd. Tabeli 20

1	2	3
Tramadol / 100 mg w kroplach	102.62 101.38 98.58 98.46 105.13 100.12 98.11	$\bar{x}_{sr} = 100.63$ $S = 2.5915$ $S_x = 0.9795$ $\mu = 100.63 \pm 2.40$ $RSD = 2.58$
Tramadolor / 100 mg w kroplach	98.12 102.85 97.32 102.78 99.16 100.36 98.28	$\bar{x}_{sr} = 99.84$ $S = 2.2427$ $S_x = 0.8477$ $\mu = 99.84 \pm 2.07$ $RSD = 2.25$

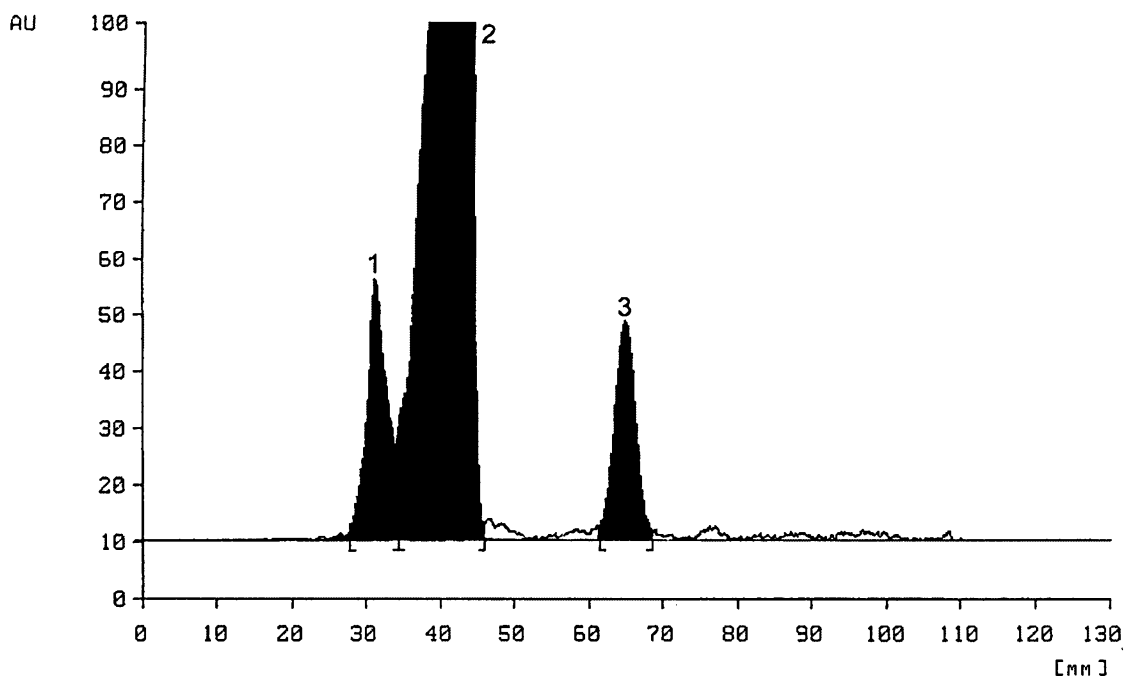
s. – numer serii; \bar{x}_{sr} – średnia arytmetyczna; S – odchylenie standardowe średniej arytmetycznej; S_x – odchylenie standardowe pojedynczego wyniku; μ – przedział ufności przy prawdopodobieństwie 95 %; RSD – współczynnik zmienności [%]

W dalszej części pracy zbadano wpływu pH środowiska, temperatury oraz czasu inkubacji na stabilność tramadolu w roztworach.

3.5.5.2.2. Badanie trwałości tramadolu w roztworach

Badania wpływu pH środowiska i czasu inkubacji na stabilność tramadolu w roztworach prowadzono dla odważek leków, odpowiadających ok. 20 mg tramadolu, w 10.0 ml kwasu solnego lub wodorotlenku sodu. Próbkę ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej w czasie, określonym planem badań (Tab. 21, 22, 23). Przygotowane jak wyżej roztwory próbek w 1 mol/l NaOH inkubowano w temperaturze 22°, 37° i 70° C (Tab. 24). Do oznaczeń chromatograficznych pobierane próbki analitu rozcieńczono metanolem w stosunku 1:1 (v/v). Badania przeprowadzono w warunkach metody przedstawionej wcześniej.

Na zarejestrowanych chromatogramach obserwowano dodatkowe piki, poza pikiem pochodzącym od tramadolu (Rys. 51).



Rysunek 51. Densytogram dla próbki badanej, otrzymany przy użyciu fazy ruchomej I (1 – zan. cis-T; 2 – tramadol; 3 – zan. B).

W celu identyfikacji zanieczyszczeń przeprowadzono badania pozwalające na określenie ich tożsamości. Dokonano określenia wartości współczynników retencji, rejestracji widm absorpcji oraz wykonano badanie ^1H NMR.

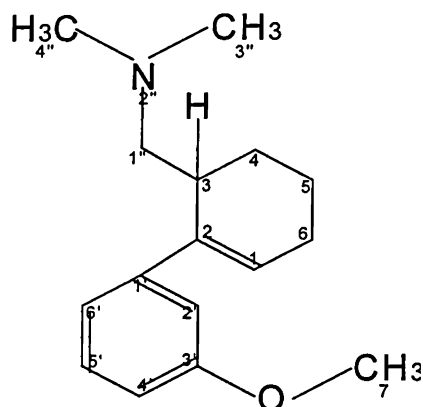
Stwierdzono, że współczynniki R_f dla poszczególnych plam wynoszą 0.24, 0.31 i 0.49. Można je przyporządkować odpowiednim składnikom badanym, którymi są: tramadol ($R_f \approx 0.34$), zan. B ($R_f \approx 0.50$) oraz zan. cis-T ($R_f \approx 0.29$).

Zarejestrowane widma absorpcji w UV mają podobny przebieg jak analogiczne dla substancji porównawczych, które opisują również charakterystyczne maksima absorpcji.

Dla potwierdzenia tożsamości występujących zanieczyszczeń wykonano widma magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR.

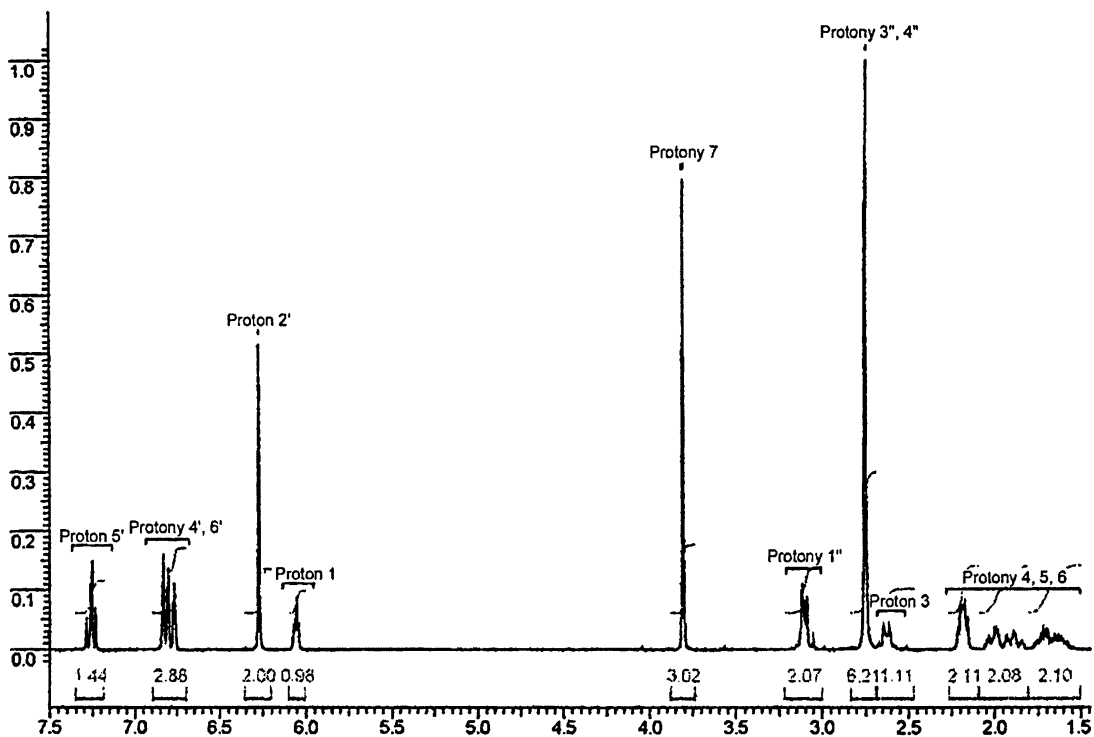
Równocześnie wykonano badanie ^1H NMR substancji wzorcowych zan. B i zan. cis-T.

Na zarejestrowanych widmach stwierdzono obecność charakterystycznych grup sygnałów pochodzących od protonów znajdujących się w cząsteczkach związków stanowiących przedmiot badania, to jest (1RS)-[2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-2-enylo]-N,N-dimetyloaminy (zan. B) (Rys. 52 i 53) oraz (1RS, 2RS)-2-[(dimetyloamino)metylo]-1-(3-metoksyfenylo)cykloheksanolu (zan. cis-T) (Rys. 54 i 55).

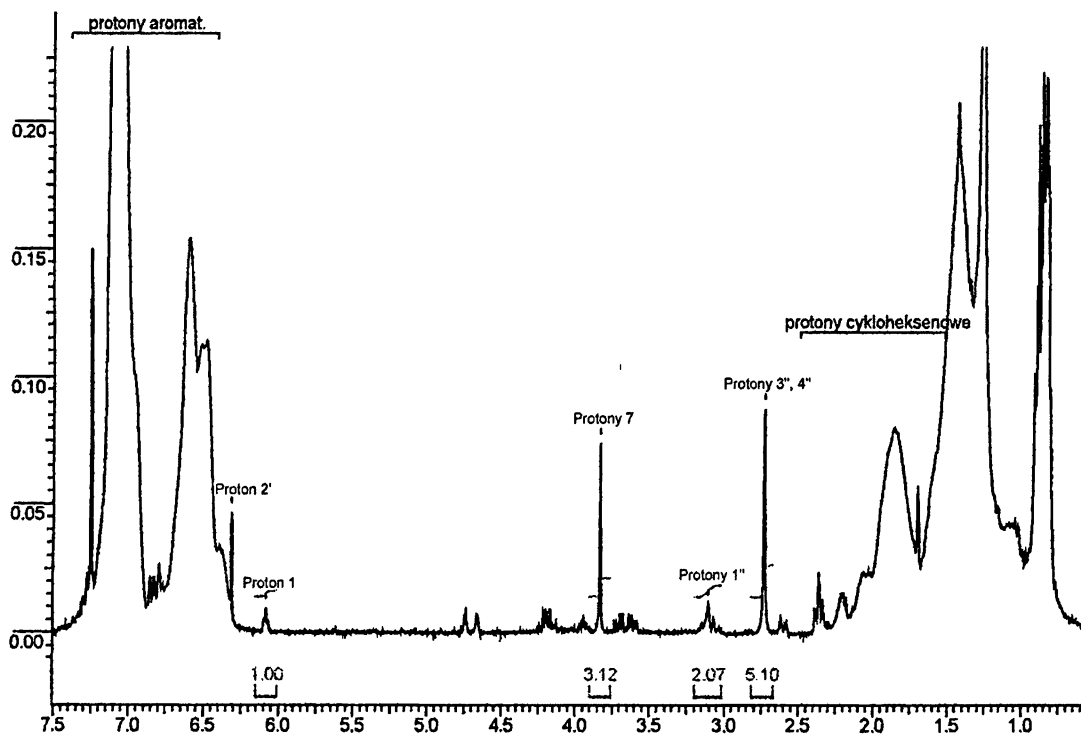


Analiza widma wzorca zanieczyszczenia B wykazała obecność następujących grup sygnałów:

- protony alifatyczne - δ 1.5-2.65 ppm – protony pierścienia cykloheksenyloвого w pozycjach 3, 4, 5, 6; δ 2.75 ppm – protony grupy N,N-dimetyloaminowej w pozycjach 3'' i 4''; δ 3.1 ppm – protony grupy metylenowej w pozycji 1''; δ 3.8 ppm – protony grupy metoksylowej w pozycji 7;
- proton winylowy - δ 6.1 ppm w pozycji 1;
- protony aromatyczne - δ 6.3 ppm – proton w pozycji 2', δ 6.75 ppm – protony w pozycjach 4' i 6', δ 7.25 ppm – proton w pozycji 5'.



Rysunek 52. Widmo ^1H NMR substancji wzorcowej zanieczyszczenia B.



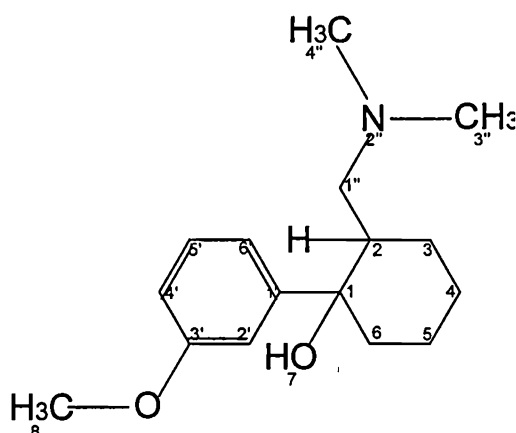
Rysunek 53. Widmo ^1H NMR próbki badanej.

W widmie próbki stwierdzono obecność sygnałów o przesunięciach chemicznych odpowiadających przesunięciom chemicznym wzorca. Są to:

- protony cykloheksenowe - δ 1.5-2.4 ppm; protony grupy $N(CH_3)_2$ - δ 2.44 ppm; protony grupy NCH_2 - δ 3.11 ppm; protony grupy OCH_3 - δ 3.84 ppm;
- proton winylowy - δ 6.1 ppm;
- protony aromatyczne - δ 6.31-7.30 ppm.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że widma próbki i wzorca pokrywają się, co wskazuje na obecność w badanej próbce zanieczyszczenia B.

Zachowując podany wyżej tok postępowania wykonano badania widma 1H NMR dla zanieczyszczenia cis-T.

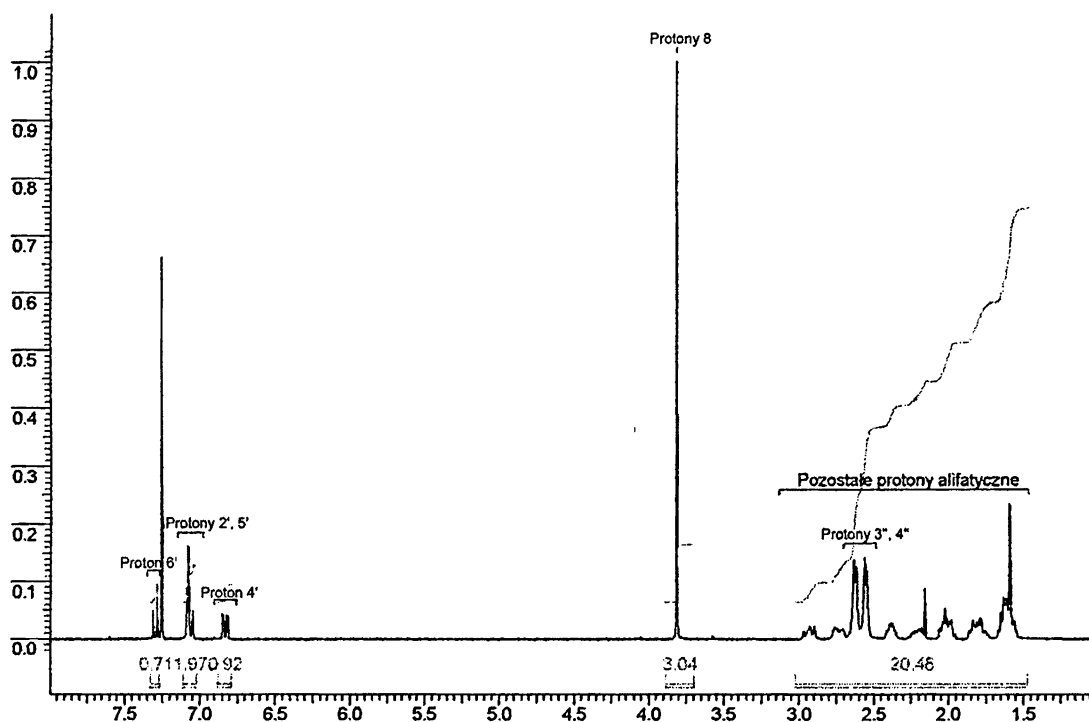


Analiza widma wzorca zanieczyszczenia cis-T wykazała obecność następujących grup sygnałów:

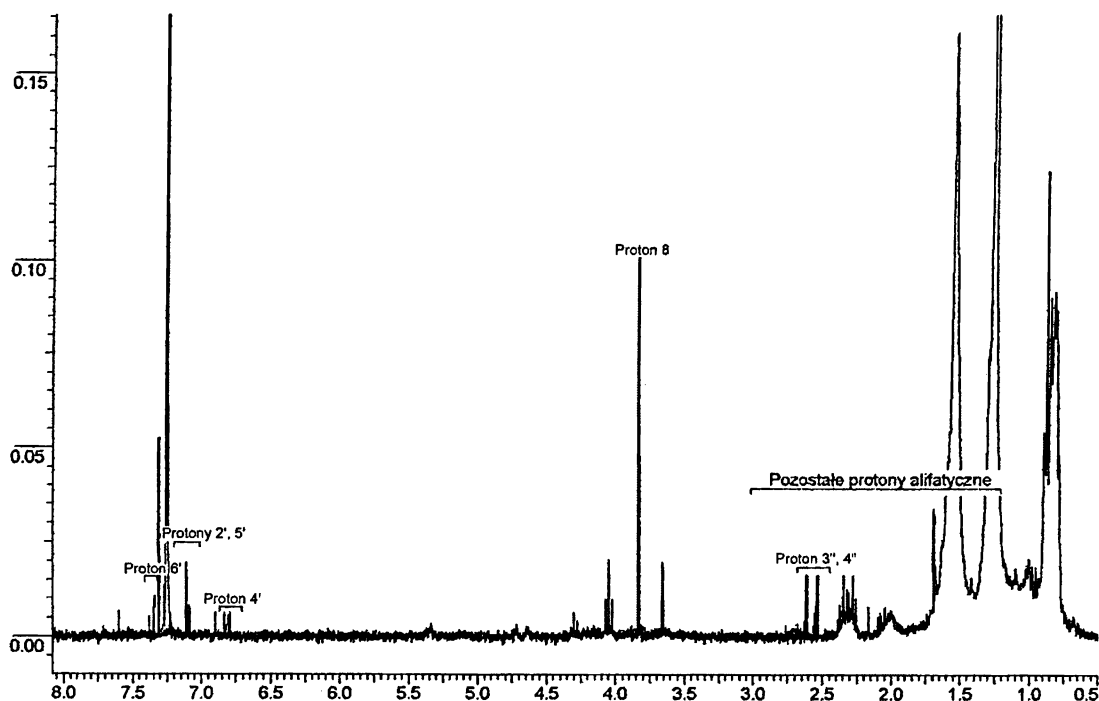
- dublet σ 2.5-2.65 ppm – sygnały protonów grupy $N(CH_3)_2$ w pozycjach 3'' i 4'' ;
- singlet σ 3.8 ppm – sygnał protonów grupy metoksylovej w pozycji 8, 9);

- multiplet σ 6.8 ppm – sygnał protonu fenyłowego leżącego w pozycji para do podstawnika cykloheksylowego w pozycji 4’;
- multiplet σ 7.1 ppm – nałożony sygnał protonów fenyłowych w pozycjach 2’ i 5’;
- dublet σ 7.3 ppm – sygnał protonu fenyłowego w pozycji para do grupy OCH_3 w pozycji 6’.

W widmie próbki także potwierdzono obecność grup sygnałów pochodzących odpowiednio od protonów grup alifatycznych i aromatycznych w pozycjach 2’, 4’, 5’, 6’ i 8. Pozostałe sygnały, występujące na zarejestrowanych widmach pochodzą od tła, tj. pozostałości rozpuszczalników oraz substancji wyluowanych z płytek chromatograficznych.



Rysunek 54. Widmo ^1H NMR substancji wzorcowej zanieczyszczenia cis-T.



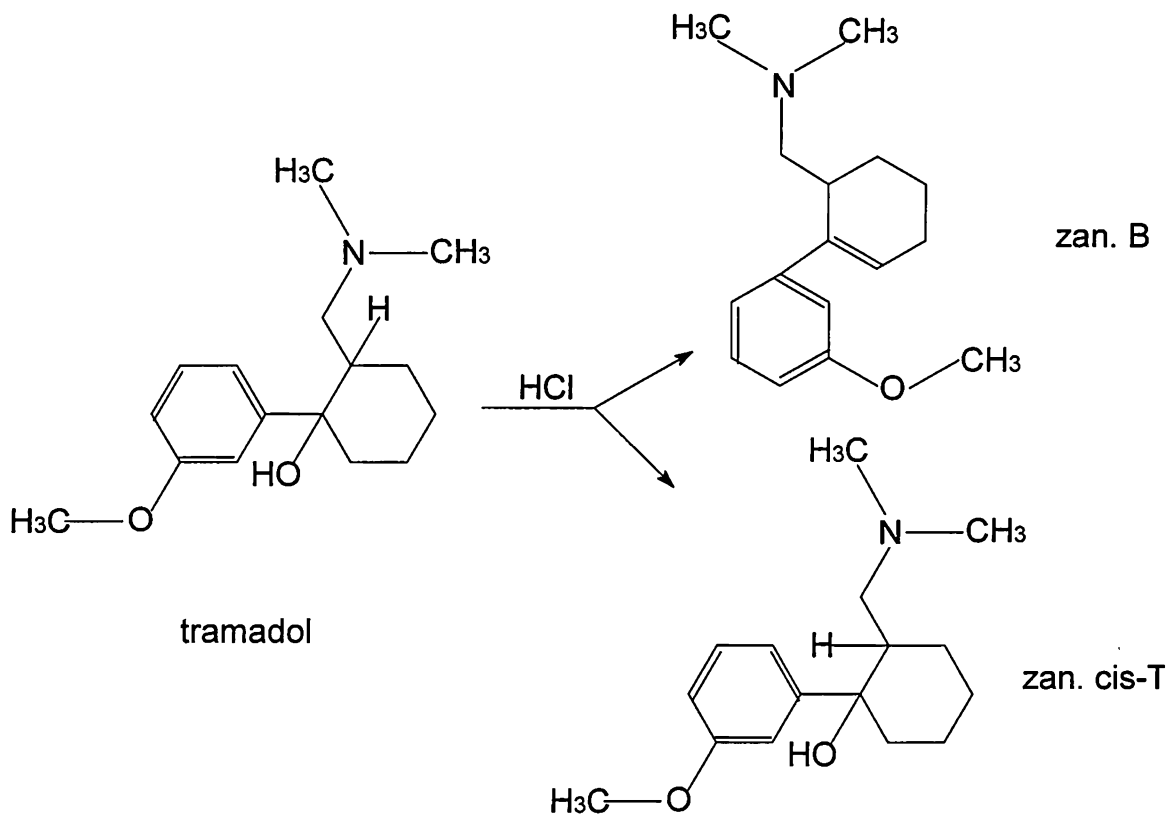
Rysunek 55. Widmo ^1H NMR próbki badanej zawierającej zanieczyszczenie cis-T.

W związku z dość skomplikowaną strukturą chemiczną analizowanego związku nie można w sposób jednoznaczny, tylko na bazie widma 1D przypisać wszystkich sygnałów z widma do odpowiednich grup protonów bez pomocy bardziej zaawansowanych technik.

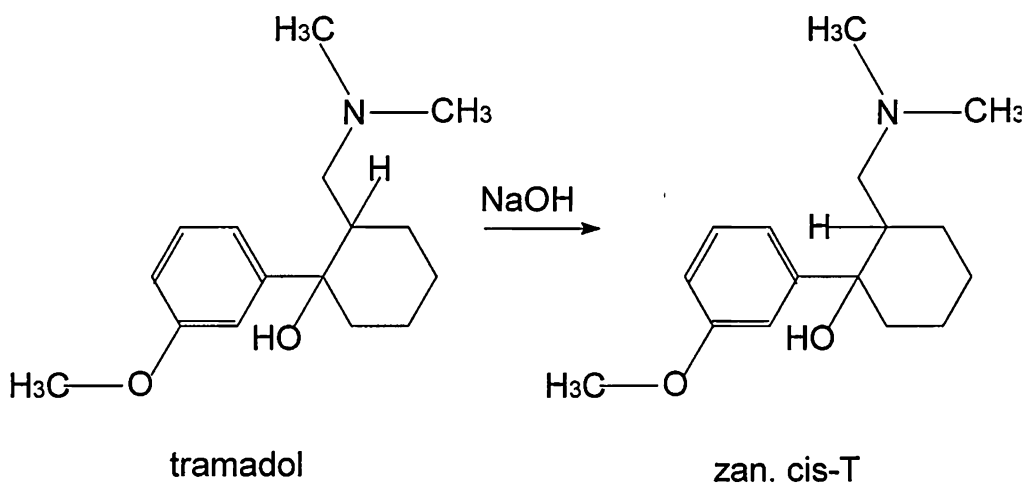
Ilościowe oznaczenia składników powstających w trakcie rozkładu tramadolu przeprowadzono w warunkach ustalonych doświadczalnie.

Wyniki badań pozwalają określić kierunek przemian, który podano na schemacie poniżej:

a) środowisko kwaśne:



b) środowisko alkaliczne:



Badania prowadzono w roztworach kwasu solnego i wodorotlenku sodu, dla leków objętych planem badań (Tab. 21) oraz w roztworach HCl i NaOH o różnych stężeniach, od 1 mol/l do 10^{-4} mol/l (Tab. 22). Zbadano także wpływ temperatury i czasu inkubacji na rozkład tramadolu w roztworze 1 mol/l HCl (Tab. 23, 24). Do określenia stężenia poszczególnych składników posłużono się metodą normalizacji wewnętrznej.

Tabela 21

Wyniki oznaczeń zawartości tramadolu oraz powstających zanieczyszczeń w preparatach, po ogrzewaniu 1 h w 1 mol/l HCl i NaOH.

Preparat	1 mol/l HCl			1 mol/l NaOH		
	z.B	z.cis-T	T	z.B	z.cis-T	T
Tramadol kaps.	22.17	12.35	65.48	—	11.19	88.81
Tramal kaps.	12.73	11.55	75.72	—	33.74	66.26
TopAlgic tab.	13.81	19.79	66.40	—	56.60	43.40
TopAlgic kaps.	14.06	15.09	70.85	—	9.88	90.12
Tramadol krople	12.63	31.30	56.07	—	38.59	61.41
Tramadolor krople	12.50	17.16	70.34	—	39.64	60.36

z.B – zawartość zanieczyszczenia B [%]; z.cis-T – zawartość zanieczyszczenia cis-T [%]; T – zawartość tramadolu [%]

Tabela 22

Wyniki oznaczeń zawartości tramadolu oraz powstających zanieczyszczeń w preparacie TopAlgic (s.699B) po ogrzewaniu 1 h w roztworach HCl i NaOH o różnych stężeniach.

Środowisko reakcji	Zawartość [%]		
	z. B	z. cis-T	T
1 mol/l HCl	15.50	11.82	72.68
0.5 mol/l HCl	7.62	3.67	88.71
0.2 mol/l HCl	—	—	100.0
0.01 mol/l HCl	—	—	100.0
0.01 mol/l NaOH	—	—	100.0
0.2 mol/l NaOH	—	—	100.0
0.5 mol/l NaOH	—	2.68	97.32
1 mol/l NaOH	—	10.21	89.79

Tabela 23

Wyniki oznaczeń zawartości tramadolu oraz powstających zanieczyszczeń w preparacie TopAlgic (s.699B), po ogrzaniu w roztworze 1 mol/l HCl i NaOH w różnym czasie.

Czas ogrzewania [min]	1 mol/l HCl			1 mol/l NaOH	
	z. B	z. cis-T	T	z. cis-T	T
0'	—	—	100.0	—	100.0
15'	8.56	2.64	88.80	5.24	94.76
30'	9.07	4.77	86.16	5.52	94.48
45'	9.99	7.97	82.04	6.42	93.58
60'	12.01	10.87	77.12	9.50	90.50
75'	13.30	10.49	76.21	15.17	84.83

cd. Tabeli 23

90'	15.54	11.44	73.02	14.86	85.14
120'	22.51	6.15	71.34	13.39	86.61
240'	26.84	3.37	69.79	2.49	97.51
360'	40.52	0.79	58.69	2.70	97.30

z. B – zawartość zanieczyszczenia B [%]; z. cis-T – zawartość zanieczyszczenia cis-T [%]; T – zawartość tramadolu [%]

Tabela 24

Wyniki oznaczeń zawartości tramadolu oraz powstających zanieczyszczeń w preparacie TopAlgie (s.699B) po ogrzewaniu w roztworach 1 mol/l HCl w temperaturze 22°, 37° i 70° C.

Temperatura	Czas ogrzewania [h]	Zawartość [%]		
		z. B	z. cis-T	T
22°	5	—	—	100.00
	22	—	—	100.00
	46	—	—	100.00
	94	—	2.36	97.64
37°	1	—	—	100.00
	5	—	—	100.00
	22	—	2.34	97.95
	48	—	5.77	94.23
70°	1	—	—	100.00
	3	2.00	11.66	86.34
	5	4.38	12.37	83.25
	7	8.47	12.80	78.73

z. B – zanieczyszczenie B; z. cis-T – zanieczyszczenie cis-T; T – tramadol

Uzyskane wyniki badań pozwalają na stwierdzenie, że w roztworach kwasu solnego powstają dwa dodatkowe produkty obok substancji czynnej, które zidentyfikowano jako zan. B i zan. cis-T, w przeciwieństwie do roztworu wodorotlenku sodu, o podobnym stężeniu, gdzie występuje tylko zan. cis-T.

Czas inkubacji posiada wpływ na stężenie poszczególnych zanieczyszczeń. Stężenie zanieczyszczenia B zwiększało się w miarę wzrostu czasu inkubacji oraz temperatury. Natomiast, w przypadku zanieczyszczenia cis-T obserwowano zmiany w początkowym okresie ogrzewania, w którym stężenie zan. cis-T zwiększyło się, a następnie ulegało zmniejszeniu. Wydaje się, że to zachowanie można przypisać izomerycznej postaci tego zanieczyszczenia.

W środowisku alkalicznym zanieczyszczenie cis-T zachowuje się podobnie. Zarówno czas inkubacji, jak również stężenie NaOH mają wpływ na poziom tego zanieczyszczenia.

4. Dyskusja wyników badań

Szybko postępujący rozwój w zakresie wytwarzania leków oraz wymagania dotyczące ich czystości stwarzają możliwości poszukiwania nowych rozwiązań w dziedzinie analitycznych metod kontroli jakości substancji farmaceutycznych oraz gotowych preparatów.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej opracowano metodę chromatograficzno – densytometryczną do identyfikacji i oznaczania ilościowego czterech wybranych substancji czynnych oraz zanieczyszczeń występujących w różnych lekach o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym z różnych grup chemicznych, szeroko stosowanych w lecznictwie [151]. Leki te występują w różnych postaciach, jak tabletki, kapsułki, iniekcje oraz krople. Badania dotyczyły preparatów indometacyny, diklofenaku, naproksenu i tramadolu. Ogółem przebadano 26 preparatów, w których występowały podane powyżej składniki.

W ustalonych warunkach wykonano oznaczenia jakościowe i ilościowe poszczególnych zanieczyszczeń i substancji czynnych po wyizolowaniu z postaci leków. W drugim etapie zbadano wpływ pH środowiska, temperatury i czasu inkubacji na trwałość wybranych leków. Tożsamości powstających produktów określono wykorzystując parametry jakościowe opracowanej metody oraz widma ^1H NMR. Przeprowadzone badania pozwoliły na dokonanie identyfikacji i określenia przypuszczalnych struktur powstających składników oraz kierunku zachodzących przemian.

Do oceny leków zawierających w składzie diklofenak opracowano warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego zarówno substancji czynnej oraz objętych badaniami zanieczyszczeń, którymi są: 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinon-2 (zanieczyszczenie A) oraz indolinon-2 (zanieczyszczenie E). Do identyfikacji posłużono się wartościami współczynników retencji oraz widmami absorpcji dla poszczególnych składników, które rejestrowano bezpośrednio z chromatogramów. Badania przeprowadzono na przykładzie ośmiu dostępnych preparatów. To, że w badaniach ograniczono się do dwóch zanieczyszczeń spośród pięciu opisanych w monografii farmakopealnej [3] dla substancji diklofenaku było związane z ich trudną dostępnością oraz z zebranymi informacjami literaturowymi [3, 4], które ograniczają ocenę czystości do określenia poziomu zanieczyszczenia A.

Prezentowaną w pracy metodę chromatograficzno – densytometryczną cechuje wysoka czułość, o czym świadczy niski limit wykrywalności: 0.13 ng dla diklofenaku oraz 0.20 ng i 0.05 ng dla zanieczyszczeń A i E. Rozdział poszczególnych składników w warunkach opisanych w pracy, przy użyciu fazy ruchomej o składzie: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v) jest dobry, co można ocenić na podstawie współczynników retencji, o wartościach: $R_f \approx 0.32$ dla diklofenaku oraz $R_f \approx 0.67$ i $R_f \approx 0.21$ dla zanieczyszczeń A i E. Ponadto prezentowaną metodę cechuje powtarzalność i precyzja oznaczeń oraz wysoki odzysk, w granicach od 92.34 % do 99.20 %.

W przebadanych lekach przechowywanych w warunkach, zgodnych z wymaganiami określonymi przez producentów, nie stwierdzono obecności zanieczyszczeń na poziomie wykrywalności opracowanej metody. Powstaje zatem pytanie, czy leki zawierające w składzie diklofenak są faktycznie wolne od zanieczyszczeń, czy też opracowana

metoda nie spełnia przyjętych w pracy założeń. W tym celu przeprowadzono dodatkowe porównawcze badania w warunkach farmakopealnych posługując się metodą HPLC. Wyniki tych badań okazały się zgodne z wynikami otrzymanymi metodą chromatograficzno - densytometryczną, co jest potwierdzeniem wiarygodności opracowanej metody i pozwala ją uznać jako alternatywną do HPLC i przydatną w ocenie czystości leków.

Obok wykazanej przydatności metody do oznaczania zanieczyszczeń w badanych lekach, opracowaną metodę można wykorzystać do oznaczania zawartości substancji czynnej obok zanieczyszczeń, co potwierdzono wynikami przedstawionymi w Tabeli 3.

Dalszy etap badań stanowiła ocena wpływu warunków środowiska na stabilność wybranych leków w roztworach o różnym pH z uwzględnieniem temperatury i czasu inkubacji. Wykazano, że w środowisku kwaśnym diklofenak ulega rozkładowi dając nowy produkt, który pojawia się na chromatogramie obok plamy pochodzącej od diklofenaku. Na otrzymanych chromatogramach w trakcie rozdzielania analitu występowały jeszcze dwie plamy, spośród których jedna pochodziła od fazy ruchomej, natomiast drugą określono jako produkt pośredni, powstający w trakcie rozpuszczania diklofenaku w kwasie solnym i metanolu. Produkt ten występował w zmiennych stężeniach, w zależności od pH, temperatury i stężenia kwasu. Wydaje się, że składnik ten może pochodzić od diklofenaku, w wyniku estryfikacji grupy karboksylowej, w warunkach wykonania oznaczenia. Za taką hipotezę przemawia fakt, że produkt ten w warunkach, w których poddano badaniom diklofenak zachowywał się podobnie, ulegając cyklizacji do zanieczyszczenia A. Próby jego identyfikacji nie przyniosły oczekiwanych rezultatów,

z powodu małego i zmiennego jego stężenia oraz interferencji z pikiem pochodzącym od fazy ruchomej.

W prowadzonych badaniach stwierdzono również, że stężenie jonów wodorowych, temperatura oraz czas sprzyjają procesowi rozkładu diklofenaku oraz produktu pośredniego, prowadząc do powstania zanieczyszczenia A. (Tab. 4, 5, 6). Wykorzystując wartość współczynnika retencji (R_f), widma absorpcji oraz badania przy użyciu ^1H NMR, potwierdzono obecność zanieczyszczenia A. Związek, o którym mowa powstaje w wyniku cyklizacji połączonej z eliminacją cząsteczki wody, prowadzącej do powstania w strukturze diklofenaku nowego pięcioczłonowego układu, który zidentyfikowano jako 1-(2,6-dichlorofenylo)indolinon-2.

Analizując poszczególne wyniki zamieszczone w tabelach 4 – 6 można również wnioskować, że diklofenak pochodzący z tabletek Majamilu wydaje się być bardziej podatny na rozkład, w porównaniu do preparatów Olfen – iniekcje oraz Dicloratio Retard – kapsułki. Rozkład diklofenaku pochodzącego z tabletek Majamilu następował na etapie jego rozpuszczania w kwasie solnym i przebiegał znacznie szybciej, w odniesieniu do pozostałych preparatów. Wydaje się, że to spostrzeżenie może być istotnym przy opracowaniu technologii wytwarzania postaci leku, która może mieć wpływ na stabilność diklofenaku.

Oznaczenia ilościowe prowadzono metodą wcześniej opracowaną, potwierdzając jej przydatność do analizy zarówno diklofenaku, jak również zanieczyszczeń.

Wyniki przeprowadzonych badań mają podwójną wartość, pozwalają bowiem z jednej strony potwierdzić fakt, że ocena farmakopealna czystości diklofenaku jest prowadzona we właściwym kierunku, przez oznaczanie zanieczyszczenia 1-(2,6-dichlorofenylo)-indolinonem-2 (zan. A)

oraz, z drugiej strony, że opracowana metoda może być alternatywną w stosunku do powszechnie stosowanej metody HPLC.

Obserwowane przemiany diklofenaku w środowisku kwaśnym wydają się również mieć istotne znaczenie dla terapii, gdyż bezpośredni kontakt leków zawierających diklofenak w kwaśnym środowisku żołądka może prowadzić do niepożądanych przemian. Tym samym może mieć wpływ na aktywność farmakologiczną oraz toksyczność leku.

Ocenę czystości tabletek i iniekcji z indometacyną wykonano na przykładzie pięciu dostępnych preparatów. W analizie jakościowej indometacyny oraz jej zanieczyszczeń posłużono się doświadczalnie wybraną fazą ruchomą o składzie: izopropanol – amoniak 25 % - woda (8 : 1 : 1, v/v/v), która pozwala na dokonanie rozdziału poszczególnych składników oraz ich densytometryczne oznaczenie w zakresie UV przy $\lambda = 230 \text{ nm}$ i $\lambda = 284 \text{ nm}$.

W opracowanych warunkach uzyskano dobry rozdział indometacyny obok zanieczyszczeń, dla których poszczególne wartości współczynników retencji są różne i wynoszą odpowiednio: $R_f \approx 0.71$ dla indometacyny, $R_f \approx 0.65$ dla kwasu 4-chlorobenzoowego oraz $R_f \approx 0.57$ dla kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego. Stwierdzono, że objęte planem badań substancje posiadają różne widma absorpcji, które pozwalają na ich identyfikację bezpośrednio na chromatogramach.

W ocenie ilościowej wykazano dużą dokładność metody oraz jej powtarzalność i wysoką czułość na poziomie 20 ng dla indometacyny i kwasu 4-chlorobenzoowego oraz 100 ng dla kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indolooctowego. Metodę cechuje także precyzja oznaczeń oraz wysoki odzysk, w granicach od 90.09 % do 100.69 %,

co potwierdzono wynikami walidacji oraz oznaczeń zawartości składników w preparatach farmaceutycznych.

Stwierdzono, że występujące w preparatach z indometacyną zanieczyszczenia dotyczą leków przeterminowanych, co pozwala przypuszczać, że substancje te pochodzą z rozkładu leku w czasie przechowywania. W lekach nieprzeterminowanych opisane zanieczyszczenia nie występują. Postanowiono zatem prześledzić zachowanie indometacyny w roztworach kwasu solnego i wodorotlenku sodu, w celu sprawdzenia przydatności opracowanej metody do oznaczeń jakościowych i ilościowych.

Wyniki tych badań (Tab. 9, 10, 11) są na ogół zgodne, środowisko wodne oraz roztwory kwasów i zasad sprzyjają procesowi rozkładu indometacyny, której zawartość zmienia się wraz ze stężeniem roztworu kwasu solnego i NaOH oraz czasu ogrzewania. W środowisku HCl rozkład indometacyny w czasie ogrzewania następował wolniej niż w roztworach NaOH i miał charakter etapowy. W pierwszej chwili pojawiał się kwas 4-chlorobenzoowy i dopiero po dłuższym czasie ogrzewania stwierdzono obecność kwasu 5-metoksy-2-metylo-3-indoloctowego. Fakt, że w identycznych warunkach indometacyna zachowuje stabilność przez dłuższy okres czasu w tabletkach rozpuszczonych w roztworze kwasu solnego można, na obecnym etapie badań wytłumaczyć wpływem składników matrycy. Wydaje się to słuszne, jeżeli uwzględnimy wyniki badań zamieszczone w Tabeli 8, dotyczące oceny bezpośredniej tabletek, w których nie stwierdzono obecności zanieczyszczeń, co pozwala przypisać większą stabilność lekom występującym w postaci tabletek.

W sprawdzonych monografiach farmakopealnych dotyczących naproksenu nie znaleziono danych odnośnie obecności ewentualnych

zanieczyszczeń, które mogą towarzyszyć preparatom zawierającym naproksen. Nie wykazano również w trakcie prowadzonych badań obecności dodatkowych plam na chromatogramach, które mogłyby wskazywać na obecność zanieczyszczeń w przebadanych lekach zawierających naproksen. Dlatego też, w pierwszym etapie badań ograniczono się do opracowania metody oznaczania substancji czynnej. W tym celu dokonano doboru odpowiednich warunków rozdziału oraz sposobu rejestracji plam na chromatogramach. Analizie poddano sześć dostępnych preparatów. Doświadczalnie wybrana faza ruchoma o składzie: cykloheksan – chloroform – metanol (12 : 6 : 1, v/v/v) pozwala na jakościową i ilościową analizę naproksenu. Prezentowaną metodę cechuje dobra powtarzalność i precyzja oznaczeń, wysoka czułość (na poziomie 30 ng) oraz zadowalający odzysk (95.39 %). Wyniki badań potwierdzono danymi oznaczania zawartości składników w preparatach farmaceutycznych, które zestawiono w Tabeli 13.

Ponieważ w przebadanych lekach nie stwierdzono obecności dodatkowych zanieczyszczeń, przeprowadzono badania trwałości naproksenu w roztworach kwasu solnego z uwzględnieniem wpływu stężeń, temperatury oraz czasu inkubacji. Badania ograniczono do roztworów kwasów, ponieważ w środowisku alkalicznym, jak już wcześniej wspomniano, nie obserwowano żadnych zmian.

W wyniku tych badań stwierdzono na chromatogramach obecność dodatkowej plamy o współczynniku retencji różnym niż naproksen (dla naproksenu $R_f \approx 0.22$; dla substancji X $R_f \approx 0.85$) oraz o podobnym widmie jak substancja macierzysta. Pozwoliło to przypuszczać, że w powstającej substancji zasadnicza struktura naproksenu zostaje zachowana. W prowadzonych badaniach obserwowano jedynie wpływ stężenia kwasu oraz czasu inkubacji na stężenie tego składnika,

co potwierdzono przez określenie malejącego stężenia naproksenu oraz wzrostu stężenia składnika X, który powstawał w środowisku HCl (Tabele 14 – 17).

Wyniki badań wskazują na zależność zachodzących przemian od stężenia kwasu, czasu ogrzewania i temperatury. Zmiany stężeń naproksenu oraz składnika X posiadają liniowy przebieg w pewnych wąskich zakresach, zwłaszcza w odniesieniu do temperatury oraz czasu inkubacji próbek. Wydaje się, że tak jak wcześniej zwrócono uwagę na odwracalność zachodzącego procesu można jeszcze mówić o zależności od temperatury. Podwyższona temperatura (70° C) sprzyja powstawaniu składnika X w pierwszym etapie ogrzewania prób (do 24 h), a po dłuższym czasie ogrzewania (48 h i 72 h) jego rozkład. W niższej temperaturze proces rozkładu tej substancji zachodzi wolniej.

Przeprowadzone badania ¹H NMR pozwoliły ustalić przypuszczalną strukturę powstającej substancji X. Okazała się nią metylowa pochodna naproksenu, występująca jako ester metylowy kwasu 2-(6-metoksynaft-2-yl)propionowego. Powstał zatem problem do wyjaśnienia pochodzenia stwierdzonej substancji, która w warunkach wykonania doświadczenia może pojawić się w roztworach badanych i może mieć wpływ na ocenę jakości leków z naproksenem. Wydaje się, że zidentyfikowany produkt można uznać jako zanieczyszczenie, które powstaje w procesie estryfikacji naproksenu w roztworze, w warunkach wykonania oznaczenia. Jest to problem, którego nie można pominąć, gdyż pokazuje nam, jak dobór metody oraz czynności związane z obróbką próbki mogą mieć wpływ na wyniki badań i tym samym na ocenę czystości leku. Przeprowadzone badania wydają się również posiadać wartość stanowiącą potwierdzenie wymagań ujętych w monografiach farmakopealnych,

które nie precyzują rodzaju występujących zanieczyszczeń przez podanie ich nazw, bądź wzorów chemicznych.

Opracowaną zatem metodę chromatograficzno – densytometryczną można wykorzystać do oznaczania zarówno substancji czynnej, jak również jej estru metylowego, obok siebie.

Dla leków zawierających w składzie tramadol opracowano nowe warunki identyfikacji i oznaczania ilościowego zarówno substancji czynnej, jak i ewentualnych zanieczyszczeń, którymi są: [2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-1-enylo]-N,N-dimetylometanamina (zan. **A**), (1RS)-[2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-2-enylo]-N,N-dimetylometanamina (zan. **B**), (2RS)-2-[(dimetylo-amino)metylo]cykloheksanon (zan. **C**), (1RS, 2RS)-2-[(dimetylo-amino)metylo]-1-(3-etoksyfenylo)cykloheksanol (zan. **cis-T**). Dokonano oceny siedmiu dostępnych preparatów.

Przy zastosowaniu fazy ruchomej I o składzie: chloroform – metanol – kwas octowy lodowaty (9 : 2 : 0.1, v/v/v) rozdzielono wszystkie składniki uzyskując wartości współczynników retencji, które pozwalają na dokonanie ich identyfikacji (dla tramadolu $R_f \approx 0.34$; dla zan. **A** $R_f \approx 0.61$; dla zan. **B** $R_f \approx 0.50$; dla zan. **cis-T** $R_f \approx 0.29$). W podanych warunkach uzyskano korzystne wyniki dla potrzeb analizy jakościowej. W przypadku oznaczeń ilościowych może zaistnieć problem przy oznaczaniu zanieczyszczenia **C** ($R_f \approx 0.91$), które na chromatogramie poruszało się z szybkością fazy ruchomej, co stwarzało trudność uzyskania dokładnych i powtarzalnych wyników, ze względu na interferencje z czołem fazy ruchomej. Dlatego w dalszych badaniach znaleziono nowe rozwiązanie, przy użyciu fazy ruchomej II o składzie: chloroform – toluen – etanol (9 : 8 : 1, v/v/v). Wprawdzie tutaj nie uzyskano dobrego rozdziału

dla tramadolu i zanieczyszczeń A, B i cis-T ($R_f \approx 0.10 - 0.15$), co można uzyskać w warunkach jak opisano wyżej, jednak zanieczyszczenie C ($R_f \approx 0.58$) przy użyciu tej fazy ruchomej rozdzieliło się od pozostałych składników.

Wyniki oznaczeń uzyskane przy walidacji opracowanej metody są zadowalające. Wykazano wystarczającą dokładność metody, jej powtarzalność i wysoką czułość, w granicach od 44 ng do 350 ng oraz zadowalający odzysk, na poziomie od 93.25 % do 99.66 %.

W przebadanych lekach będących w terminie ważności podanym przez producentów nie odnotowano obecności zanieczyszczeń. Na chromatogramach stwierdzono tylko plamę substancji czynnej, dla której wykonano oznaczenia jej zawartości w tych lekach. Wyniki badań zebrane w Tabeli 20 cechuje dokładność i precyzja oznaczeń, podobnie jak w badaniach z lekami opisanymi wcześniej.

W dalszej części pracy zbadano wpływ odczynu środowiska, temperatury i czasu inkubacji na stabilność tramadolu w roztworach. Wyniki tych badań wykazały obecność dodatkowych składników (Tabela 21 – 24). W opracowanych warunkach wykonania oznaczenia tramadolu oraz poszczególnych zanieczyszczeń dokonano ich identyfikacji przez porównanie wartości współczynników retencji (R_f) oraz na podstawie zarejestrowanych widm absorpcji z analogicznymi danymi uzyskanymi dla substancji porównawczych. Wyniki tych badań pozwoliły na określenie tożsamości dla następujących zanieczyszczeń: (1RS)-[2-(3-metoksyfenylo)cykloheks-2-enylo]-N,N-dimetylometanaminy (zan. B) oraz (1RS, 2RS)-2-[(dimetylo-amino)metylo]-1-(3-etoksyfenylo)cykloheksanolu (zan. cis-T) powstających w środowisku kwaśnym oraz zanieczyszczenia cis-T, w środowisku alkalicznym. Dla potwierdzenia identyfikacji posłużono się także badaniami widm

^1H NMR, które potwierdziły opracowany sposób identyfikacji składników w warunkach omawianej metody.

Poza stwierdzoną obecnością zanieczyszczenia B i cis-T w środowisku kwaśnym oraz zanieczyszczenia cis-T w środowisku alkalicznym na chromatogramach roztworów badanych nie występowały dodatkowe plamy mogące świadczyć o obecności innych produktów rozkładu.

W większości przebadanych leków stężenie zanieczyszczenia cis-T jest większe w roztworach alkalicznych niż kwaśnych, z wyjątkiem dwóch preparatów: Tramadol kaps. i TopAlgic kaps. (s. 699B). Stwierdzono również, że stężenie zan. B oraz zan. cis-T w środowisku kwaśnym jest zależne od stężenia kwasu i maleje, w miarę jego zmniejszania. W przebadanych lekach stężenie zan. B jest podobne, z wyjątkiem preparatu Tramadol kaps., w którym stwierdzono prawie dwukrotnie wyższy jego poziom niż w pozostałych lekach, w przeciwieństwie do zan. cis-T, którego poziom w środowisku alkalicznym waha się od 9.88 % do 56.60 % w przebadanych preparatach (Tab. 21 i 22). Na stężenie powstających zanieczyszczeń ma także wpływ czas inkubacji oraz temperatura.

Poczynione spostrzeżenia wydają się być istotne z punktu widzenia terapii, jeżeli uwzględnimy fakt, że leki te przy podaniu doustnym mogą być narażone na oddziaływanie pH środowiska kwaśnego oraz alkalicznego, i mogą ulegać w ustroju niepożądanym zmianom.

Podsumowując uzyskane wyniki badań można stwierdzić, że opracowana metoda chromatograficzno – densytometryczna pozwala na jednoczesne wykonanie badania tożsamości, czystości i zawartości ewentualnych zanieczyszczeń, jak i substancji czynnych. Poszczególne składniki można zidentyfikować na podstawie wartości współczynników

retencji R_f oraz widm absorpcji, rejestrowanych bezpośrednio z chromatogramów. Wydaje się, że wprowadzenie do identyfikacji rejestracji widm absorpcji może mieć istotne znaczenie, gdyż jak wykazano, poszczególne składniki mają różne widma, wykazujące maksima i minima absorpcji przy różnych zakresach długości fali. Problem detekcji densytometrycznej należy również szczególnie podkreślić w aspekcie farmakopealnej oceny czystości leku, gdzie stosuje się sposób wzrokowy, który nie zawsze jest obiektywny, a ponadto wymaga użycia do badań większych stężeń składników oznaczanych. Chemiczna struktura badanych zanieczyszczeń została dodatkowo potwierdzona badaniami ^1H NMR, które potwierdziły wysoką jakość parametrów opracowanej metody oraz pozwoliły ustalić kierunek zachodzących przemian prowadzących do rozkładu leku.

Prezentowana metoda jest stosunkowo szybka. W tym samym czasie i z tej samej płytki można dokonać zarówno identyfikacji, oznaczania składników, jak i oceny czystości preparatów. Cechuje ją łatwy sposób wykonania analizy, który nie wymaga specjalnego wstępnego przygotowania próbek. W opisanych warunkach nie obserwuje się interferencji składników matrycy pochodzących z preparatów, gdyż chromatograficzny rozdział eliminuje ich wpływ.

Podjęte badania wykazały, że opracowane warunki metody chromatograficzno – densytometrycznej spełniają zasadnicze wymagania w zakresie dobrej praktyki laboratoryjnej. Metodę cechuje wysoka specyficzność wobec składników oznaczanych w obecności substancji pomocniczych oraz innych substancji czynnych, w przypadku leków złożonych. Czułość metody jest wysoka dla potrzeb oznaczania niskich poziomów stężeń składników, które mogą występować jako zanieczyszczenia. Otrzymano dobre wartości odzysku oraz korzystne

warunki rozdziału składników i densytometrycznej detekcji. Liniowość jest zachowana w szerokich zakresach stężeń, precyzja zapewnia powtarzalność otrzymywanych wyników. Potwierdzeniem przydatności metody są także wyniki oznaczeń zawartości składników w preparatach farmaceutycznych.

Opracowana metoda chromatograficzno – densytometryczna może służyć zarówno do kontroli czystości leków zawierających wybrane niesteroidowe leki przeciwzapalne, jak i do prowadzenia badań kinetycznych rozkładu odpowiednich substancji czynnych.

Na podkreślenie zasługuje również to, że badane leki w warunkach ich przechowywania zachowują stabilność. W środowisku wodnym, w zależności od pH roztworu, temperatury i czasu inkubacji obserwuje się daleko posunięte zmiany, które prowadzą do powstania produktów rozkładu. Biorąc pod uwagę fakt, że badane leki stosunkowo łatwo ulegają niepożądanym przemianom w roztworach, jak również to, że biodostępność i aktywność farmakologiczna pozostaje w ścisłym związku z rozpuszczalnością w płynach ustrojowych, wydaje się, że poczynione obserwacje mogą mieć ścisły związek ze skutecznością działania i bezpieczeństwem ich stosowania.

Podjęte i opisane w pracy badania, obok poznania naukowego mają również aspekt praktyczny. Można je wykorzystać do rutynowej analizy substancji farmakopealnych i leków gotowych w zakresie, zarówno badania tożsamości i zawartości, jak i do oceny czystości tych preparatów.

5. Wnioski

1. Opracowano warunki jednoczesnej identyfikacji oraz oznaczania ilościowego zanieczyszczeń i składników czynnych w wybranych lekach o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym. Do rozdziału chromatograficznego użyto różne fazy stacjonarne oraz fazy ruchome, które wybrano doświadczalnie.
2. W opracowanych warunkach oznaczania wykazano możliwość identyfikacji składników w oparciu o wartości współczynników retencji (R_f) oraz widma absorpcji rejestrowane bezpośrednio z chromatogramów. Detekcja densytometryczna w UV pozwala na oznaczenie niskich stężeń w sposób dokładny, co jest istotne w badaniach poziomu zanieczyszczeń w lekach.
3. Stwierdzono, że większość analizowanych leków, występujących w różnych postaciach i pochodzących od różnych producentów zachowuje trwałość w terminach ich ważności. Występowanie zanieczyszczeń obserwowano jedynie w lekach przeterminowanych.
4. Środowisko wodne, pH roztworu, temperatura oraz czas inkubacji analitu mają wpływ na proces degradacji leków objętych planem badań. Powstające produkty rozkładu zidentyfikowano także na podstawie badania ^1H NMR jako zanieczyszczenia. Wyniki tych badań pozwoliły na ustalenie kierunku zachodzących przemian, prowadzących do rozkładu leku.
5. Podatność badanych leków na rozkład w roztworach o różnym pH może mieć istotne znaczenie w odniesieniu do procesu wytwarzania postaci leku, jak również skuteczności działania i bezpieczeństwa stosowania po ich doustnym podaniu.

6. Piśmiennictwo

1. The Validation of Analytical Procedure Used in the Examination of Pharmaceutical Materials WHO/Pharm.89.541/Rev.2.Genf, 1989
2. The United States Pharmacopeia, 24, 12601, Twinbrook, Parkway, Pockville, 2000
3. European Pharmacopoeia, Third Edition, Strasbourg, 1997 oraz suplementy 1999, 2000, 2001 i 2002
4. British Pharmacopoeia, complete Edition CD, 2000
5. Farmakopeia Polska, Wyd. V, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 1990
6. Commission Européenne de Pharmacopoeae, dokument PA/PH/SG 94, 123, 1993
7. Agatonovic-Kustrin S., Zivanovic L., Zecevic M., Radulovic D. – *Spectrophotometric study of diclofenac – Fe(III) complex* – J. Pharm. Biomed. Anal., 16 (1), 147-153, 1997
8. Agrawal Y. K., Shivramchandra K. – *Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in tablets* – J. Pharm. Biomed. Anal., 9 (2), 97-100, 1991
9. Ahuja S. – *Impurities evaluation of pharmaceuticals* – Marcel Dekker Inc., 1998
10. Ali A. M. – *Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug indomethacin* – J. Pharm. Biomed. Anal., 18 (6), 1005-1020, 1998
11. Alibrandi G., Micali N., Trusso S., Villari A. – *Hydrolysis of aspirin studied by spectrophotometric and fluorometric variable-temperature kinetics* – J. Pharm. Sci., 85 (Oct), 1105-1108, 1996

12. Al-Rashood K. A. – *Determination of naproxen in tablets and suppositories by gas / liquid chromatography (GC)* – Sci. Pharm., 62 (Sep), 215-224, 1994
13. Avgerinos A., Karidas T., Malamataris S. – *Extractionless high performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 130 (Sep 22), 324-329, 1993
14. Banks C. T. – *The development and application of coupled HPLC – TLC for pharmaceutical analysis* – J. Pharm. Biomed. Anal., 11 (8), 705-710, 1993
15. Berezniński Y., Thompson R., O'Neill E., Grinberg N. – *Thin-layer chromatography – a useful technique for the separation of enantiomers* – J. AOAC Inter., 84 (4), 1242-1251, 2001
16. Bhatia M. S., Kashedikar S. G., Chaturvedi S. C. – *Three simple spectrophotometric methods for simultaneous estimation of diclofenac sodium and paracetamol from tablets* – Indian Drugs, 33 (May), 213-218, 1996
17. Bodiřoga M., Popović R., Lukić L. – *Potentiometric and conductometric determination of tramadol hydrochloride* – Acta Pharm., 42 (1), 47-51, 1992
18. Bojarski J. – *Chromatograficzny rozdział enancjomerów. I. Metody* – Wiad. Chem., 47, 279-297, 1993
19. Bojarski J. – *Chromatograficzny rozdział enancjomerów. II. Mechanizmy i zastosowania* – Wiad. Chem., 47, 419-443, 1993
20. Borkowski B. – *Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej* – PZWL, Warszawa, 1973
21. Bystrowska B., Nowak J., Brandy J. – *Validation of a LC method for the determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in plasma* – J. Pharm. Biomed. Anal., 22, 341-346, 2000

22. Cabrera K., Lubda D. – *Influence of temperature on chiral high – performance liquid chromatographic separation of oxazepam and prominal on chemically bonded β -cyclodextrin as stationary phase* – J. Chromatogr., 666 (1-2), 433-438, 1994
23. Cakirer O., Kilic E., Atakol O., Kenar A. – *Non-aqueous titrimetric assay of the selected anti-inflammatory agents using tetra-n-butylammonium hydroxide as titrant* – J. Pharm. Biomed. Anal., 20 (1-2), 19-26, 1999
24. Carreira L. A., Rizk M., El-Shabrawy Y., Zakchar N. A., Toubar S. S. – *Europium(III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium* – J. Pharm. Biomed. Anal., 13 (11), 1331-1337, 1995
25. Carrlucci G., Mazzea P., Quaglia M. G., Vetuschi C. – *Determination of 5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid in indomethacin by derivative UV-spectrophotometry* – Inter. J. Pharm., 49 (Jan 1), 79-82, 1989
26. Caturla M. C., Cusido E. – *Solid phase extraction for the high performance liquid chromatographic determination of indomethacin, suxibuzone, phenylbutazone and oxyphenbutazone in plazma, avoiding degradation of compounds* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 119 (Oct 2), 101-107, 1992
27. Cavrini V., Gatti R., Di Pietra A. M. – *Determination of salicylic acid in saliva by high performance liquid chromatography* – Farmaco, 45 (Jun), 683-687, 1990
28. Chawla J. L., Sodhi R. A., Sane R. T. – *Simultaneous determination of chlorzoxazone, paracetamol and diclofenac sodium by different chromatographic techniques* – Indian Drugs, 33 (Apr), 171-179, 1996
29. Curran N. M., Lovering E. G., McErlane K. M., Watson J. R. – *Impurities in drugs. Part LI. Indomethacin* – J. Pharm. Sci., 69 (Feb), 187-189, 1980
30. Cygański A. – *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej* – WNT, Warszawa, 1997

31. Czarnecki A., Mazurek A. P. – *Zasady postępowania z lekami – związkami optycznie czynnymi* – Acta Polon. Pharm., 50 (1), 1-3, 1993
32. Ćwiertnia B., Hładoń T., Stobiecki M. – *Stability of diclofenac sodium in the inclusion complex with beta-cyclodextrin in the solid state* – J. Pharm. And Pharmacol., 51 (Nov), 1213-1218, 1999
33. Damiani P. C., Bezrzotti M., Cabezon M. A., Olivieri A. C. – *Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments* – J. Pharm. Biomed. Anal., 20 (3), 587-590, 1999
34. Danysz A., Kleinrok Z. – *Podstawy farmakologii* – Wyd. Volumed, Warszawa, 1996
35. Deokate U. A., Kaskhediker S. G. – *Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac sodium, chlormezanone and paracetamol from combined dosage forms* – East. Pharm., 42 (Nov), 125-126, 1999
36. Dolejsova J., Karlicek R., Pospisilova M. – *Determination of paracetamol in tablets by the method of flow injection analysis* – Ceska Slov. Farm., 44 (1), 25-26, 1995
37. El Kousy N. – *Spectrometric method for the determination of some antiinflammatory drugs and their pharmaceutical formulations* – Egypt. J. Pharm. Sci., 34 (1-3), 81-90, 1993
38. El-Sadek M. – *Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in the presence of its impurities via chalcone formation* – Egypt. J. Pharm. Sci., 32 (3-4), 457-463, 1991
39. El-Shanawany A., El-Sadek M., Aboul-Khier A., Rucker G. – *Quantitative determination of a mixture of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in the presence of their degradation products applying HPLC* – Indian J. Pharm. Sci., 53 (5), 209-212, 1991
40. El-Shanawany A., Neugebauer M., El-Sadek M., Abaulkhier A., Rucker G. – *HPLC method for quantitative determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine mixture* – Indian J. Pharm. Sci., 52 (4), 182-185, 1990

41. Erk N., Ozkaz Y., Banoglu E., Ozkan S. A., Senturk Z. – *Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometry and LC* – J. Pharm. Biomed. Anal., 24 (3), 469-475, 2001
42. Erram S. V., Tipnis H. P. – *Simultaneous estimation of methocarbamol and paracetamol from single and combined dosage tablets by RP-HPLC* – Indian Drugs, 30 (Mar), 116-119, 1993
43. Ferenczi-Fodor K., Vegh Z., Nagy-Turak A., Renger B., Zeller M. – *Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis* – J. AOAC Inter., 84 (4), 1265-1276, 2001
44. Fijałek Z. – *Ocena jakości środków farmaceutycznych w krajach wspólnoty europejskiej i w Polsce* – Biul. Inst. Lek., 44 (1), 15-20, 2000
45. Fini A., Fazio G., Rabasco A. M., Fernandez-Hervas M. J., Holgado M. A. – *Effect of the temperature on a hydrate diclofenac salt* – Inter. J. Pharm., 181 (Apr 20), 95-106, 1999
46. Flores-Picazo Y., Perez-Krizar S., Castaneda-Hernandez G. – *Determination of indomethacin in whole-blood microsamples using HPLC with electrochemical detection* – Rev. Mex. Chien. Farm., 29 (1), 22-25, 1998
47. Gasparrini F., Misiti D., Villani C., Pierini M., La Torze F. – *Direct high-performance liquid chromatographic resolution of 2-aryl- and 2-heteroarylpropionic acid on a chiral stationary phase containing the N,N'-dinitrobenzoyl derivative of (1R, 2R)-diaminocyclohexane* – J. Chromatogr., 633, 81-87, 1993
48. Giagoudakis G., Markantonis S. L. – *Alternative high performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma* – J. Pharm. Biomed. Anal., 17 (4-5), 897-901, 1998
49. Glombitza B. W., Schmidt P. C. – *Comparison of three new spectrophotometric methods for simultaneous determination of aspirin and salicylic acid in tablets without separation of pharmaceutical excipients* – J. Pharm. Sci., 83 (May), 751-757, 1994

50. Gołkiewicz W., Bartoś A. – *Oznaczanie śladowych ilości kwasu salicylowego i kwasu acetylosalicylowego w Polopirynie i innych lekach zawierających kwas acetylosalicylowy* – Acta Polon. Pharm., 50 (2-3), 143-147, 1993
51. Gonzalez L., Yuln G., Volonte M. G. – *Determination of cyanocobalamin, betamethasone and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography* – J. Pharm. Biomed. Anal., 20, 487-492, 1999
52. Goto Y., Makino K., Kataoka Y., Shuto H., Oishi R. – *Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis* – J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 706 (2), 329-335, 1998
53. Guermouche M.-H., Atik N., Chader H. – *Assay of naproxen in rat serum by high-performance thin-layer chromatography / densitometry* – J. AOAC Inter., 83 (6), 1489-1492, 2000
54. Gunther H. – *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego* – PWN, Warszawa, 1983
55. Haust D., Petterson C., Westerlund D. – *Separation of (R)- and (S)-naproxen using micellar chromatography and an α_1 -acid-glycoprotein column: application for chiral monitoring in human liver microsomes by coupled-column chromatography* – J. Biochem. Biophys. Meth., 25, 273-284, 1992
56. Hopkała H., Kowalczyk D. – *Thin-layer chromatographic analysis of nalidixic acid, oxolinic acid and cinoxacin* – Acta Polon. Pharm., 56 (1), 11-15, 1999
57. Hopkała H., Misztal G., Wieczorek A. – *Tramadol selective PVC membrane electrodes and their analytical application* – Pharmazie, 53 (Dec), 869-871, 1998
58. Hutt A. J., Caldwell J. – *The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids – a novel route with pharmacological consequences* – J. Pharm. Pharmacol., 35, 693-704, 1983

59. Hyun M. H., Cho Y. J., Ryoo J.-J., Jyung K. K., Heo G. S. – *Preparation and application of an (S)-naproxen chiral stationary phase* – J. Chromatogr. A, 696, 173-183, 1995
60. Indrayanto G., Sunarto A., Adriani Y. – *Simultaneous assay of phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in silabat tablets using HPLC with diode array detection* – J. Pharm. Biomed. Anal., 13 (12), 1555-1559, 1995
61. Ionescu C., Curea E. – *Effect of diclofenac sodium formulation upon the parameters of separation and identification by thin layer chromatography* – Farmacia, 43 (Sep-Dec), 25-29, 1995
62. Jarzębiński J., Ciszewska-Jędrasik M. – *Zastosowanie pomiarów densytometrycznych do oznaczania składników czynnych w lekach* – Acta Polon. Pharm., 45 (2), 141-145, 1988
63. Jovovic G., Nikolic L., Rajic K. K., Agbaba D., Djuric Z. – *Third-order derivative UV spectrophotometry and densitometry for the simultaneous assay of acetylsalicylic acid and salicylic acid in tablet formulations* – Farmaco, 50 (Apr), 285-288, 1995
64. Juhl W. E., Kirchhoefer R. D. – *Aspirin – a national survey I: semiautomated determination of aspirin in bulk and tablet formulations and salicylic acid in tablet formulations* – J. Pharm. Sci., 69 (5), 544-548, 1980
65. Juzwin S. J., Wang D. C., Anderson N. J., Wong F. A. – *The determination of RWJ-38705 (tramadol N-oxide) and its metabolites in preclinical pharmacokinetic studies using LC-MS/MS* – J. Pharm. Biomed. Anal., 22 (3), 469-480, 2000
66. Kalatzis E., Zarbi I. – *Spectrophotometric determination of p-aminophenol alone or in the presence of acetaminophen* – J. Pharm. Sci., 65 (1), 71-75, 1976
67. Kamath B. V., Shivram K., Shah A. C. – *Determination of diclofenac sodium, famotidine and ketorolac tromethamine by flow injection analysis using dichloronitrophenol* – J. Pharm. Biomed. Anal., 12 (3), 343-346, 1994

68. Kaniewska T. – *Identyfikacja leków psychotropowych metodą chromatografii cienkowarstwowej* – Farm. Pol., 42 (7), 346-350, 1986
69. Kanna-Babu S., Uday-Shankar P., Machu-Kumar G. – *Spectrophotometric estimation of diclofenac sodium in pharmaceutical formulations* – East. Pharm., 38 (Mar), 147-148, 1995
70. Karger A. E., Stoll A. E., Hansel W. – *Direkte chirale trennung von Tiaprofen, Carprofen und Flurbiprofen durch cyclodextrin – modifizierte kapillarelektrophorese* – Pharmazie, 49 (2/3), 155-159, 1994
71. Karpińska J., Mikołuc B., Piotrowska-Jastrzębska J. – *Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceutical and plasma* – J. Pharm. Biomed. Anal., 17 (8), 1345-1356, 1998
72. Kazemifard A. G., Moore D. E. – *Liquid chromatography with amperometric detection for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 533 (Nov 30), 125-132, 1990
73. Kees F., Jehnich D., Grobecker H. – *Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography* – J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 677 (1), 172-177, 1996
74. Kessler A., Krzek J. – *Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej i densytometrii w badaniach złożonych leków recepturowych* – Farm. Pol., 38 (9), 357-360, 1982
75. Kirchhoefer R. D., Jefferson E., Flint P. E. – *Aspirin – a national survey V: determination of aspirin and impurities in enteric coated tablets and suppository formulations and in vitro dissolution of enteric coated tablets* – J. Pharm. Sci., 71 (9), 1049-1052, 1982
76. Kirchhoefer R. D., Juhl W. E. – *Aspirin – a national survey II: determination of salicylic acid in bulk aspirin and aspirin formulations by high-pressure liquid chromatography using a fluorescence detector* – J. Pharm. Sci., 69 (5), 548-550, 1980

77. Kmetec V. – *Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC* – J. Pharm. Biomed. Anal., 10 (Oct-Dec), 1073-1076, 1992
78. Kokot Z., Burda K. – *Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative UV spectrophotometry* – J. Pharm. Biomed. Anal., 4-5, 871-875, 1998
79. Korlkovas A., Haraguchi T. – *Assay of tramadol hydrochloride in nonaqueous titration and ultraviolet spectrophotometry* – Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo, 31 (1), 39-41, 1995
80. Krasowska H., Krówczyński L., Bogdanik Z. – *The assay of indomethacin in the presence of its hydrolytic degradation products* – Pol. J. Pharmacol. Pharm., 25, 417-421, 1973
81. Krzek J. – *Spektrofotometryczna metoda oznaczania kwasu salicylowego po ekstrakcji układem izopropanol – wodorotlenek sodu* – Farm. Pol., 36 (5), 281-283, 1980
82. Krzek J. – *Densitometric determination of impurities in drugs. Part III. Determination of guaifenesin in Methocarbamol preparations* – Acta Polon. Pharm., 55 (2), 99-103, 1998
83. Krzek J. – *Kontrola jakości leków w świetle wymogów farmakopealnych* – Farm. Pol., 55 (2), 86-95, 1999
84. Krzek J., Bielska A. – *Densytometryczne oznaczanie składników w recepturowych postaciach leków* – Farm. Pol., 41 (9), 534-537, 1985
85. Krzek J., Bielska A., Kessler A. – *Densytometryczne oznaczanie zanieczyszczeń w lekach. I. Oznaczanie m-aminofenolu (MAP) i 1,3-bis-(7-teofilinylo)-2-hydroksypropanu (BIS)* – Farm. Pol., 39 (6), 343-345, 1983

86. Krzek J., Hubicka U., Dąbrowska-Tylka M., Leciejewicz-Ziemecka E. – *Determination of budesonide R(+) and S(-) isomers in pharmaceuticals by high performance thin layer chromatography with UV detection densitometry* – *Chromatographia*, 56 (Dec), 759-762, 2002
87. Krzek J., Janeczko Z. – *Spektrofotometryczna i chromatograficzno – densytometryczna metoda oznaczania zawartości (+)-katechiny w preparacie Catergen* – *Chem. Anal.*, 30, 465-470, 1985
88. Krzek J., Kozera A. – *Densytometryczne oznaczanie kapsaicyny w nalewce z owocu pieprzowca (Capsicum annuum L.)* – *Farm. Pol.*, 40 (10), 587-588, 1984
89. Krzek J., Kwiecień A. – *Densitometric determination of impurities in drugs. Part IV. Determination of N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamic acid in preparations of folic acid* – *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (2 Nov), 451-457, 1999
90. Krzek J., Kwiecień A. – *Densitometric determination of impurities in drugs. Part V. Determination of folic acid and 2,4-diaminopteridine-6-carboxylic acid in methotrexate* – *Chem. Anal.*, 45, 551-559, 2000
91. Krzek J., Kwiecień A., Starek M., Kierszniewska A., Rzeszutko W. – *Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin and spectinomycin in veterinary preparations by thin layer chromatography and densitometry* – *J. AOAC Inter.*, 83 (6), 1502-1506, 2000
92. Krzek J., Maślanka A. – *Densitometric determination of impurities in drugs. Part VI. Determination of 4,4-bis-[p-(chlorophenyl)-4-hydroxypiperidino]butyrophenone in haloperidol* – *Acta Polon. Pharm.*, 57 (1 Jan-Feb), 23-26, 2000
93. Krzek J., Maślanka A. – *Densitometric determination of impurities in pharmaceuticals. Part VIII. Simultaneous determination of fluoxetine and (1R)-3-methylamino-1-phenylpropan-1-ol, N-methyl-3-phenylpropan-1-amine and C-1 as drug impurities* – *J. Planar Chromatogr.*, 15 (Jan/Feb), 50-55, 2002

94. Krzek J., Moniczewska M. – *Densytometryczne oznaczanie barbituranów w lekach recepturowych* – Farm. Pol., 38 (1), 19-21, 1982
95. Krzek J., Moniczewska M. – *Densytometryczna metoda oznaczania Lanatozydu C w lekach recepturowych* – Farm. Pol., 40 (11), 655-656, 1984
96. Krzek J., Starek M. – *The effect of acetylsalicylic acid on the stability of methocarbamol in complex drugs* – Acta Polon. Pharm., 56 (5), 369-374, 1999
97. Krzek J., Starek M. – *Densitometric determination of active constituents and impurities in complex analgesic and antipyretic pharmaceuticals* – J. Planar Chromatogr., 12 (Sep/Oct), 356-360, 1999
98. Krzek J., Starek M. – *Simultaneous densitometric determination of indomethacin and its degradation products, 4-chlorobenzoic acid and 5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid, in pharmaceutical preparations* – J. AOAC Inter., 84, 6, 1703-1707, 2001
99. Krzek J., Starek M. – *Densitometric determination of diclofenac, 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-one and indolin-2-one in pharmaceutical preparations and model solutions* – J. Pharm. Biomed. Anal., 28, (Apr 15), 227-243, 2002
100. Krzek J., Starek M., Kwiecień A. – *Simultaneous determination of guaiamar carbamate and acetylsalicylic acid by a chromatographic – densitometric method* – Acta Polon. Pharm., 55 (6), 429-434, 1998
101. Krzek J., Starek M., Kwiecień A., Rzeszutko W. – *Simultaneous determination and quantitative determination of neomycin sulfate, polymixin B sulfate, zinc bacytracin and methyl and propyl hydroxybenzoates in ophthalmic ointment by TLC* – J. Pharm. Biomed. Anal., 24, 629-636, 2001
102. Krzek J., Starek M., Stożek T. – *Ocena stabilności kwasu acetylosalicylowego w tabletkach* – Farm. Pol., 21, 974-978, 2001

103. Kubala T., Gambhir B., Borst S. I. – *Specific stability indicating HPLC method to determine diclofenac sodium in raw materials and pharmaceutical solid dosage forms* – Drug Dev. Ind. Pharm., 19 (7), 749-757, 1993
104. Kuhlmann O., Stoldt G., Struck H. G., Krauss G. J. – *Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine of human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection* – J. Pharm. Biomed. Anal., 17 (8), 1351-1356, 1998
105. Kwong E., Pillai G. K., McErlane K. M. – *HPLC analysis of indomethacin and its impurities in capsule and suppository formulations* – J. Pharm. Sci., 71 (Jul), 828-830, 1982
106. Larsen C. – *Macromolecular prodrugs. Part 8. Determination of the ionization constant of dextran by potentiometric titration and from kinetic analysis of the hydrolysis of dextran indomethacin ester conjugates* – Inter. J. Pharm., 52 (May 15), 55-61, 1989
107. Leciejewicz-Ziemecka E. – *Ocena zanieczyszczeń w surowcach farmaceutycznych jako element wymagań farmakopealnych* – Biul. Inst. Lek., 44 (1), 241-409, 2000
108. Lee H. S., Jeong C. K., Choi S. J., Kim S. B., Sohn D. H. i in. – *Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by narrowbore HPLC using column switching* – J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (5), 775-781, 2000
109. Lewandowska I., Tyfczyńska J., Bujak M. – *Oznaczanie acebutololu w surowicy krwi* – Acta Polon. Pharm., 46 (4), 350-353, 1989
110. Lykkesfeldt J., Loft S., Poulsen H. E. – *Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection – are they reliable biomarkers of oxidative stress ?* – Anal. Biochem., 229 (2), 329-335, 1995
111. Mack M., Hauck H. E. – *Separation of enantiomers in thin-layer chromatography* – Chromatogr., 26, 197-205, 1988

112. Mamolo M. G., Vio L., Maurin V. – *High pressure liquid chromatographic analysis of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid in tablets. Salicylic acid quantitation* – Farmaco. Ed. Pract., 40 (Apr), 111-123, 1985
113. Marković S., Kusec Z. – *Determination of caffeine, paracetamol and propyphenazone in pharmaceutical preparations by gas chromatography method* – Pharmazie, 45 (Dec), 935-936, 1990
114. Martin C., Dominiguez E. – *New enzyme electrode for quantification of salicylic acid in a FIA system* – J. Pharm. Biomed. Anal., 19 (1-2), 107-112, 1999
115. Martos N. R., Diaz A. M., Navalon A., De-Orbe-Paya I., Vallvey L. F. – *Simultaneous spectrofluorimetric determination of acetylsalicylic acid, codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations using partial least squares multivariate calibration* – J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (5), 837-844, 2000
116. Mascellani G., Tortolani G. – *Interpretation of the drug purity concept* – Boll. Chim. Farm., 119 (Oct), 600-607, 1980
117. Mason W. D., Winter N. – *Kinetics of aspirin, salicylic acid and salicyluric acid following oral administration of aspirin as a tablet and two buffered solutions* – J. Pharm. Sci., 70 (3), 262-264, 1981
118. Matysik G. – *Problemy optymalizacji chromatografii cienkowarstwowej* – AM, Lublin, 1997
119. McCormik T. J., Gibson A. B., Diana F. J. – *Development and validation of a dissolution method for warfarin sodium and aspirin combination tablets* – J. Pharm. Biomed. Anal., 15 (12), 1881-1891, 1997
120. McMahon G. P., Kelly M. T. – *Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction* – Anal. Chem., 70 (2), 409-414, 1998

121. Mikami E., Goto T., Ohno T., Matsumoto H., Nishida M. – *Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high performance liquid chromatography* – J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (5), 917-925, 2000
122. Misztal G., Gumienniczek A. – *Chromatographic analysis (TLC) aprindine and nadoxolol in human plasma* – Acta Polon. Pharm., 51 (3), 215-218, 1994
123. Misztal G., Hopkała H., Przyborowski L. – *Determination of tramadol hydrochloride in pharmaceutical preparations by HPLC* – Acta Polon. Pharm.-Drug Res., 53 (4), 245-247, 1996
124. Misztal G., Hopkała H., Sławik T. – *Chromatographic analysis (TLC) of fluoxetine, doxepine, imipramine and opipramol in human plasma* – Acta Polon. Pharm. – 54 (4), 257-259, 1997
125. Moeslinger T., Brunner M., Volf J., Spieckermann P. G. – *Spectrophotometric determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid* – Clin. Chem., 41 (8, Aug), 1177-1181, 1995
126. Muller H. J., Berg J. – *Stability of tramadol hydrochloride in PVC infusion bags* – Krankenhauspharmazie, 18 (Feb), 75-79, 1997
127. Natishan T., Wu Y. – *Residual solvents determination in the antibiotic L-749,345 by static headspace gas chromatography* – J. Chromatogr., 800 (2), 275-281, 1998
128. Nikolic K., Velasevic K. – *Spectrophotometric determination of salicylic acid, acetylsalicylic acid and lysine acetylsalicylate* – Arh. Farm., 38 (4), 121-124, 1988
129. Nikolic K., Velasevic K. – *Bromocoulometric method for the determination of salicylic acid* – Arh. Farm., 38 (4), 125-129, 1988
130. Nissen W. M. A. – *Analysis of antibiotics by liquid chromatography mass spectrometry* – J. Chromatogr., 812 (1-2), 53-75, 1998

131. Nogowska M., Muszalska I., Zając M. – *Simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparations* – Chem. Anal., 44, 1041-1048, 1999
132. Notarianni L. J., Collins A. J. – *Method for the determination of acemetacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in plasma by high performance liquid chromatography* – J. Chromatogr., 413 (Jan 23), 305-308, 1987
133. Onur F., Acar N. – *Simultaneous determination of active ingredients in suppositories containing paracetamol by first derivative UV spectrophotometry* – STP Pharma Sci., 5 (2), 152-155, 1995
134. Palomo M. E., Ballesteros M. P., Frutos P. – *Analysis of diclofenac sodium and derivatives* – J. Pharm. Biomed. Anal., 21, 83-94, 1999
135. Parimoo P., Bharathi A., Babu R. J., Gupta C. N., Sudha-Rao S. – *Simultaneous and selective determination of diclofenac sodium and paracetamol in tablet preparations by titrimetry* – East. Pharm., 40 (Apr), 111-112, 1997
136. Paw B., Misztal G., Dzwonnik K. – *Thin-layer chromatographic analysis of fludarabine and formycin A in human plasma* – Acta Polon. Pharm., 57 (5), 341-343, 2000
137. Pawełczyk E., Hermann T. – *Podstawy trwałości leków* – PZWL, Warszawa, 1982
138. Pawełczyk E., Płotkowiak Z., Zając M. – *Chemiczna analiza leków* – PZWL, Warszawa, 1981
139. Pawlaczyk J. – *Zanieczyszczenia substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych – stary problem, nowe spojrzenie* – Farm. Pol., 55 (6), 282-292, 1999
140. Pawlaczyk J., Zając M. – *Walidacja metod analizy chemicznej* – Wyd. II, AM, Poznań, 2001

141. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Sanz A., SanMiguel M. T. – *Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations* – J. Pharm. Biomed. Anal., 16 (2), 249-254, 1997
142. Peterdi-Nagy A., Sperlagh J., Vegh M. – *Spectrophotometric determination of quinine sulfate and acetylsalicylic acid in Pulv. Chenacisal c. Vit. C FONO V. preparation* – Acta Pharm. Hung., 56 (Mar), 115-119, 1986
143. Pfeiffer C. D., Pankey J. W. – *Determination of related compounds in aspirin by liquid chromatography* – J. Pharm. Sci., 71 (5), 511-514, 1982
144. Pirkle W. H., Terfloth G. J. – *Naproxen-derived segmented and sidechain-modified polysiloxanes as chiral stationary phases* – J. Chromatogr. A, 704, 269-277, 1995
145. Pirkle W. H., Welch C. J., Wilson S. R. – *Assignment of absolute configuration to an improved enantioselective naproxen selector* – Chirality, 6, 615-622, 1994
146. Plaizier-Vercammen J. A., Dewolf D. – *Research into chemical stability of indomethacin eye drops: National formulary VI by means of UV spectrophotometry* – Farm. Tijdschr. Belg., 70 (Dec), 10-13, 1993
147. Plakogiannis F. M., Ali A., Kazmi S. – *High pressure liquid chromatographic determination of indomethacin in capsules* – Drug Dev. Ind. Pharm., 7 (2), 215-222, 1981
148. Płotkowiak Z., Popielarz-Brzezińska M., Andrzejewska J., Leppert W., Łuczak J. – *Badania analityczne chlorowodoru tramadolu i jego mieszanin z lekami wspomagającymi* – Biul. Inst. Lek., 40 (3), 3-9, 1996
149. Płotkowiak Z., Popielarz-Brzezińska M., Andrzejewska J., Leppert W., Łuczak J. – *Analiza mieszanin leków przeciwbólowych z lekami wspomagającymi* – Biul. Inst. Lek., 42 (3/4), 147-152, 1998
150. Poctova M., Kakać B. – *Polarographic determination of ester of indomethacin with tropic acid* – Cesc. Farm., 28 (8), 344-346, 1979

151. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A. – *Leki współczesnej terapii* – Wyd. Fundacji Buchnera, Warszawa, 1999
152. Pospisilova M., Dolejsova J. – *Analysis of indomethacin – containing dosage forms using the method of capillary isotachopheresis* – Ceska Slov. Farm., 46 (6), 265-268, 1997
153. Pouli N., Antoniadou-Vyzas A., Foscolos G. B. – *Methocarbamol degradation in aqueous solution* – J. Pharm. Sci., 83 (Apr), 499-501, 1994
154. Prządka U., Fijałek Z. – *The densitometric determination of purity of sodium metamizol injections and tablets* – Acta Polon. Pharm., 56 (5), 357-360, 1999
155. Raggi M. A., Lucchini F., Da-Re P. – *X-ray fluorescence determination of bromine traces in pharmaceutical formulations containing sodium diclofenac* – Boll. Chim. Farm., 132 (Jan), 29-31, 1993
156. Ramos-Martos N., Aguirre-Gomez F., Molina-Diaz A., Capitan-Vallvey L. F. – *Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine and thiamine in pharmaceutical preparations* – J. AOAC Inter., 84 (3), 676-682, 2001
157. Rao C. N. R. – *Spektroskopia elektronowa związków organicznych* – PWN, Warszawa, 1982
158. Rzeszutko W. – *Oznaczanie karbaminianu gwajamaru* – Acta Polon. Pharm., 47 (3-4), 17-20, 1990
159. Rzeszutko W., Kopec T. – *Indirect iodometric method of determination of ascorbic and thioglycolic acid and AsO_2^- and $S_2O_3^{2-}$ ions* – Acta Polon. Pharm., 52 (1), 9-12, 1995
160. Saha U., Baksi K. – *Spectrophotometric determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations using cooper(II) acetate as a colour developer* – Analyst, 110 (Jan), 739-741, 1985

161. Sane R. T., Samant R. S., Nayak V. G. – *High performance liquid chromatographic determination of diclofenac sodium from pharmaceutical preparation* – Drug Dev. Ind. Pharm., 13 (7), 1307-1314, 1987
162. Sane R. T., Surve S. R., Gangrade M. G., Bapat V. V., Chonkar N. L. – *Simultaneous gas chromatographic estimation of combined dosages: amitriptyline hydrochloride with chlordiazepoxide, methocarbamol with ibuprofen, paracetamol with diclofenac sodium and paracetamol with promethazine hydrochloride* – Indian Drugs, 30 (Feb), 66-72, 1993
163. Sastry C. S., Mangala D. S., Rao K. E. – *Spectrophotometric and fluorimetric method for the determination of indomethacin* – Analyst, 111 (Mar), 323-325, 1986
164. Sastry C. S., Rao A. R., Gopala-Krishna C. V., Muthry A. G. – *Gas liquid chromatography determination of diclofenac sodium tablets* – Indian J. Pharm. Sci., 50 (May-Jun), 175-178, 1988
165. Sawchuk R. J., Maloney J. A., Cartier L. L., Rackley R. J., Lau H. S. i in. – *Analysis of diclofenac and four of its metabolites in human urine by HPLC* – Pharm. Res., 12 (May), 756-762, 1995
166. Schmitz G., Lepper H., Estler C. J. – *High performance liquid chromatographic method for the routine determination of diclofenac and its hydroxy and methoxy metabolites from in vitro systems* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 131 (Oct 22), 158-163, 1993
167. Schneider W., Degen P. H. – *Simultaneous determination of diclofenac sodium and its metabolites in plasma by capillary column gas chromatography with electron-capture detection* – J. Chromatogr., 383 (Dec 19), 412-418, 1986
168. Schoenmakers P. J., Peeters A., Lynch R. J. – *Optimization of chromatographic method by a combination of optimization software and expert systems* – J. Chromatogr., 506, 169-184, 1990
169. Shakya A. K., Joshi G. K., Mishra P. – *Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceutical dosage forms* – Indian J. Pharm. Sci., 54 (1), 44-46, 1992

170. Singh A. K., Jang Y., Mishra U., Granley K. – *Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high performance liquid chromatography and gas chromatography – mass spectrometry* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 568 (Aug 23), 351-361, 1991
171. Sinsheimer E., Breault G. O. – *Chromatographic determination of benzoic acid derivatives for application to metabolism studies* – J. Pharm. Sci., 60 (2), 255-257, 1971
172. Sioufi A., Pommier F., Godbillon J. – *Determination of diclofenac in plasma and urine by capillary gas chromatography – mass spectrometry with possible simultaneous determination of deuterium-labeled diclofenac* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 571 (Nov 15), 87-100, 1991
173. Sioufi A., Richard J., Mangoni P., Godbillon J. – *Determination of diclofenac in plasma using a fully automated analytical system combining liquid-solid extraction with liquid chromatography* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 565 (Apr 19), 401-407, 1991
174. Soczewiński E. i in. – *Zastosowanie chromatografii cieczowej w badaniu mechanizmu cząsteczkowego podziału i adsorpcji związków organicznych* – Ossolineum, PAN, 1974
175. Sodhi R. A., Chawla J. L., Sane R. T. – *Simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen and chlorzoxazone by HPLC, HPTLC and GC methods* – Indian Drugs, 33 (Jan), 280-285, 1996
176. Stefański A., Stolarczyk M. – *Analysis of ternary solutions by applying the spectrophotometry measurements of unary, binary and ternary standard solutions* – Chem. Anal., 46, 261-268, 2001
177. Street K. W., Schenk G. H. – *Spectrofluorometric determination of acetylsalicylic acid, salicylamide and salicylic acid as an impurity in pharmaceutical preparations* – J. Pharm. Sci., 70 (Jan), 641-646, 1981

178. Stubbs R. J., Schwartz M. S., Chiou R., Entwistle L. A., Bayne W. F. – *Improved method for the determination of indomethacin in plasma and urine by reverse-phase high performance liquid chromatography* – J. Chromatogr., 383 (Dec 19), 432-437, 1986
179. Su Y., Tomassetti M., Sammartino M. P., Crescentini G., Campanell L. – *New salicylate ISFET for the determination of salicylic and acetylsalicylic acid in drugs* – J. Pharm. Biomed. Anal., 13 (4-5), 449-457, 1995
180. Suryanarayanan R., Venkatesh S., Hodgins L., Hanson P. – *Determination of the physical state of salicylic acid in hydrogel formulations by x-ray diffractometry* – Inter. J. Pharm., 78 (Jan 1), 77-83, 1992
181. Szczepaniak W. – *Metody instrumentalne w analizie chemicznej* – PWN, Warszawa, 1997
182. Szyszko E. – *Instrumentalne metody analityczne* – PZWL, Warszawa, 1982
183. Taguchi V. Y., Cotton M. L., Yates C. H., Millar J. F. – *Determination of drug stability in aspirin tablet formulations by high-pressure liquid chromatography* – J. Pharm. Sci., 70 (1), 64-67, 1981
184. Tomankowa H., Vasatova M. – *Densitometric determination of propyphenazone, paracetamol, guaiacol glycerol ether, caffeine, acetylsalicylic acid in preparations with analgesic – actipyretic activity using thin layer chromatography* – Pharmazie, 44 (Mar), 197-198, 1989
185. Tosunoglu S. – *Spectrophotometric determination of (S)-(+)-naproxen in tablets* – Acta Pharm. Turc., 31 (3), 119-122, 1989
186. Tsikas D., Tewes K. S., Gutzki F. M., Schwedhelm E., Griepel J., Frolich J. C. – *Gas chromatographic – tandem mass spectrometric determination of acetylsalicylic acid in human plasma after oral administration of low – dose aspirin and guimesal* – J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 709 (1), 79-88, 1998

187. Ustun M., Sungur S., Ersoy L. – *Comparison of HPLC and derivative spectrophotometric method for the determination of paracetamol (acetaminophen) and acetylsalicylic acid in tablets* – Pharmazie, 47 (Jul), 558-559, 1992
188. Vajda M., Otta-Horvath K., Tith-Forgacs E. – *Development of analytical methods for the determination of Indosol substance and eye drops* – Acta Pharm. Hung., 64 (4), 131-134, 1994
189. Vilchez J. L., Blanc R., Avidad R., Navalon A. – *Spectrofluorimetric determination of paracetamol in pharmaceuticals and biological fluids* – J. Pharm. Biomed. Anal., 13 (9), 1119-1125, 1995
190. Villari A., Micali N., Fresta M., Puglisi G. – *Simultaneous spectrophotometric determination in solid phase of aspirin and its impurity salicylic acid in pharmaceutical formulations* – J. Pharm. Sci., 81 (Sep), 895-898, 1992
191. Vree T. B., Van-Den-Biggelaar-Martea M., Verwey Van Wissen C. P. – *Determination of indomethacin, its metabolites and their glucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient high performance liquid chromatographic analysis: preliminary pharmacokinetics and effect of probenecid* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 127 (Jul 2), 271-282, 1993
192. Wall P. E. – *Preparation and application of HPTLC plates for enantiomer separation* – J. Planar Chromatogr., 2 (Jun), 228-232, 1989
193. Wang Q. F., Mei H. H. – *Determination of indomethacin in glucosamine indomethacin enteric coated tablets by HPLC* – Chin. J. Pharmaceuticals, 31 (Aug), 362-363, 2000
194. Witek A., Przyborowski L. – *Identification of celiprolol and talindol in substance and tablets by means of TLC* – Acta Polon. Pharm., 52 (6), 399-402, 1996
195. Witek A., Przyborowski L. – *Thin – layer chromatographic analysis of some β – blocking drugs in plasma* – Acta Polon. Pharm., 54 (3), 183-186, 1997

196. Witkiewicz Z. – *Podstawy chromatografii* – WNT, Warszawa, 1995
197. Zając M., Jedlińska A., Muszalska I., Nogowska M., Stanisław B. – *Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH* – Wyd. Kontekst, Poznań, 2000
198. Zając M., Pawełczyk E. – *Chemia leków* – AM, Poznań, 2000
199. Zając M., Stanisław B., Musiał W. – *The stability of diclofenac in acid medium* – Acta Polon. Pharm., 55 (5), 371-374, 1998
200. Zarapkar S. S., Halkar U. P., Bhandari N. P. – *Reverse phase high performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, paracetamol and methocarbamol in tablets* – Indian Drugs, 36 (Nov), 710-713, 1999
201. Zecca L., Ferrario P., Costi P. – *Determination of diclofenac and its metabolites in plasma and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection* – J. Chromatogr. Biomed. Appl., 567 (Jul 5), 425-432, 1991
202. Zejc A., Gorczyca M. – *Chemia leków* – PZWL, Warszawa, 1998

