

# Razvoj HPLC-DAD metode za istovremenu analizu odabranih analgoantipiretika u kombiniranim ljekovitim oblicima

---

**Rački, Bruno**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:915858>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Bruno Rački**

**Razvoj HPLC-DAD metode za istovremenu  
analizu odabranih analgoantipiretika u  
kombiniranim ljekovitim oblicima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

*Pred sam kraj ovog ogromnog i važnog poglavlja u mom životu, želim zahvaliti svima koji su bili dio mene i mog životnog puta. Prije svega bih htio zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na bezuvjetnoj pomoći ne samo oko izrade mog diplomskog rada, već također na bezuvjetnoj potpori, poticajima i savjetima za bilo što čemu sam težio. Hvala i svim divnim zaposlenicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta koji su učinili moje studiranje ljepšim i boljim.*

*Posebna zahvala je za mog najboljeg prijatelja Mihovila, prijatelje iz osnovne škole Mateja, Jurana i Lovru te Nikolu, bez čijih dugogodišnjih prijateljstva sve ovo ne bi imalo smisla. Hvala i mojim dragim prijateljima iz srednje škole Maji, Ani, Martini i Karlu na potpori i druženju u srednjoj školi, ali i šire. Studiranje bez prijatelja nije studiranje – neizmjereno hvala mojim najdražim prijateljicama Jeleni i Valentini te djevojkama iz vježbeničke grupe V7 na svemu što smo zajedno prošli u ovih nekoliko godina. Hvala vam Monika Popčević, Anamarija, Matea, Barbara, Andrea, Eva, Amra, Monika Perica i ostale! Veliki pozdrav i hvala najboljoj mentorskoj grupi VI! Hvala također i dragoj Patriciji na svojoj pomoći koju si mi pružila i time otvorila mnoga vrata! Hvala i Domagoju, Heleni, Ivi, Lucianu, Davidu, Ružici i Luciji na svim druženjima, obranama i lijepim trenucima.*

*Moje studiranje ne bi bilo ni približno ovakvo bez naše Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA), kojoj sam posvetio preko 4 godine svog života i studiranja. Preko nje, upoznao sam predivne i kvalitetne ljude, što domaće, što strane, proživio mnoge više ili manje uzbudljive avanture te posjetio 23 države Europe i svijeta. Prije svega, posebice hvala Franji na upoznavanju s CPSA-om, pomoći, savjetima i svemu što si za mene učinio! Hvala svim CPSA timovima, a posebice posljednja dva, na svemu dobrom i lošem što smo prošli zajedno: Jelena K., Dalia, Petra N., Sara, Tajana, Jelena D., Marin T. i V., Karlo, Dora, Borna, Lucija, Iva, Emily, Zrinka, Karolina, Petra Š., Katarina, Luka, Mia, Stjepan, Jelena M. – sve ovo bez vas ne bi bilo moguće. Također hvala i Davidu, mom EPSA mentoru na sveobuhvatnom pružanju uvida u farmaceutsku industriju. Hvala i mojim stranim prijateljima Matei, Viktoriji, Nikoli, Katarini, Sandri, Juliji, Marku, Stefanu, Neži, Moniki, Jeleni, Astrid, Duyju, Philippu, Sergeju, Bernardu, Diogu, Hyunjin, Ennis, Jasonu, Gelan, Chihabu, Robertu, a posebno i Phoebe na svim predivnim trenucima koje smo u ovih nekoliko proteklih godina zajedno imali! Povezano s radom u Udruzi, hvala puno i Ivanu na pomoći i mentorstvu oko moje velike strasti – grafičkog dizajna.*

*Moj je život definitivno obilježio i odlazak na šestomjesečni internship u Švicarsku i farmaceutsku kompaniju F. Hoffmann-La Roche Ltd. u 2016. godini. Hvala svima, a posebice prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky, mom šefu Martinu, mentorima Michaelu i Nathalie, dragom prijatelju Pierre-Yvesu i ostalima iz Basela na svemu što ste za mene učinili!*

*Za kraj, bez moje obitelji ne bih dospio ovdje gdje sam sada. Neizmjereno hvala mojoj majci Biserki, ocu Vladimiru i prekrasnoj i najboljoj sestri Lei na nebrojenoj i nemjerljivoj pomoći, podršci i njegovanju ambicija tijekom mog života i studiranja! Također, ništa ne bi bilo ovakvo kakvo je sada da nije bilo mojih baka, Stanke i Tatjane, te mojih djedova, Martina i Josipa. Hvala također i mojoj široj obitelji – Branku, Editi, Ediju i Lani te Tamari, Leu, Franu i Tiboru.*

# **SADRŽAJ RADA**

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b>   | 1  |
| <b>1.1. Aktivni farmaceutski sastojci</b>                            | 1  |
| 1.1.1. Acetilsalicilna kiselina                                      | 1  |
| 1.1.2. Paracetamol   | 3  |
| 1.1.3. Kofein  | 4  |
| <b>1.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti</b>           | 6  |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>  | 9  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b>  | 10 |
| <b>3.1. Materijali</b>   | 10 |
| 3.1.1. Kemikalije  | 10 |
| 3.1.2. Radni instrumenti   | 11 |
| 3.1.3. Laboratorijski pribor   | 11 |
| 3.1.4. Programski paketi   | 11 |
| <b>3.2. Analitičke metode</b>  | 12 |
| 3.2.1. Priprema standardnih otopina                                  | 12 |
| 3.2.2. Priprema mobilne faze   | 12 |
| 3.2.3. Priprema uzorka   | 12 |
| 3.2.4. Uvjeti kromatografske analize                                 | 13 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>                                       | 14 |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b>  | 22 |
| <b>6. LITERATURA</b>   | 23 |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b>  | 25 |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION<br/>CARD</b> |    |

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>OTC</b>             | bezpreceptni lijek, od engl. <i>over the counter</i>  |
| <b>DDD</b>             | definirana dnevna doza, od engl. <i>defined daily dose</i>  |
| <b>HALMED</b>          | Agencija za lijekove i medicinske proizvode   |
| <b>pKa</b>             | konstanta disocijacije kiseline   |
| <b>COX</b>             | enzim ciklooksigenaza, od engl. <i>cyclooxygenase</i>   |
| <b>NSAID</b>           | nesteroidni protuupalni lijekovi, od engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>                   |
| <b>TXA<sub>2</sub></b> | tromboksan-A <sub>2</sub>   |
| <b>ATL</b>             | aspirinom potaknuti lipoksini, od engl. <i>aspirin triggered lipoxines</i>                                |
| <b>cAMP</b>            | ciklički adenzin monofosfat, od engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>                               |
| <b>HPLC</b>            | tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, od engl. <i>high performance liquid chromatography</i>    |
| <b>DAD</b>             | detektor s nizom dioda, od engl. <i>diode array detector</i>  |
| <b>ECD</b>             | elektrokemijski detektor, od engl. <i>electron capture detector</i>                                       |
| <b>ELSD</b>            | detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku, engl. <i>evaporative light-scattering detector</i>         |
| <b>USP</b>             | Američka farmakopeja  |
| <b>JP</b>              | Japanska farmakopeja  |
| <b>Ph. Eur.</b>        | Europska farmakopeja  |
| <b>Ph. Int.</b>        | Svjetska farmakopeja  |
| <b>API</b>             | aktivni farmaceutski sastojak, od engl. <i>active pharmaceutical ingredient</i>                           |
| <b>UV-Vis</b>          | spektroskopija u UV i vidljivom području valnih duljina, od engl. <i>ultraviolet-visible spectroscopy</i> |

## 1. UVOD

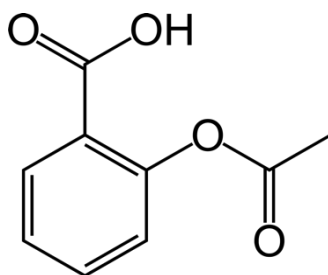
Antipiretici i analgetici jedni su od najprodavanijih i najčešće korištenih OTC lijekova (engl. *over the counter*). Koriste se za liječenje manjih i većih tegoba poput glavobolje, zubobolje, bolova lokomotornog sustava i snižavanje povišene tjelesne temperature. U ljekarnama su dostupni gotovi lje koviti oblici s različitim kombinacijama antipiretika i analgetika (acetilsalicilna kiselina, paracetamol, ibuprofen) uz dodatak tvari kao što su primjerice kofein, pseudoefedrin i askorbinska kiselina. Prema podacima o potrošnji lijekova u Hrvatskoj u 2016. godini, spomenuti antipiretici i analgetici zauzimaju prvih nekoliko mjesta po financijskoj potrošnji i po DDD (definirana dnevna doza, engl. *defined daily dose*)/1000 stanovnika/dan ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

U ovom su radu korišteni acetilsalicilna kiselina, paracetamol i kofein kao aktivni farmaceutski sastojci gotovog lijeka Kofedon tablete protiv bolova.

### 1.1. Aktivni farmaceutski sastojci

#### 1.1.1. Acetilsalicilna kiselina

Acetilsalicilna kiselina (lat. *acidum acetylsalicylicum*) stari je i dobro poznati lijek za ublažavanje bolova, snižavanje povišene tjelesne temperature, a koristi se, u nižim dozama (75 i 100 mg), i kao kardioprotektiv zbog antitrombotskog učinka ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Po strukturi je acetatni ester salicilne kiseline (slika 1.). Prema Merckovom indeksu, 1 gram acetilsalicilne kiseline otapa se u 300 mL vode pri 25 °C, u 100 mL vode pri 37 °C, u 5 mL alkohola, 17 mL kloroforma, 10-15 mL etera, a nešto manje u bezvodnom eteru. Konstanta disocijacije (pKa) za acetilsalicilnu kiselinu iznosi 3,49 pri 25 °C ([www.toxnet.nlm.nih.gov](http://www.toxnet.nlm.nih.gov)).



Slika 1. Kemijska struktura acetilsalicilne kiseline

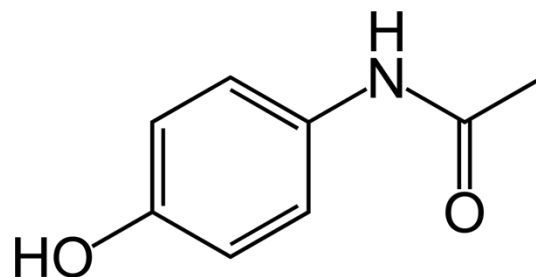
Svi NSAID-ovi dijele zajednički mehanizam inhibicije COX enzima, što rezultira smanjenjem stvaranja prostaglandina kao medijatora upale. Međutim, za razliku od ostalih NSAID-ova, acetilsalicilna kiselina ireverzibilno inhibira COX enzime. U tome sudjeluje i acetilni i salicilatni dio molekule, a potonji je ujedno i aktivni metabolit acetilsalicilne kiseline. U dozama od 75 do 100 mg dnevno, acetilni dio molekule se kovalentno veže na serin 530 COX-1 enzima, inhibirajući tako stvaranje tromboksana-A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) i agregaciju trombocita. On također acetilira i serin 516 COX-2 enzima, čime inhibira stvaranje prostaglandina, ali time preusmjerava aktivnost enzima na stvaranje supstrata za aspirinom potaknute lipoksine (ATL). U višim dozama od 650 mg do 4 g dnevno, acetilsalicilna kiselina inhibira i COX-1 i COX-2 enzime. Inhibicijom stvaranja prostaglandina i stvaranjem ATL-a, postiže se gašenje upalnog odgovora i smanjenje boli, a inhibicijom stvaranja tromboksana i prevencija kardiovaskularnih bolesti (Cadavid, 2017). Unatoč povoljnim svojstvima, acetilsalicilna kiselina ne smije se primjenjivati u pedijatrijskoj populaciji zbog mogućnosti pojave Reyeovog sindroma ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Na hrvatskom tržištu, acetilsalicilna kiselina se može naći kao samostalna djelatna tvar ili u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima u različitim gotovim ljekovitim oblicima: tabletama, obloženim tabletama, želučanootpornim tabletama, šumećim tabletama, šumećim prašcima, oralnim prašcima, granulama za oralnu suspenziju, tvrdim kapsulama i tvrdim kapsulama s prilagođenim oslobađanjem. Lijekovi su dostupni i na recept i bez recepta ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).



### 1.1.2. Paracetamol

Paracetamol (lat. *paracetamolum*, u američkom nazivlju engl. *acetaminophen*) je široko rasprostranjeni analgetik i antipiretik. Po strukturi je 4-acetaminofenol (slika 2.). Prema Merckovom indeksu, paracetamol je lako topljiv u alkoholu, topljiv u metanolu, etanolu, dimetilformamidu, etilen dikloridu, acetonu i etil acetatu, slabije topljiv u eteru, a praktički netopljiv u petroleteru pentanu i benzenu (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). U vodi ima topljivost od 14 mg/mL pri 25 °C (www.drugbank.ca). Konstanta disocijacije (pKa) za paracetamol iznosi 9,38 (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 2. Kemijska struktura paracetamola

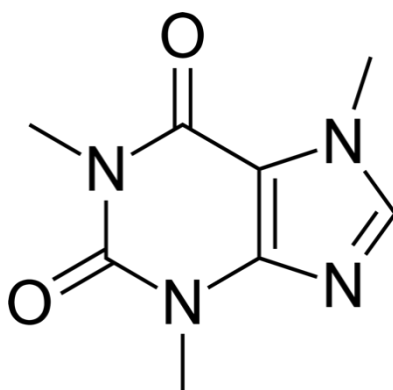
Paracetamol se najčešće koristi za snižavanje povišene tjelesne temperature i bolova (www.gljz.hr). Njegov mehanizam djelovanja uključuje prvenstveno inhibiciju COX enzima u mozgu. Spektar njegovog djelovanja sličan je selektivnim COX-2 inhibitorima i nesteroidnim protuupalnim lijekovima (NSAID) (Graham i sur., 2013). Slabijeg je djelovanja od navedenih, ali je široko korišten zbog dobre podnošljivosti, poglavito u vidu gastrointestinalnih nuspojava. Iako njegov mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, generalno se smatra da inhibira COX-1 i COX-2 enzime kroz metabolizam posredovan peroksidaznim djelovanjem navedenih enzima. To rezultira inhibicijom stvaranja fenoksil radikala na aminokiselini tirozinu koji su nužni za ciklooksigenaznu aktivnost tih izoenzima i stvaranje prostaglandina. Iako inhibira stvaranje medijatora upale, ima smanjenu aktivnost pri jačim upalama gdje je prisutna veća količina medijatora. Zbog toga nema učinka pri liječenju tegoba upalnih bolesti poput reumatoidnog artritisa ili akutnog napada gihta, ali pomaže kod, primjerice, boli i upale uzrokovanih vađenjem zuba. Za paracetamol se često smatra da ima i COX-2 selektivnost inhibicije zbog slabog antitrombotskog učinka i već ranije spomenute gastrointestinalne podnošljivosti. Iako je generalno vrlo siguran lijek, predoziranje

paracetamolom prvi je uzrok akutnog zatajenja jetre i transplantacije u Sjedinjenim Američkim Državama (Yoon i sur., 2017) i Ujedinjenom Kraljevstvu (Tanne, 2006).

Na hrvatskom tržištu, paracetamol se može naći kao samostalna djelatna tvar ili u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima u različitim oblicima: tabletama, filmom obloženim tabletama, šumećim tabletama, granulama, granulama za oralnu otopinu, prašcima, prašcima za oralnu otopinu, sirupima, tvrdim kapsulama, čepićima, oralnim suspenzijama i otopinama za infuziju. Lijekovi su dostupni i na recept i bez recepta ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### 1.1.3. Kofein

Kofein (lat. *caffeinum*) široko je rasprostranjena i korištena psihoaktivna tvar. Najprominentniji učinak kofeina je stimulacija centralnog živčanog sustava, što rezultira povećanom budnošću, povećanom koncentracijom i agitacijom. Osim u biljci kavovca, *Coffea arabica*, *Rubiaceae* L. i njenim plodovima kao sirovini za izradu kave, kofein još nalazimo i u preko 60 biljnih vrsta poput čajevca, mate listovima, guarani, sjemenkama kole, kakaa itd. (Lipton i sur., 2017). Kofein je po strukturi ksantin, kemijskog naziva 1,3,7-trimetilksantin (slika 3.). Prema Merckovom indeksu, 1 gram kofeina topljiv je u 46 mL vode, 5,5 mL vode pri 80 °C, 1,5 mL ključale vode, 66 mL alkohola (etanola), 22 mL alkohola pri 60 °C, 50 mL acetona, 5,5 mL kloroforma, 530 mL etera, 100 mL benzena i 22 mL ključalog benzena ([www.toxnet.nlm.nih.gov](http://www.toxnet.nlm.nih.gov)). Konstanta disocijacije (pKa) za kofein iznosi 14,0 pri 25 °C i 10,4 pri 40 °C ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).



Slika 3. Kemijska struktura kofeina

Kofein stimulira medularni, vagalni, vazomotorni i respiratorni centar na način da potiče bradikardiju, vazokonstrikciju i povećanje brzine disanja. Djeluje kao kompetitivni neselektivni antagonist  $A_1$ ,  $A_{2A}$  i  $A_{2B}$  adenozijskih receptora, a nešto manjeg afiniteta i na  $A_3$  receptore (Lipton i sur., 2017). Glumeći adenzin, blokira vezu cikličkih 3',5'-adenozin monofosfata (cAMP) i tako povećava njegovu intercelularnu koncentraciju. Uz antagonizam receptora, kofein je i inhibitor fosfodiesteraze koja je odgovorna za razgradnju cAMP-a, dodatno tako povećavajući koncentraciju kofeina u međustaničnom prostoru ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). Kofein se u lijekovima koristi kao adjuvans koji pojačava djelovanje analgetika protiv boli. Dostupan je i kao dodatak prehrani, najčešće u tabletama, prvenstveno kao dodatni izvor energije za sportaše.

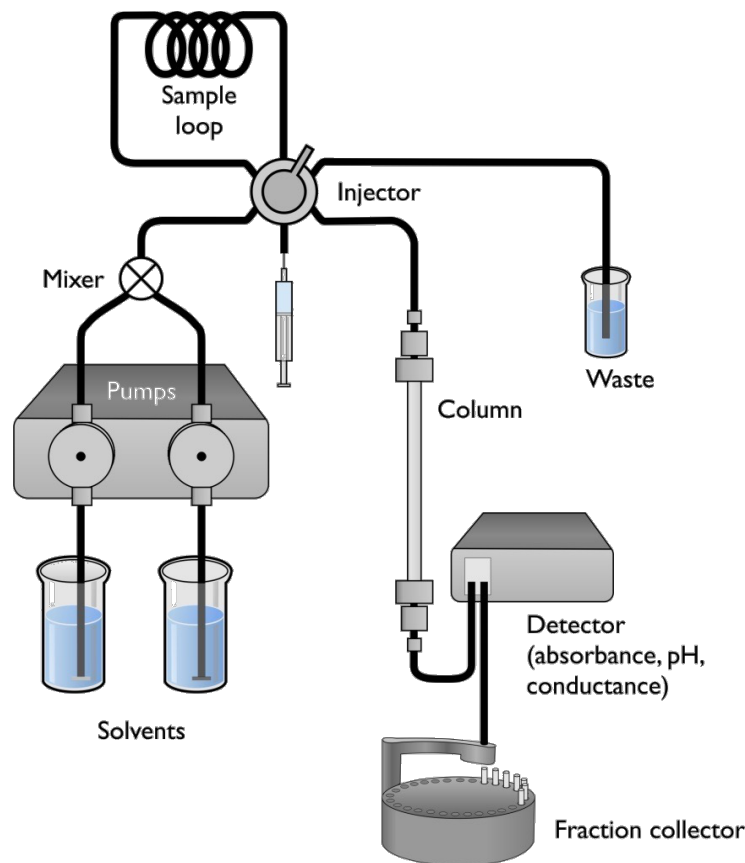
Na hrvatskom tržištu, kofein se u bezreceptnim lijekovima može naći isključivo u kombinaciji s drugim djelatnim tvarima, posebice s paracetamolom, u različitim ljekovitim oblicima: tabletama, filmom obloženim tabletama i tvrdim kapsulama ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Kao što je već spomenuto, kofein se također može pronaći i kao dodatak prehrani.

## 1.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Kromatografija je fizikalni analitički postupak koji se temelji na raspodjeli kemijskih tvari između dvije faze, a ovisi o svojstvima adsorpcije, razdjeljenja, ionske izmjene i isključenja - raspodjeli prema veličini čestica i stereokemiji (npr. odjeljivanje enantiomera). U kromatografiji je jedna faza uvijek stacionarna, a druga pokretna, odnosno mobilna. Ovisno o vrsti uzorka, stacionarnih i mobilnih faza, razlikujemo više vrsta kromatografija (Luterotti, 2013).

Jedna od najčešćih vrsta kromatografija koju susrećemo u analitičkoj kemiji je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). HPLC je zlatni standard u analitici lijekova u farmaceutskoj industriji. U većini slučajeva, HPLC je konfiguriran kao kromatografija obrnutih faza, što znači da je mobilna faza polarnih svojstava, a stacionarna nepolarnih. Primjeri takvih mobilnih faza su pojedinačne ili kombinacije otapala poput etanola, metanola, acetonitrila, vode i sl., a primjeri najčešće korištenih stacionarnih faza su oktilsilil (npr. kolone C8) i oktadecilsilil (npr. kolone C18) koji se koriste u oko 80% analiza u farmaciji (Nigović, 2015). Uobičajena veličina čestica stacionarne faze u HPLC kolonama iznosi 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Osim mobilne faze jednakog sastava kroz cijelo trajanje analize (izokratno ispiranje), moguće je mijenjati sastav mobilne faze (gradijentno ispiranje) u određenim vremenskim periodima. Primjerice, nakon što jedan od analita napusti kolonu i bude detektiran, može se promijeniti pH mobilne faze ili udio organskog otapala u mobilnoj fazi kako bi se ispiranje idućeg analita ubrzalo.

Tipični HPLC uređaj sastoji se od spremnika za mobilne faze, sustava za obradu otapala (odstranjivanje plinova koji se ne smiju dospjeti do kolone), crpke (za visoke tlakove do 300 bara), sustava za unošenje uzorka, kolone i detektora (slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz HPLC uređaja ([www.google.com](http://www.google.com))

Postoji više vrsta detektora za HPLC uređaje: detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector* (DAD)), elektrokemijski detektor (ECD), fluorescencijski detektor, detektor raspršenja svjetla u uparenom zraku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD) i maseni detektor (engl. *Mass spectrometer*, MS) (Nigović, 2015). U ovom je radu korišten DAD detektor. Radi se o detektoru koji emitira kompletan spektar UV svjetlosti (uz rezoluciju od 1 nm). Prilikom prolaska analita kroz detektor mjeri se apsorbancija po svim valnim duljinama UV svjetlosti. Na ovaj način, analit ostaje nepromijenjen, odnosno ne događaju se kemijske promjene. Međutim, da bi analit mogao biti detektiran DAD detektorom, u svojoj strukturi mora imati kromofor – nezasićeni dio molekule koji može apsorbirati UV svjetlost (chemistry.tutorvista.com). Ukoliko analit ne sadrži kromofor, može se podvrgnuti obradi s kemikalijama kako bi se kromofor dodao u strukturu molekule, no takav pristup nije uvijek poželjan pa se analit detektira drugim detektorom. Dodatna prednost detekcije DAD detektorima jest mogućnost razlikovanja spektara pikova koji imaju isto ili slično vrijeme zadržavanja. S obzirom da se radi o različitim kemijskim tvarima, njihovi su spektri različiti i zato ih je moguće razlikovati (Watson, 1999).

Velika prednost analize HPLC uređajem je mogućnost predviđanja izlaska analita s kolone i mogućnost podešavanja uvjeta analize poput sastava mobilne faze, temperature, brzine protoka i slično. U kromatografijama normalnih faza, mobilna faza je nepolarnih svojstava, a stacionarna polarnih. U takvoj bi kromatografiji nepolarniji analiti izašli prije od polarnijih, koji bi ušli u jače interakcije s polarnom stacionarnom fazom. Obrnuto se događa u kromatografijama obrnutih faza gdje je mobilna faza polarnih, a stacionarna nepolarnih svojstava. U takvoj bi se kromatografiji polarniji analiti zadržali u mobilnoj fazi, ne bi ušli u jače interakcije s nepolarnom stacionarnom fazom i izišli bi ranije s kolone. Kada imamo nekoliko analita sličnih svojstava, moguće je primjerice podesiti pH otopine kako bi spojevi s kiselim ili alkalnim skupinama promijenili ionizaciju, a time i svoju polarnost. Ionizirani, odnosno disocirani spojevi su polarni, dok su neionizirani i nedisocirani spojevi manje polarni. Tako je moguće povećanjem kiselosti mobilne faze neku slabu organsku kiselinu učiniti nepolarnijom – u ovom se slučaju disocirani proton vraća na disocirani dio molekule i smanjuje se polarnost. Valja svakako voditi računa o pKa vrijednostima molekula koje diktiraju opisani proces. Temperatura također utječe na vrijeme zadržavanja analita na koloni na način da se, u pravilu, povećanjem temperature vrijeme zadržavanja skraćuje (Nigović, 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Acetilsalicilna kiselina, paracetamol i kofein kao dodatna tvar široko su rasprostranjeni i dostupni u lijekovima različitih farmaceutskih oblika u Hrvatskoj i svijetu. Većinom su dostupni kao OTC lijekovi, što znači da su dostupni bez liječničkog recepta. Iako su na prvi pogled bezazleni, njihova pogrešna uporaba može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema. Kao što je prethodno već spomenuto, paracetamol je jedan od glavnih uzroka za transplantaciju jetre u Sjedinjenim Američkim Državama, dok upotreba acetilsalicilne kiseline u djece mlađih od 12 godina može dovesti do pojave Reyeovog sindroma.

U analitici lijekova, glavni izvor informacija za provedbu analiza su farmakopeje. Farmakopeje su knjige standarada u kojima su opisane standardne kemikalije i postupci za analizu lijekova. Svrha farmakopeja je osiguravanje kvalitete i sigurnosti lijekova ([www.edqm.eu](http://www.edqm.eu)). To se postiže kroz standardizaciju postupaka analize, identifikacije i ispitivanja sadržaja ljekovitih supstancija i/ili gotovih ljekovitih oblika. Postoje nacionalne farmakopeje, od kojih su najprominentnije Američka (USP) i Japanska farmakopeja (JP), te supranacionalne i regionalne farmakopeje: Europska (Ph. Eur.), Afrička i Svjetska farmakopeja (Ph. Int.) ([www.who.int](http://www.who.int)).

Europska farmakopeja još uvijek nema monografije za gotove ljekovite oblike, dok Američka farmakopeja u pravilu koristi tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti za analizu gotovih ljekovitih oblika. Kod gotovog ljekovitog oblika, za razliku od aktivnih ljekovitih sastojaka (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API), potrebno je sastojke ekstrahirati iz ljekovitog oblika, što ponekad zahtjeva optimizaciju ekstrakcijskih uvjeta. Cilj ovog rada bio je razviti brzu i jednostavnu HPLC-DAD metodu za istovremenu analizu acetilsalicilne kiseline, paracetamola i kofeina u kombiniranim gotovim ljekovitim oblicima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Kemikalije**

###### **Standardne supstancije**

- paracetamol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- acetilsalicilna kiselina (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- kofein (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

###### **Otapala**

- acetonitril (J. T. Baker)
- metanol (J. T. Baker)
- mravlja kiselina 98-100% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ultračista voda pročišćena sustavom za pročišćavanje vode SG Water euRO (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Germany)

###### **Pufer**

- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- trietilamin (Merck, Hohenbrunn, Njemačka)

###### **Ispitivani uzorak**

- Kofedon tablete protiv bolova, Gradska ljekarna Zagreb
  - o Ispitivani uzorak sadrži:
    - 300 grama acetilsalicilne kiseline
    - 220 grama paracetamola
    - 50 grama kofeina



### **3.1.2. Radni instrumenti**

- vezani sustav tekućinske kromatografije (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- centrifuga IKA Mini G, brzina 6000 rpm (Ika, Staufen, Njemačka)
- vorteks tresilica za epruvete IKA Lab Dancer (Ika, Staufen, Njemačka)
- magnetni mješač IKA Mini MR Standard (Ika, Staufen, Njemačka)
- pH metar Mettler Toledo FiveEasy Plus (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- sustav za pročišćavanje vode SG Water euRO (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Germany)

### **3.1.3. Laboratorijski pribor**

- kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, SAD)
- boce za mobilne faze tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (Agilent Technologies, SAD)
- bočice za uzorkovanje zapremnine 1,5 mL i 2 mL (Agilent Technologies, SAD)
- mikropipete promjenjivih volumena (2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  i 100-1000  $\mu\text{L}$ ) (Hirschmann, Eberstadt, Njemačka)

### **3.1.4. Programski paketi**

- 3D-CE/MSD ChemStation, verzija A 10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

## **3.2. Analitičke metode**

### **3.2.1. Priprema standardnih otopina**

Prije pripreme standardnih otopina acetilsalicilne kiseline, paracetamola i kofeina, prethodio je detaljan pregled Europske i Američke farmakopeje kako bi se pronašla najbolja otapala i proučile postojeće farmakopejske metode. Standardne otopine pripremljene su vaganjem 10 mg svake supstance i otapanje u 10 mL etanola u odmjernim tikvicama kako bi se dobile otopine koncentracije 1 mg/mL. Ove su otopine bile korištene za pronalazak optimalnih uvjeta i sastava mobilne faze. Tijekom izrade pokusa za potrebe ovog diplomskog rada, nekoliko puta su pripremljene svježe standardne otopine.

### **3.2.2. Priprema mobilne faze**

U procesu pronalaska optimalnog sastava mobilne faze, isprobane su kombinacije različitih otapala i pufera

Pripremljene su i otopine 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu te 0,1%-tne otopina mravlje kiseline u ultračistoj vodi. Korištena je izokratna elucija uz omjer acetonitrila, vode i mravlje kiseline 15:80:0,1%

Također je ispitana mobilna faza koja se sastojala od fosfatnog pufera i metanola. Otopina fosfatnog pufera pripremljena je otapanjem 2,0007 g kalijevog dihidrogenfosfata u 1 L ultračiste vode, uz dodatak 2 mL trietilamina i 1,5 mL ortofosforne kiseline. pH pripremljene otopine pufera iznosio je 2,61. Korištena je izokratna elucija, uz različite udijeje metanola u mobilnoj fazi.

### **3.2.3. Priprema uzorka**

Lijek Kofedon tablete protiv bolova kupljen je u Gradskoj ljekarni Zagreb te su uzete dvije tablete čije su mase izvagane na analitičkoj vagi. Tablete su potom usitnjene i usitnjene u tarioniku. Odgovarajuća odvaga usitnjene tablete ekstrahirana je u 10 mL acetonitrila do koncentracije kofeina, kao supstancije u najnižoj koncentraciji, 1 mg/mL. Kako bi se

pospješio postupak ekstrakcije, uzorak je najprije protresena pomoću vorteks tresilice u trajanju od 5 minuta (2800 rpm), te stavljen na ultrazvučnu kupelj tijekom 15 minuta. Otopina je centrifugirana pri brzini od 6000 rpm tijekom 5 minuta, i otopina iznad taloga je korištena za daljnju analizu tekućinskom kromatografijom uz, po potrebi odgovarajuća razrijeđenja mobilnom fazom.

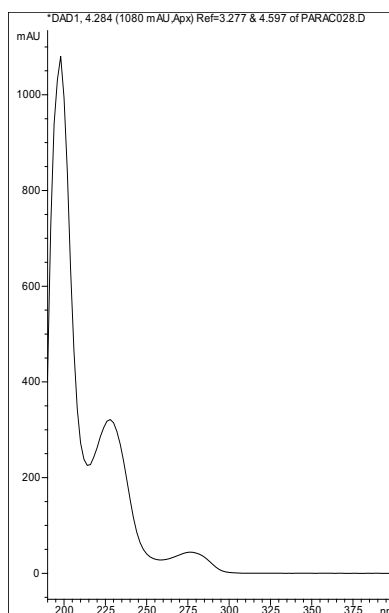
#### **3.2.4. Uvjeti kromatografske analize**

Kromatografske analize vršene su uz pomoć Agilentovog 1100 Chromatograph vezanog sustava za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti. Korištena je Watersova kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 µm. Optimalnom metodom pokazala se mobilna faza sastava acetonitril:voda:mravlja kiselina u omjeru 20:80:0,1% v/v, uz brzinu protoka 1,5 mL/min i temperaturu kolone 40 °C. Ukupno vrijeme trajanja optimalne analize iznosilo je manje od 10 minuta uz uspješno razdvajanje sve tri aktivne farmaceutske tvari u uzorku analizirane tablete analgoantipiretika, kofeina, paracetamola i acetilsalicilne kiseline. Svakog dana prije početka mjerenja, kolona je ispirana mobilnom fazom.

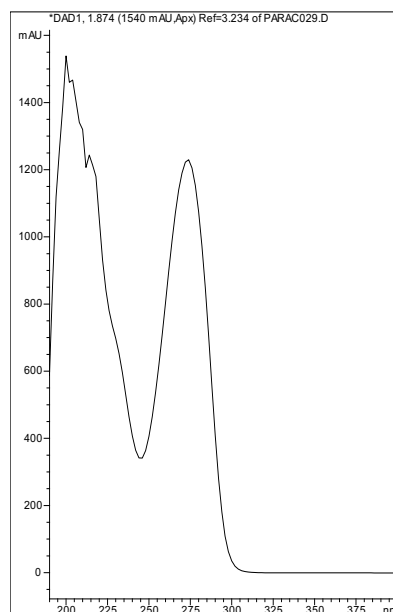
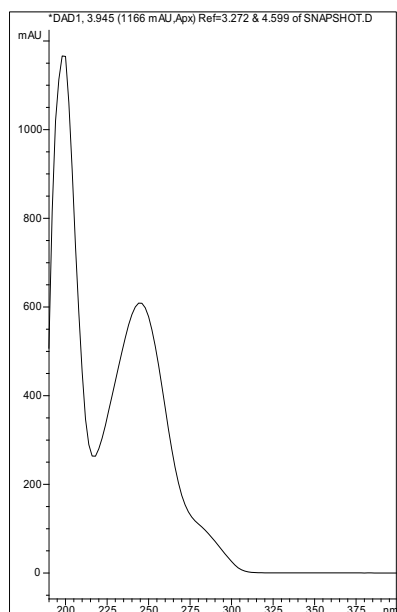
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Europska farmakopeja ne sadržava monografije za gotove ljekovite oblike, što znači da ne sadržava ni metode za istovremenu analizu supstancija u kombiniranim ljekovitim oblicima, niti optimizirane ekstrakcijske metode. Pregledom je literature utvrđeno da postoje brojne metode za istovremenu analizu različitih kombinacija analgetika, ali nije pronađena HPLC metoda kojom se analiziraju isključivo acetilsalicilna kiselina, paracetamol i kofein. Pregledom pretežito Američke farmakopeje pronađene su različite kombinacije otapala i eluenta kojim bi se pojedine supstance mogle uspješno analizirati HPLC metodom. Supstance su u ovom istraživanju uspješno otopljene u etanolu.

Prve analize napravljene su korištenjem izokratne elucije primjenom mobilne faze sastava acetonitril i voda, uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline. Ključni korak tijekom optimizacije kromatografske metode bio je utvrditi vrijeme zadržavanja svake pojedine tvari kao i njihove UV-Vis spektre. Snimljeni UV-Vis spektri prikazani su na slikama 5-7. Također je odabrana i valna duljina na kojoj je bilo moguće istovremeno analizirati sva tri analita te je ona iznosila 237 nm.



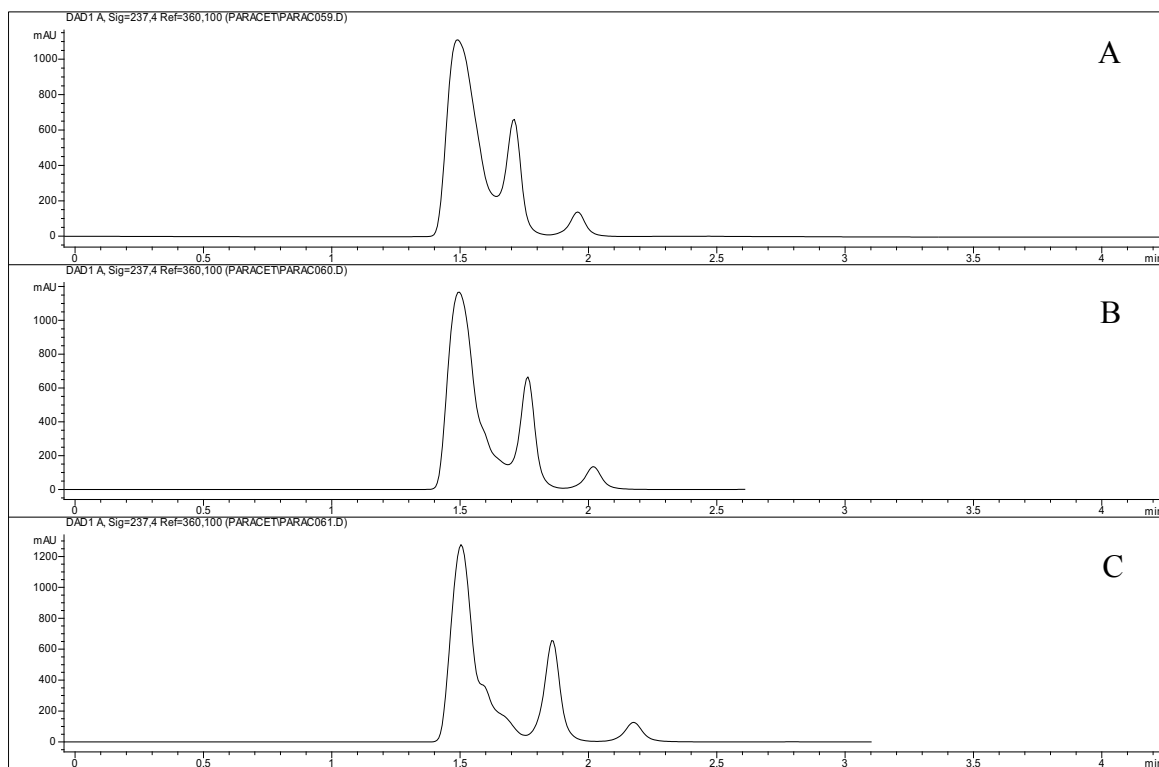
Slika 5. UV-Vis spektar acetilsalicilne kiseline



Slike 6. i 7. UV-Vis spektar paracetamola i kofeina

Uz snimanje UV-Vis spektara, utvrđen je i redoslijed elucije analita koji je kasnije u analizi smjese potvrđen. U ispitivanim uvjetima, prvi je uvijek izlazio paracetamol, netom poslije kofein, a posljednja je izlazila acetilsalicilna kiselina. Redoslijed elucije analita određen je pH vrijednosti mobilne faze te pKa odnosno lipofilnosti svakog analita. S obzirom da se ovdje radilo o kromatografiji obrnutih faza, očekujemo da će prve izlaziti supstancije polarnijih svojstava, a posljednje one nepolarnijih.

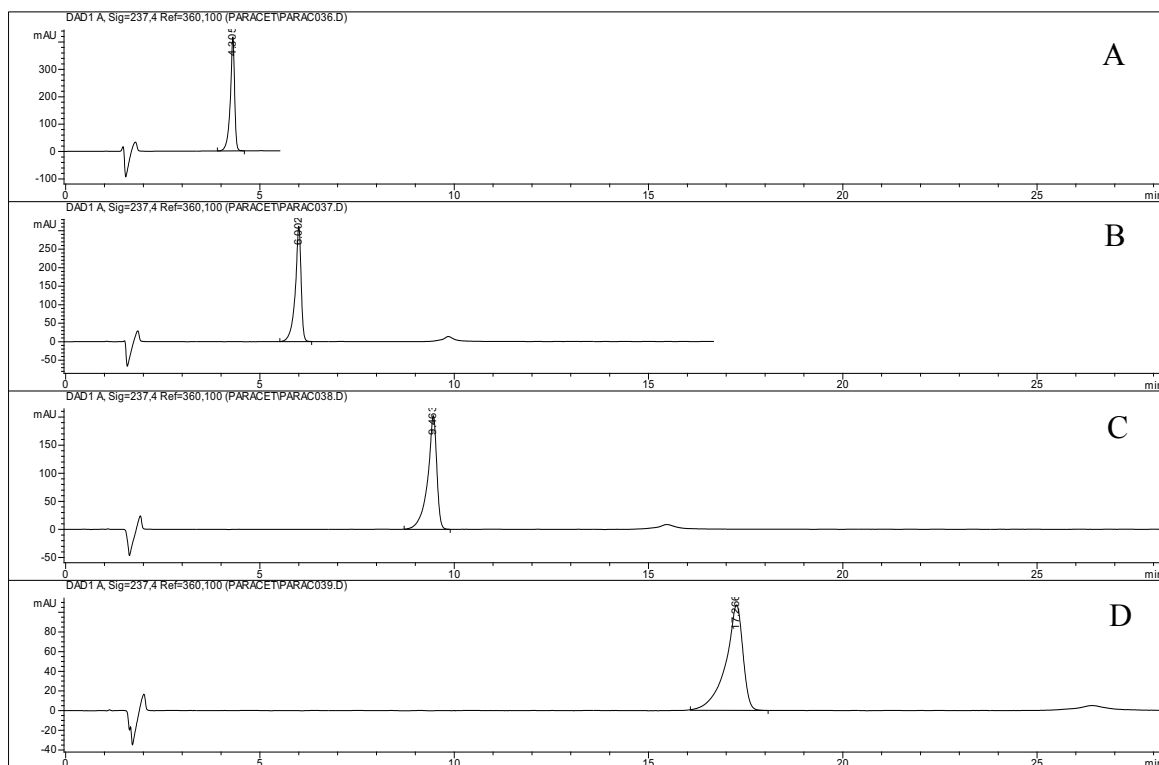
U daljnjim ispitivanjima provjerena je uspješnost razdvajanja i trajanje analize primjenom mobilne faze s puferom. Pripremljen je pufer otapanjem odgovarajuće količine kalijevog dihidrogenfosfata u pročišćenoj vodi, uz dodatak trietilamina i ortofosforne kiseline u pH pripremljenog pufera iznosio je od 2,61. Taj se eluens kombinirao s metanolom u različitim omjerima (slika 8.) uz izokratnu eluciju.



Slika 8. Kromatogrami smjese standardnih supstanci uz primjenu mobilne faze s različitim udjelima pufera i metanola u mobilnoj fazi. *Uvjeti analize: kolona Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu$ m. Temperature kolone 25 °C. Mobilna faza fosfatni pufer:metanol = 20:80, v/v (slika A), fosfatni pufer:metanol = 25:75, v/v (slika B), fosfatni pufer:metanol = 30:70, v/v (slika C). Brzina protoka 1,5 ml/min. Valna duljina detekcije 237 nm.*

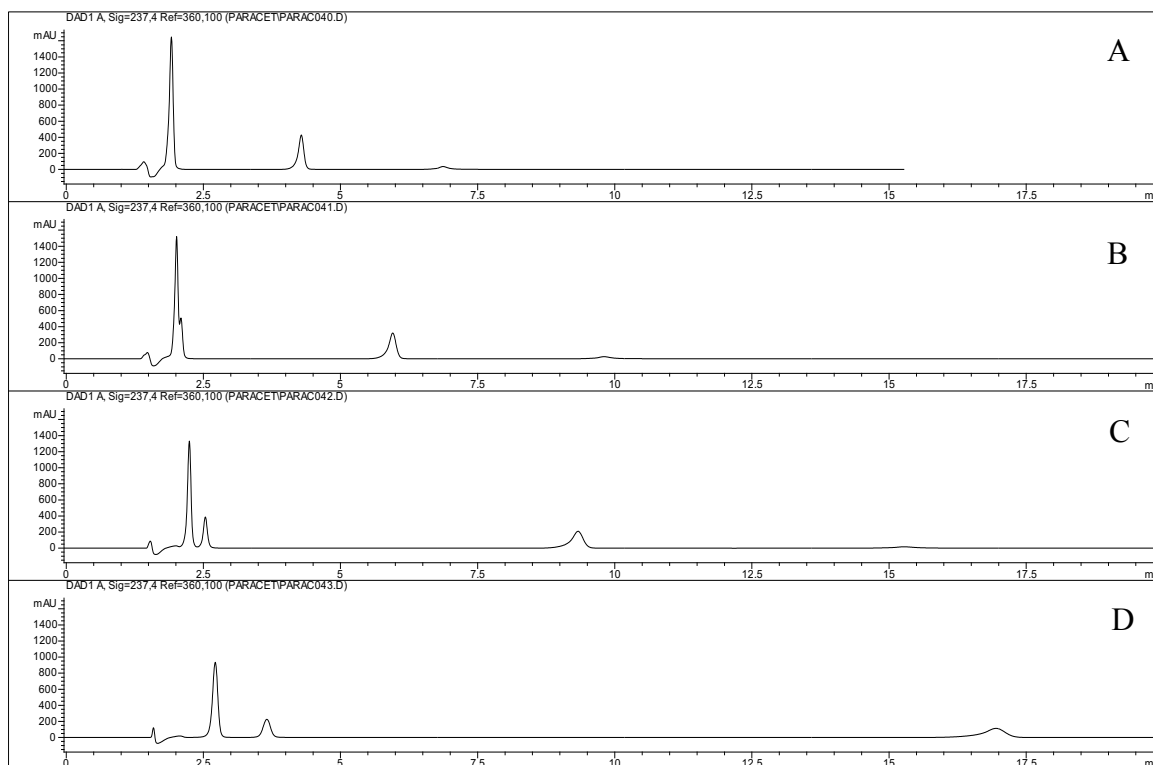
Iz dobivenih kromatograma se može vidjeti da primjenom fosfatnog pufera nije postignuta zadovoljavajuća simetrija kromatografskih pikova kao niti njihovo razdvajanje. Naime, dva pika (paracetamol i kofein) koja izlaze između 1,5 i 2 minute nisu dovoljno dobro razdvojeni uz ove uvjete.

Stoga je u daljnjim ispitivanjima ponovno korištena kombinacija acetonitrila i vode uz dodatak 0,1% mravlje kiseline. Na primjeru acetilsalicilne kiseline, kao analita koji eluira posljednji, ispitani su različiti omjeri acetonitrila i vode kako bi se utvrdilo ukupno trajanje analize (slika 9.).



Slika 9. Utjecaj udjela vode u mobilnoj fazi na vrijeme zadržavanja acetilsalicilne kiseline. *Uvjeti analize: kolona Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu$ m. Temperature kolone 25 °C. Mobilna faza sastava voda:acetonitril:mravlja kiselina = 70:30:0,1, v/v (slika A), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 75:25:0,1, v/v (slika B), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 80:20:0,1, v/v (slika C), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 85:15:0,1, v/v (slika D). Brzina protoka 1,5 ml/min. Valna duljina detekcije 237 nm.*

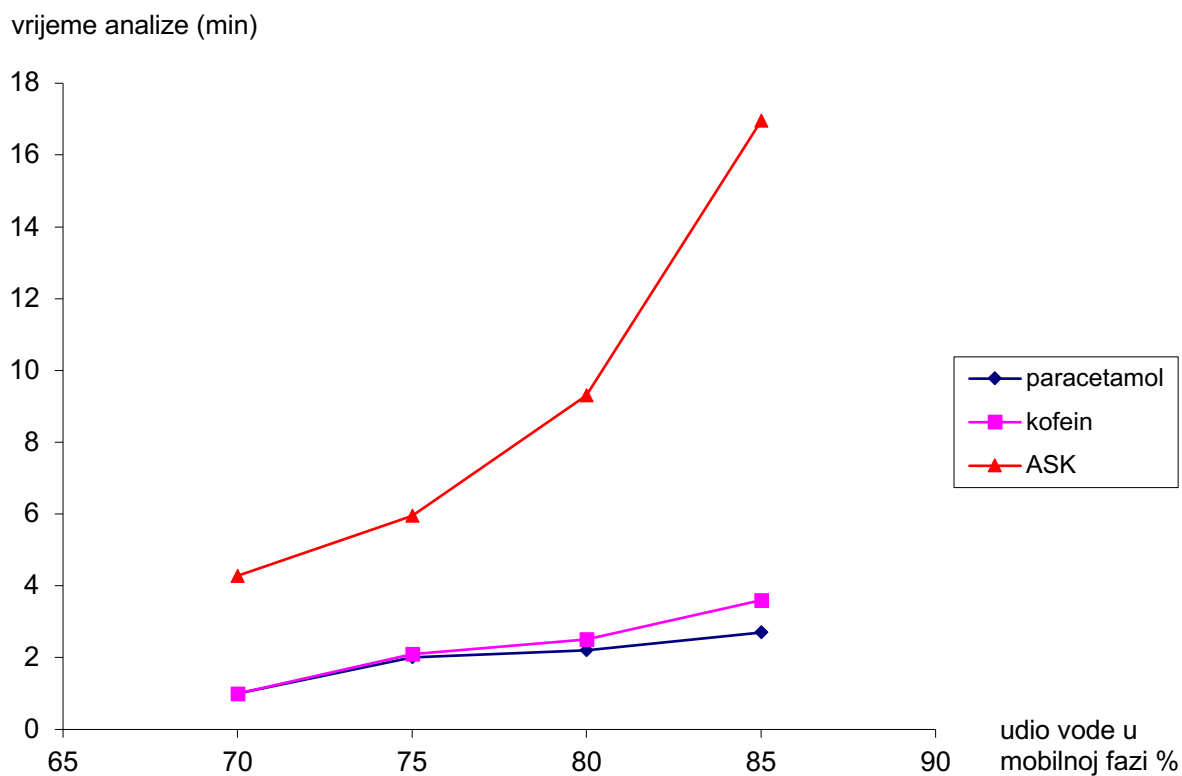
Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da povećanjem udjela vode raste vrijeme zadržavanja acetilsalicilne kiseline. To nije neočekivano, s obzirom da je acetilsalicilna kiselina pri ovim uvjetima analize nedisocirana te se zato povećavanjem polarnosti mobilne faze ona više zadržava na koloni. U bočicu za uzorke u kojoj se nalazila acetilsalicilna kiselina dodali smo zatim paracetamol i kofein te izmjerili njihova vremena zadržavanja uz mobilne faze istih udjela vode kao za samu acetilsalicilnu kiselinu (slika 10.).



Slika 10. Utjecaj udjela vode u mobilnoj fazi na razdvajanje kromatografskih pikova i njihovo vrijeme zadržavanja. *Uvjeti analize: kolona Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$ . Temperature kolone 25 °C. Mobilna faza sastava voda:acetonitril:mravlja kiselina = 70:30:0,1, v/v (slika A), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 75:25:0,1, v/v (slika B), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 80:20:0,1, v/v (slika C), voda:acetonitril:mravlja kiselina = 85:15:0,1, v/v (slika D). Brzina protoka 1,5 ml/min. Valna duljina detekcije 237 nm.*

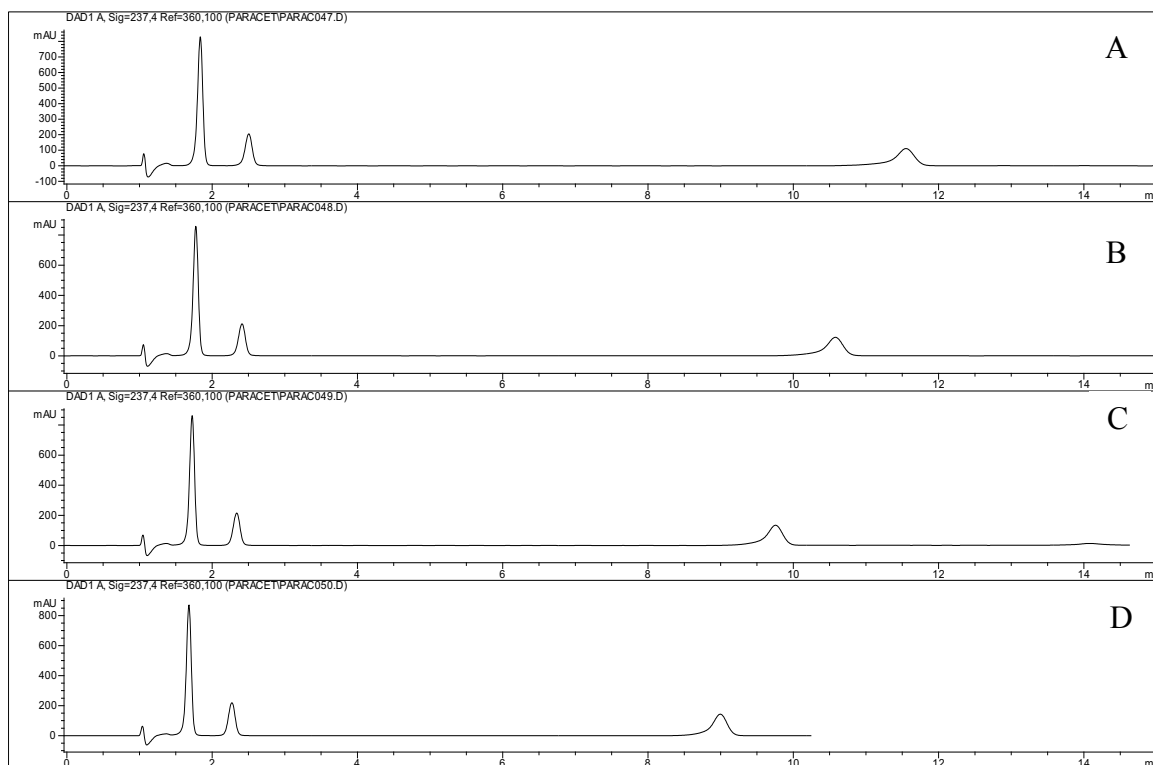
Iz ovih je kromatograma vidljivo da povećanjem udjela vode razdvajanje pikova paracetamola i kofeina postaje zadovoljavajuće. Međutim, pri optimalnom udjelu vode od 85%, vrijeme zadržavanja acetilsalicilne kiseline prelazi 17 minuta, što je predugo vrijeme trajanja analize za ispitivani uzorak kombiniranog gotovog ljekovitog oblika analgoantipiretika (slika 11.).





Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti vremena zadržavanja acetilsalicilne kiseline, paracetamola i kofeina o udjelu vode u mobilnoj fazi

Sljedeće na redu bilo je ispitati utjecaj temperature kolone na vrijeme zadržavanja analita. Ispitane temperature bile su 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C (slika 12.)



Slika 12. Kromatogrami izokratnih elucija mješavine standardnih otopina paracetamola, acetilsalicilne kiseline i kofeina u ovisnosti o različitim temperaturama. *Uvjeti analize: kolona Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm. Mobilna faza sastava voda:acetonitril:mravlja kiselina = 85:15:0,1, v/v. Brzina protoka 1,5 ml/min. Valna duljina detekcije 237 nm. Temperature kolone 25 °C (slika A), 30 °C (slika B), 35 °C (slika C), 40 °C (slika D).*

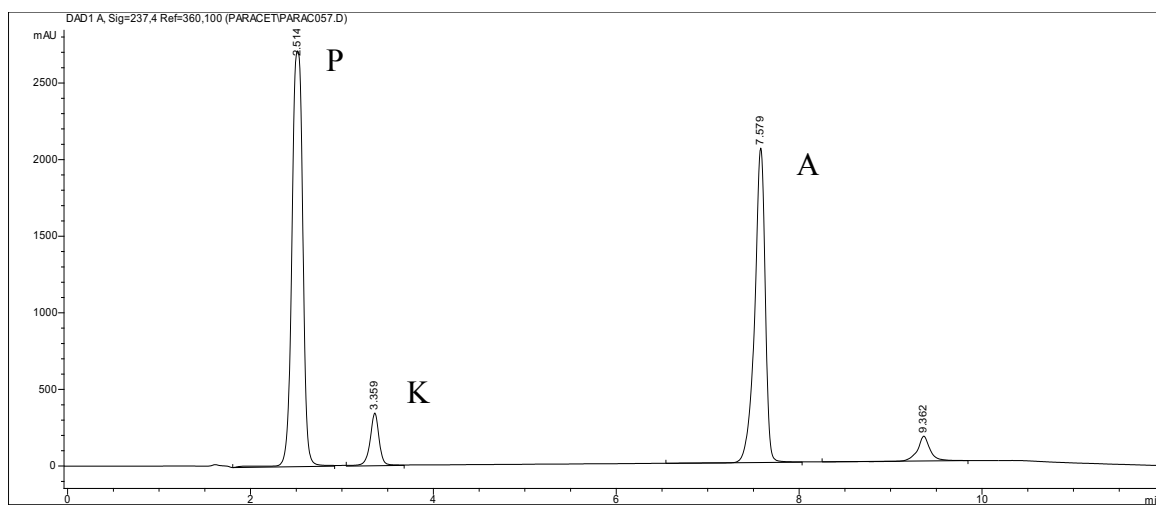
Kako je i bilo očekivano, porastom temperature opadaju vremena zadržavanja analita zbog bržeg gibanja molekula. Samim time, veze između analita i stacionarne faze postaju slabije te analiti prije izađu iz kolone i bivaju detektirani. Utjecaj temperature može se dokazati van't Hoffovom jednadžbom:

$$\ln k' = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R + \ln (1/\beta)$$

gdje je  $k'$  faktor zadržavanja analita na stacionarnoj fazi,  $\Delta H^0$  i  $\Delta S^0$  standardna entalpija i standardna entropija prijenosa otopljene tvari iz pokretne na stacionarnu fazu,  $R$  je univerzalna plinska konstanta, a  $\beta$  omjer volumena mobilne i stacionarne faze. Porastom temperature direktno opada vrijednost prirodnog logaritma faktora zadržavanja analita, čime

se analit kraće zadržava u koloni (Luterotti, 2013.). Za daljnja mjerenja izabrana je temperatura od 40 °C na kojoj su pikovi supstancija simetrični, dobro odijeljeni te je vrijeme analize prihvatljivo ( $t < 10$  min).

Predložena metoda primijenjena je na realnom uzorku tablete Kofedona. Uzorak je pripremljen prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.3 te analiziran pri brzini protoka 1,5 mL/min, temperaturi od 40 °C te sastavu mobilne faze voda:acetonitril:mravlja kiselina = 15:85:0,1, v/v (slika 13.).



Slika 13. Kromatogram uzorka tablete Kofedona pri optimalnim uvjetima. P = pik paracetamola, K = pik kofeina, A = pik acetilsalicilne kiseline. *Uvjeti analize: kolona Symmetry C18, 150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu$ m, temperatura kolone 40 °C, mobilna faza sastava voda:acetonitril:mravlja kiselina = 85:15:0,1, v/v. Brzina protoka 1,5 ml/min. Valna duljina detekcije 237 nm.*

Iz priloženog kromatograma može se zaključiti da je metoda uspješno primijenjena za analizu gotovog ljekovitog oblika tablete analgoantipiretika s tri djelatne tvari, paracetamolom, kofeinom i acetilsalicilnom kiselinom. Predmet daljnjih istraživanja bit će validacija predložene novorazvijene kromatografske metode.

Na kromatogramu je također uočljiv kromatografski pik  $t = 9,362$  min. Pretpostavka je da je riječ o salicilnoj kiselini, koja nastaje hidrolizom acetilsalicilne kiseline.

## 5. ZAKLJUČCI

Koristeći metodu tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uspješno su određeni optimalni uvjeti za istovremenu analizu paracetamola, acetilsalicilne kiseline i kofeina u gotovim lijekovima.

Imajući na umu karakteristike svake pojedinačne supstance, eluensa koji su činili mobilne faze i korištene kolone, ispitani su različiti uvjeti analize te doneseni sljedeći zaključci:

- a) Mobilna faza sastava metanol i voda uz dodatak fosfatnog pufera i pH vrijednosti 2,61 nije pokazala zadovoljavajuće rezultate. Naime, povećanje udjela vode u sastavu mobilne faze nije rezultiralo zadovoljavajućim razdvajanjem kromatografskih pikova paracetamola i kofeina na baznoj liniji. Osim samog razdvajanja, ni simetrija pikova, napose paracetamola, nije bila zadovoljavajuća.
- b) Kombinacija vode i acetonitrila pokazala se dobrom za istovremenu analizu spomenutih analita, dajući pikove zadovoljavajuće simetrije. Pri udjelu vode 85% razdvajanje među analitima je bilo odgovarajuće. Međutim, vrijeme analize pri takvom sastavu mobilne faze i temperaturi od 25 °C bilo je predugo ( $t > 17$  min).
- c) Utvrđeno je da povećanje temperature doprinosi skraćivanju vremena analize. Temperatura koja se pokazala optimalnom je 40 °C, jer je pri toj temperaturi vrijeme analize iznosilo manje od 10 minuta, dok je razdvajanje između pikova paracetamola i kofeina (kao kritičnog čimbenika) bilo i dalje zadovoljavajuće.

Optimalni uvjeti predložene kromatografske metode za istovremenu analizu paracetamola, kofeina i acetilsalicilne kiseline su brzina protoka 1,5 mL/min, temperatura od 40 °C te sastav mobilne faze voda:acetonitril:mravlja kiselina = 85:15:0,1, v/v.

Novorazvijena HPLC-DAD metoda uspješno je primijenjena na uzorku tablete Kofedona koje sadrže paracetamol, acetilsalicilnu kiselinu i kofein te je prikladna za analizu gotovog lijekovitog pripravka.

## 6. LITERATURA

1. Acetylsalicylic Acid, Toxnet HSDB Full Record, 2008., <http://toxnet.nlm.nih.gov>, pristupljeno 16.8.2018.
2. Aspirin 500 mg tablete. Sažetak opisa svojstava lijeka, 2018, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno 24.8.2018.
3. Baza lijekova, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno 23.8.2018.
4. Cadavid AP. Aspirin: the mechanism of action revisited in the context of pregnancy complications. *Front Immunol*, 2017, 8, 261, doi: 10.3389/fimmu.2017.00261.
5. Caffeine, Toxnet HSDB Full Record, 2014., <http://toxnet.nlm.nih.gov>, pristupljeno 23.8.2018.
6. Chromophore Definition, <http://chemistry.tutorvista.com>, pristupljeno 24.8.2018.
7. DrugBank Acetaminophen, [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca), pristupljeno 14.8.2018.
8. DrugBank Caffeine, [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca), pristupljeno 23.8.2018.
9. Factsheet: The European Pharmacopoeia – Ensuring the safety and good quality of medicines, 2018, [www.edqm.eu](http://www.edqm.eu), pristupljeno 19.8.2018.
10. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern Pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, 2013, 201-232
11. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2016. godini, [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr), pristupljeno 25.8.2018.
12. Kofedon tablete protiv bolova, Uputa za uporabu, [www.gljz.hr](http://www.gljz.hr), pristupljeno 31.8.2018.
13. Lipton, R. B., Diener, H.-C., Robbins, M. S., Garas, S. Y., & Patel, K. Caffeine in the management of patients with headache. *J Headache Pain*, 2017, 18(1), 107.
14. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, 6. izdanje. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2013, str. 215-221.
15. Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova, Zagreb, 2015.
16. Paracetamol Compound Summary CID 1983, [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), pristupljeno 14.8.2018.
17. Tanne J. Paracetamol causes most liver failure in UK and US. *BMJ: Brit Med J*. 2006, 332(7542):628.

18. Watson DG. *Pharmaceutical Analysis – A textbook for Pharmacy students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh, Harcourt Publishers Limited, 1999, str. 249-250.
19. World Health Organization – *Index of Pharmacopoeias*, 2004, [www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 19.8.2018.
20. Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M, Pysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol*, 2016, 131-142.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### **Razvoj HPLC-DAD metode za istovremenu analizu odabranih analgoantipiretika u kombiniranim ljekovitim oblicima**

Antipiretici i analgetici jedni su od najprodavanijih i najkorištenijih OTC lijekova u ljekarnama. Koriste se za liječenje tegoba glavobolja, zubobolja, bolova lokomotornog sustava i snižavanje povišene temperature. Postoje različite kombinacije antipiretika i analgetika uz dodatak tvari kao što su kofein i askorbinska kiselina.

Cilj rada bio je razviti HPLC-DAD metodu za istovremenu analizu paracetamola, acetilsalicilne kiseline i kofeina kao farmaceutskih sastojaka koje dolaze u kombiniranim ljekovitim oblicima dostupnim na tržištu. Za analizu je korištena Symmetry (Waters) C18 kolona, 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ . Tijekom razvoja metode ispitani su različiti sastavi mobilne faze pri različitim brzinama protoka (0,8 – 1,5 mL/min) i različitim temperaturama analize (25 – 40 °C). Optimalnom se pokazala izokratna elucija uz mobilnu fazu u sastavu acetonitril:H<sub>2</sub>O:HCOOH = 15:85:0,1, v/v pri brzini protoka 1,5 mL/min i temperaturi od 40 °C na valnoj duljini 237 nm. Ova jednostavna i brza metoda (10 min) je uspješno primijenjena za istovremenu analizu sva tri sastojka u gotovom ljekovitom obliku.

## **Development of HPLC-DAD method for simultaneous analysis of selected analgoantipyretics in combined medicinal products**

Antipyretics and analgesics are one of the best-selling OTC products found in pharmacies. They are used to treat headache, toothache, pains in locomotory system and to lower elevated body temperature. There are many products containing antipyretics and analgesics with substances like caffeine and ascorbic acid.

The aim of this thesis was to develop HPLC-DAD method for simultaneous analysis of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine as pharmaceutical ingredients of combined products available on the market. Symmetry (Waters) C18 column, 150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m was used for the analysis. During method development, several different mobile phases were tested, at different flow rates (0.8 – 1.5 mL/min) and different column temperatures (25 – 40 °C). The optimal conditions were the mobile phase containing acetonitrile:water:formic acid = 15:85:0.1, v/v, isocratic elution, flow rate of 1,5 mL/min and the column temperature of 40 °C. Detection was performed at 237 nm wavelength. This simple and fast method (10 min) was successfully applied for the simultaneous analysis of all three pharmaceutic ingredients in combined drug product.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### RAZVOJ HPLC-DAD METODE ZA ISTOVREMENU ANALIZU ODABRANIH ANALGOANTIPIRETIKA U KOMBINIRANIM LJEKOVITIM OBLICIMA

**Bruno Rački**

#### SAŽETAK

Antipiretici i analgetici jedni su od najprodavanijih i najkorištenijih OTC lijekova u ljekarnama. Koriste se za liječenje tegoba glavobolja, zubobolja, bolova lokomotornog sustava i snižavanje povišene temperature. Postoje različite kombinacije antipiretika i analgetika uz dodatak tvari kao što su kofein i askorbinska kiselina.

Cilj rada bio je razviti HPLC-DAD metodu za istovremenu analizu paracetamola, acetilsalicilne kiseline i kofeina kao farmaceutskih sastojaka koje dolaze u kombiniranim ljekovitim oblicima dostupnim na tržištu. Za analizu je korištena Symmetry (Waters) C18 kolona, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm. Tijekom razvoja metode ispitani su različiti sastavi mobilne faze pri različitim brzinama protoka (0,8 – 1,5 mL/min) i različitim temperaturama analize (25 – 40 °C). Optimalnom se pokazala izokratna elucija uz mobilnu fazu u sastavu acetonitril:H<sub>2</sub>O:HCOOH = 15:85:0,1, v/v pri brzini protoka 1,5 mL/min i temperaturi od 40 °C na valnoj duljini 237 nm. Ova jednostavna i brza metoda (10 min) je uspješno primijenjena za istovremenu analizu sva tri sastojka u gotovom ljekovitom obliku.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 26 stranica, 13 grafičkih prikaza i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: analgoantipiretici, HPLC, kromatografija

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Živka Juričić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### DEVELOPMENT OF HPLC-DAD METHOD FOR CONCOMINANT ANALYSIS OF SELECTED ANALGOANTIPYRETICS IN COMBINED MEDICINAL PRODUCTS

**Bruno Rački**

#### SUMMARY

Antipyretics and analgesics are one of the best-selling OTC products found in pharmacies. They are used to treat headache, toothache, pains in locomotory system and to lower elevated body temperature. There are many products containing antipyretics and analgesics with substances like caffeine and ascorbic acid.

The aim of this thesis was to develop HPLC-DAD method for simultaneous analysis of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine as pharmaceutical ingredients of combined products available on the market. Symmetry (Waters) C18 column, 150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  was used for the analysis. During method development, several different mobile phases were tested, at different flow rates (0.8 – 1.5 mL/min) and different column temperatures (25 – 40 °C). The optimal conditions were the mobile phase containing acetonitrile:water:formic acid = 15:85:0.1, v/v, isocratic elution, flow rate of 1,5 mL/min and the column temperature of 40 °C. Detection was performed at 237 nm wavelength. This simple and fast method (10 min) was successfully applied for the simultaneous analysis of all three pharmaceutic ingredients in combined drug product.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 26 pages, 13 figures and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: analgoantipyretics, HPLC, chromatography

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasmina Lovrić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.

