



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÉHO NESTEROIDNÍHO ANTIFLOGISTIKA – IBUPROFENU V LÉČIVECH POMOCÍ UV/VIS A FTIR SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF CONTENT OF SELECTED NONSTEROIDAL ANTIPHLOGISTIC – IBUPROFEN IN  
DRUGS USING UV/VIS AND FTIR SPECTROMETRY

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jiří Lindovský

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1523/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Jiří Lindovský**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu vybraného nesteroidního antiflogistika – Ibuprofenu v léčivech pomocí UV/Vis a FTIR spektrometrie

### Zadání bakalářské práce:

Stanovit obsah Ibuprofenu ve vybraných léčivech pomocí UV/Vis a ATR–FTIR spektrometrie.  
Navrhnout a optimalizovat stanovení Ibuprofenu v lékových formách pomocí spektrometrických metod.  
Provést literární rešerši na zadané téma.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Jiří Lindovský  
student(ka)

-----  
Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Hlavním cílem bakalářské práce bylo stanovení obsahu nesteroidního antiflogistika v léčivech pomocí spektrometrických metod a následné porovnání výsledků. Konkrétně se práce zaměřuje na ibuprofen, používající se hlavně jako analgetikum a antipyretikum. Tato účinná látka byla vybrána díky své významné schopnosti absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové a infračervené oblasti. Pro tyto účely byla vybrána různá generická léčiva s obsahem ibuprofenu, která byla analyzována pomocí molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Důležitým faktorem, ovlivňujícím chemometrické charakteristiky získaných výsledků byla také optimalizace metod. Po navržení postupu práce byly z lékových forem obsahujících ibuprofen připraveny roztoky vzorků pomocí vhodného rozpouštědla, a tyto vzorky byly následně spektrometricky analyzovány. Z naměřených UV/Vis a FTIR spekter byl pomocí metody standartního přídatku vypočten obsah ibuprofenu v jednotlivých vzorcích. Z výsledků vyplývá, že vhodnější metodou pro stanovení obsahu ibuprofenu se zdá být infračervená spektrometrie. Nicméně je nutné podotknout, že velmi záleží na typu použitého extrakčního činidla. Získané informace z této bakalářské práce by mohly posloužit při budoucích rutinních kontrolách a monitorování léčiv.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ibuprofen, UV/Vis spektrometrie, infračervená spektrometrie, validace, generika

## **ABSTRACT**

The main aim of bachelor thesis was to validate the content of the nonsteroidal antiphlogistic in drugs using spectrometric methods and subsequent comparison of results. Specifically, the thesis is focused on ibuprofen, which is used mainly as analgesic and antipyretic. This substance was chosen for its significant ability of absorbing electromagnetic radiation in ultraviolet and infrared regions of spectra. For this purpose, various generics were selected and analyzed by molecular absorption spectrometry (UV/Vis) and infrared spectrometry with Fourier transform (FTIR). Very important factor influencing chemometric properties of the obtained results was optimization of the spectrometric methods. After designing the working procedure, sample solutions were prepared from ibuprofen-containing dosage forms using suitable solvent and these samples were analyzed spectrometrically. The content of ibuprofen in individual samples was calculated from the measured UV/Vis and FTIR spectra using method of standard addition. The results show that infrared spectrometry seems to be more suitable method for determining the ibuprofen content. Nevertheless, it should be noted that the choice of a suitable extractant is very important step in the determination. The information obtained from this bachelor's thesis could be used in future routine inspections and monitoring of drugs.

## **KEY WORDS**

Ibuprofen, UV/Vis spectrometry, infrared spectrometry, validation, generics

LINDOVSKÝ, Jiří. *Stanovení obsahu vybraného nesteroidního antiflogistika – ibuprofenu v léčivech pomocí UV/Vis a FTIR spektrometrie*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123842>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Stanovení obsahu vybraného nesteroidního antiflogistika – ibuprofenu v léčivech pomocí UV/Vis a FTIR spektrometrie jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Jiří Lindovský

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za odbornou pomoc, vedení, trpělivost a cenné rady, které mi při vypracovávání této bakalářské práce věnoval.

Dále bych rád poděkoval mé rodině a všem v mém okolí za čas a podporu, kterou mi poskytli při psaní této bakalářské práce.

# OBSAH

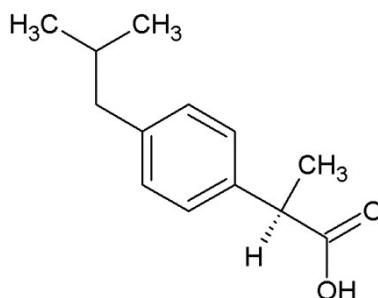
<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÉ ZÁKLADY</b> .....	<b>9</b>
1.1 Historie ibuprofenu.....	9
1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti ibuprofenu.....	9
1.3 Syntéza ibuprofenu.....	10
1.4 Farmakologie.....	13
1.5 Farmakokinetika a mechanismus účinku.....	14
1.6 Metabolismus.....	14
1.7 Lékové formy a generika ibuprofenu.....	15
1.8 Lékové formy ibuprofenu ve formě kapslí a prášků.....	15
1.8.1 <i>Brufen</i> .....	15
1.8.2 <i>Ibalgin</i> .....	15
1.8.3 <i>Nurofen</i> .....	16
1.8.4 <i>APO-Ibuprofen</i> .....	16
1.9 Lékové formy ibuprofenu ve formě čípků.....	16
1.9.1 <i>Nurofen čípky</i> .....	16
1.10 Lékové formy ibuprofenu ve formě suspenze a sirupu.....	16
1.10.1 <i>Nurofen pro děti Jahoda suspenze 200ml</i> .....	16
1.10.2 <i>Ibalgin Junior</i> .....	17
1.11 Lékové formy ibuprofenu ve formě gelů a mastí.....	17
1.11.1 <i>Dolgit</i> .....	17
1.11.2 <i>Ibalgin krém/gel</i> .....	17
1.12 Nečistoty ibuprofenu.....	17
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>19</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
3.1 Použité chemikálie.....	23
3.2 Použité přístroje a vyhodnocovací programy.....	23
3.3 Příprava kalibračních roztoků pro UV/Vis spektrometrii.....	23
3.4 Příprava vzorků tablet pro UV/Vis spektrometrii.....	24
3.5 Měření UV/Vis spekter kalibračních roztoků a vzorků tablet.....	24
3.6 Příprava kalibračních roztoků pro FTIR spektrometrii.....	25
3.7 Příprava vzorků Ibalginu a Ibuprofenu pro FTIR analýzu.....	26

3.8	Příprava vzorků suspenze Nurofenu pro děti pro FTIR analýzu.....	26
3.9	Měření FTIR spekter kalibračních roztoků a vzorků tablet a suspenze .....	27
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>28</b>
4.1	Stanovení obsahu ibuprofenu pomocí UV/Vis spektrometrie.....	28
4.2	Stanovení obsahu ibuprofenu pomocí ATR-FTIR spektrometrie .....	29
4.2.1	<i>Výsledky optimalizace nanesení vzorku na ATR krystal .....</i>	<i>29</i>
4.2.2	<i>Kvalitativní analýza standardu ibuprofenu.....</i>	<i>29</i>
4.2.3	<i>Kvantitativní analýza ibuprofenu v lékových formách tablet a suspenze</i>	<i>30</i>
4.2.4	<i>Porovnání UV/Vis a FTIR spektrometrie pomocí krabicových grafů.....</i>	<i>32</i>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....</b>	<b>40</b>

## ÚVOD

Ibuprofen je známé léčivo, které bylo syntetizováno v 50. letech minulého století výzkumným týmem společnosti Boots Pure Drug Company pod vedením Dr. Stewarta Adamse. Užívá se především jako analgetikum (k tlumení bolesti) a antipyretikum (ke snižování horečky). Mezi pacienty je především znám jako lék ulevující od bolesti při artritidě. Ibuprofen se vyskytuje v mnoha lékových formách pod různými obchodními značkami. Většina těchto lékových forem je dostupná bez lékařského předpisu v lékárnách od roku 1984. Právě tato volná dostupnost na trhu může vést k nadměrnému užívání léčiv obsahující ibuprofen pacienty. Toto nadužívání může především způsobovat chronické obtíže spojené s gastrointestinálním traktem (GIT) a vylučovací soustavou. Lékové formy ibuprofenu zatěžují hlavně játra, střeva, žaludek, slinivku a ledviny. Mimo jiné by zvláštní pozornost k užívání ibuprofenu měli věnovat pacienti, kteří jsou léčeni pomocí Warfarinu a jiných léčiv upravujících srážlivost krve. Je obecně známo, že ibuprofen má antikoagulační účinky, a proto je v přímé kontraindikaci s výše zmíněnými antikoagulanty. Podle výzkumu vědců z McGill University and the Centre Hospitalier de l'Université de Montreal také zvyšuje riziko srdečního selhání o 48 %.

Z chemického hlediska se jedná o derivát kyseliny propionové. Čistý ibuprofen je obvykle tvořen svými dvěma izomerními formami tzn. R a S konfigurací. Obrázek 1 ukazuje jeho chemickou strukturu a název podle IUPAC [1].



Obrázek 1 *Strukturní vzorec ( $\pm$ ) -2-(4-isobutylfenyl)propionové kyseliny (ibuprofen)*

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení obsahu ibuprofenu v běžně dostupných léčivech pomocí molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Pro studium obsahu ibuprofenu byla vybrána následující běžně dostupná léčiva: Ibuprofen®, Ibalgin® a Nurofen pro děti®. Rovněž si tato bakalářská práce klade za cíl ověřit vhodnost použitých spektrometrických metod pro kvantitativní stanovení této účinné látky.



# 1 TEORETICKÉ ZÁKLADY

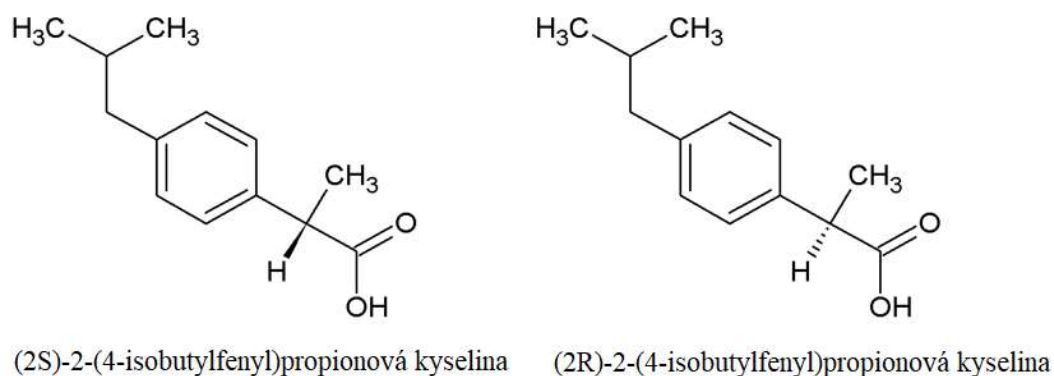
## 1.1 Historie ibuprofenu

Látka byla objevena týmem Dr. Stewarta Adamse v 50. letech 20. století a syntetizována byla Dr. Johnem Nicholsonem. V roce 1961 byly testovány její protizánětlivé účinky na Morčeti domácím (*Cavia aperea f. porcellus*) a v únoru toho roku byl ve Spojeném království udělen patent. Hlavním cílem týmu Dr. Adamse bylo vyvinout bezpečnější a šetrnější alternativu k Aspirinu. Tzn. látku bez gastrointestinálních účinků, a také bez závažných nepříznivých účinků fenylobutazonu a kortikosteroidů. Nejdříve bylo týmem připraveno několik stovek látek a u některých z nich se protizánětlivé účinky potvrdily [12]. Nicméně většina z těchto léků měla velmi negativní vliv na organismus, a proto byl po rozsáhlém screeningu vybrán právě ibuprofen, který sice nebyl nejúčinnější z vybraných látek, ale vykazoval nejnižší toxicitu. Akutní toxicita ibuprofenu (LD50) se u myši při perorálním podání pohybuje okolo  $800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Lék se dále vyvíjel a v roce 1999 proběhly testy ibuprofenu u pacientů s revmatickou artritidou a bezpečnost léku byla potvrzena v klinické studii, jenž se zúčastnilo více než 19 tisíc pacientů [2]. V dnešní době se stały léčiva s obsahem této účinné látky nejběžněji dostupnými, a proto jsou první volbou pacientů k mírnění projevů chřipky, nachlazení a různých bolestivých stavech jako je pulpitida, artritida aj.

## 1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti ibuprofenu

Z chemického hlediska je to bezbarvá, krystalická pevná látka, která je omezeně rozpustná ve vodě, kdy rozpustnost této účinné látky byla stanovena při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  na  $2,1 \cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Tato látka je velmi dobře rozpustná v polárních i nepolárních rozpouštědlech, jako je např. chloroform, dichlormethan, diethylether, aceton a methanol. Jak již bylo zmíněno výše, toto nesteroidní antiflogistikum je opticky aktivní sloučenina, a proto je v lékových formách přítomna ve dvou izomerních formách R(-) a S(+), z nichž *dexibuprofen* vykazuje vyšší biologickou aktivitu v porovnání s pravotočivou formou R(-) [25]. Rozdíl v jejich asymetrii prostorového uspořádání ukazuje Obrázek 2.



Obrázek 2 R a S izomery ibuprofenu

Léčivo je syntetizováno jako racemická směs, což znamená, že obsahuje levotočivý i pravotočivý enantiomer. Předpokládá se, že po požití léčiva R-enantiomer podlehně rozsáhlé konverzi na S-enantiomer in-vivo aktivitou alfa-methylacyl-CoA racemázy. Tato skutečnost

ale doposud nebyla přímo dokázána. Odborná literatura uvádí, že mezi izomery není výrazný rozdíl v biologické aktivitě, nicméně lze říct, že S-enantiomer vykazuje o něco vyšší biologickou aktivitu [3]. Sumární vzorec ibuprofenu je  $C_{13}H_{18}O_2$  a jeho molekulová hmotnost se udává jako  $206,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . S hodnotou disociační konstanty  $pK_a = 5,3$  látka vykazuje spíše kyselý charakter [5].

### 1.3 Syntéza ibuprofenu

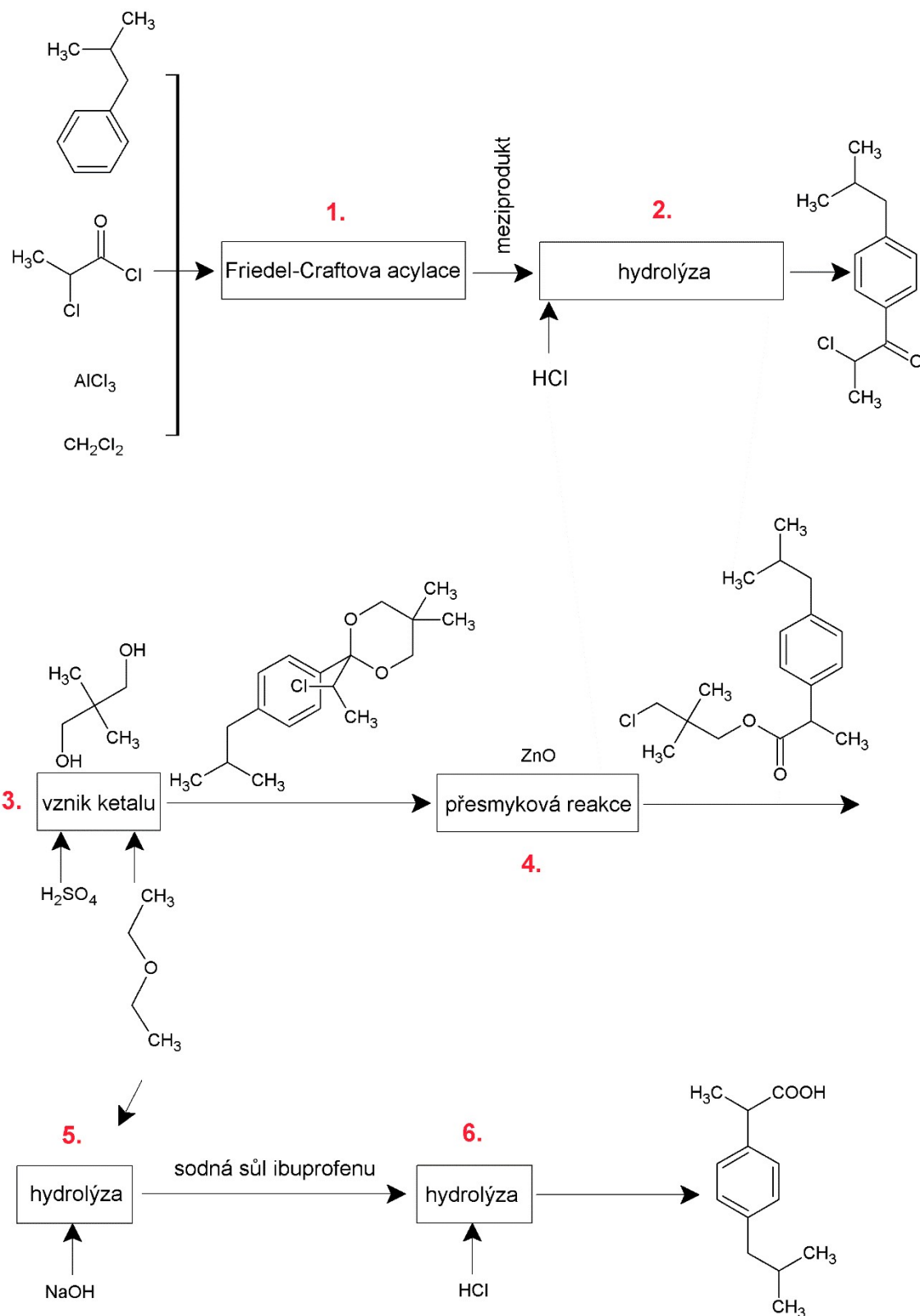
V 60. letech 20. století byla příprava a syntéza ibuprofenu patentována britskou farmaceutickou společností Boots, která tuto syntézu vyvinula jako šestistupňový proces. Prvním krokem průmyslové výroby ibuprofenu je Friedel-Craftsova acylace. Výchozími sloučeninami této reakce jsou isobutylbenzen a chloropropionylchlorid, které jsou rozpuštěny v dichlormethanu za přítomnosti  $AlCl_3$  jako katalyzátoru. Byly otestovány i jiné halogenidy, ale použití chloridu hlinitého vedlo k větším výtěžkům. Po Friedel-Craftsově acylaci už se postupy k získání ibuprofenu mohou různě modifikovat [4]. V druhém kroku následuje hydrolyza vzniklého meziprojektu v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové při  $pH \sim 3$  za vzniku 1-chlorethyl-4-butylbenzen ketonu. V dalším kroku reaguje tento meziprojekt s neopentylglykolem v prostředí diethyletheru. Vznik surového ketalu je katalyzován prostřednictvím kyseliny sírové, přičemž je vzniklý produkt několikrát promyt vodou. Následuje reakce, kdy je ester ibuprofenu produkován katalytickým přesmykem pomocí oxidu zinečnatého při teplotě reaktoru  $135\text{--}160 \text{ }^\circ\text{C}$ . V dalším kroku je ester ibuprofenu hydrolyzován pomocí roztoku NaOH za vzniku sodné soli ibuprofenu. Žlutá surová sůl ibuprofenu je přečištěna pomocí aktivního uhlí a nečistoty jsou odstraněny pomocí průmyslové centrifugy. V posledním kroku je sodná sůl ibuprofenu převedena na ibuprofen okyselením roztoku pomocí koncentrovaného roztoku HCl. Jinými slovy je karboxylová skupina protonována  $H^+$  ionty. Schéma průmyslové výroby ibuprofenu podle společnosti Boots® je znázorněno na Obrázku 3 [13].

Ma a kol. ve své práci poukázal na skutečnost, že v případě navrženého postupu výroby ibuprofenu podle farmaceutické společnosti Boots® je silně zatěžováno životní prostředí. V případě této šestikrokové syntézy je hlavním environmentálním rizikem vznik velkého množství nežádoucích produktů o poměrně vysoké toxicitě. Z tohoto důvodu je výroba ibuprofenu z ekonomického hlediska velmi nákladná, jelikož samotná syntéza v sobě zahrnuje i ekologické nakládání s těmito nežádoucími látkami. V dnešní době je kladen důraz na ekologicky efektivnější farmaceutickou výrobu, kde hlavními hodnotícími kritérii jsou emise skleníkových plynů a nežádoucí látky vzniklé při výrobě produktu [14].

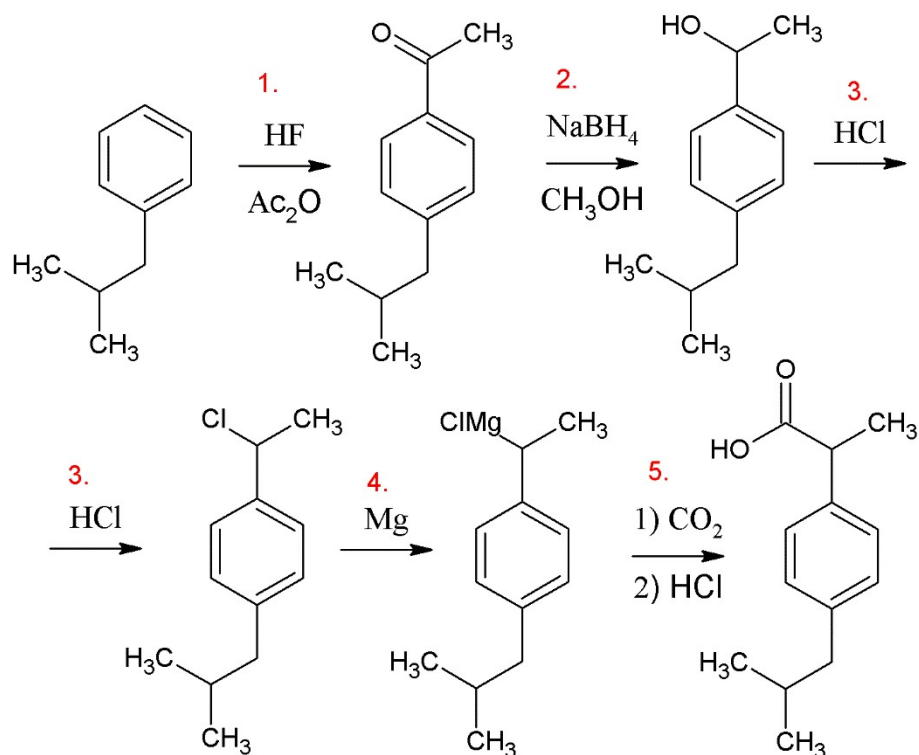
V roce 1992 vyvinula farmaceutická společnost BHC® novou z environmentálního hlediska udržitelnou syntézu ibuprofenu, která snížila počet reakčních kroků na polovinu (viz. Obrázek 4). V prvním reakčním kroku je jako katalyzátor použit bezvodý fluorovodík, který je následně recyklován a znovu použit ve výrobě. Tato farmaceutická společnost uvádí, že toto reakční schéma snižuje množství nežádoucích odpadů na minimum v důsledku vzniku pouze jedné molekuly vody jako vedlejšího produktu. Tato syntéza ibuprofenu je odbornou společností označována jako „zelená“ resp. *environmental friendly* [15].

Na tuto ekologicky vhodnou syntézu se pokusili navázat Kilburg & Tyler, jejichž reakční schéma se skládá z pěti reakčních kroků. V prvním kroku reaguje isobutylbenzen s acetanhydridem při Friedel-Craftsových acylačních podmínkách za vzniku

p-isobutylacetofenonu. Následně je tato sloučenina redukována pomocí  $\text{NaBH}_4$  v prostředí MeOH, kdy je keto-skupina nahrazena hydroxylovou funkční skupinou. V dalším reakčním kroku byla alkoholová skupina nahrazena chlorem pomocí nukleofilní substituce za  $\text{H}^+$  podmínek. Pomocí Grignardova činidla a oxidu uhličitého byl na meziproduct zaveden karboxylátový anion, který byl následnou protonací převeden na  $-\text{COOH}$  funkční skupinu. V tomto reakčním kroku vzniká molekula ibuprofenu [15].



Obrázek 3 Příprava ibuprofenu Friedel-Craftovou acylací podle společnosti Boots



Obrázek 4 Pětistupňová syntéza dle Kilburg & Tylera

Reakčních schémat přípravy či farmaceutické výroby ibuprofenu je v odborných publikacích prezentována celá řada, avšak hlavním kritériem vhodnosti syntézy je její ekonomická a environmentální nenáročnost.

## 1.4 Farmakologie

Lékové formy obsahující aktivní látku ibuprofen jsou dnes v určitých koncentracích dostupné bez lékařského předpisu, a proto jsou běžně k dostání v lékárnách a jiných obchodech, ať už máme na mysli obchodní řetězce, či čerpací stanice. Na tomto místě je nutné podotknout, že volný prodej léčivých preparátů ibuprofenu v sobě skrývá i jistá rizika spojená s nadužíváním těchto běžně dostupných antiflogistik. Na českém trhu je ibuprofen k dostání v tabletách a jiných lékových formách (viz. níže) s koncentrací od 200 do 800 mg, přičemž doporučená denní dávka je krátkodobě stanovena na 1200 mg·den<sup>-1</sup>. Tablety obsahující 200 mg ibuprofenu jsou určeny především pro těhotné ženy a v suspenzi také pro děti. Koncentrace 400 mg je obsažena v léčivech, které jsou volně dostupné na trhu a používají se při běžně se vyskytujících zdravotních obtížích. Je možné se setkat také s prášky o koncentraci 800 mg, nicméně tyto jsou vázány na lékařský předpis a v současné době nejsou na českém trhu dostupné.

Lék začíná působit 1 až 2 hodiny po užití a 24 hodin po poslední dávce je metabolickými dráhami zcela eliminován z těla. 99 % léku je extenzivně metabolizováno v játrech a jen malé množství projde tělem beze změny. Závisí ovšem také na zdravotním stavu pacienta [5].

Ibuprofen se na trhu prosadil díky vysoké účinnosti a nižší toxicitě, než vykazují jiná antiflogistika např. diclofenak. Jedno z možných využití ibuprofenu je například při zmírnění projevů revmatické artritidy a osteo-artritidy. Ve speciálních případech (u pacientů s pokročilým stádiem revmatoidní artritidy) jsou po odborném vyhodnocení pacientům

krátkodobě podávány vyšší denní dávky účinné látky. Například 2400 mg ibuprofenu denně vede k rychlému zlepšení dnové artritidy, ale bohužel byla u 10–33 % pacientů pozorována zvýšená žaludeční toxicita [5].

Lék se nejvíce uplatňuje při bolestech hlavy, horečkách a menstruačních bolestech. Koncentrace ibuprofenu ve volně prodejných lécích dokáže zmírnit bolesti. Nutné je také zmínit, že na tyto obvyklé potíže byla testována kombinace paracetamolu a ibuprofenu, která snížila horečku velmi rychle. Toto kombinované použití s paracetamolem ukázalo, že ibuprofen působí proti horečce silněji [5].

## 1.5 Farmakokinetika a mechanismus účinku

Ibuprofen patří mezi tzv. neselektivní inhibitory enzymu s názvem cyklooxygenáza (dále jen COX). Tento enzym je zodpovědný za syntézu prostaglandinů a také je důležitý pro přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), což je specifický druh prostaglandinů s průměrnou dobou života cca. 60-100 s. PGH<sub>2</sub> se dále přemění na biologicky aktivní prostaglandiny. Konečným výsledkem inhibice COX ibuprofenem je snížení tvorby prostaglandinů vlastním tělem [6].

Prostaglandiny tvořeny z PGH<sub>2</sub> jsou důležitými přenašeči pocitů a tělesných procesů, jako je bolest a horečka. Ke snížení horečky může dojít v důsledku působení na hypotalamus, které následně způsobí vazodilataci, zvýšený průtok periferní krve a rozptýlení tepla [6].

Ibuprofen má pozitivní účinky při léčbě akutních i chronických zánětů. V těle se vyskytují dvě formy cyklooxygenáz – COX-1 a COX-2. Tyto dva enzymy potlačují vznik prostaglandinů, a to vede k utlumení bolesti v postižených oblastech periferního a centrálního nervového systému [6].

Ibuprofen nachází své využití i ve stomatologii. Zde lokálně inhibuje produkci prostanoidů, zvyšuje antiedemickou aktivitu a hladinu plazmatických beta-endorfinů. Dále bylo potvrzeno, že ibuprofen snižuje produkci COX-2 v zubní buničině [6].

## 1.6 Metabolismus

Primární metabolismus ibuprofenu je oxidativní a důležitou roli zde hrají enzymy cytochromu P450 (CYP), které jsou důležité pro biotransformaci, detoxikaci, ale také bioaktivaci cizorodých látek v organismu. Hlavními látkami metabolismu ibuprofenu v lidském těle jsou karboxylové a hydroxylové deriváty ibuprofenu, které jsou vylučovány přednostně renálním systémem (ledvinami), přičemž již ztratily biologickou a farmakologickou aktivitu. Ibuprofen je lidským organismem téměř zcela metabolizován, ale i přesto, malé množství účinné látky zůstane během metabolismu nedotčeno a opouští tak tělo v nezměněné podobě [7].

V těle existují dvě metabolické dráhy založené na rozdílech mezi R a S enantiomery ibuprofenu. Metabolismus S-ibuprofenu je katalyzován hlavně enzymem CYP2C9, zatímco R-ibuprofen je více katalyzován enzymem CYP2C8. Samozřejmě se uplatňují i jiné enzymy z rodiny cytochromů, ale ve velmi malém množství a také záleží na koncentraci užitého ibuprofenu [7].

Metabolismus ibuprofenu probíhá velmi rychle v játrech za vzniku hlavních metabolitů, což jsou hydroxyderiváty a deriváty karboxylových kyselin. Jakmile je R-enantiomer

absorbován, 50–65 % podlehe rozsáhlé konverzi na aktivnější S-enantiomer působením alfa-methylacyl-CoA racemázy. K tomuto může dojít v tenkém střevě, anebo v jaterním parenchymu [7].

## 1.7 Lékové formy a generika ibuprofenu

Léčivá látka ibuprofen se používá v řadě komerčních léčivých přípravků a lékových forem. Může se jednat o lékové formy, jako jsou například potahované tablety, sirupy, gely a krémy. Na trhu jsou nejvíce zastoupená tzv. *generika*, které se komerčně objevují jako značkové s vlastní ochrannou známkou, nebo neznačkové, které obvykle používají jako označení zjednodušený název účinné látky. Na originální léčivo je většinou udělena patentová ochrana. Jedná se o léčivo, které je uvedeno na trh jako první svého druhu. Také může být uváděno jako inovativní léčivo. Naopak generické léčivo je vyráběno jako alternativa pro originální léčivo po vypršení jeho patentové ochrany [8]. V případě ibuprofenu je originálním léčivem tzv. Brufen a další léčiva; budou blíže popsány v subkapitolách 1.8 až 1.11; jsou jeho generikem. Jedná se o léčiva, která jsou všeobecně známa pod komerčním označením, jako je např. Ibalgin, APO-Ibuprofen, Nurofen, Dolgit atd.

## 1.8 Lékové formy ibuprofenu ve formě kapslí a prášků

### 1.8.1 Brufen

Brufen, jak již bylo výše zmíněno je originální léčivý přípravek obsahující léčivou látku ibuprofen. Jako první byl uveden na trh ve Velké Británii roku 1969. Je volně dostupný jako sirup, nebo potahované tablety s koncentrací ibuprofenu 400 mg. Tablety s vyšší koncentrací jsou v lékárně dostupné jen s lékařským předpisem. Používá se jako antirevmatikum, antipyretikum a také ke zmírnění bolesti. Užívání tohoto přípravku může působit negativně a vyvolávat nežádoucí účinky a rizika. Mezi ně patří například zvýšení rizika srdečních a mozkových cévních příhod, nebo může poškodit plodnost u žen. Dalšími nežádoucími účinky mohou být zažívací potíže, alergické reakce způsobené léčivou látkou, nebo jinou látkou obsaženou v léku jako plnivo (např. laktóza) [22].

### 1.8.2 Ibalgin

Nejznámějším z generických léčiv, která jsou alternativami k originálnímu léku je Ibalgin. Tento přípravek se vyrábí ve více lékových formách. Je možné zakoupit Ibalgin jako velmi známou růžovou potahovanou tabletu, krém, gel, nebo sirup pro děti. Tento lék se používá ke všem druhům bolesti, jako jsou například bolest hlavy, zubů a zad. Také jako v předchozím případě snižuje teplotu a užívá se jako doplňková léčba při chřipce. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou nauzea, zvracení, pálení žáhy, průjem, zácpa a nadýmání. Samozřejmě se mohou vyskytnout i nežádoucí účinky uvedené u Brufenu, ale tato možnost je vzácná [22].

V účinnosti lékových forem není velký rozdíl. Snad jen v použití. Na bolest svalů a kloubů je vhodné použít gel, nebo krém, který působí jen lokálně v oblasti postiženého místa. Účinnost tablety, nebo sirupu je v celém těle stejný, tzn., že pokud pacienta bolí hlava, tak ibuprofen v Ibalginu zmírní bolest, ale působí i na ostatní části těla. Sirup je vhodný pro malé děti a osoby, kterým není příjemné polykání tablet.

### 1.8.3 Nurofen

Tento léčivý přípravek je k dostání s koncentrací 200 mg, a proto je vhodný pro děti a kojící ženy. Zároveň se kvůli této nízké koncentraci ibuprofenu používá při mírných až středně silných bolestech hlavy a nezatěžuje tak metabolismus jako léčiva s vyšším obsahem této účinné látky. Pro dospělé a děti nad 12 let je doporučena denní dávka 6 tablet denně a pro děti od 6 do 12 let nejvýše 4 tablety denně [22].

Kromě ibuprofenu tableta obsahuje pomocné plnicí látky, kterými jsou sodná sůl kroskarmelosy, natrium-lauryl-sulfát, dihydrát citronanu sodného, kyselina stearová, koloidní bezvodý oxid křemičitý, sodná sůl karmelosy, mastek, arabská klovatina usušená rozprášením, sacharosa, oxid titaničitý, makrogol 6000, černý inkoust (šelak, černý oxid železitý (E 172), propylenglykol [22].

### 1.8.4 APO-Ibuprofen

V lékárnách také lze zakoupit APO-Ibuprofen a APO-Ibuprofen Rapid s koncentrací 400 mg ibuprofenu v tabletě. Rozdíl mezi těmito dvěma alternativami je ve formě. Klasický APO-Ibuprofen je ve formě potahovaných tablet a stejnojmenný přípravek s přívlastkem Rapid je tobolka, kdy je účinná látka spolu s pomocnými látkami obalena želatinou s částečně dehydratovaným sorbitolem. Tento obal zajišťuje rychlejší uvolnění účinné látky z tablety a tím i rychlejší nástup účinku [22].

Pomocné látky jsou podobné jako v předchozím případě. U tohoto přípravku se navíc přidává hlinitý lak oranžové žluti, který potahované tablety dodává oranžovou barvu [22].

## 1.9 Lékové formy ibuprofenu ve formě čípků

### 1.9.1 Nurofen čípky

Čípky určené pro děti od 2 do 6 let obsahují 125 mg účinné látky a používá se v případě, že lék nelze podávat ústy, nebo když pacient zvrací. Jak již bylo řečeno Nurofen pro děti čípky 125 mg by měly užívat pouze děti starší 2 let, s minimálním tělesnou hmotností 12,5 kg. Maximální celková denní dávka ibuprofenu je 20–30 mg na kilogram tělesné hmotnosti rozdělená do 3 až 4 dílčích dávek. Přípravek je určen k podání do konečníku [21].

## 1.10 Lékové formy ibuprofenu ve formě suspenze a sirupu

### 1.10.1 Nurofen pro děti Jahoda suspenze 200ml

Nurofen je také velmi známé a rozšířené léčivo s obsahem ibuprofenu. Tato práce se zaměřuje na Nurofen sirup, který byl analyzován pomocí infračervené spektroskopie. Tato bílá sirupovitá suspenze působí protizánětlivě a je určena primárně pro děti. Důvodem je snazší požití než v případě potahované tablety. Další výhodou tohoto přípravku je dobrá snášenlivost léku. To znamená, že nežádoucí účinky se projevují méně často než u ostatních lékových forem, které byly zmíněny výše [22].

Stejně jako Ibalgin Junior je tato suspenze určena dětem nad 6 let. Zatím nebyly provedeny žádné specifické farmakokinetické studie u dětí, ale literární data potvrzují, že absorpce, metabolismus a eliminace ibuprofenu u dětí postupuje stejným způsobem jako u dospělých.



### 1.10.2 Ibalgin Junior

Další dětskou variantou suspenze s obsahem ibuprofenu 40 mg na 1 ml je Ibalgin Junior. Přípravek je určen dětem nad 6 let s tělesnou váhou přesahující 20 kg a pomáhá utišit mírnou až středně silnou bolest a horečku až na 8 hodin [22].

Pomocnými látkami v tomto přípravku jsou nekystalizující sorbitol 70 %, disperzní celulóza, sodná sůl karmelosy, monohydrát kyseliny citronové, natrium-benzoát, chlorid sodný, malinové aroma, třešňové aroma, thaumatin, sukralosa, sodná sůl sacharinu, polysorbát 60 a růžový anthokyaninový extrakt [22].

Seznam následujících nežádoucích účinků sestává ze všech nežádoucích účinků, které se objevily během léčby ibuprofenem, včetně těch, které se vyskytly během léčby vysokými dávkami ibuprofenu u pacientů s revmatem.

## 1.11 Lékové formy ibuprofenu ve formě gelů a mastí

### 1.11.1 Dolgit

Další alternativou s obsahem ibuprofenu je Dolgit. Tento lék je volně prodejný jako krém a pro zakoupení tablet je nutný lékařský předpis. V současné době ale není možné zakoupit tento přípravek na českém trhu. Díky vysokému obsahu účinné látky (800 mg) je určen k léčbě dospělých osob. V podstatě se účinky neliší od již zmíněných léků. Přípravek Dolgit dále obsahuje sodnou sůl karboxymethylškrobu, hypromelosu 2910/3, koloidní bezvodý oxid křemičitý, kyselinu stearovou, mastek, mikrokrystalickou celulózu, potahovou soustavu Opadry Y-1-7000 bílá (hypromelosa, makrogol 400, oxid titaničitý) [22].

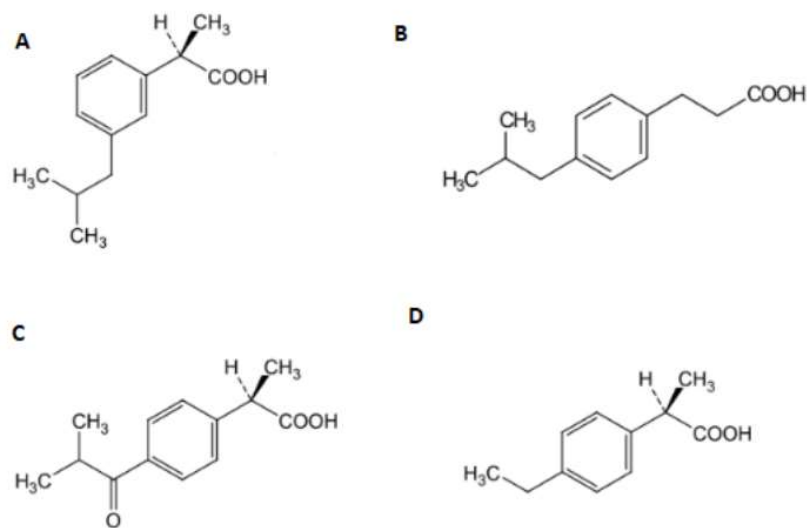
### 1.11.2 Ibalgin krém/gel

Tento přípravek je vhodný pro léčení místních projevů revmatických i nereumatických bolestivých stavů pohybového ústrojí jako jsou např. degenerativní onemocnění kloubů, povrchní žilní onemocnění a také k léčbě poúrazových stavů a následků sportovních úrazů jako jsou otoky, zhmoždění, podvrtnutí kloubu, poranění měkkých částí kloubů. V postiženém místě tlumí zánět, snižuje otok a potlačuje bolest. Používání gelu je vhodné i při celkové léčbě tabletami s obsahem ibuprofenu. Koncentrace účinné látky je 5 g ibuprofenu ve 100 g krému/gelu [21].

## 1.12 Nečistoty ibuprofenu

Nečistoty obsažené v ibuprofenu by mohly ovlivnit stanovení celkové koncentrace a dále při užívání léku s nadbytkem těchto nečistot by mohlo mít negativní vliv na lidský organismus. A proto Lékopis USA stanovil hranici koncentrace jednoho procenta nečistot v léku [9].

Mezi hlavní nečistoty v ibuprofenu patří například kyselina (2RS)-2-(3-isobutylfenyl)propanová (Obrázek 5A), kyselina 3-(4-isobutylfenyl)propanová (Obrázek 5B), kyselina (2RS)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová (Obrázek 5C) a kyselina (2RS)-2-(4-ethylfenyl)propanová (Obrázek 5D) a jejich enantiomery [9].



Obrázek 5 Nečistoty v ibuprofenu – převzato, upraveno [10]

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V několika předešlých desetiletích zaznamenal vývoj instrumentálních technik nebývalý rozvoj, který je především kladen na časovou nenáročnost a jednoduchost prováděných analýz jak z kvantitativního, tak i kvalitativního hlediska. V oblasti farmaceutického výzkumu, resp. průmyslové výroby můžeme tyto moderní instrumentální techniky rozdělit na separační a spektrometrické techniky. V případě separačních technik se především jedná o kapalinovou chromatografii, popřípadě o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii HPLC (High-performanceliquid chromatography). Tyto analytické metody jsou výhradně používány pro stanovení a separaci analytů, které se ve zkoumaném vzorku nacházejí ve směsi. V oblasti farmaceutického výzkumu se obvykle jedná o stanovení jednotlivých účinných látek ve směsi. Takovým příkladem může být např. stanovení kodeinu a paracetamolu v lékových formách, které tyto dvě substance obsahují (Talvosilen).

Spektrometrické metody můžeme rozdělit na dva základní typy a to, zda po absorpci elektromagnetického záření vzorkem je záření pouze absorbováno, anebo dochází k vyzáření přebytečné energie tzn. energie je vyzářena v podobě světla (emisního záření) zpravidla o vyšší vlnové délce. V případě spektrometrických metod, kdy dochází po interakci elektromagnetického záření se vzorkem pouze k absorpci záření mluvíme především o molekulové absorpční spektrometrii v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervené spektrometrii s Fourierovou transformací (FTIR), Ramanově spektrometrii a v neposlední řadě i fluorescenční spektrometrii v tzv. ustáleném stavu (steady-state).

Infračervená spektrometrie zaznamenala v několika málo letech ohromný rozvoj instrumentace. Jedná se zejména o zdokonalení používaných detektorů, měřitelných spektrálních oblastí (Far – vzdálenou infračervenou oblast a Nir – blízkou infračervenou oblast), děličů paprsků tzv. beamsplitrů, a především měřících technik, jako je ATR – technika zeslabeného úplného odrazu, DRIFT – difuzní reflektance a FTIR mikroskopie. FTIR mikroskopie umožňuje např. stanovení distribuce léčiva v objemu tablety, případně stanovení nežádoucích příměsí v tabletě.

Mallah a kol. se ve své práci zabývali simultánním stanovením obsahu ibuprofenu a paracetamolu v léčivech pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Dále se autoři pokusili navrhnout validační metodu, která by byla vhodná k ověření koncentrace těchto účinných látek v lékových formách, jako jsou tabletky a želatinové tobolky. Tato metoda by měla být použita pro rutinní kontrolu kvality ve farmaceutickém průmyslu. Pro získání kalibračních závislostí aktivních látek ve vzorku byly použity standardy ibuprofenu a paracetamolu o čistotě 99,9 hm. % dodávaných společností Sigma-Aldrich. Standardní látky a vzorky léčiv byly měřeny na FTIR spektrometru Nicolet 5700 v rozsahu vlnočtů  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  s rozlišením  $8\text{ cm}^{-1}$  a celkovým počtem akumulovaných skenů 32. Jako měřící technika byla autory vybrána transmisní metoda, tzn. technika KBr tablet. Kalibrační křivky aktivních látek byly připraveny pomocí lisování KBr tablet, kdy k předem vyžíhanému KBr (100 mg) byla přidána aktivní látka v rozmezí 0,001–1 mg. K měření pozadí (background) byla použita čistá KBr tableta. Obsah účinné látky byl stanoven ze spektrální oblasti  $1781\text{--}1683\text{ cm}^{-1}$  pro ibuprofen, která odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových skupinách a  $1630\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$ , která je výhradně připisována valenční symetrické vibraci C=O vazeb v sekundárních amidech pro paracetamol. Z výsledků je

zřejmé, že transmisní technika FTIR spektrometrie je vhodnou instrumentální technikou pro stanovení ibuprofenu a paracetamolu v lékových formách. Tyto závěry byly rovněž podpořeny vynikajícími hodnotami koeficientů  $R^2$  a přesností kalibračního modelu, který byl ověřen hodnotami střední kvadratické chyby křížové validace (RMSECV) [16].

Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Matkovic a kol., kteří se ve své práci zabývali stanovením ibuprofenu v následujících léčivech: Ibuzidine 400 mg, Ibu-evanol 200 mg, Sindol 600 mg a Ibupirac 400 mg. Koncentrace této účinné látky byla analyzována pomocí spektrometrických metod UV/Vis a FTIR. Kalibrační roztoky ibuprofenu byly připraveny z farmaceuticky čisté účinné látky, jež je dodávána společností Národní agenturou pro léčiva v Argentině. V případě infračervené spektrometrie byly roztoky standardů a vzorků měřeny pomocí transmisní techniky ve speciální kyvetě, jejichž optická dráha byla zhotovena z velmi málo IR-absorbujícího materiálu, tj.  $\text{CaF}_2$ . Pro vyhodnocení obsahu ibuprofenu v analyzovaných vzorcích byl použit absorpční pás při  $1721\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci  $\text{C}=\text{O}$  vazeb v karboxylových skupinách substituovaných na Ar-jádře. Autoři ve své práci uvádějí, že kvantifikace ibuprofenu v léčivých přípravcích pomocí FTIR spektrometrie splňuje požadavky na specifičnost, přesnost a robustnost, a proto je tato technika vhodná jako metoda pro kontrolu léčiv. Na základě zjištěných výsledků dále autoři uvádějí, že transmisní techniku založenou na měření roztoků ibuprofenu v  $\text{CHCl}_3$  lze s výhodou použít k spolehlivé kvantifikaci tohoto analytu. V porovnání s UV/Vis spektrometrií vykazovala infračervená spektrometrie z hlediska statistické analýzy lepších hodnot jako je pravdivostní koeficient  $R^2$ , detekční limit, relativní standardní odchylka a reprodukovatelnost [17].

Pokusem vyvinout úspornější metodu ke stanovení tablet obsahující paracetamol a ibuprofen se zabývala studie Nugrahani a kol. Tato práce byla zaměřena na použití infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Kalibrační křivky ibuprofenu a paracetamolu byly získány pomocí transmisního měření FTIR spekter KBr tablet. Tablety byly připraveny pomocí laboratorního lisu s pracovním tlakem  $10\text{--}20\text{ MPa}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Na základě kvalitativní analýzy absorpčních spekter byly vybrány FTIR pásy, které odpovídají specifické absorpci jednotlivých stanovovaných komponent (ibuprofen  $\times$  paracetamol). Koncentrace aktivních látek byla vyhodnocena jako plocha, resp. plošný integrál pod absorpčním pásem při specifické hodnotě vlnočtu. Transmisní infračervená spektra byla naměřena na FTIR spektrometru Jasco 4200 Type A. Obsah paracetamolu a ibuprofenu byl simultánně stanoven na základě 20-ti nezávislých měření tzn. z každé lékové formy bylo připraveno 20 vzorků KBr tablet. Analyzované tablety byly zváženy, namlety a zhomogenizovaný, aby stanovovaná látka byla rovnoměrně distribuována v celém objemu vzorku. KBr tablety byly připraveny smísením vzorku s předem vyžíhaným bromidem draselným, kdy celková hmotnost analyzovaného vzorku činila 100 mg. Absorpční infračervená spektra vzorků byla změřena při stejném nastavení spektrometru jako v případě měření kalibračních křivek IBU a ACT. Pro vyhodnocení koncentrace účinných látek v tabletách si autoři vybrali absorpční pásy v oblasti valenčních vibrací tj.  $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ . Pro stanovení obsahu paracetamolu byla vybrána spektrální oblast v rozmezí vlnočtů  $3289\text{--}3220\text{ cm}^{-1}$  s maximem při  $3248\text{ cm}^{-1}$ . Tento absorpční pás odpovídá valenční symetrické vibraci  $\text{N}\text{--}\text{H}$  vazeb v sekundárních amidech tj.  $\text{--NH--CO--}$ . Naproti tomu obsah ibuprofenu byl kvantifikován pomocí absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti  $1847\text{--}1758\text{ cm}^{-1}$  s maximem absorpce při  $1795\text{ cm}^{-1}$ , která odpovídá valenční symetrické vibraci  $\text{C}=\text{O}$  vazeb v  $\text{--COOH}$  skupinách.

V případě paracetamolu byla jeho koncentrace ve vzorku stanovena o 3,59 hm. % vyšší, než byla udávaná hodnota. Relativní směrodatné odchylky stanovení obsahu paracetamolu byla 0,62 %. Rovněž i v případě ibuprofenu byla jeho koncentrace stanovena o 0,59 až 1,92 hm. % vyšší s hodnotou RSD pod 0,1 %. Autoři ve své práci uvádějí, že stanovení obsahu těchto aktivních látek pomocí FTIR spektrometrie je v porovnání s HPLC chromatografií jednodušší, rychlejší a s obdobnou přesností stanovení. Naproti tomu je stanovení obsahu paracetamolu a ibuprofenu pomocí FTIR spektrometrie omezeno nižší citlivostí, která se pohybuje okolo 10–100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [18].

Nová precizní a jednoduchá UV/Vis spektrometrická validační metoda pro stanovení ibuprofenu byla vyvinuta panem Kirtawade a kol. Autoři použili pro svou analýzu UV/Vis spektrofotometr Shimadzu, model-1700 (Japonsko). Prvním krokem pro navržení nové metody bylo zjištění vlnové délky s největší absorpční ( $\lambda_{max}$ ). Roztok pro stanovení  $\lambda_{max}$  byl připraven z 10 mg ibuprofenu rozpuštěného v 20 ml 0,1 M NaOH. Měření probíhalo v rozmezí vlnových délek od 200 do 400 nm a zjištěné maximum bylo při 221 nm. Po získání této vlnové délky byla proměřena sada kalibračních roztoků a byla sestavena kalibrační křivka. Stanovení poté probíhalo na 20 tabletách s označením Brufen 200. Tablety byly rozdrceny na prášek a 100 mg této rozdrcené směsi bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,1 M NaOH. Tyto roztoky byly 15 minut ponechány v ultrazvuku a přefiltrovány přes filtrační papír Whatmann a poté byla změřena absorbance roztoků při 221 nm. Výsledky ukázaly, že tato metoda pro stanovení ibuprofenu je jednoduchá, citlivá, velmi dobře reprodukovatelná a úsporná. Výhodou také bylo použití levného rozpouštědla, a proto by tato metoda mohla být použita pro rutinní kontroly kvality tohoto léčiva [19].

Hoang a kol. se ve své práci zabývali stanovením obsahu ibuprofenu a paracetamolu pomocí UV/Vis a HPLC chromatografie v léčivech Alaxan®, Dibulaxan® a Febro®. V této práci si autoři kladou za cíl navrhnout a optimalizovat validační metodu stanovení těchto aktivních látek pomocí UV/Vis spektrometrie. Pro stanovení obsahu paracetamolu a ibuprofenu použili metodu transformace absorpčních spekter pomocí matematického modelu *Savitzky-Golay*. Tato metoda je založena na derivaci, resp. odvození konvolučních koeficientů naměřeného signálu (UV/Vis spektra). Standardní roztoky ibuprofenu a paracetamolu byly připraveny o hmotnostní koncentraci 500  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  ve standardním fosfátovém pufru při hodnotě pH  $\sim 7,2$ . Z těchto zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky při shodné hodnotě pH. Obdobným způsobem byly připraveny roztoky vzorků komerčních léčiv. Všechny vzorky byly změřeny na UV/Vis spektrometru Thermo Spectronic VISION32 v rozsahu vlnových délek 200–325 nm. Naměřená spektra byla vyhodnocena modelem *Savitzky-Golay* v matematickém programu MatLab® 2013. Pro porovnání byly připravené roztoky proměřeny na HPLC chromatografii Agilent 1100 Series s detektorem diodového pole. Před nástřikem vzorku na kolonu byly roztoky filtrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Autoři v této práci vyvinuli validační metodu založenou na transformaci UV spekter pomocí jejich poměrů a následné derivaci. Tato metoda stanovení obsahu ibuprofenu a paracetamolu tvořící binární směs ukázala některé výhody, z nichž nejvýznamnější je získání vyšší intenzity absorpčních píků a eliminace procesu změny měřítka. Z naměřených a vypočtených hodnot obsahu ibuprofenu a paracetamolu vyplývá, že tato navržená metoda je v porovnání s HPLC chromatografií jednodušší a z časového hlediska méně náročná. Mimo jiné autoři poukázali na fakt, že metoda stanovení pomocí UV/Vis spektrometrie je ze statistického hlediska srovnatelná s HPLC chromatografií.

Proto tato validační metoda nabízí možnost záměny s kapalinovou chromatografií pro simultánní stanovení IBU a ACT kombinovaných v tabletách léčivých přípravků [20].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

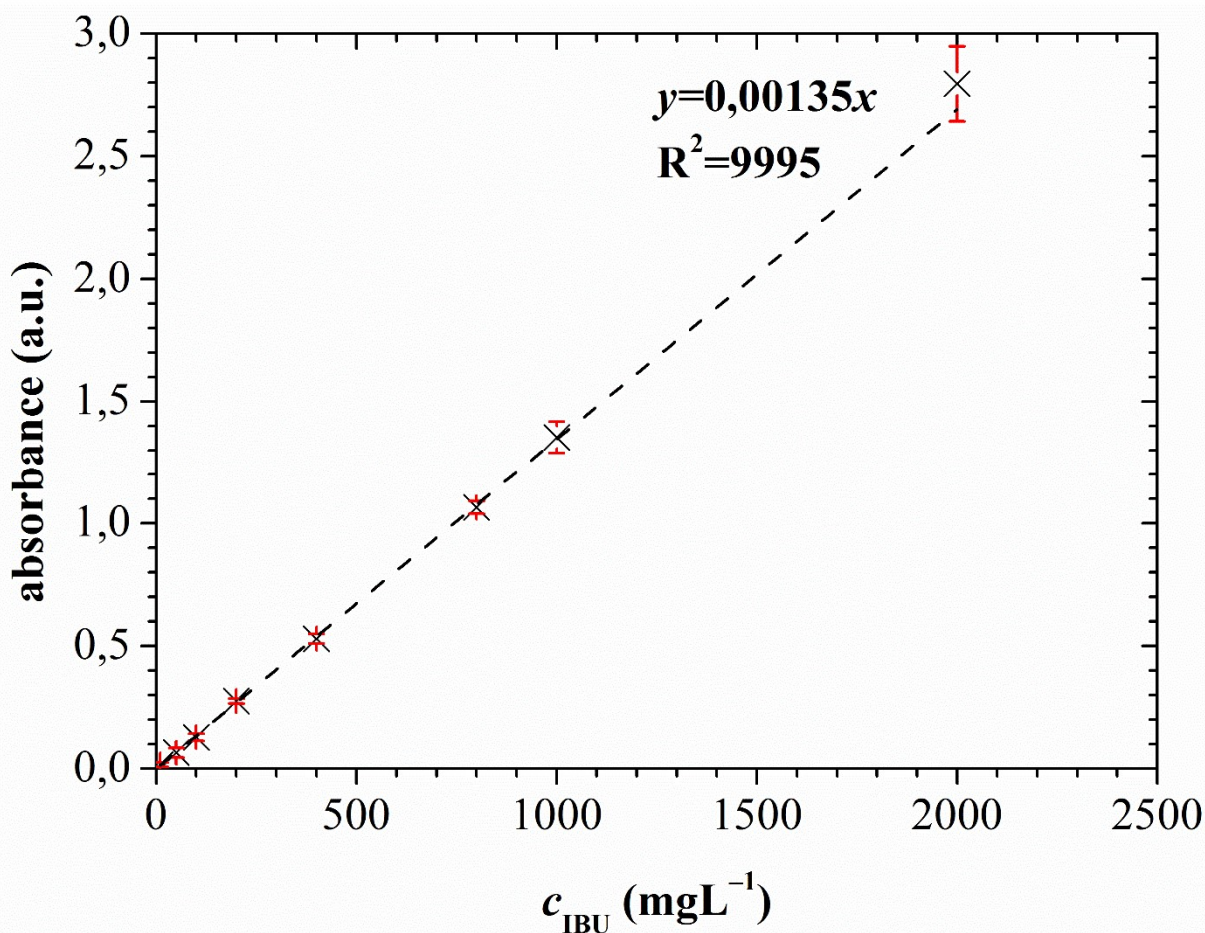
- Ibuprofen od společnosti Sigma-Aldrich;
- Methanol o čistotě pro spektrometrii;
- Chloroform stabilizovaný v amylenu.

### 3.2 Použité přístroje a vyhodnocovací programy

- Hitachi U3900H – UV/Vis spektrometr;
- Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc – FTIR spektrometr;
- Hettich Rotofix 32 – centrifuga;
- Nicolet OMNIC – měření FTIR spekter a analýza dat;
- OriginPro2019b software – vyhodnocení a analýza dat.

### 3.3 Příprava kalibračních roztoků pro UV/Vis spektrometrii

Kalibrační křivka standardu ibuprofenu pro stanovení tohoto nesteroidního antiflogistika v tabletách Ibalginu a Ibuprofenu pomocí molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření byla připravena podle následujícího postupu. Na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo požadované množství standardu ibuprofenu pro přípravu zásobního roztoku v methanolu o hmotnostní koncentraci  $1 \cdot 10^4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Takto připravený zásobní roztok byl ponechán po dobu 2 h na magnetické míchačce, kdy bylo zajištěno úplné rozpuštění standardu ibuprofenu. Z takto připraveného zásobního roztoku byly odpipetovány požadované objemy a následně byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky a doplněny po rysku rozpouštědlem methanolu. Kalibrační křivka byla připravena v rozsahu hmotnostních koncentrací ibuprofenu odpovídajících  $10\text{--}2 \cdot 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Na tomto místě je nutné podotknout, že jednotlivé kalibrační roztoky byly připraveny ve třech opakováních. Kalibrační křivka standardu ibuprofenu sestavená při  $\lambda_{\text{max}}$  264 nm je uvedena na Obr. 6.



Obrázek 6: UV/Vis kalibrační křivka standardu ibuprofenu

### 3.4 Příprava vzorků tablet pro UV/Vis spektrometrii

Vzorky komerčních tablet Ibalginu a Ibuprofenu byly suspendovány v 10 cm<sup>3</sup> methanolu o čistotě pro UV/Vis spektrometrii. Vzorky byly vloženy na vícemístnou magnetickou míchačku, přičemž doba míchání byla stanovena na základě vizuálního pozorování na dobu 2 h, kdy po této době došlo k úplnému „rozpuštění“ tablet. Tímto způsobem byla zajištěna kvantitativní extrakce účinné látky do organického rozpouštědla. Následně byly vzorky filtrovány přes stříkačkový filtr o průměru pórů 0,45 μm. Z takto připraveného roztoku bylo automatickou pipetou odpipetováno 0,625 cm<sup>3</sup> do odměrné baňky o objemu 25 cm<sup>3</sup> a následně byla odměrná baňka doplněna methanolem po rysku. Tímto způsobem bylo připraveno pro každý vzorek antiflogistika (Ibalgin a Ibuprofen) celkem deset roztoků. Připravené vzorky byly uchovány v lednici, aby nedocházelo k odpařování organického rozpouštědla.

### 3.5 Měření UV/Vis spekter kalibračních roztoků a vzorků tablet

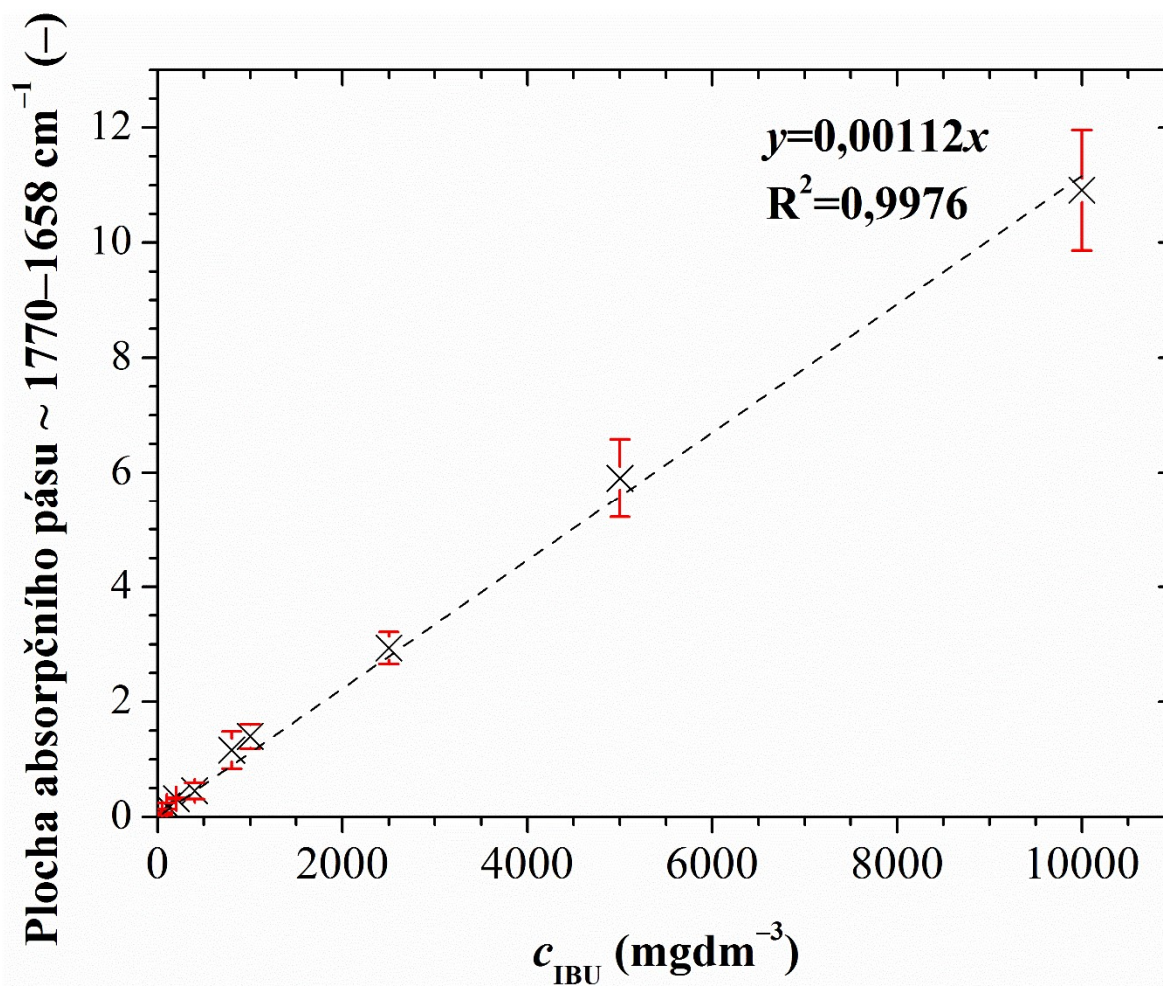
Vzorky kalibračních roztoků a studovaných antiflogistik (Ibalgin a Ibuprofen) byly měřeny na dvoupráskovém UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H v křemenných kyvetách SUPRASIL<sup>®</sup>. Všechny roztoky byly měřeny v rozsahu vlnových délek 240–290 nm s rychlostí skenování 600 nm·min<sup>-1</sup> při nastavené šterbině monochromátoru 2 nm.



Z naměřených UV/Vis spekter byly odečteny hodnoty absorbance při 264 nm, což je maximální hodnota absorpčního pásu ibuprofenu v protonované formě H<sup>+</sup>.

### 3.6 Příprava kalibračních roztoků pro FTIR spektrometrii

Kalibrační křivka standardu ibuprofenu byla připravena podle následujícího postupu. Na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa bylo naváženo požadované množství standardu ibuprofenu pro přípravu zásobního roztoku v chloroformu o hmotnostní koncentraci  $2 \cdot 10^4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Takto připravený zásobní roztok byl ponechán po dobu 2 h na magnetické míchače, kdy bylo zajištěno úplné rozpuštění tohoto nesteroidního antiflogistika. Z takto připraveného zásobního roztoku byly odpipetovány požadované objemy a následně byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky a doplněny po rysku rozpouštědlem chloroformu. Kalibrační křivka byla připravena v rozsahu hmotnostních koncentrací ibuprofenu odpovídajících  $50\text{--}1 \cdot 10^4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Na tomto místě je nutné podotknout, že jednotlivé kalibrační roztoky byly připraveny ve třech opakováních. K minimalizaci odpařování rozpouštědla byly roztoky uchovávány v ledničce, přičemž uzavřené odměrné baňky byly zajištěny parafilmem. Před samotným měřením byly vzorky temperovány na laboratorní teplotu, aby nedocházelo během měření ke změně naneseného objemu na ATR krystalu. Kalibrační křivka ibuprofenu vypočtená z plochy absorpčního pásu při  $1702 \text{ cm}^{-1}$  je uvedena na Obr. 7.



Obrázek 7: FTIR kalibrační křivka ibuprofenu

### 3.7 Příprava vzorků Ibalginu a Ibuprofenu pro FTIR analýzu

Vzorky tablet byly suspendovány v 10 cm<sup>3</sup> chloroformu, přičemž doba míchání na magnetické míchačce byla stanovena na základě vizuálního pozorování, kdy po 1 h došlo k úplnému „rozpuštění“ tablet. Následně byla suspenze odstředěna na laboratorní centrifuze při 4000 ot·min<sup>-1</sup>, kdy došlo k oddělení supernatantu od pevného podílu, který je tvořen plnivými a pomocnými látkami v tabletě. Následně byl roztok filtrován přes stříkačkový membránový filtr o průměru pórů 0,45 μm. Z takto připraveného roztoku analyzovaného vzorku bylo odpipetováno 500 μl do odměrné baňky o objemu 50 cm<sup>3</sup> a následně byl tento vzorek doplněn příslušným rozpouštědlem, tj. chloroformem po rysku. Tímto způsobem bylo připraveno pro každý vzorek antiflogistika (Ibalgin a Ibuprofenu) celkem deset roztoků. Připravené vzorky byly před měřením na FTIR spektrometru uchovávány stejným způsobem jako roztoky kalibrační křivky viz. sub-kapitola 3.6.



Obrázek 8: Připravené vzorky Ibalginu a Ibuprofenu

### 3.8 Příprava vzorků suspenze Nurofenu pro děti pro FTIR analýzu

Vzorky suspenze Nurofenu pro FTIR spektrometrii byly připraveny podle následujícího postupu. Do skleněné vialky bylo kvantitativně odpipetováno 5 cm<sup>3</sup> homogenizovaného vzorku suspenze Nurofenu. K tomuto množství suspenze bylo přidáno 5 cm<sup>3</sup> chloroformu a následně byly tyto vzorky uloženy na třepačku, kde byly třepány po dobu 24 h. Tímto způsobem byla zajištěna kvantitativní extrakce účinné látky do chloroformové fáze, přičemž nad touto organickou fází vznikla hydrogelová fáze z původního rozpouštědla a pomocných látek obsažených v suspenzi (viz. Obr. 9). Z chloroformové fáze bylo odpipetováno 500 μl do odměrné baňky o objemu 25 cm<sup>3</sup> a následně byl tento vzorek doplněn příslušným rozpouštědlem, tj. chloroformem po rysku. Tímto způsobem bylo připraveno celkem 10 vzorků ke kvantitativní analýze ibuprofenu v suspenzi Nurofenu. Připravené vzorky byly uchovávány stejným způsobem jako roztoky kalibrační křivky viz. sub-kapitola 9.



Obrázek 9: Dvou-fázový systém vzorku Nurofenu při extrakci ibuprofenu chloroformem

### 3.9 Měření FTIR spekter kalibračních roztoků a vzorků tablet a suspenze

Vzorky kalibračních roztoků a studovaných léčiv (Ibuprofen, Ibuprofen a Nurofen pro děti) byly měřeny na FTIR spektrometru Nicolet iS50. Všechna infračervená spektra vzorků po odpaření rozpouštědla, tj. chloroformu byla změřena v rozmezí vlnočtů  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  s rozlišením  $8\text{ cm}^{-1}$  a s celkovým počtem akumulovaných skenů 64. Dále je nutné podotknout, že vzorky byly nanášeny na diamantový ATR krystal pomocí skleněné kapiláry z Pausterovy pipety. Optimálnost nanesení vzorku na ATR krystal byla hodnocena z hlediska dvou kritérií, a to zajištění opakovatelnosti nanesení vzorku na krystal a pokrytí celého povrchu ATR krystalu, přičemž nesmí docházet k roztečení kapky mimo krystal. Pomocí vyhodnocovacího programu Omnic byly zjištěny plochy pod absorpčním pásem, který odpovídá specifické absorpci C=O vazeb v  $\text{--COOH}$  skupinách vázaných na Ar. Tento absorpční pás byl lokalizován v oblasti vlnočtů  $1770\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ . Před každým měřením byl ATR krystal nejprve očištěn destilovanou vodou a následně ethanolem.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Stanovení obsahu ibuprofenu pomocí UV/Vis spektrometrie

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2, molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis) je stále hojně využívanou instrumentální technikou ke kvantifikaci účinných látek v tabletách. Mimo jiné je na tomto místě nutné podotknout, že tuto spektrometrickou techniku lze využít v případě, kdy analyzovaná látka je schopna absorbovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce. Za specifickou absorpci záření v rozmezí vlnových délek 200–300 nm (UVC–UVB) s maximem absorpce při 264 nm jsou v případě účinné látky ibuprofenu zodpovědné aromatické konstituční jednotky benzoidního typu s určitou mírou substituce aromatického jádra elektronakceptorními skupinami. V případě molekuly ibuprofenu se jedná o kyselou funkční skupinu –COOH. Přítomnost těchto funkčních skupin na Ar způsobují, že absorpční pás, resp. maximum je posunuto do oblasti vyšších vlnových délek. Tento spektrometrický jev nazýváme batochromní, resp. červený posun.

Tabulka 1: Stanovené množství ibuprofenu v tabletách pomocí UV/Vis spektrometrie

<b>léčivo</b>	<b>stanovené množství (mg-tableta<sup>-1</sup>)</b>
Ibalgin	360,98 ± 25,74
Ibuprofen	376,89 ± 12,06

Z naměřené kalibrační křivky UV/Vis spektrometrie standardu ibuprofenu byly vypočteny koncentrace účinné látky nesteroidního antiflogistika v  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , které byly následně přečteny na obsah ibuprofenu v  $\text{mg}\cdot\text{tableta}^{-1}$ . Jak již bylo zmíněno v experimentální části této bakalářské práce, stanovení obsahu ibuprofenu bylo provedeno v 10-ti opakováních. Z vypočtených hodnot obsahu ibuprofenu uvedených v Tabulce 1 vyplývá, že koncentrace této účinné látky jsou v porovnání s deklarovaným obsahem poněkud podhodnocené, avšak relativně nízké hodnoty směrodatných odchylek svědčí o přesném stanovení tohoto antiflogistika v tabletách. Z výsledků je rovněž patrné, že vyšší průměrná koncentrace ibuprofenu byla stanovena v případě léčiva, které je komerčně označeno jako Ibuprofen. Dále si můžeme povšimnout, že vypočtená směrodatná odchylka tohoto léčiva byla v porovnání s léčivem Ibalgin 2× nižší. Nižší hodnoty obsahu účinné látky mohou být způsobeny několika faktory, z nichž mezi nejpravděpodobnější patří stáří lečiva a metodická chyba při přípravě vzorků. V případě stáří lečiva se především jedná o fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí, tzn. vzdušná vlhkost, teplota, UV-záření, kterým je léčivo během skladování vystaveno. Tyto faktory obecně způsobují degradaci účinné látky v léčivech, anebo mohou přispívat k nežádoucím reakcím účinné látky s plnivými a pomocnými látkami. Avšak jako významnější faktor se jeví metodická chyba při přípravě vzorků k měření UV/Vis spekter. Tato hypotéza byla potvrzena měřením FTIR spekter MeOH výluhů nerozpuštěných částí tablet po filtraci přes membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ , kdy v supernatantu byla stanovena přítomnost ibuprofenu. To znamená, že jistá část účinné látky je sorbována na plniva, resp. pomocné látky tvořící in-sit tablet. V extrakci účinné látky ibuprofenu methanolem a následné filtraci, která je v této metodě velmi důležitým krokem přípravy vzorků z důvodu omezení turbidity při měření

UV/Vis spekter vidíme, že tato metoda stanovení [17] vyžaduje širší experimentální činnost na vyřešení této problematiky.

## 4.2 Stanovení obsahu ibuprofenu pomocí ATR-FTIR spektrometrie

### 4.2.1 Výsledky optimalizace nanesení vzorku na ATR krystal

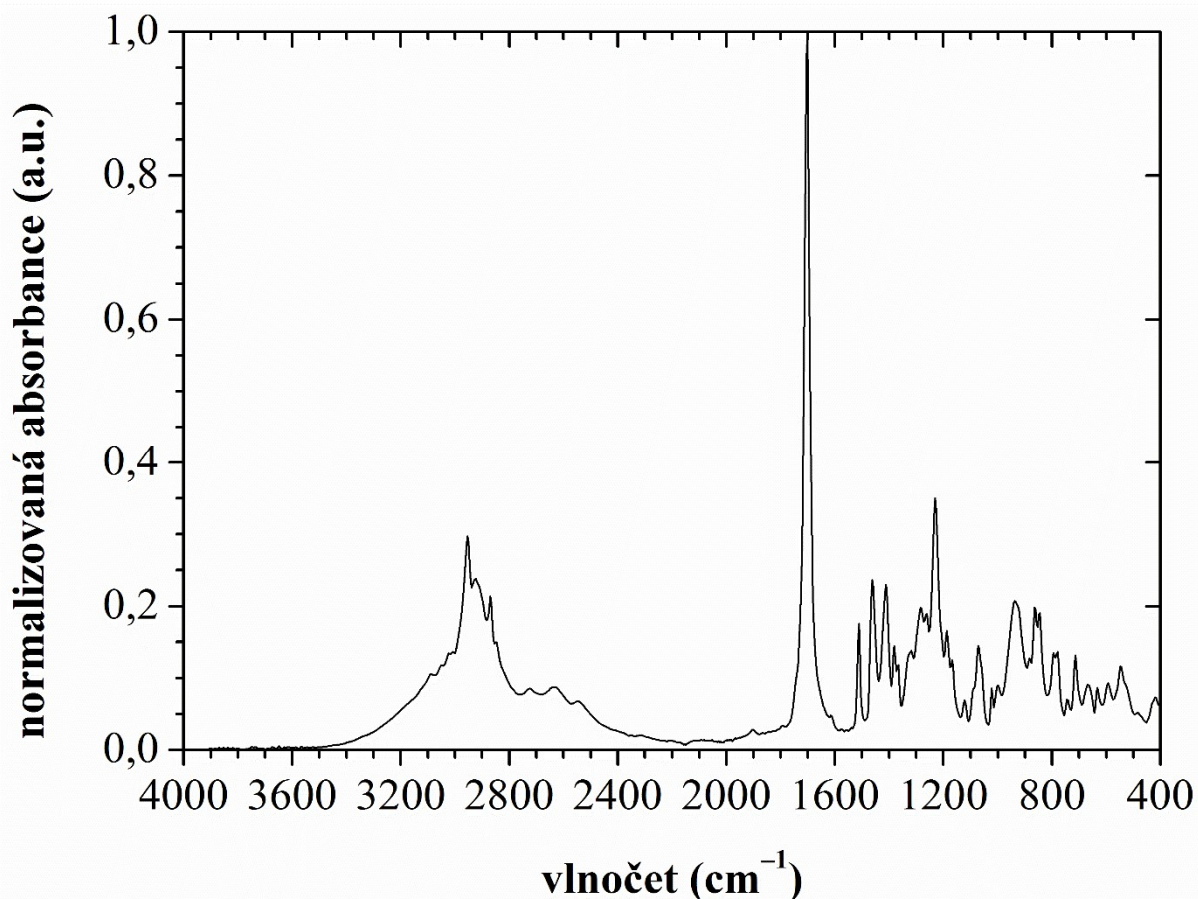
Na prvním místě této sub-kapitoly je nutné podotknout, že způsob nanesení vzorku na ATR krystal hraje klíčovou roli v souboru metodických kroků stanovení obsahu ibuprofenu v lékových formách. Proto byly experimentálně testovány některé způsoby nanášení vzorků, kdy musí být zabezpečeno nanesení vždy stejného objemu vzorku po celé ploše ATR krystalu. Na základě naměření pilotních spekter bylo zjištěno, že neoptimálnějším způsobem nanesení je použití skleněné kapiláry Pasteurovy pipety, kdy bylo dosaženo naměření FTIR spekter roztoku ibuprofenu o známé koncentraci ( $400 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) s prakticky totožnými hodnotami absorbance absorpčního píku, který byl vybrán ke kvantitativní analýze.

### 4.2.2 Kvalitativní analýza standardu ibuprofenu

Na Obr. 10 je uvedeno ATR-FTIR spektrum standardu ibuprofenu dodávaného společností Sigma-Aldrich. Interpretace absorpčních pásů byla provedena na základě odborné literatury [23; 24]. Ostré a výrazné absorpční pásy lokalizované při  $2954 \text{ cm}^{-1}$  a  $2869 \text{ cm}^{-1}$  odpovídají valenční asymetrické a symetrické vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Tyto funkční skupiny byly potvrzeny dalšími absorpčními pásy lokalizovanými v oblasti otisku palce tzn. fingerprintu, jež byly lokalizovány při  $1461 \text{ cm}^{-1}$  a  $1382 \text{ cm}^{-1}$  a odpovídají asymetrické a symetrické deformační vibraci C–H vazeb v  $-\text{CH}_3$  a  $-\text{CH}_2-$  skupinách. Méně intenzivní dublet absorpčních pásů identifikovaný při  $2925 \text{ cm}^{-1}$  a  $2849 \text{ cm}^{-1}$  je zpravidla připisován asymetrické valenční vibraci C–H vazeb v methylenových skupinách. V infračerveném spektru standardu ibuprofenu si nelze nepovšimnout tripletu absorpčních pásů v oblasti vlnočtů  $3100\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci C–H vazeb na aromatickém kruhu. Tyto konstituční jednotky byly rovněž potvrzeny dvěma absorpčními pásy, které byly lokalizovány při  $1615 \text{ cm}^{-1}$  a  $1512 \text{ cm}^{-1}$  a odpovídají valenční symetrické vibraci C–H vazeb v Ar. Z FTIR-ATR spektra je patrné, že absorpční pás lokalizovaný při  $1615 \text{ cm}^{-1}$  je překrytý silnou absorpcí pásu karboxylových funkčních skupin. Různě intenzivní absorpční pásy lokalizované v oblasti vlnočtů  $1275\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$ , vyjma absorpčního pásu při  $1230 \text{ cm}^{-1}$ , jsou zpravidla připisovány rovinným deformačním vibracím C–H vazeb přítomných na aromatických strukturních jednotkách ibuprofenu. O di-substituovaných aromatických jednotkách vypovídají absorpční pásy (dublet), které byly lokalizovány při  $862 \text{ cm}^{-1}$  a  $846 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto pásy odpovídají mimo-rovinným deformačním vibracím C–H vazeb. Tento dublet absorpčních pásů je charakteristický pro 1,4 – di-substituované Ar jednotky, tzn. aromát je substituovaný v para poloze. Z naměřeného infračerveného spektra je zřejmé, že nejintenzivnějším absorpčním pásem je ostrý pik lokalizovaný při  $1702 \text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových skupinách. Dále si ve spektru nelze nepovšimnout absorpčního pásu při  $1412 \text{ cm}^{-1}$ , který je zpravidla připisován deformační rovinné vibraci C–O–H vazeb v karboxylových skupinách. Přítomnost karboxylových funkčních skupin byla rovněž potvrzena absorpčním pásem identifikovaným při  $1230 \text{ cm}^{-1}$ , který je výlučně přiřazen k valenční symetrické vibraci C–O vazeb v  $-\text{COOH}$

skupinách. Méně intenzivní absorpční pás při  $936\text{ cm}^{-1}$  odpovídá mimo-rovinné deformační vibraci C–O–H v karboxylových funkčních skupinách.

Na základě změřeného ATR-FTIR spektra standardu ibuprofenu byl pro sestavení kalibrační křivky a vyhodnocení obsahu ibuprofenu vybrán absorpční pás lokalizovaný při  $1702\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční symetrické vibraci karbonylu v karboxylových funkčních skupinách. Tento absorpční pás je velmi vhodný pro sestavení kalibrační závislosti ibuprofenu, a to z důvodu jeho intenzity a prostorové symetrie v infračerveném spektru. Mimo jiné bylo ověřeno, že tento izolovaný absorpční pás není nikterak ovlivněn případnými plnivy v lékových tabletách Ibuprofenu, Ibalginu a suspenze Nurofenu.



Obrázek 10: ATR-FTIR spektrum standardu ibuprofenu dodávaného společností Sigma-Aldrich

Dále si na Obr. 10 můžeme povšimnout, že absorpční pás při  $1702\text{ cm}^{-1}$  je charakterizován nejvyšší intenzitou absorbance, a proto je i směrnice kalibrační křivky nejstrmější. Tato strmost je v přímé úměrnosti s citlivostí stanovení, a proto mohou být po odpaření rozpouštědla stanoveny i poměrně nízké koncentrace této účinné látky.

#### 4.2.3 Kvantitativní analýza ibuprofenu v lékových formách tablet a suspenze

Obsah účinné látky ibuprofenu byl vypočten pomocí FTIR kalibrační křivky, která byla sestavena z plochy absorpčního pásu v rozmezí vlnčetů  $1770\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ , jež odpovídá specifické absorpci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách. Mimo jiné je na tomto

místě nutné říci, že při měření FTIR spekter pomocí ATR krystalu nedochází k de-protonaci, resp. dekarboxylaci kyselých funkčních skupin, jak je tomu v případě použití klasické transmisní techniky, tj. měření vzorků ve formě KBr tablet. Naměřená ATR-FTIR spektra vzorků vybraných léčiv jsou uvedena v kapitole přílohy.

Jako v předchozím případě viz. sub-kapitola 4.1 bylo stanovení obsahu ibuprofenu provedeno v 10-ti nezávislých opakováních. Z vypočtených hodnot obsahu ibuprofenu uvedených v Tabulce 2 si nelze nepovšimnout, že stanovené koncentrace ibuprofenu jsou velmi blízké hodnotám, které jsou deklarovány farmaceutickými společnostmi. V případě tablet (Ibuprofen a Ibalgin) byl obsah ibuprofenu dán velmi úzkým rozmezím 394 až 397  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3} \sim \text{mg}\cdot\text{tableta}^{-1}$ , přičemž více odpovídající hodnota byla stanovena v případě léčiva Ibalgin. Z hodnot směrodatných odchylek vyplývá, že stanovení obsahu ibuprofenu pomocí ATR-FTIR spektrometrie v případě léčiv v tabletových formách vyniká poměrně vysokou přesností, i když jako srovnávací prvek bereme v úvahu jen deklarované množství uváděné výrobcem. Z výsledků uvedených v Tabulce 2 je patrné, že velikost směrodatných odchylek se pohybovala v rozmezí 4,3–4,8 % z deklarovaného obsahu ibuprofenu, což lze vyjádřit hmotnostním rozmezím 17–19 mg. Stanovení obsahu ibuprofenu v suspenzi (Nurofen pro děti) bylo v porovnání s léčivem ve formě tablet více přesné, kdy stanovená hodnota činila  $19,96 \pm 0,78 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  při deklarovaném obsahu výrobcem  $20 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Experimentální metodika stanovení v případě suspenze byla velmi vhodná, a to především z důvodu, že během extrakce aktivní složky do chloroformové fáze se z pomocných látek vytvořil velmi kompaktní gel, jenž ulehčoval další preparativní činnost.

Tabulka 2: Stanovené množství ibuprofenu v tabletách a suspenzi pomocí ATR-FTIR spektrometrie

Léčivo	stanovené množství ( $\text{mg}\cdot\text{tableta}^{-1}$ ); ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) <sup>a</sup>
Ibalgin	$397,06 \pm 17,16$
Ibuprofen	$393,64 \pm 19,11$
Nurofen pro děti	$19,96 \pm 0,78$

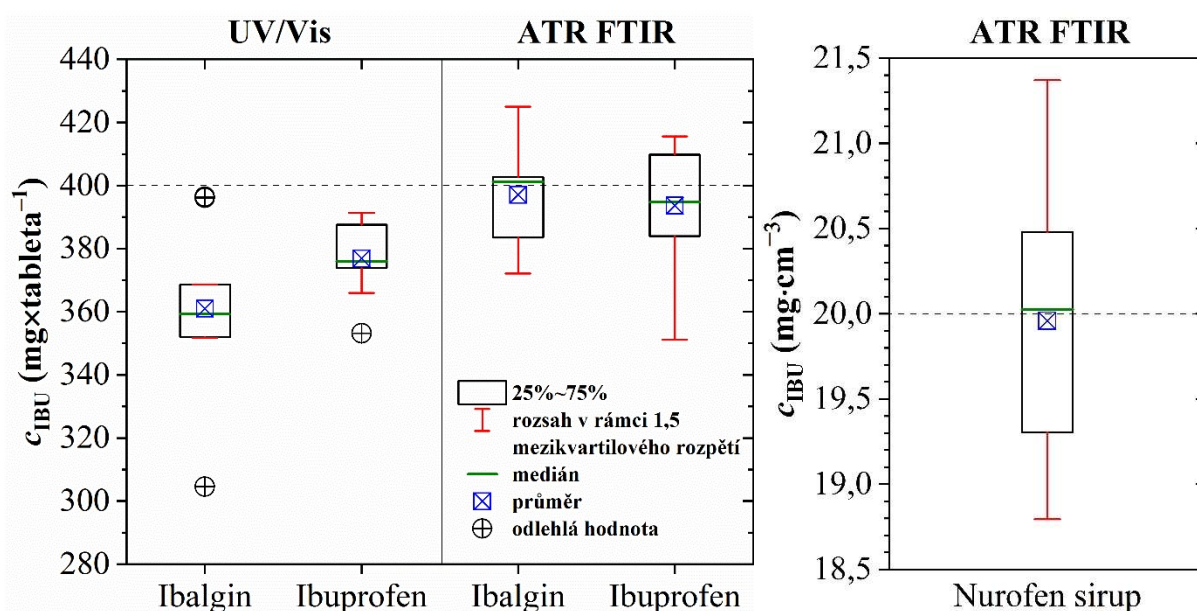
<sup>a</sup>Stanovená koncentrace obsahu ibuprofenu pro suspenzi Nurofen pro děti

Z porovnání směrnice kalibračních křivek pro FTIR a UV/Vis spektrometrii vyplývá, že v případě UV/Vis spektrometrie je směrnice kalibrační křivky charakterizována o něco vyšší hodnotou, a proto by stanovení obsahu ibuprofenu mělo být charakterizováno vyšší citlivostí, a tedy i vyšší přesností stanovení. Na základě těchto výsledků jsme se přiklonili, že problematika stanovení ibuprofenu pomocí UV/Vis spektrometrie je vázána na použité experimentální metodice. Dále je na tomto místě nutné říci, že v případě stanovení obsahu ibuprofenu v těchto vybraných lékových formách (tableta a suspenze) byl jako extrakční reagent použit chloroform, který se zdá být vhodnějším extrakčním činidlem než methanol. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že chloroform je více specifické extrakční činidlo pro tuto stanovovanou účinnou látku a také zjevně zamezuje resorpci ibuprofenu na rozličná plniva a pomocné látky.

#### 4.2.4 Porovnání UV/Vis a FTIR spektrometrie pomocí krabicových grafů

K porovnání vhodnosti použité metodiky (UV/Vis a FTIR spektrometrie) kvantitativního stanovení ibuprofenu v tabletách a suspenzi byl použit deskriptivní statistický aparát, který je označován jako boxplot či krabicový graf. Jedná se o grafické znázornění numerických dat pomocí jejich kvartilů. Obecně v takovém grafickém znázornění můžeme nalézt následující parametry jako je 1. a 3. kvartil, který nám ohraničuje spodní a horní část krabicového grafu. Mezi nimi můžeme nalézt tzv. medián, který je definován jako rozdělení hodnot na dvě stejné části, přičemž medián odpovídá hodnotě, která se nalézá uprostřed vzestupně seřazených dat. Dále v boxovém grafu můžeme nalézt usečky, které znázorňují maximální a minimální hodnoty, které byly získány z aktuálního souboru dat. Na tomto místě je nutné podotknout, že toto grafické znázornění neodpovídá chybovým úsečkám. Dále se v krabicových grafech mohou vyskytovat odlehlé hodnoty, které jsou z výpočtu mediánu, 1. a 2. kvartilu a aritmetického průměru vyřazeny.

Boxové grafy stanovení obsahu ibuprofenu v léčivých formách jsou uvedeny na Obr. 11.



Obrázek 11: Boxové grafy stanovení obsahu ibuprofenu v léčivech pomocí UV/Vis a FTIR spektrometrie

Deklarovaný obsah ibuprofenu farmaceutickými výrobci je v Obr. 11 znázorněn pomocí přerušované čáry. Z boxových grafů jednoznačně vyplývá, že použití ATR-FTIR spektrometrie vede ke kvantitativnějšímu stanovení obsahu ibuprofenu v léčivech, očemž vypovídají hodnoty aritmetického průměru a mediánu. Mimo jiné si v Obr. 11 nelze nepovšimnout, že v případě použití ATR-FTIR spektrometrie jsou stanovené hodnoty obsahu ibuprofenu umístěny v širším rozmezí prvního a třetího kvartilu a rovněž i minimální a maximální hodnoty se nalézají ve větším rozmezí hodnot, avšak odlehlé hodnoty se při všech stanoveních, tzn. tablety a suspenze v získaném souboru dat nevyskytují. Naproti tomu v případě použití UV/Vis spektrometrie se sice všechna pozorovaná statistická kritéria nacházejí v užším rozmezí hodnot, avšak stanovené hodnoty obsahu ibuprofenu neodpovídají deklarovanému množství výrobcem a také jsou v boxových grafech přítomny odlehlé



hodnoty. Na základě prezentovaných výsledků v boxových grafech je zřejmé, že v případě stanovení obsahu účinné látky pomocí UV/Vis spektrometrie, tzn. experimentální metodika pro UV/Vis obsahuje s největší pravděpodobností experimentální chybovost, které může být vysvětlena pomocí nižší schopnosti extrahovat tuto účinnou látku methanolem, nebo dochází k re-sorpci ibuprofenu na použítá plniva a pomocné látky. Tento dílčí závěr je poměrně v dobré konzistenci s příslušnými odlehlými hodnotami, které jsou přítomny v grafickém zázornění. Dále pak si můžeme povšimnout, že při stanovení ibuprofenu pomocí UV/Vis spektrometrie jsou hodnoty, které odpovídají deklarovanému množství tj. 400 mg statisticky označeny jako odlehlé. To rovněž potvrzuje názor, že při tomto způsobu stanovení hraje klíčovou roli extrakční činidlo, resp. sorpční procesy na původní matrici.

V rámci dosažených výsledků lze konstatovat, že metodicky vhodnější experimentální technikou pro stanovení ibuprofenu v tabletách a suspenzích je ATR-FTIR spektrometrie, přičemž klíčovou roli při tomto způsobu hraje přesné nanesení analyzovaného vzorku na ATR krystal, tzn. dodržení podmínky stejného (optimálního) objemu a nanesení vzorku na jeho celou plochu.

## 5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala stanovením účinné látky (ibuprofenu) v léčivých přípravcích pomocí spektrometrických metod. Ibuprofen je látka vykazující schopnost absorpce elektromagnetického záření, a proto byly pro tento účel vybrány molekulová absorpční spektrometrie (UV/Vis) a metoda zeslabeného úplného odrazu infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (ATR-FTIR). Pro samotné stanovení byla nutná optimalizace spektrometrických metod a postupu zpracování vzorků. Pomocí UV/Vis spektrometrie byly stanovovány lékové formy Ibuprofenu a Ibalginu ve formě tablet a pro FTIR spektrometrii byl navíc zařazen Nurofen sirup.

Stanovení obsahu účinné látky bylo realizováno pomocí metody kalibrační křivky, která vyžadovala přípravu sady kalibračních roztoků pro každou ze spektrometrických metod. Důležitým faktorem pro přípravu vzorků bylo zvolení vhodného rozpouštědla, resp. extrakčního činidla, ve kterém bylo možné provést specifickou extrakci ibuprofenu z lékové formy. Pro UV/Vis spektrometrii byl zvolen methanol a pro FTIR spektrometrii to byl chloroform stabilizovaný v amylenu, který se později projevil jako vhodnější, jelikož u něj na rozdíl od methanolu patrně nedochází k resorpci ibuprofenu na plniva obsažená v léčivých formách. Poté byla naměřena absorpční spektra kalibračních roztoků a připravených roztoků vzorků a pomocí rovnice kalibrační přímky byl vypočten obsah ibuprofenu ve stanovovaných vzorcích.

Stanovení pomocí UV/Vis spektrometrie ukázalo, že koncentrace ibuprofenu v tabletách nedosahuje deklarovaných hodnot. Odchytky mohly být způsobeny degradací ibuprofenu způsobenou špatným uchováváním léčiva, anebo působením vnějších fyzikálně-chemických faktorů. Nicméně pravděpodobnější příčinou stanovení nižšího obsahu účinné látky mohla být metodická chyba při přípravě vzorků. Tato chyba byla způsobena již zmíněným výběrem méně vhodného rozpouštědla (methanolu), kdy určité množství ibuprofenu je re-adsorbováno na nerozpustnou část léčiva, tzn. plniva a pomocné látky. Pravděpodobně se jedná o více polární plniva jako je mikrokrytalická celulóza a škrob, které jsou v léčivech přítomny v majoritních množstvích v porovnání se stearáty alkalických zemin ( $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ), které hrají v tabletách úlohu stmelujícího činidla. Příznivějších výsledků však bylo dosaženo použitím ATR-FTIR spektrometrie, kdy naměřené hodnoty blízce korelovaly s deklarovaným obsahem účinné látky. Těchto uspokojivých výsledků bylo dosaženo jak u vzorků ve formě tablet, tak i sirupu.

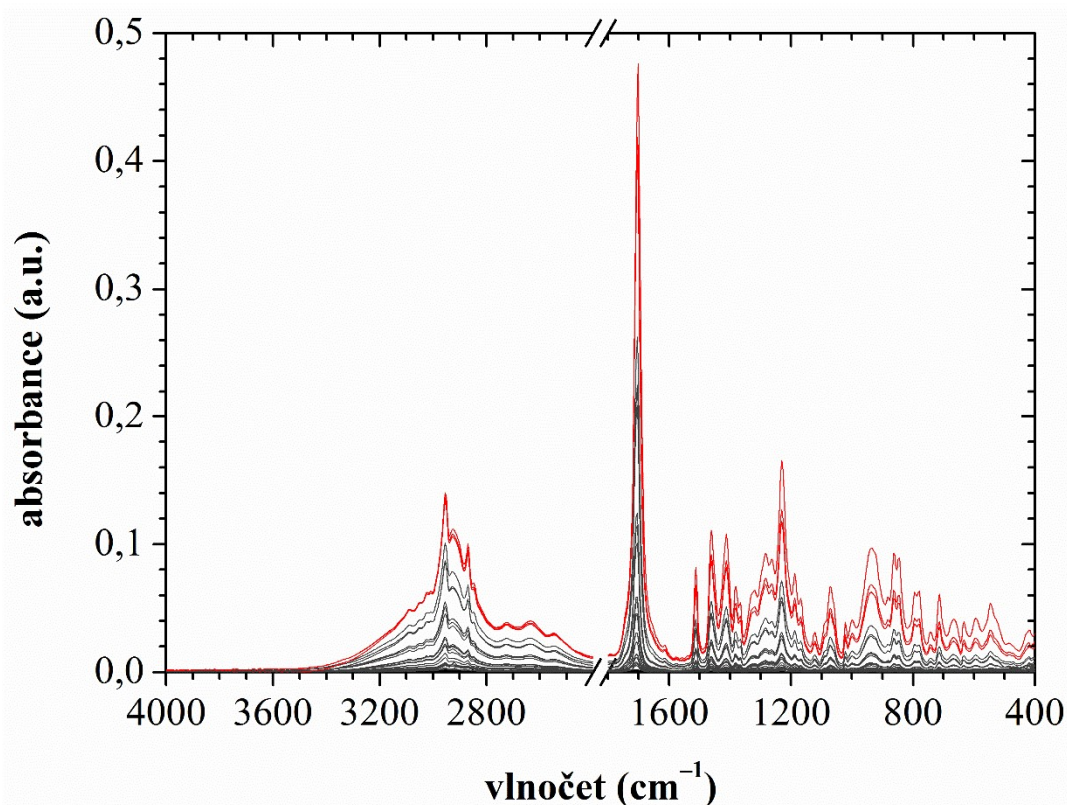
Pomocí získaných výsledků byla jako výhodnější spektrometrická metoda pro stanovení účinné látky v léčivech zvolena ATR-FTIR spektrometrie. Je však nutná preciznost a přesnost při nanášení vzorku na ATR krystal a také je důležitá správná volba specifického extrakčního činidla.

## 6 LITERATURA

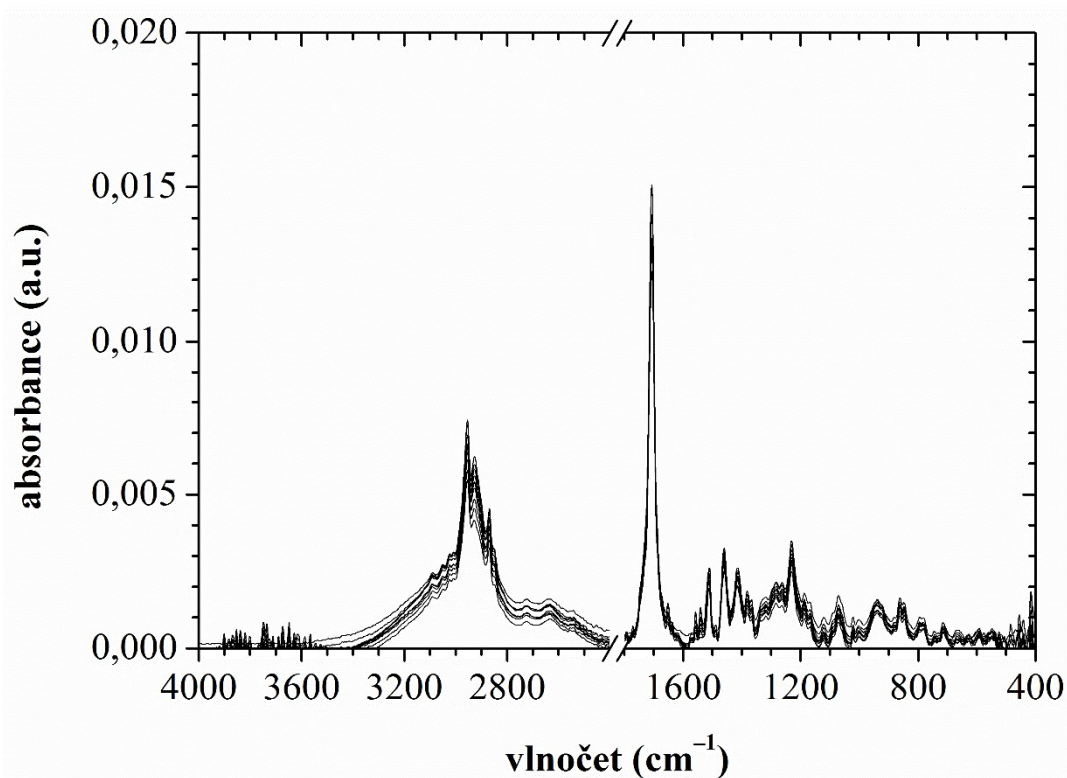
- [1] S. HAWORTH, Ian. Ibuprofen [online]. 1 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <http://www.chemistryexplained.com/Hy-Kr/Ibuprofen.html>
- [2] Rainsford, K.D. *Inflammopharmacol* (2011) 19: 293. <https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1007/s10787-011-0103-7>
- [3] TRACY, T.S. a S.D. HALL. Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-coenzyme A. 1992.
- [4] BOGDAN, Andrew R., Sarah L. POE, Daniel C. KUBIS, Steven J. BROADWATER a D. Tyler MCQUADE. The Continuous-Flow Synthesis of Ibuprofen. *Angewandte Chemie*. 2009, 48(45), 8547-8550. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200903055>.
- [5] BUSHRA, Rabia a Nousheen ASLAM. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman medical journal*. 2010, 25(3), 155–1661. DOI: 10.5001/omj.2010.49.
- [6] ROBERTSON, Sally. Ibuprofen Mechanism. *News Medical* [online]. 2018 [cit. 2019-09-13]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/Ibuprofen-Mechanism.aspx>
- [7] MAZALEUSKAYA, Liudmila L., Katherine N. THEKEN, Li GONG, Caroline F. THORN, Garret A. FITZGERALD, Russ B. ALTMAN a Teri E. KLEIN. PharmGKB summary. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. 2015, 25(2), 96-106 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1097/FPC.000000000000113. ISSN 1744-6872. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01213011-201502000-00006>
- [8] MAYER, Otto. Originální lék versus generikum. *Interní medicína* [online]. 2012, 2012, 14(10), 396–398 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/10/12.pdf>
- [9] NGUYEN, Ngoc Van Thi, Tiet Nghia Thi TRAN, Manh Quan NGUYEN a Trung Kien NGUYEN. Rapid and simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen and related impurity of ibuprofen by UPLC/DAD. *Pharmaceutical Sciences Asia* [online]. 2018, 45(4), 213-220 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.29090/psa.2018.04.017.0056. ISSN 25868195. Dostupné z: [https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/journal/\\_files/2018-45-4\\_3.pdf](https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/journal/_files/2018-45-4_3.pdf)
- [10] Český lékopis ...: *Pharmacopoea Bohemica*. Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [11] EBESHI, Benjamin, Kehinde OSENI, Augustine AHMADU a James OLUWADIYA. Comparative utilization of visual, potentiometric titrations and UV spectrophotometric methods in the determination of Ibuprofen. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009, 3(9), 426-431.
- [12] RAINSFORD, K. D. Fifty years since the discovery of ibuprofen. *Inflammopharmacology* [online]. 2011, 19(6), 293-297 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/s10787-011-0103-7. ISSN 0925-4692. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10787-011-0103-7>
- [13] MURPHY, Mark A. Early Industrial Roots of Green Chemistry and the history of the BHC Ibuprofen process invention and its Quality connection. *Foundations of Chemistry* [online]. 2018, 20(2), 121-165 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/s10698-017-9300-9. ISSN 1386-4238. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10698-017-9300-9>

- [14] MA, Yixin, Xia ZHANG, Zhaoyou ZHU, Yinglong WANG, Jun GAO a Peizhe CUI. Process intensification and waste minimization for ibuprofen synthesis process. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2018, 194, 396-405 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.05.131. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652618314719>
- [15] KILBURG, McKenna a Rachel TYLER. IBUPROFEN SYNTHESIS. *Central College* [online]. 2017,1 [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://www.central.edu/writing-anthology/2019/04/11/ibuprofen-synthesis/>
- [16] MALLAH, Muhammad Ali, Syed Tufail Hussain SHERAZI, Sarfaraz Ahmed MAHESAR a Abdul Rauf KHASKHELI. Simultaneous Quantification of Ibuprofen and Paracetamol in Tablet Formulations Using Transmission Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, 03(08), 503-511 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.4236/ajac.2012.38067. ISSN 2156-8251. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2012.38067>
- [17] MATKOVIC, S.R. QUANTITATIVE ANALYSIS OF IBUPROFEN IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS THROUGH FTIR SPECTROSCOPY. *Latin American Applied Research*. 2005, (35), 189-195.
- [18] NUGRAHANI, Ilma. GREEN METHOD FOR ACETAMINOPHEN AND IBUPROFEN SIMULTANEOUS ASSAY IN THE COMBINATION TABLET USING FTIR. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2018, 10(3), 77-85.
- [19] KIRTAWADE, Rupali. VALIDATED SPECTROSCOPIC METHOD FOR ESTIMATION OF IBUPROFEN FROM TABLET FORMULATION. *Archives of Pharmaceutical Science and Research*. 2010, 2(1), 271-273.
- [20] HOANG, Vu Dang, Dong Thi Ha LY, Nguyen Huu THO a Hue MINH THI NGUYEN. UV Spectrophotometric Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Combined Tablets by Derivative and Wavelet Transforms. *The Scientific World Journal* [online]. 2014, 2014, 1-13 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1155/2014/313609. ISSN 2356-6140. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/313609/>
- [21] KOLARCZYKOVÁ, Barbora. *Stanovení lisovatelnosti ibuprofenu*. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Milan Řehula.
- [22] Mediatly: Databáze léčiv [online]. Slovinsko: MODRA JAGODA [cit. 2020-04-29]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs>
- [23] QANDIL, Amjad M., Aiman A. OBAIDAT, Muaadh A. Mohammed ALI, et al. Investigation of the Interactions in Complexes of Low Molecular Weight Chitosan with Ibuprofen. *Journal of Solution Chemistry* [online]. 2009, 38(6), 695-712 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1007/s10953-009-9405-4. ISSN 0095-9782. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10953-009-9405-4>
- [24] STUART, Barbara. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken: John Wiley, 2004. ISBN 978-0-470-85428-0.
- [25] ANZENBACHER, Pavel a Jaroslav JEZDINSKÝ. LÉČIVA A CHIRALITA. *Klin Farmakol Farm*. Olomouc, 2003, 17, 148-150. ISSN 1803-5353.

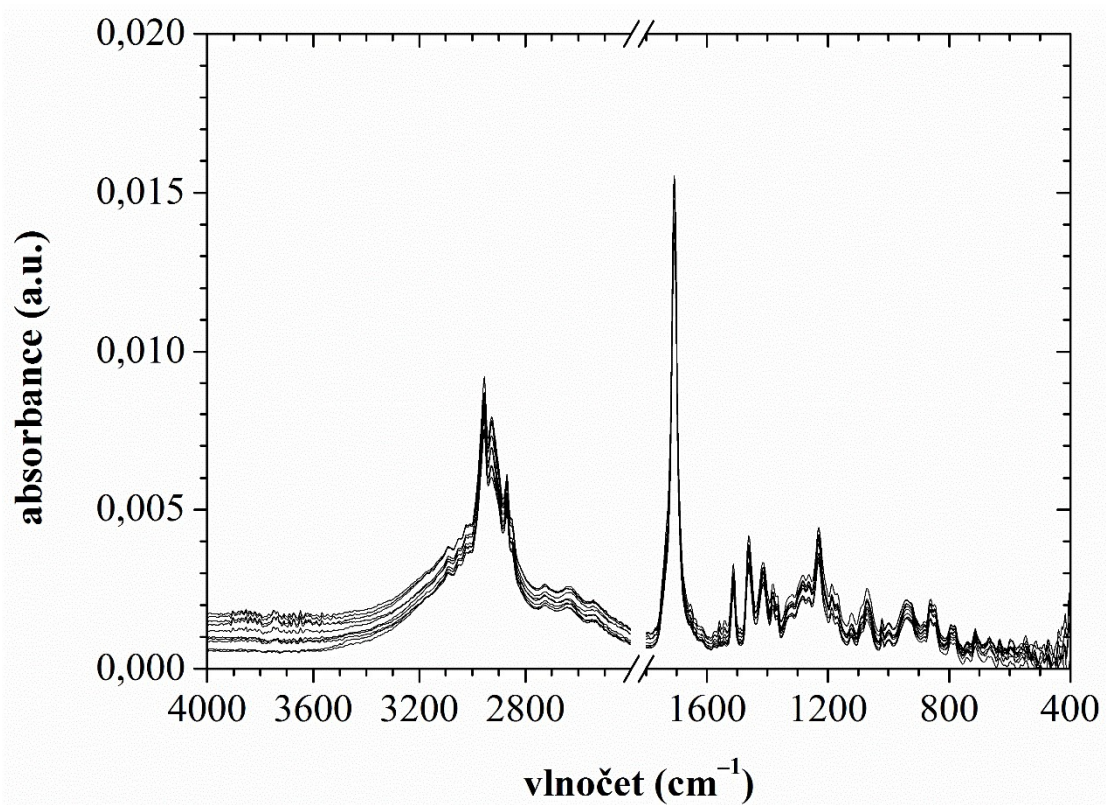
## 7 PŘÍLOHY



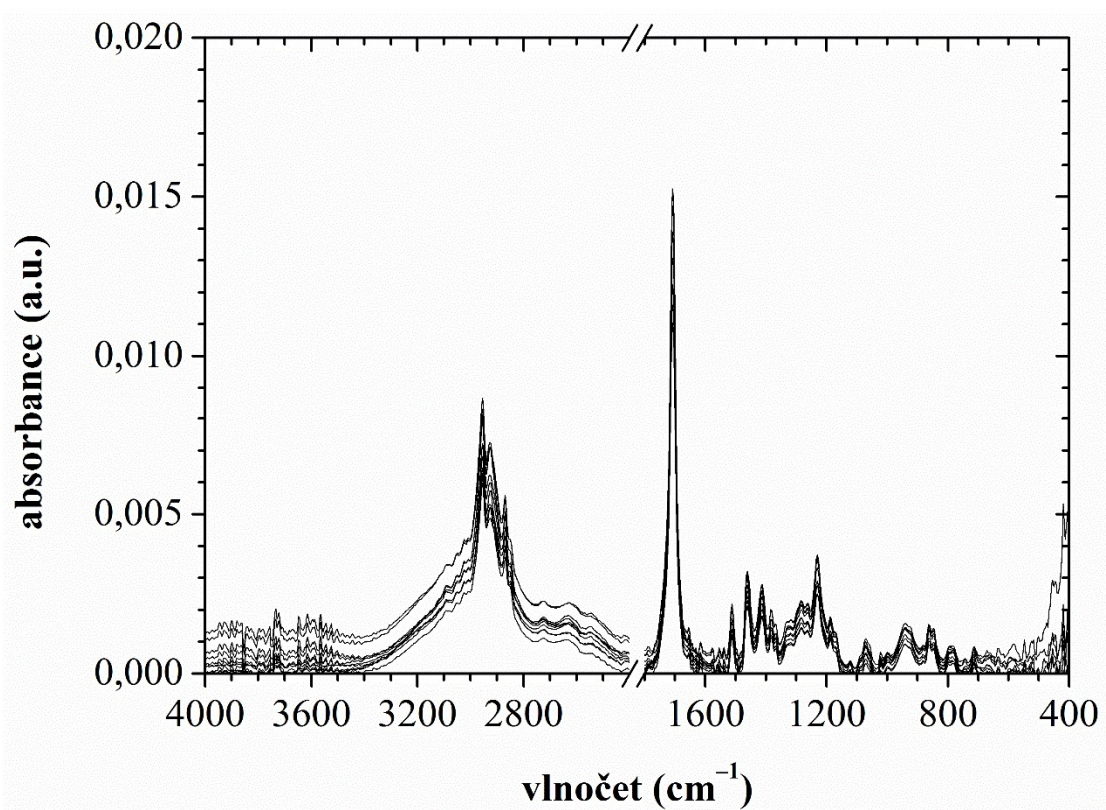
Obrázek 12: Infračervená spektra kalibračních roztoků standardu ibuprofenu Sigma Aldrich



Obrázek 13: Infračervená spektra organických extraktů vzorku Ibalginu



Obrázek 14: *Infračervená spektra organických extraktů vzorku Ibuprofenu*



Obrázek 15: *Infračervená spektra chloroformových fází vzorku Nurofenu*

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	paracetamol
ATR	metoda zeslabeného úplného odrazu
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
CYP2C8	cytochrom P4502C8
CYP2C9	cytochrom P4502C9
DRIFT	metoda difuzní refelxe
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IBU	ibuprofen
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
PGH <sub>2</sub>	prostaglandin H <sub>2</sub>
RMSECV	křížová validace
RSD	relativní směrodatná odchylka
UVB	středněvlnné ultrafialové záření
UVC	krátkovlnné ultrafialové záření
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

$\lambda_{\max}$	vlnová délka s nejvyšší hodnotou absorbance
LD50	střední smrtelná dávka
pKa	disociační konstanta
pH	vodíkový exponent