

STUDIUM STABILITY *p*-AMINOFENOLU JAKO DOMINANTNÍHO ROZKLADNÉHO PRODUKTU PARACETAMOLU

LENKA HANYŠOVÁ, PETR KASTNER
a JIŘÍ KLIMEŠ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Hanysova@faf.cuni.cz

Došlo 5.9.03, přijato 26.9.03.

Klíčová slova: HPLC, *p*-aminofenol, fotostabilita, derivatizace

Úvod

Paracetamol (*N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid) je hodnotné nesteroidní léčivo světově užívané při bolestech hlavy, zad a při redukci horečky u bakteriálních či virových infekcí¹⁻³.

V současné době jsou kladeny vysoké požadavky na stabilitu léčiv, se kterou úzce souvisí i čistota. Mezi nejčastější rozkladné reakce v tekutých lékových formách patří hydrolytické štěpení esterové a amidické vazby. Ze stabilitních studií paracetamolu je patrné, že paracetamol v roztoku podléhá alkalické i kyselé hydrolyze vazby N-C, viz. schéma 1 (cit.⁴⁻⁶). Koshy a Lach zkoumali vliv různého pH na hydrolytický rozklad paracetamolu v roztoku, který byl temperován na 70 °C po dobu 20, 40, 60, 80 a 90 hodin. Při pH 2 a 9 byl roztok temperován na 80 a 90 °C a spektrofotometrické stanovení bylo ovlivněno změnou zbarvení díky oxidačním produktům *p*-aminofenolu⁷. Čistá substance paracetamolu je poměrně stabilní i při teplotě 45 °C, ale přítomnost *p*-aminofenolu i v malých koncentracích způsobuje charakteristické barevné změny substance od růžové přes hnědou až na černošedou⁸⁻¹⁰.

p-Aminofenoly se totiž dlouhodobým vystavením na vzduchu a světle ochotně oxidují na chinony, chinoniminy a semi-chinoniminy^{8,9}.

Stabilitou *p*-aminofenolu v 50% methanolu a v 0,5% kyselině octové po dobu 24 a 48 hodin se zabýval Bloomfield, vzorky byly skladovány za laboratorních podmínek z dosahu přímého slunečního světla¹¹.

V této práci byl sledován vliv teploty, světla a UV záření na stabilitu *p*-aminofenolu.

Ačkoli je paracetamol látkou široce užívanou, jejíž používání je vžito i v mnoha volně prodejných přípravcích, při předávkování či enzymatické indukci aktivity hepatálního cytochromu P450 může docházet ke kumulaci toxických metabolitů paracetamolu, které mohou způsobit velmi

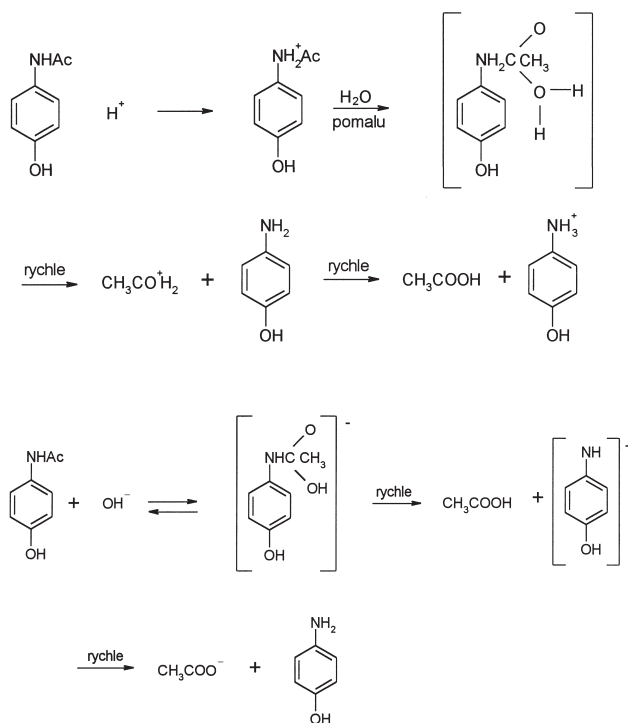


Schéma 1. Mechanismus kyselé a alkalické hydrolyzy paracetamolu

vážné poškození jater. Jeho toxicitou, metabolismem a stabilitou se zabývá řada prací¹²⁻¹⁹. Hlavní příčinou jeho toxicity je jeho metabolit a zároveň jeho hlavní rozkladný produkt, *p*-aminofenol.

Jeho toxicita je běžnou příčinou akutního jaterního selhání a to vede k hlubokému nabourání fyziologických funkcí a je charakterizováno vasoplegií, encefalopatií a koagulopatií. Je běžně komplikováno renálním selháním, mozkovým edémem a multiorgánovou disfunkcí. Mortalita je vysoká a pacienti často vyžadují služby víceoborových specialistů na intenzivní péči a transplantaci jater²⁰.

S ohledem na riziko spojené s jeho přítomností v léčivých přípravcích byla zaměřena pozornost na jeho stanovení ve velmi nízkých koncentracích. K tomu byla vypracována vhodná metodika HPLC za použití derivatizace volné aminoskupiny.

Experimentální část

Chemikálie

p-Aminofenol, dansylchlorid, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl chlorid, *o*-ftaldialdehyd, 2-sulfanylethanol (Sigma Aldrich), kyselina fosforečná, kyselina boritá, hydroxid sodný, ethanol p. a., acetonitril p. a., methanol p. a., kyselina octová p. a. (Lachema a. s.), destilovaná voda.

Separace *p*-aminofenolu

K separaci *p*-aminofenolu byly použity kolony Symmetry:

1. s reverzní fází C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm a jako mobilní fáze byla použita methanol/0,6 % CH₃COOH (5–15 : 95–85, v/v), průtoková rychlost byla 1,2 ml.min⁻¹.
2. s reverzní fází C8, 250 × 4,6 mm, 5 μm a v tomto případě byla zkoušena mobilní fáze methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v) a průtoková rychlost byla 0,8 ml.min⁻¹. Dále byla zkoušena mobilní fáze acetonitril/voda (80 : 20, v/v), průtoková rychlost byla 0,9 ml.min⁻¹.

Chromatografické záznamy byly měřeny při vlnových délkách 282 nm – absorpční maximum *p*-aminofenolu a 243 nm – absorpční maximum oxidačního produktu *p*-aminofenolu. Vzorky byly nastříkány na kolonu v objemech 10 μl. Separace probíhala při teplotě 25 °C.

Při zjišťování fotostability *p*-aminofenolu v roztoku byla použita UV lampa (Camag, Switzerland) s nastavenou vlnovou délkou 254 nm, intenzita záření byla 1200 μW.cm⁻².

Roztok *p*-aminofenolu byl v křemenné baňce.

Hodnocení *p*-aminofenolu

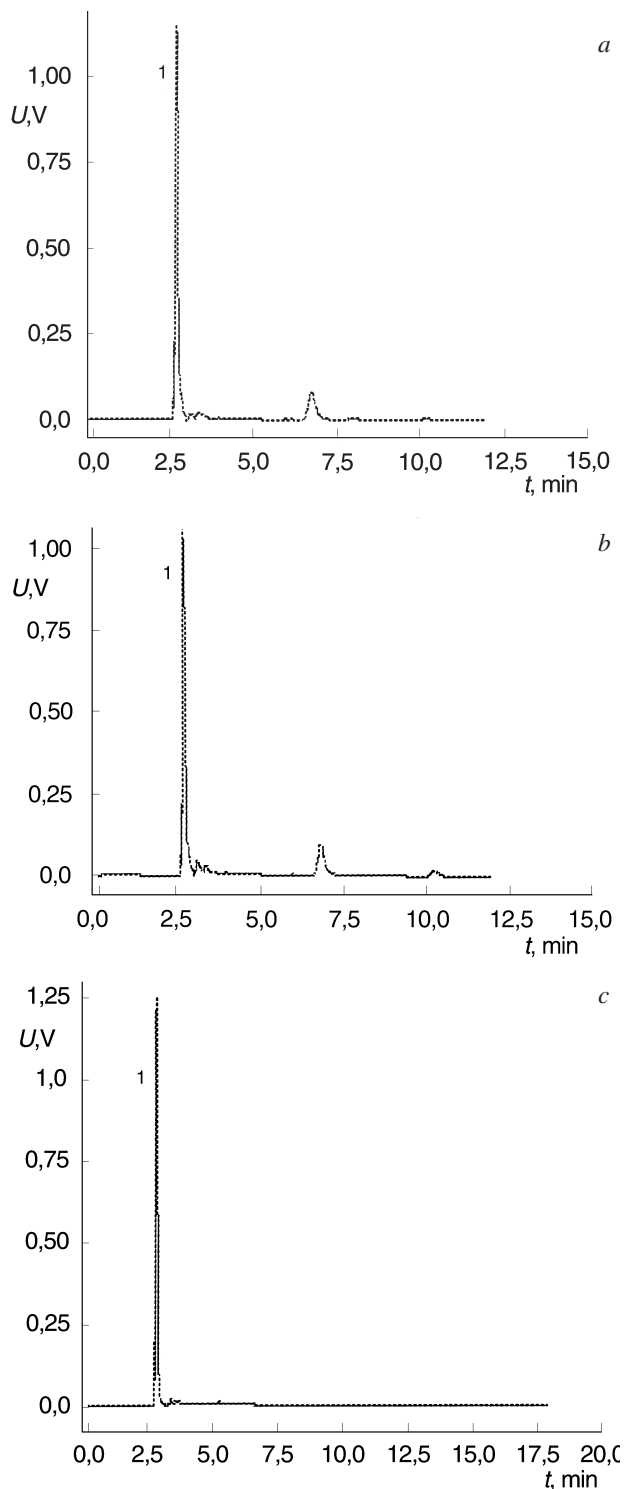
K hodnocení derivátu *p*-aminofenolu byla použita kolona Separon SGX s reverzní fází C 18, 250 × 4,6 mm, 7 μm a jako mobilní fáze byla použita methanol/voda (60 : 40, v/v) s upravenou hodnotou pH na 7,40 pomocí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH. Průtoková rychlost byla 0,9 ml.min⁻¹.

Chromatografické záznamy derivátu byly měřeny fluorescenčním detektorem při excitačním maximu 333 nm a emisní maximum bylo 450 nm. Vzorky byly nastříkány v objemech 20 μl. Separace probíhala při teplotě 20 °C.

Použité přístroje byly součástí sestavy HPLC firmy SHIMADZU: System kontroler SCL-10A_{VP}, UV-VIS detektor SPD-10A_{VP}, fluorescenční detektor RF-10AXL, pumpa LC-10AD_{VP}, low pressure gradient flow control valve FCV-10AL_{VP}, on-line degasser DGU-14A, pec pro kolonu CTO-10AS_{VP}, PC Pentium III s chromatografickým softwarem Class-VP.

Výsledky a diskuse

Při zjišťování vhodných chromatografických podmínek pro hodnocení *p*-aminofenolu jsme použili delší kolonu 250 mm s reverzní fází C8, přičemž mobilní fáze obsahovala menší podíl organické složky, abychom docílili prodloužení retenčních faktorů alespoň do 3. minuty. Při použití mobilní fáze acetonitril/voda (80 : 20, v/v) byl retenční čas *p*-aminofenolu 1,9 min a byla horší reprodukovatelnost při kvantifikaci *p*-aminofenolu než při použití mobilní fáze methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v). Pro ověření selektivity této metody pro separaci *p*-aminofenolu a jeho oxidačních produktů bylo provedeno měření i při vlnové délce 243 nm, což bylo absorpční maximum oxidačních produktů *p*-aminofenolu. Tyto rozkladné produkty měly odlišné retenční charakteristiky než *p*-aminofenol.



Obr. 1. Chromatografický záznam analýzy *p*-aminofenolu v roztoku 50% methanolu; a) po 48 h při laboratorní teplotě za nepřístupu světla, b) po 48 h působení UV záření, c) po 48 h při 7 °C. Podmínky analýzy: kolona s reverzní fází C8, 250 × 4,6 mm, 5 μm a jako mobilní fáze byla použita směs methanol/0,02 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (30 : 70, v/v) a průtoková rychlost byla 0,8 ml.min⁻¹, detekce při 282 nm. Pík č. 1 – *p*-aminofenol

Bylo provedeno hodnocení HPLC obsahu *p*-aminofenolu v roztoku 50% methanolu při různém skladování, viz obr. 1a, b, c.

Obsah *p*-aminofenolu byl zjišťován metodou vnějšího standardu, který byl čerstvě připraven, jen v případě hodnocení fotostability působením UV záření o vlnové délce 254 nm byl použit jako vnější standard roztok *p*-aminofenolu

Tabulka I
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) při 7 °C, bez přístupu světla

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	199,98	99,99
1	199,76	99,87
4,5	199,29	99,64
24	195,12	97,56
31	193,55	96,78
46	191,07	95,54
75	185,95	92,98
96	181,68	90,84
125	173,22	86,61
148	166,58	83,29
168	157,66	78,83
199	147,84	73,92
219	139,16	69,58
293	135,78	67,89

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

Tabulka II
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) ve tmě při 20 °C

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	198,89	99,45
2,5	197,52	98,75
3	197,01	98,50
7	193,9	96,59
15	189,76	94,87
21	185,82	92,91
25	183,15	91,57
47	174,54	87,27
57	170,37	85,18
76	166,10	83,05
110	163,90	81,95
125,5	155,30	77,65
148	143,66	71,83
196	130,58	65,29
220	116,50	58,25

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

uchovávaný při 7 °C. V případě, že byl roztok uchovávaný při 7 °C v lednici, během dvanácti dnů byl sledován úbytek *p*-aminofenolu až na 67,89 %, viz tabulka I.

Dále byl roztok ponechán bez světla při laboratorní teplotě a byl sledován úbytek *p*-aminofenolu po dobu deseti dnů až na 58,25 %, viz tabulka II. Fotolytický rozklad byl sledován po dobu 48 hod, viz tabulka III.

Tabulka III
Úbytek *p*-aminofenolu v methanolickém roztoku (0,2 mg.ml⁻¹) působením UV záření

Čas [h]	<i>c</i> [μg.ml ⁻¹] ^a	Obsah <i>p</i> -aminofenolu ^b [%]
0	199,99	99,99
7	192,04	96,02
22,5	179,84	89,92
24	179,55	89,77
31	174,06	87,03
32	170,92	85,46
34	169,39	84,69
48	158,34	79,17

^a Aktuální koncentrace, ^b obsah v % vzhledem k vnějšímu standardu

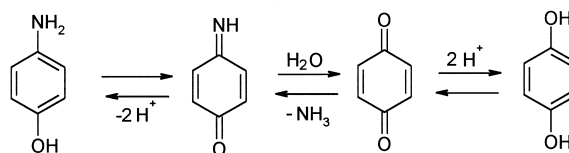
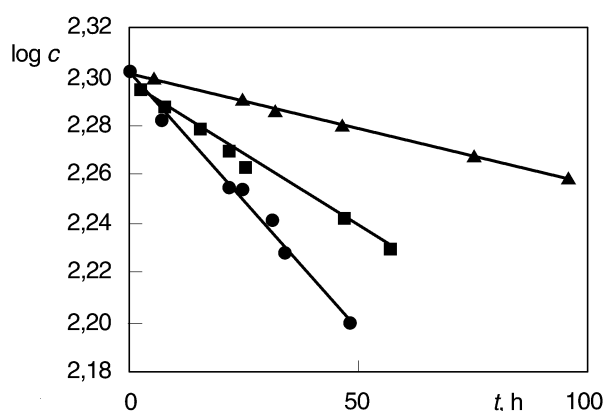


Schéma 2. Mechanismus oxidace *p*-aminofenolu ve vodných roztocích

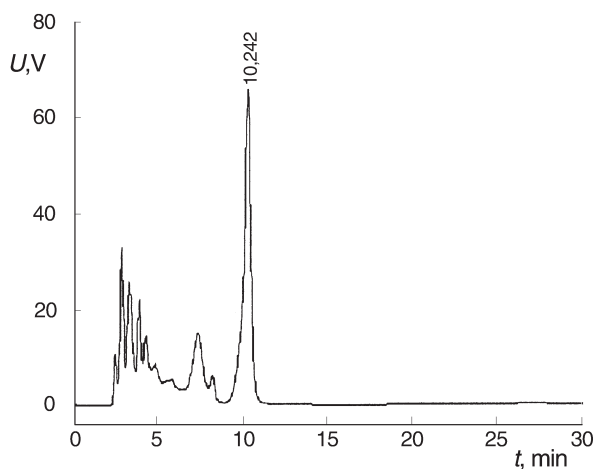
Nestabilitu *p*-aminofenolu v roztoku zachycuje reakční schéma 2 (cit.²¹).

Na základě zjištěných hodnot koncentrace nerozloženého *p*-aminofenolu v čase odběru vzorku byly vypočteny kinetické charakteristiky oxidačního procesu v tom časovém úseku, kdy byly závislosti hodnot log *c* na čase lineární. Tento časový úsek vyjadřuje graf na obr. 2.

Pro zvýšení citlivosti byla zkoušena derivatizace *p*-aminofenolu. K derivatizaci byla použita derivatizační činidla – dansylchlorid, 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid a *o*-ftaldialdehyd. V prvních dvou případech byl *p*-aminofenol v acetonitrilu s nadbytkem činidla zahříván pod zpětným chladičem 30, 40 a 60 min na teplotu 60 °C. Po odfoukání acetonitrilu pod dusíkem a po rozpuštění zbytku v mobilní fázi byly vzorky nastříkované na kolonu s reverzní fází C 18, kterou protékala mobilní fáze methanol/ 0,05 mol.l⁻¹ H₃PO₄ (50 : 50, v/v) rychlostí 0,8 ml.min⁻¹. Měření probíhalo při vlnové délce 220 nm. Z hlediska separace byly tyto chromatografické podmínky optimální, ale nepodařilo se optimalizovat podmínky derivatizace tak, aby reakce probíhala kvantitativně a reprodukovatelně. Proto bylo použito k derivatizaci další činidlo, *o*-ftaldialdehyd.



Obr. 2. Závislost logaritmu koncentrace *p*-aminofenolu v methanickém roztoku na čase; standard v lednici – rychlostní konstanta $k = 9,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, vzorek ve tmě $k = 2,745 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, vzorek pod UV lampou $k = 4,769 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 ● UV lampa, ■ bez přístupu světla a při laboratorní teplotě, ▲ 7 °C, bez přístupu světla



Obr. 3. Chromatografický záznam analýzy derivátu *p*-aminofenolu ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podmínky analýzy: kolona Separon SGX s reverzní fází C 18, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$ a jako mobilní fáze byla použita methanol/voda ($60 : 40, \text{ v/v}$) s upravenou hodnotou pH na 7,40 pomocí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaOH}$. Průtoková rychlost byla $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Vzorky byly měřeny při excitačním maximu 333 nm a emisní maximum bylo 450 nm. Pík s retenčním časem 10,24 min vyjadřuje derivát a všechny píky do osmé minuty pocházejí z činidla.

Při přípravě derivatizačního činidla se vycházelo z literatury²². 30 mg *o*-ftaldialdehydu bylo rozpuštěno v 0,5 ml ethanolu a po přidání 20 μl 2-sulfanyethanolu byl obsah doplněn borátovým pufrem o hodnotě pH 8,5 na 5 ml. Tento zásobní roztok byl naředěn borátovým pufrem dvacetkrát.

Vzorky pro analýzu byly připraveny tak, že 0,5 ml roztoku činidla bylo doplněno do 2 ml methanického roztoku

kem *p*-aminofenolu tak, aby výsledné koncentrace *p*-aminofenolu byly 4; 1; 0,5; 0,25; 0,125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Reakce činidla s *p*-aminofenolem probíhala 60 s za intenzivního třepání těsně před nástřikem vzorku na kolonu. Byla zkoušena mobilní fáze methanol : H_2O v různém poměru o hodnotě pH od 3,6 až 7,5. S nárůstem organické složky v mobilní fázi se snižoval retenční čas a při vyšším pH mobilní fáze se také retenční čas posouval k nižším hodnotám, což bylo vzhledem k nízké stabilitě derivátu výhodné. Při hodnotě pH 6,6 byl retenční čas derivátu 33 min a při pH 7,4 už jen 11 min, což se ukázalo jako optimální, protože doba analýzy byla dostatečně krátká a zároveň byl nadbytek derivatizačního činidla dobře separován od produktu derivatizace, viz obr. 3.

Pro výpočet detekčního limitu byla sestrojena kalibrační křivka potvrzující linearitu v koncentračním rozmezí $0,125\text{--}10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s korelačním koeficientem $R = 0,9998$. Detekční limit pro stanovení *p*-aminofenolu byl $1,00554 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Práce byla vypracována za podpory výzkumného záměru MSM 111600001.

LITERATURA

- Mohamed F. A., Abdullah M. A., Shammatt S. M.: *Talanta* 44, 61 (1997).
- Reynolds J. (Ed.): *Martindale 31. Royal Pharmaceutical Society*. London 1996.
- Rodenas V., García M. S.: *Talanta* 52, 517 (2000).
- Thompson D. C., Perera K., London R.: *Drug Metab. Dispos.* 24, 866 (1996).
- Noble M., Clough G. F.: *Hepatology Nutrition* 4, 58 (2001).
- Song H., Chen T. S.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 34 (2001).
- Yoshida R., Oikawa S., Ogawa Y., Miyakoshi Y.: *Mutat. Res.* 415, 139 (1998).
- Hahn J. H., Quinn J. F (Monsanto Chemical Co.): U. S. 3,042,719 (Cl. 260–562).
- Carmel G. W., Angelis J. (Warner-Lambert Pharmaceutical Co.): U. S. 2,998,450 (Cl. 260–562).
- Florey K. (Ed): *Analytical profiles of drug substances 3*. Academic Press, New York 1974.
- Bloomfield M. S.: *Talanta* 58, 1301 (2002).
- Weeks B. S., Gamache P., Klein N.W., Hinson J.A., Bruno M., Khairallah E.: *Teratog., Carcinog., Mutagen.* 10, 361 (1990).
- Ray S. D., Kamendulis L. M., Gurule M. W., Yorkin R. D., Corcoran G. B.: *FASEB J.* 7, 453 (1993).
- Ellis E. F., Dodson L. Y., Police R. J.: *J. Neurosurg.* 75, 774 (1991).
- Dimova S., Stoytchev T.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 311 (1994).
- Bonkovsky H. L., Kane R. E., Jones D. P., Galinsky R. E., Banner B.: *Hepatology* 19,1141 (1994).

17. James R. C., Harbison R. D., Roberts S. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118, 159 (1993).
18. Prasad J. S., Chen N. Q., Liu Y. X., Goon D. J., Holtzman J. L.: *Biochem. Pharmacol.* 40, 1989 (1990).
19. Shizuka Haruo: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 57 (1969).
20. Shizuka Haruo: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 52 (1969).
21. J. Zhang, S. Yao, L. Nie, W. Wei: *J. Anal. Sci.* 16, 87 (2000).
22. www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/AMK/OPA_other.htm, staženo.

L. Hanyšová, P. Kastner, and J. Klimeš (*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of*

Pharmacy, Charles University, Hradec Králové): **Study of Stability of 4-Aminophenol as Dominant Decomposition Product of Paracetamol**

An HPLC method for determination of very low concentrations of 4-aminophenol was elaborated, and the kinetics of its decomposition at low temperatures and at laboratory temperature in the absence of light or under irradiation at 254 nm were compared. To increase the sensitivity of the method, derivatization of 4-aminophenol with various reagents was tested. Phthalaldehyde proved to be the best; its reaction at laboratory temperature in the presence of 2-sulfanylethanol is very fast. The derivatization conditions were optimized.