



# 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 PARACETAMOLU VE VYBRANÝCH LÉČIVECH POMOCÍ ATR-FTIR SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF PARACETAMOL CONTENT IN SELECTED DRUGS USING ATR-FTIR  
SPECTROMETRY

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristína Waczulíková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1552/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Kristína Waczulíková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu Paracetamolu ve vybraných léčivech pomocí ATR–FTIR spektrometrie

### Zadání bakalářské práce:

Stanovit obsah paracetamolu ve vybraných léčivech pomocí ATR–FTIR spektrometrie.

Navrhnout a optimalizovat stanovení Paracetamolu v lékových formách pomocí přímého měření vzorku tzv. suchá cesta.

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.

-----  
Kristína Waczulíková  
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**

Táto bakalárska práca sa zaoberá stanovením obsahu paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch pomocou ATR-FTIR spektrometrie, ako aj navrhnutím a optimalizovaním stanovenia paracetamolu v liekových formách pomocou priameho merania vzorky – tzv. suchej cesty. Boli študované tablety troch liečivých prípravkov s obsahom paracetamolu. Z FTIR spektier boli vybraté oblasti vlnočtov, kde bola absorpcia plnív (mikrokryštalickej celulózy, škrobu a stearátu horečnatého) minimálna. Na zostrojenie kalibračnej krivky boli vybraté absorpčné pásy paracetamolu pri  $1\,503\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,224\text{ cm}^{-1}$ . Množstvo paracetamolu v prítomnosti jednotlivých plnív bolo vypočítané pomocou analytických kalibračných kriviek získaných metódou lineárnej regresie. Najnižšia odchýlka od výrobcom uvádzaného obsahu 500 mg paracetamolu bola identifikovaná u kalibračnej krivky pre paracetamol v prítomnosti mikrokryštalickej celulózy. Zistené priemerné množstvo paracetamolu v jednej tablete u študovaných prípravkov sa pohybovalo v rozmedzí 493,5–505,5 mg. Z analýzy výsledkov merania je možné vyvodit' záver, že metóda ATR-FTIR spektrometrie je vhodná na kvantitatívne stanovenie paracetamolu v liečivých prípravkoch pomocou priameho merania vzorky, pretože odchýlky od referenčnej hodnoty 500 mg nepresiahli 1,5 % pre mikrokryštalickú celulózu a 3,85 % pre stearát horečnatý a sú tak v medziach akceptovateľných pre prieskumné meranie.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with determination of paracetamol content in selected drugs by ATR-FTIR spectrometry and aims to design and optimize determination of paracetamol in dosage forms by a direct measurement of the sample, called 'dry way'. Tablets of three drugs containing paracetamol have been studied. Wavelength ranges were determined from the measured FTIR spectra as regions where the absorptions of fillers (microcrystal cellulose, starch and magnesium stearate) were minimal. Absorption bands of paracetamol were selected at the wavenumbers of  $1\,503\text{ cm}^{-1}$  and  $1\,224\text{ cm}^{-1}$  in order to construct a calibration curve. The contents of paracetamol in the drug tablets were calculated using calibration curves obtained by the method of simple regression analysis. The lowest deviation from the amount of 500 mg paracetamol per tablet as reported by the manufacturer was from the calibration curve for paracetamol with microcrystalline cellulose. The determined amounts of paracetamol per tablet in the selected drugs lied within range 493.5–505.5 mg. These results point to the conclusion that the ATR-FTIR spectrometry method can be used for the quantitative determination of paracetamol in drugs using direct measurement, as deviations from the reference value of 500 mg did not exceed 1.5 % for cellulose and 3.85 % for magnesium stearate and therefore are within acceptable limits for the exploratory study.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Paracetamol, ATR-FTIR spektrometria, FTIR spektra, mikrokryštalická celulóza

## **KEYWORDS**

Paracetamol, ATR-FTIR spectrometry, FTIR spectra, microcrystalline cellulose

WACZULÍKOVÁ, Kristína. *Stanovení obsahu Paracetamolu ve vybraných léčivech pomocí ATR-FTIR spektrometrie* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123841>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Kristína Waczulíková

*Na tomto mieste by som sa veľmi rada poďakovala vedúcemu bakalárskej práce Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za jeho čas, trpezlivosť, nápomocnosť a poskytnutie cenných rád a pripomienok. Ďalej by som chcela poďakovať svojim rodičom za usmernenie pri štúdiu problematiky spracovania experimentálnych dát, rady pri editovaní textu a za celkovú podporu počas štúdia.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>8</b>
2.1	Fyzikálne a chemické vlastnosti paracetamolu .....	8
2.2	Chemická syntéza paracetamolu .....	8
2.3	Stabilita liečiva .....	10
2.4	Farmakológia .....	11
2.4.1	Farmakokinetika .....	11
	<i>Absorpcia paracetamolu</i> .....	<i>11</i>
	<i>Metabolizmus paracetamolu</i> .....	<i>11</i>
	<i>Eliminácia paracetamolu</i> .....	<i>12</i>
2.4.2	Farmakodynamika .....	12
	<i>Účinok paracetamolu</i> .....	<i>12</i>
	<i>Indikácia paracetamolu</i> .....	<i>13</i>
	<i>Kontraindikácia paracetamolu</i> .....	<i>13</i>
	<i>Nežiaduce účinky paracetamolu a toxicita</i> .....	<i>14</i>
2.5	Liekové formy .....	14
2.5.1	Pevné liekové formy .....	14
	<i>Tablety</i> .....	<i>14</i>
	<i>Kapsule</i> .....	<i>15</i>
	<i>Prášok na prípravu perorálneho roztoku</i> .....	<i>15</i>
2.5.2	Polotuhé liekové formy .....	15
	<i>Čapíky</i> .....	<i>15</i>
2.5.3	Tekuté liekové formy .....	15
	<i>Suspenzie</i> .....	<i>15</i>
<b>3</b>	<b>SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>16</b>
3.1	UV/Vis spektrofotometrické stanovenie paracetamolu .....	16
3.2	Stanovenie paracetamolu pomocou cerimetrie .....	16
3.3	Stanovenie paracetamolu pomocou voltametrie .....	16
3.4	Stanovenie paracetamolu kvapalinovou chromatografiou s UV detekciou .....	17
3.5	Stanovenie paracetamolu kvapalinovou chromatografiou s MS detekciou .....	17
3.6	Stanovenie paracetamolu pomocou kapilárnej elektroforézy .....	18

3.7	Stanovenie paracetamolu pomocou infračervenej spektroskopie .....	18
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>20</b>
4.1	Použité chemikálie .....	20
4.2	Použité prístroje, pomôcky a programy .....	20
4.3	Postup merania vzoriek pre kalibračné krivky.....	20
4.3.1	Príprava vzoriek.....	20
4.3.2	Inštrumentácia.....	21
4.3.3	Meranie vzoriek .....	22
4.3.4	Spracovanie spektrálnych dát .....	22
4.4	Postup samotného merania vybraných liečivých prípravkov .....	23
4.4.1	Príprava vzoriek.....	23
4.4.2	Inštrumentácia a podmienky merania .....	23
4.4.3	Meranie vzoriek .....	23
4.4.4	Spracovanie spektrálnych dát .....	24
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>25</b>
5.1	Voľba vhodného absorpčného pásu pre kalibračnú krivku.....	25
5.2	Kalibračné krivky paracetamolu s mikrokryštalickou celulórou, stearátom horečnatým a so škrobom .....	29
5.2.1	Regresná analýza kalibračných kriviek .....	31
5.3	Vyhodnotenie jednotlivých meraní a stanovenie obsahu paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch.....	33
5.3.1	Analýza výsledkov samotného merania .....	35
<b>6</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>PRÍLOHY .....</b>	<b>45</b>

# 1 ÚVOD

Paracetamol, taktiež nazývaný acetaminofen, chemicky N-(4-hydroxyfenyl)acetamin (sumárny vzorec  $C_8H_9NO_2$ ) je biela kryštalická látka, ktorá patrí medzi najrozšírenejšie používané analgetiká (tíši bolesť) a antipyretiká (znižuje horúčku). Napomáha tíšiť mierne bolesti hlavy, kĺbov, chrbta, zubov, príznaky chrípky. V porovnaní s inými analgetikami sa paracetamol radí medzi látky prvej voľby takmer u všetkých skupín pacientov. Je to vďaka jeho priaznivému bezpečnostnému profilu a overeným terapeutickým účinkom. Existuje veľa druhov liekov, ktoré obsahujú účinnú látku paracetamol, napríklad Paralen<sup>®</sup>, Panadol<sup>®</sup>, Coldrex<sup>®</sup>, Mexavit<sup>®</sup>, Dafalgan<sup>®</sup>, Ataralgin<sup>®</sup> a ďalšie [1].

Dá sa povedať, že objav účinkov paracetamolu bola serendipita (šťastná náhoda). Podobná molekula acetanilid, derivát anilínu (sumárny vzorec  $C_8H_9NO$ ) bola podávaná pacientom ako analgetikum a antipyretikum od roku 1886. Acetanilid je vo vyšších dávkach toxický, pretože spôsobuje methemoglobinémiu (oxidáciu  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  v hemoglobíne). Preto sa vedci snažili nájsť bezpečnejšiu náhradu, ktorá by si zároveň zachovala jeho pozitívne účinky [2] [3].

V roku 1878 bol Harmonom Morsenom syntetizovaný nový derivát anilínu, fenacetín (chemický vzorec N-(4-ethoxyfenyl)acetamid, sumárny vzorec  $C_{10}H_{13}NO_2$ ), ktorý sa začal používať ako liečivo od roku 1886. Tento liek sa používal takmer 100 rokov, až kým nebol stiahnutý z trhu v roku 1983 na podnet americkej agentúry FDA (Food and Drug Administration). Dôvodom boli nežiaduce toxické účinky, ako napríklad analgetická nefropatia (ochorenie obličiek) [2] [3].

Úspešnú syntézu paracetamolu z fenacetínu vykonali vedci z nemeckej firmy Bayer v spolupráci s nemeckým fyziológom Josephom von Meringom v roku 1893, avšak z dôvodu nesprávnej domnienky, že táto látka má podobné vedľajšie účinky ako acetanilid, sa klinické používanie paracetamolu ako liečiva posunulo o 50 rokov. Až v štyridsiatych rokoch 20. storočia vedci vyvrátili von Meringovu hypotézu a dokázali, že fenacetín je v ľudskom tele metabolizovaný v 99 % na paracetamol a v 1 % na kyselinu hydroxamovú, ktorá vyvoláva toxicitu [2] [3].

Tento objav umožnil v roku 1953 uvedenie paracetamolu na trh s liekmi a spustil jeho masívnu produkciu, ktorá pretrváva do dnešných čias. Od roku 1959 sú lieky obsahujúce účinnú látku paracetamol dostupné bez lekárskeho predpisu [2] [3].

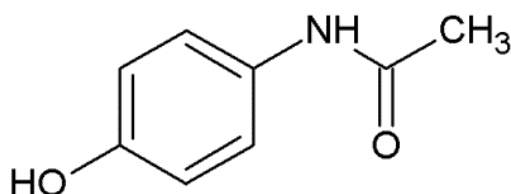
U každého lieku je nevyhnutné, aby bola overená jeho účinnosť, bezpečnosť a užitočnosť predtým, než sa liek uvedenie na trh. Ale aj po uvedení na trh musí výrobca zabezpečiť a udržiavať systém kvality a vnútornej kontroly, či sa v lieku nachádza účinná látka a ostatné súčasti v takom zložení a dávke, v akej tam majú byť. Je potrebné zabezpečiť, aby liečivo v danej forme (či už ide o tabletu, kapsulu, alebo kvapky) bolo chemicky stabilné, aby každá tableta spĺňala istý rozsah hmotnosti, pevnosti a homogenity, a to v rámci celej výrobnéj dávky (vo farmácii nazývanej šarža). Existuje veľa spoľahlivých, komplexnejších aj menej komplexných technológií a metód na stanovenie kvality a kvantity liečiva v liečivom prípravku. Keďže vo farmaceutických a chemických firmách je snaha o čo najvyššiu efektivitu práce pri rozumne vynaloženom čase a prostriedkoch, hľadajú sa jednoduché, časovo nenáročné metódy, ktoré poskytujú výsledky s požadovanou presnosťou. Medzi finančne a časovo nenáročnú metódu patrí aj metóda ATR-FTIR spektrometrie, ktorá je predmetom tejto bakalárskej práce [4].

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Fyzikálne a chemické vlastnosti paracetamolu

Paracetamol (Obrázok 1) je biela kryštalická látka horkastej chuti a bez zápachu. Z chemického hľadiska je paracetamol derivát anilínu, ktorý sa skladá z benzénového jadra substituovaného jednou hydroxylovou skupinou a atómu dusíka amidového charakteru v para pozícii (1,4). Amidovou skupinou je acetamid [5] [6].

Molekula paracetamolu je usporiadaná do planárnej štruktúry s  $sp^2$  hybridizáciou. Jedná sa o konjugovaný systém kvôli elektrónovému  $\pi$ -oblaku na benzéne,  $p$ -orbitálu na karbonylovom uhlíku a kvôli voľným elektrónovým párom na kyslíku, dusíku a na karbonylovej skupine. Konjugácia spôsobuje zníženie zásaditosti kyslíka a dusíka, zatiaľ čo hydroxylová skupina zvyšuje kyslosť spôsobenú delokalizáciou náboja vedúceho k vzniku fenoxidového aniónu [5] [6].



Obrázok 1. Chemická štruktúra paracetamolu

Ide o veľmi slabú kyselinu s hodnotou disociačnej konštanty  $pK_a$  9,38. Preto je paracetamol vo väčšine fyziologických roztokoch nedisociovaný. Tento poznatok vysvetľuje voľnú difúziu paracetamolu do tkaniva. Molekulová hmotnosť paracetamolu je  $151,165 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a hustota pri teplote  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  činí  $1,293 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Rozdeľovací koeficient (oktanol/voda) je 3,2 [7] [8].

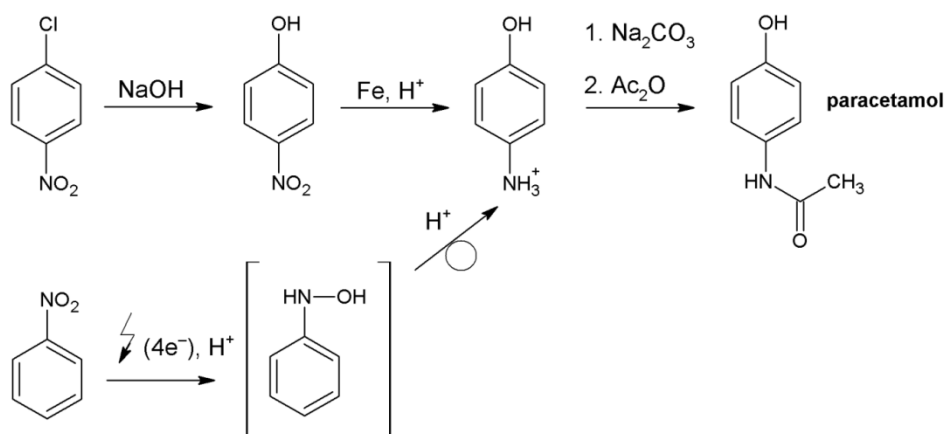
Paracetamol má nízku rozpustnosť v nepolárnych látkach a v chlórovaných uhlíkovodíkoch, ako napríklad toluén, benzén a tetrachlórmetán. Avšak jeho rozpustnosť je vysoká v stredne polárnych rozpúšťadlách, ako napríklad N,N-dimetylformamid, dimetylsulfoxid a dietylamín. Je slabo rozpustný vo vode ale silno rozpustný v alkoholoch s kratším uhlíkovým reťazcom, napríklad v metanole a etanole. Rozpustnosť mierne stúpa so zvyšujúcou sa teplotou. Bod topenia je pomerne vysoký, pohybuje sa medzi  $168\text{--}170 \text{ }^\circ\text{C}$ . Teplota varu sa pohybuje okolo  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  [7] [8].

### 2.2 Chemická syntéza paracetamolu

Chemická syntéza paracetamolu sa dá uskutočniť niekoľkými základnými spôsobmi s niekoľkými počiatočnými látkami, ako napríklad 4-chlornitrobenzén, *p*-aminofenol, fenol a nitrobenzén.

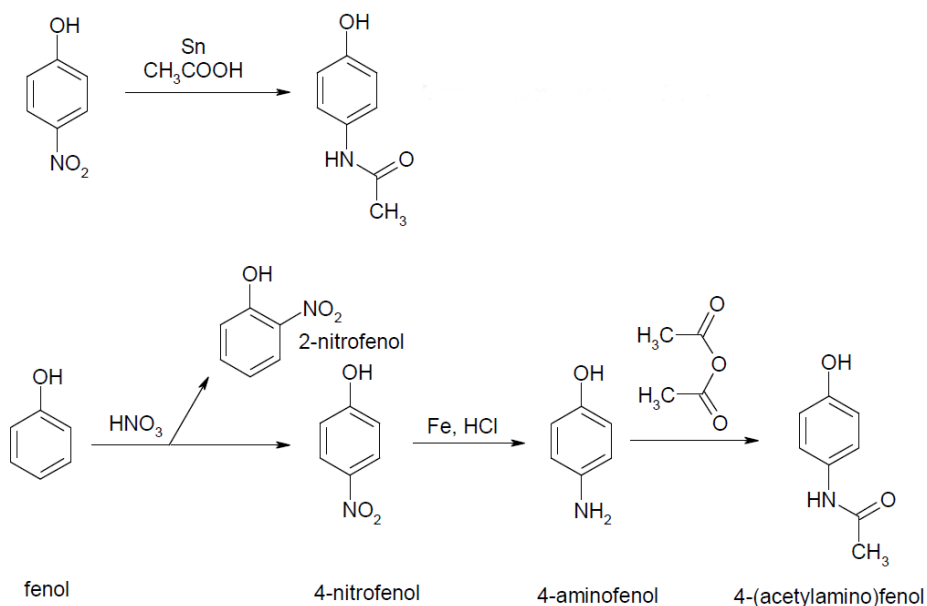
Na Obrázok 2 je východiskovou látkou 4-chlornitrobenzén. Chlór sa nukleofilnou substitúciou nahradí hydroxidovým iónom a vznikne 4-nitrofenol, ktorý sa ďalej redukuje na 4-aminofenol. Následnou acetyláciou za použitia acetanhydridu vzniká finálny produkt paracetamol. V druhom prípade ide o elektrochemickú, kyslo katalyzovanú redukciiu nitrobenzénu Bambergerovým prešmykom fenyhydroxyalamínu na 4-aminofenol. Ďalej sa postupuje ako v prvom prípade, a to acetyláciou 4-aminofenolu na paracetamol [9].





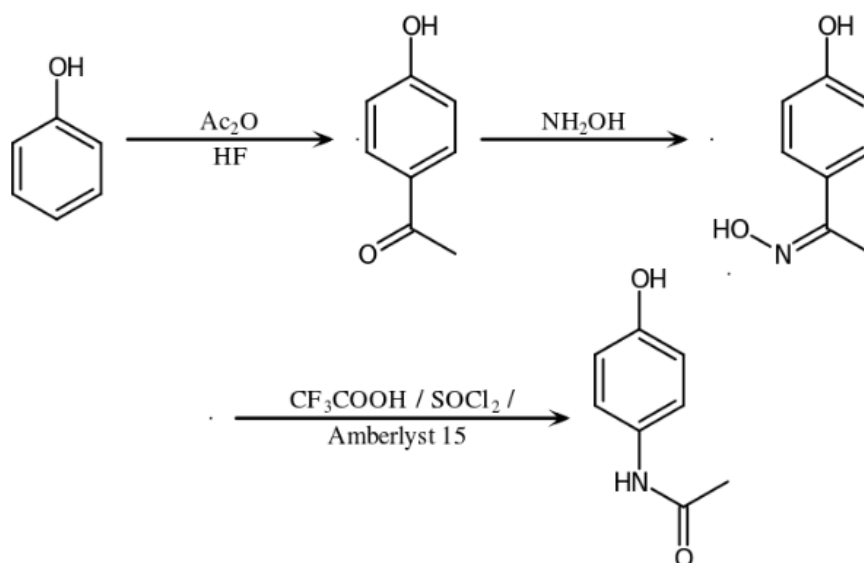
Obrázok 2. Syntéza paracetamolu s východiskovými látkami 4-chlórnitrobenzén a nitrobenzén [9]

Ďalšie možné syntézy paracetamolu sú uvedené na Obrázok 3 a Obrázok 4. Na Obrázok 3 ide o redukciu 4-nitrofenolu kovmi a následnú reakciu s kyselinou octovou za vzniku paracetamolu. V ďalšom prípade je počiatočnou látkou fenol, ktorý reaguje s kyselinou dusičnou a NO<sub>2</sub> skupina sa viaže na fenol do polohy ortho a para. Pre vznik paracetamolu je podstatná NO<sub>2</sub> skupina v polohe para. Ďalším krokom sa 4-nitrofenol zredukuje v kyslom prostredí na 4-aminofenol. V poslednom kroku prebehne acetylácia 4-aminofenolu acetanhydridom a vzniká finálny produkt 4-(acetylamo)fenol, zjednodušene paracetamol [10].



Obrázok 3. Syntéza paracetamolu s východiskovými látkami 4-nitrofenol a fenol [10]

Na Obrázok 4 je naznačená alternatívna syntéza, takzvaná zelená syntéza, vynájdená vedcami z firmy Hoechst-Celanese. Jedná sa o ďalšiu obmenu syntézy paracetamolu. Fenol je acetylovaný acetanhydridom za kyslej katalýzy. Následne hydroxylamín spôsobí premenenie keto skupiny na oxim. V poslednom kroku kyslo katalyzovaný Beckmannov prešmyk dáva amid [11].



Obrázok 4. Zelená syntéza paracetamolu s východiskovou látkou fenol [11]

### 2.3 Stabilita liečiva

Liečivo, alebo účinná látka (český ekvivalent *léčivá látka*) je chemicky jednotná alebo nejednotná látka ľudského, rastlinného, živočíšneho, chemického alebo prírodného pôvodu, ktorá je nositeľom biologického účinku využiteľného na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií [12].

Liek, taktiež nazývaný liečivý prípravok (český ekvivalent *léčivý přípravek*) je výrobok, ktorý obsahuje jedno alebo viac liečiv a pomocné látky. Lieky sú upravené technologickým procesom do rôznych liekových foriem (napr. tablety, čapíky, kvapky, sirupy, krémy, atď.) a sú určené na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií [12].

Liečivý prípravok má kvôli fyzikálnym a chemickým vlastnostiam obmedzenú stálosť. Keďže mechanická a chemická stabilita liečiva do veľkej miery ovplyvňuje aj biologickú aktivitu, teda účinnosť látky v živom organizme, musia byť štúdie stability súčasťou vývoja každého nového lieku. Testy stability zisťujú zmeny kvality liečiva a liekovej formy v dôsledku rôznych vplyvov [13].

Faktory ovplyvňujúce stabilitu liečiv sa rozdeľujú na vnútorné a vonkajšie. Vnútorné faktory súvisia s chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami liečiva a s nečistotami (degradačné produkty, rezíduá rozpúšťadiel apod.). Medzi vonkajšie faktory patrí vplyv teploty, vlhkosti prostredia, svetelného žiarenia, prítomnosť kyslíka a oxidu uhličitého, ako aj vplyv rôznych mikroorganizmov [13].

Dôsledkom nedostatočnej stability liečivého prípravku môže byť strata aktivity, zvýšenie alebo zníženie koncentrácie liečivej látky, zvýšenie alebo zníženie obsahu toxických metabolických produktov, zmena biologickej dostupnosti alebo strata integrity systému [14].

Paracetamol sa chemicky zaraďuje medzi amidy a práve amidová skupina môže byť citlivá na hydrolytickú degradáciu, ktorá je spôsobená zvýšenou vlhkosťou prostredia. Testy stability ukázali, že pri rôznych zmenách teplôt a vlhkosti dokážu byť fyzikálne vlastnosti paracetamolu v práškovej forme nezmenené až niekoľko mesiacov [15].

Polčas rozpadu paracetamolu u dospelého človeka je dve a pól hodiny pri intravenóznejš dávke  $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Polčas rozpadu paracetamolu pri predávkovaní záleží na patofyziologickom stave pečene, kde sa paracetamol metabolizuje. Jeho polčas rozpadu v pečeni pri predávkovaní sa pohybuje medzi štyrmi a ôsmimi hodinami [16].

## **2.4 Farmakológia**

Farmakológia je definovaná ako veda o liekoch, veda, ktorá sa zaoberá interakciami uskutočňovanými chemickými alebo fyzikálnymi procesmi medzi chemickými látkami (xenobiotikami) a živým organizmom na všetkých jeho úrovniach, ktorých dôsledkom je modulácia telesných pochodov [17].

### **2.4.1 Farmakokinetika**

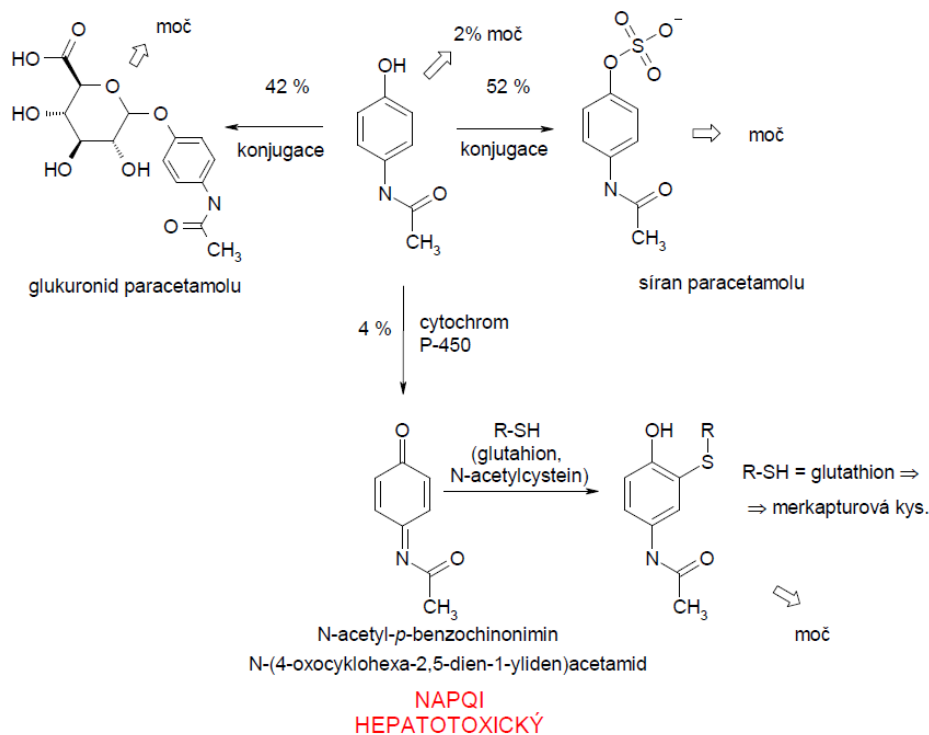
Farmakokinetika sa zaoberá procesmi, ktoré modifikujú časový priebeh koncentrácie liečiva v organizme, a popisuje ju vhodnými farmakokinetickými parametrami. Zaoberá sa tým, ako organizmus pôsobí na liečivo. Rozlišuje niekoľko fáz: absorpcia, distribúcia, metabolizmus a eliminácia [17].

#### ***Absorpcia paracetamolu***

Paracetamol sa po perorálnom podaní vstrebáva v žalúdku a v tenkom čreve v priebehu 30–60 min. Biologický polčas paracetamolu je dve až tri hodiny. Po užití vyššej, toxickej dávky je maximálna koncentrácia paracetamolu dosiahnutá do štyroch hodín. Rektálna absorpcia je pomerne neštandardná a dosahuje slabšieho vstrebávania. Odporúčaná dávka pri rektálnom podaní je 3 až 4krát vyššia v prepočte na kg ( $40\text{--}45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) než pri perorálnej dávke ( $10\text{--}15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) [18].

#### ***Metabolizmus paracetamolu***

Paracetamol sa predovšetkým metabolizuje konjugáciou v pečeni na hydrofilné látky glukuronid a síran paracetamolu (Obrázok 5). Malá časť paracetamolu sa vylúči v nezmenenej forme močom. Okolo 4 % paracetamolu sa metabolizuje cytochrómom P450 na reaktívny toxický metabolit N-acetyl-p-benzochinonimín (NAPQI). Pokiaľ nie je ďalej metabolizovaný a hromadí sa, naviaže sa na bunečné makromolekuly pečene a usmrcuje bunky. NAPQI sa po správnom konjuguje v pečeni s donormi  $\text{-SH}$  skupín, ako s netoxickým glutatiónom alebo N-acetylcysteínom, a vzniká netoxická kyselina merkapturová. Všetky produkty metabolizmu paracetamolu sú prednostne vylúčené močom a časť sa vylučuje žľou [10] [18].



Obrázok 5. Metabolizmus paracetamolu v ľudskej pečeni [10]

### Eliminácia paracetamolu

Paracetamol sa primárne vylučuje z organizmu močom vo forme netoxických metabolitov (40–60 % ako glukuronát, 30 % ako síran a 2 % v nezmenenej forme). Malá časť metabolitov sa vylučuje žlčou a pri nesprávnej funkcii pečene sa exkrécia konjugátov s glutatiómom žlčou zvyšuje na 40 % [18].

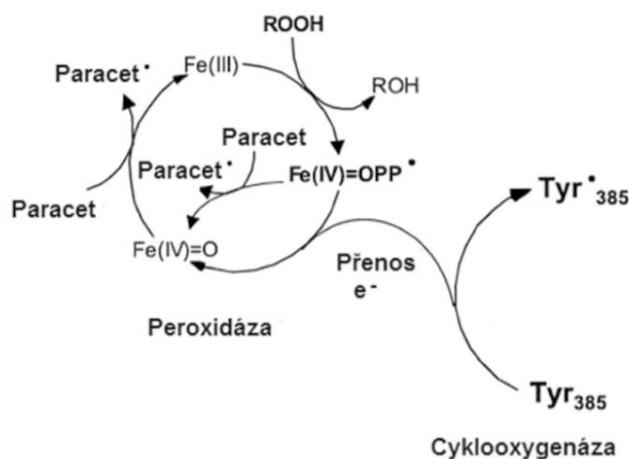
### 2.4.2 Farmakodynamika

Pod pojmom farmakodynamika rozumieme štúdium biochemických a fyziologických účinkov látok vrátane mechanizmov pôsobenia s cieľom určiť ich terapeutické účinky a toxické dôsledky ich podávania – zaoberá sa mechanizmom pôsobenia liečiv [17].

### Účinok paracetamolu

Presný mechanizmus pôsobenia paracetamolu nie je doposiaľ úplne objasnený a potvrdený, ale predpokladá sa, že hlavným mechanizmom účinku paracetamolu je inhibícia enzýmu cyklooxygenázy v centrálnej nervovej sústave (antipyretický účinok), ktorý spôsobí zníženie tvorby prostaglandínov. Nepriamo pôsobí na sérotonínové 5-HT<sub>3</sub> receptory v mieche (analgetický účinok). Jeden možný mechanizmus účinku spočíva v tom, že paracetamol sa naviaže na peroxidázovú časť systému cyklooxygenázy a dochádza k tvorbe radikálu (Paracet). Tým sa skrátí cyklus premeny radikálu kationu feryl-protoporfyrínu (Fe(IV) = OPP) na feryl-protoporfyrín (Fe(IV) = O) bez príjmu elektrónu z cyklooxygenázy a bez nedostatku radikálu tyrozínu (Obrázok 6). Akonáhle je radikál tyrozínu potrebný k iniciálnej aktivácii radikálu arachidovej kyseliny, paracetamol začne blokovat' funkciu cyklooxygenázy (COX). Výskyt radikálov a hladina kyseliny arachidovej výrazne ovplyvňuje účinok paracetamolu na inhibíciu COX-1. V oblasti vzniku zápalu dochádza k tvorbe

škodlivých radikálov produkovaných COX-2, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú funkciu paracetamolu. Z toho sa dá usudzovať vyšší analgetický účinok paracetamolu u nezápalových bolestiach, ako sú napríklad úrazy, pooperačné bolesti a iné. Hlavná oblasť účinku paracetamolu je stále predmetom vedeckých diskusií. Najpravdepodobnejšími teóriami účinku sa zaoberajú práce [10] [17] [18].



Obrázok 6. Mechanizmus účinku paracetamolu na cyklooxygenázu [18]

### **Indikácia paracetamolu**

Indikácia paracetamolu zahŕňa liečbu mierne silnej bolesti, ako je bolesť hlavy, chrbta, svalov, kĺbov, menštruačné bolesti, bolesť zubov, hrdla, a tiež liečba horúčky pri chrípkovom ochorení a akútnej zápal horných dýchacích ciest [16].

Rôzne liečivé prípravky obsahujú rôzne množstvá účinnej látky paracetamolu. Bežná jednorazová dávka paracetamolu u dospelého človeka je 500 až 1 000 mg s odstupom najmenej štyri hodiny. Odporúčaná maximálna denná dávka u dospelého človeka je 4 000 mg, teda najviac osem 500 mg tabliet paracetamolu. Pri dlhodobom užívaní sa denná dávka paracetamolu znižuje na 2 500 mg za deň. U detí sa viaže dávka na ich telesnú hmotnosť. Množstvo podaného paracetamolu by nemalo prekročiť hladinu  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  váhy dieťaťa [18] [19].

### **Kontraindikácia paracetamolu**

Rovnako ako pri užívaní iných liekov je nutné dodržiavať terapeutické množstvo, optimálne dávkovanie a nepresahovať maximálnu dennú dávku. Kontraindikácia podania paracetamolu nastáva pri známej precitlivenosti na liečivú látku alebo na inú zložku prípravku. Ďalej paracetamol nesmie byť podávaný ľuďom trpiacim hemolytickou anémiou. Konzumácia alkoholu počas užívania paracetamolu sa silno neodporúča. Podávanie lieku ľuďom s vážnou poruchou pečene je kontraindikované, pretože paracetamol je metabolizovaný v pečeni a funkcia pečene je tým zaťažovaná [10] [18].

Nebezpečenstvo užívania paracetamolu počas gravidity a laktácie nebolo hlásené a potvrdené. Časť paracetamolu síce prestupuje cez placentárnu bariéru, ale neboli preukázané žiadne škodlivé vplyvy jeho užívania na embryonálny vývin dieťaťa alebo graviditu. Počas tehotenstva sa má užívať paracetamol v čo najnižšej účinnej dávke a iba krátkodobo s čo najnižšou frekvenciou [16].

### ***Nežiaduce účinky paracetamolu a toxicita***

Paracetamol je pri dodržiavaní doporučeného dávkovania obvykle veľmi dobre znášaný, avšak ako každý liek, aj lieky obsahujúce paracetamol môžu mať vedľajšie účinky, ktoré sa ale nemusia vyskytnúť u každého jednotlivca. Medzi zriedkavé (menej ako 1 z 1 000 osôb) nežiaduce účinky patrí kožná alergická reakcia, svrbenie a žihľavka (urtikária). Medzi veľmi zriedkavé (menej ako 1 z 10 000 osôb) nežiaduce účinky patrí zúženie priedušiek, závažná alergická reakcia sprevádzaná opuchnutím horných dýchacích ciest, porucha funkcie pečene a porucha krvotvorby [20].

Paracetamol sám o sebe nie je toxický, ale problematický je jeho metabolit N-acetyl-p-benzochinonimín (NAPQI), ktorý vzniká metabolizovaním cytochrómom P450. Za normálneho fungovania organizmu sa tento toxický metabolit ďalej metabolizuje na netoxickú kyselinu merkapturovú a je vylúčený z organizmu močom. Pokiaľ je táto druhá metabolizácia narušená a NAPQI sa hromadí v organizme, môže dôjsť k intoxikácii. Najväčšie riziko intoxikácie nastáva pri predávkovaní sa paracetamolom, keď sa toxický metabolit NAPQI nestíha metabolizovať a hromadí sa v organizme. V lepšom prípade sa NAPQI rýchlo viaže s glutatiómom a vylučuje obličkami. V horšom prípade dôjde k poškodeniu pečenevých buniek, čo môže viesť k smrteľným intoxikáciám [18] [21].

U dospelého človeka s hmotnosťou nad 60 kg je toxická dávka viac ako 7,5 g paracetamolu a u detí 150 mg·kg<sup>-1</sup> váhy dieťaťa. Toxická hraničná dávka môže byť nižšia u alkoholikov, pri užití nalačno, pri virózach alebo pri súčasnom užití lieku indukujúceho cytochróm [18] [21].

Na liečbu intoxikácie sa najčastejšie používa aktívne čierne uhlie, ktoré sa odporúča podať do 1 hodiny v dávke 1 g·kg<sup>-1</sup> telesnej hmotnosti. Čiastočne účinné do 1 hodiny od požitia toxickéj dávky je zvracanie, avšak pretrvávajúce zvracanie je komplikáciou. Po dlhšom čase od užitia sa na liečbu hepatotoxicity používa antidotum N-acetylcysteín (NAC), ktoré musí byť užitú najneskôr do ôsmich hodín od predávkovania sa paracetamolom. Aj keď je toxicita paracetamolu pomerne nízka, nie je zanedbateľná [18] [21].

## **2.5 Liekové formy**

Paracetamol, ako jeden z najčastejšie používaných analgetík a antipyretík, existuje v najrôznejších liekových formách. Nájdú sa prípravky v pevných, v polotuhých a v tekutých liekových formách [22].

### **2.5.1 Pevné liekové formy**

#### ***Tablety***

Tablety sú najrozšírenejšou liekovou formou medzi prípravkami paracetamolu. Najčastejšie sú vytvárané v oválnom až predĺženom tvare s poliacou ryhou na jednej strane tablety, kvôli rozdeleniu tablety na dve rovnaké časti o nižšej dávke. Na druhej strane tablety často býva vyrezaný názov prípravku, ako napríklad Paralen<sup>®</sup> alebo Panadol<sup>®</sup>. U prípravku Paralen<sup>®</sup> Grip sú tablety jemne predĺžené v dĺžke, užšie v šírke oproti liekom Paralen<sup>®</sup> a Panadol<sup>®</sup>, a sú z oboch strán čisté bez potlače a bez poliacej ryhy. Existujú aj tablety vhodné pre deti na prehĺtanie. Tie bývajú menšieho okrúhleho tvaru a najčastejšie s poliacou ryhou, aby sa dávka paracetamolu mohla znížiť a dala sa prispôbiť váhe dieťaťa [22].

Jedna tableta môže obsahovať rôzne množstvá účinnej látky paracetamolu. Dávkovanie paracetamolu primárne záleží na hmotnosti človeka. Najpredávanejšie a najbežnejšie sú tablety s obsahom 500 mg účinnej látky paracetamolu, ktoré sa podávajú dorastu a dospelým ľuďom. U dospelých s váhou nad 50 kg je povolená jednotlivá dávka jedna až dve tablety s 500 mg množstvom paracetamolu, avšak maximálna denná dávka je osem tabliet, čo odpovedá 4 g paracetamolu denne. Pre deti vážiace medzi 20–50 kg sa podáva pól až jedna tableta s obsahom 500 mg paracetamolu [19].

### ***Kapsule***

Vo forme kapsúl sa vyskytuje dvojzložkový prípravok Talvosilen® Forte, ktorý obsahuje paracetamol, ópioidné analgetikum a antitusikum kodeín zmierňujúci kašeľ. Liečivý prípravok Talvosilen® Forte obsahuje tvrdé želatínové kapsule bez potlače, telo kapsule je bielej farby a vo vnútri sa nachádza biely prášok zmesi paracetamolu a kodeínu. V jednej kapsule sa nachádza 500 mg paracetamolu a 30 mg kodeínu. Tento liek môžu užívať ľudia s telesnou hmotnosťou viac ako 43 kg [22] [23].

### ***Prášok na prípravu perorálneho roztoku***

Jedná sa o prípravky typu Theraflu® a Coldrex®, ktoré obsahujú vrecúška s práškom na prípravu nápoja. Obidva prípravky sa krátkodobo používajú k úľave od príznakov chrípky a nachladnutia. Theraflu® je biely, sypký prášok bez hrudiek a cudzorodých častíc. Jedno vrecúško s práškom môže obsahovať buď 325 mg alebo 1 000 mg paracetamolu. Theraflu® prášky sú povolené len ľuďom vážiacim viac ako 50 kg [25].

Coldrex® je svetlo žltý, kryštalický prášok. V jednom vrecúšku sa nachádza 750 mg paracetamolu. Rovnako ako u Theraflu®, môžu užívať Coldrex® ľudia s váhou viac ako 50 kg [26].

## **2.5.2 Polotuhé liekové formy**

### ***Čapíky***

Čapíky sú vhodnou liekovou formou pre dojčatá a malé deti. Deťom s hmotnosťou viac ako 7 kg sa podávajú čapíky s obsahom 100 mg paracetamolu. Pre deti s hmotnosťou nad 9 kg existujú čapíky s obsahom 125 mg paracetamolu a u detí vážiacich viac ako 15 kg sa môžu použiť čapíky obsahujúce 250 mg paracetamolu. U dospelého človeka sa rektálne podávajú čapíky s 500 mg paracetamolu, ale nie je to najbežnejší spôsob užitia [22].

## **2.5.3 Tekuté liekové formy**

### ***Suspenzie***

Suspenzívne prípravky sú primárne určené pre malé deti, pre ktoré by bolo ešte nemožné či nebezpečné prehĺtať tablety. Najpoužívanejším prípravkom je Paralen® SUS, ktorý v 1 ml suspenzie obsahuje 24 mg paracetamolu. Ide o béžovú až bielu viskóznou suspenziu. Tento liek je povolený pre deti od troch mesiacov a vážiace 5 a viac kilogramov [22] [27].

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Existuje niekoľko metód stanovovania paracetamolu alebo jeho jednotlivých metabolitov v liečivom prípravku. Medzi tie najbežnejšie patrí titrácia, voltametria, infračervená spektrometria, fluorescenčná spektroskopia, UV/Vis spektrofotometria, kapilárna elektroforéza, kvapalinová a plynová chromatografia. Nevhodná metóda na stanovenie je hydrolýza paracetamolu, pretože reakciami vzniká farebný komplex p-aminofenol, ktorý môže zvýšiť spotrebu činidla, predĺžiť čas analýzy stanovovania a zvýšiť možnosť kontaminácie danej vzorky. Vo veľkých farmaceutických či chemických firmách, ktoré analyzujú a stanovujú kvalitu a kvantitu danej vzorky, ide hlavne o čas, efektívnosť a presnosť stanovovania. Volia sa hlavne jednoduché, rýchlejšie a nenáročné metódy, ktoré si ale zachovávajú vysokú presnosť. Je požadované, aby bolo v substanciiach 99,0–101,0 % obsahu paracetamolu a v samotných liečivých prípravkoch je potrebných 95,0–105,0 % deklarovaného obsahu [28].

#### 3.1 UV/Vis spektrofotometrické stanovenie paracetamolu

Autori Fardous a kol. [29] vo svojej publikácii popisujú možnosti stanovovania paracetamolu a p-aminofenolu pomocou UV/Vis spektrofotometrických metód. UV/Vis spektrofotometrické stanovenie spočíva v reakcii p-aminofenolu, ktorý vzniká hydrolýzou paracetamolu so sulfidom sodným za prítomnosti oxidačného činidla síranu amónno-železitého alebo síranu amónno-cerického. Vzniká modrý komplex metylénovej modrej, ktorý pretrváva po dobu troch hodín. Vlnovú dĺžku maxima autori stanovili pri 550 nm. Výhody tejto metódy sú, že reakcia prebieha za laboratórnej teploty, a ako rozpúšťadlo sa používa destilovaná voda.

#### 3.2 Stanovenie paracetamolu pomocou cerimetrie

Cerimetria patrí medzi oxidačno-redukčné titrácie, ktoré sú súčasťou metód kvantitatívnej analýzy. Ceričitá soľ v kyslom prostredí sa používa ako vhodné oxidačné činidlo. Ako odmerný roztok sa používa sýto žlté zafarbený síran ceričitý, ktorý je stály za vyšších teplôt a titrácia nie je rušená prítomnosťou chloridových iónov. Behom titrácie dochádza k redukcii ceričitého katiónu na ceritý [30].

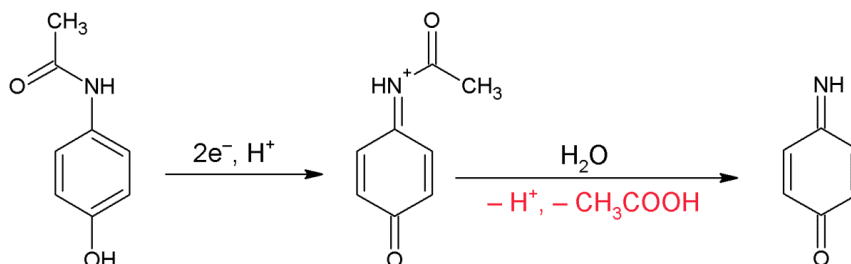
Cerimetrické stanovenie paracetamolu v lieku je založené na kyslej hydrolýze paracetamolu na p-aminofenol, ktorý je ceričitými iónmi oxidovaný na p-benzochinonimín. Bod ekvivalencie sa dá určiť buď vizuálne alebo inštrumentálne. Vizuálna indikácia bodu ekvivalencie nie je úplne vhodná metóda kvôli vysokým chybám a odchýlkam pri určovaní bodu ekvivalencie. U presnejšej inštrumentálnej indikácii sa určujú závislosti zmeny fyzikálnych veličín (potenciál, absorbanca, alebo vodivosť) na objem pridaného odmerného roztoku [30].

#### 3.3 Stanovenie paracetamolu pomocou voltametrie

Autori Goyal a Singh [31] vo svojich štúdiách z roku 2006 popisujú voltametrické stanovenie paracetamolu pomocou C<sub>60</sub>-modifikovanej uhlíkovej sklenenej elektródy. Reakcia na elektróde spočíva v oxidácii paracetamolu na N-acetyl-p-benzochinonimín s následnou hydrolýzou za vzniku p-benzochinonimínu (Obrázok 7). Pripravili zásobný roztok 2 mmol·dm<sup>-3</sup> paracetamolu v destilovanej vode. Potrebné množstvo zásobného roztoku



pridali do štandardného fosfátového tlmivého roztoku a vzorku doplnili destilovanou vodou do celkového objemu. Vytvorili kalibračnú závislosť prúdu na koncentráciu paracetamolu s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,985$ . Následne premerali rôzne vzorky liečivých prípravkov obsahujúce paracetamol a pomocou rovníc kalibračných kriviek zistených regresnou analýzou experimentálne získaných údajov stanovili množstvo paracetamolu v danom liečivom prípravku. Štandardná odchýlka (SD) pre osem stanovení bola 5,53 %. Táto metóda sa považuje za veľmi spoľahlivú, rýchlu, a vysoko citlivú.



Obrázok 7. Chemická rovnica oxidácie paracetamolu na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimín a následná hydrolyza za vzniku *p*-benzochinonimínu [31]

### 3.4 Stanovenie paracetamolu kvapalinovou chromatografiou s UV detekciou

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s UV detekciou patrí medzi bežne používané metódy pre kvantifikáciu paracetamolu a jeho metabolitov. Hlavná nevýhoda UV detekcie je neschopnosť analyzovať niekoľko metabolitov paracetamolu naraz z dôvodu podobnosti ich štruktúr a fyzikálno-chemických vlastností. UV detekciu je možné nahradiť pomocou hmotnostného spektrometru, ktorý dokáže selektívne analyzovať jednotlivé metabolity paracetamolu [32].

Autori Di Girolamo a kol. [33] vo svojej publikácii z roku 1998 popisujú stanovenie paracetamolu spolu so síranom a glukuronidom v moči diagnostikovaných pacientov s AIDS za použitia HPLC a UV detektoru s prepínaním vlnových dĺžok. Metóda spočíva v gradientovej elúcii. Kolónu naplnili  $5\ \mu\text{m}$  časticami  $C_{18}$ . Mobilná fáza obsahovala tlmivý roztok octanu sodného ( $50\ \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pH 3,5) a acetonitrilu (modifikovaný 0,35 % kyselinou trifluóroctovou) v pomere 94:6 (v/v). Výsledky autorov boli nasledovné: látky glukuronid a síran detegovali pri vlnovej dĺžke 260 nm s retenčným časom 4,8 a 8,5 min a samotný paracetamol zaznamenali pri vlnovej dĺžke 240 nm s retenčným časom 19 min.

Veľmi podobná metóda bola opísaná autormi Babu a Rao v práci z roku 2016 [34], kde autori popisujú stanovenie paracetamolu a cefixímu v zajačej plazme pomocou RP-HPLC (kvapalinová chromatografia s obrátenými fázami). Ako mobilnú fázu použili fosfátový tlmivý roztok (pH 6,4) a acetonitril v pomere 80:20 (v/v). Paracetamol detegovali pri vlnovej dĺžke 245 nm s retenčným časom 4,6 min.

### 3.5 Stanovenie paracetamolu kvapalinovou chromatografiou s MS detekciou

V súčasnosti je kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostným spektrometrom jednou z najviac používaných metód na stanovenie paracetamolu, a to vďaka vysokej selektivite, účinnosti a citlivosti [32].

Autori AN a kol. [32] vo svojom článku poukazujú na metódu stanovenia paracetamolu a jeho šiestich metabolitov v plazme potkanov pomocou kvapalinovej chromatografie

v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Mobilná fáza bola zložená z 0,1% kyseliny mravčej a buď s 95% destilovanou vodou (v/v), alebo s 95% acetonitrilom (v/v). Paracetamol a metabolity separovali na kolóne s 5  $\mu\text{m}$  časticami  $\text{C}_{18}$  a samotná kvantifikácia vzorky prebehla na hmotnostnom spektre s trojitým kvadrupólom. Analýzy uskutočnili v SRM (Selected Reaction Monitoring) móde. Táto metóda má veľkú výhodu v časovej nenáročnosti, vysokej citlivosti, a dokáže merať vzorky s nízkymi koncentraciami v rádoch  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Nevýhodou je vysoká cena experimentálnej zostavy.

Novú analytickú metódu stanovovania paracetamolu a jeho metabolitov v ľudskej plazme opísali v svojej publikácii Flint a kol. [35]. Použili ultra-vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou využívajúcou k ionizácii vzorky elektrosprej. Metóda separácie spočíva v gradientovej elúcii. Kolóna s reverznou fázou obsahovala 1,8  $\mu\text{m}$  častice  $\text{C}_{18}$  a mobilná fáza sa skladala z roztoku octanu amónneho a kyseliny mravčej v destilovanej vode alebo v metanole. Detekciu a kvantifikáciu paracetamolu a jeho metabolitov vykonali v SRM (Selected Reaction Monitoring) móde.

### 3.6 Stanovenie paracetamolu pomocou kapilárnej elektroforézy

Kapilárna elektroforéza patrí medzi elektroforetické metódy, ktoré slúžia k separácii látok na základe rozdielnej pohyblivosti v elektrickom poli. Výhodami kapilárnej elektroforézy sú časová nenáročnosť, finančná dostupnosť, vysoká selektivita a účinnosť, minimálne množstvo dávkovaného vzorku a minimálny organický odpad. Najviac využívané detektory látok sú UV spektrofotometria, hmotnostná spektrometria a teraz aj detekcia pomocou chemiluminiscencie [36].

Autori Zhao a kol. [36] vo svojej práci z roku 2006 opisujú stanovenie paracetamolu vo vybranom liečivom prípravku a v ľudskom moči pomocou kapilárnej elektroforézy s nepriamou chemiluminiscenčnou detekciou. Pri samotnej kvantifikácii paracetamolu zohľadnili fakt, že paracetamol inhibuje chemiluminiscenčnú reakciu luminolu a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Stupeň inhibície chemiluminiscencie je tým pádom pri stanovení priamo úmerný koncentrácii paracetamolu. Ako elektrolyt použili 0,5  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  luminol v 30  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tlmivom roztoku boritanu sodného s pH 9,4. Paracetamol migroval v separačnej kapiláre, kde sa zmiešal s luminolom. Pozorovali lineárnu závislosť luminiscenčného signálu od množstva paracetamolu. Kapilárna elektroforéza s nepriamou chemiluminiscenčnou detekciou preukazuje vysokú citlivosť a presnosť. Oproti kvapalinovej chromatografii je táto metóda jednoduchšia, rýchlejšia, nevyžaduje pred-úpravu vzoriek a produkuje minimálny organický odpad.

### 3.7 Stanovenie paracetamolu pomocou infračervenej spektroskopie

Metóda infračervenej spektroskopie tiež patrí medzi často využívané analytické metódy a využíva sa aj na stanovenie obsahu paracetamolu v liečivom prípravku. Infračervená spektroskopia patrí do skupiny nedeštruktívnych a časovo nenáročných analytických metód. Metóda je založená na princípe interakcie infračerveného žiarenia s danou vzorkou. Absorpciou energie dochádza ku zmene rotačno-vibračných energetických stavov molekuly v závislosti na zmenách dipólového momentu molekuly. Pri infračervenej spektroskopii s Fourierovou transformáciou (FTIR) sa interferometrický signál matematicky prevedie na infračervené spektrum. Technika zoslabeného úplného odrazu (ATR – Attenuated Total

Reflection) je založená na princípe úplného odrazu žiarenia na fázovom rozhraní meranej vzorky a merajúceho ATR kryštálu s vysokým indexom lomu [37].

Autori Lawson a kol. [38] publikovali v roku 2018 článok, v ktorom popisujú stanovenie obsahu paracetamolu v tabletách vybraných liečivých prípravkov pomocou ATR-FTIR infračervenej spektroskopie. Autori najprv zmerali spektrá jednotlivých komponentov, ako sú čistý paracetamol, mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý, a následne vybrali vhodnú spektrálnu oblasť na zostrojenie kalibračnej krivky. Zmerané spektrá zmesí paracetamolu s príslušným komponentom a zostrojená kalibračná závislosť plochy absorpčného pásu od hmotnostnej koncentrácie paracetamolu tvorili základ pre kvantitatívnu analýzu. Pre zistenie množstva paracetamolu bol braný absorpčný pás vlnočtov  $1\ 524\text{--}1\ 493\ \text{cm}^{-1}$ . Po premeraní jednotlivých tabliet, autori pomocou regresnej rovnice kalibračných kriviek stanovili množstvo paracetamolu v danej tablete. Pomocou tejto metódy premerali rôzne tablety obsahujúce účinnú látku paracetamol z rôznych krajín sveta. Meraním zistili, že celkovo 7 tabliet paracetamolu, čo tvorilo 12 % zo všetkých preskúmaných tabliet, obsahovalo neštandardné množstvo paracetamolu.

V tejto bakalárskej práci, konkrétne v experimentálnom postupe sme vychádzali z tejto publikácie.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanoviť obsah účinnej látky paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch pomocou ATR-FTIR spektrometrie a navrhnúť a optimalizovať stanovenie paracetamolu v liekových formách pomocou priameho merania práškových vzoriek "in situ" bez potreby úpravy meranej vzorky - tzv. suchá cesta. Hlavným cieľom tejto práce bolo stanoviť množstvo paracetamolu v tabletoch vybraných liekových prípravkov s ohľadom na štatistické údaje, ktoré sú prezentované v krabicových grafoch (kapitola 5.3.1).

Ďalším cieľom práce bolo optimalizovať prípravu vzoriek na zostrojenie kalibračných kriviek a prípravu vzoriek z tabliet vybraných liekov. Najdôležitejším krokom v príprave vzoriek bolo pretrepávanie a zhomogenizovanie obsahu v eppendorfkách na vibračnom mlyne pred samotným spustením merania na ATR-FTIR spektrometri. Výskumným zámerom tejto práce bolo ukázať spoľahlivosť a presnosť metódy ATR-FTIR spektrometrie na stanovenie presného množstva účinnej látky paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch, ako je udávané výrobcom na obale prípravku t. j. 500 mg paracetamolu v jednej tablete.

### 4.1 Použité chemikálie

- Paracetamol, výrobca Sigma Aldrich;
- Mikrokryštalická celulóza, výrobca Sigma Aldrich;
- Škrob, rozpustný, výrobca Sigma Aldrich;
- Stearát horečnatý, výrobca Sigma Aldrich;
- Panadol<sup>®</sup> Novum 500 mg, výrobca GlaxoSmithKline Consumer Healthcare;
- Paralen<sup>®</sup> 500 mg, výrobca Zentiva;
- Parapyrex<sup>®</sup> 500 mg, výrobca Dr. Max Pharma s.r.o.

### 4.2 Použité prístroje, pomôcky a programy

- Thermo Scientific<sup>™</sup> Nicolet<sup>™</sup> iS<sup>™</sup> 50 FT-IR Spektrometer, výrobca ThermoFisher Scientific;
- Analytická váha KERN, dielik 0,1 mg;
- Vibračný mlyn;
- Plastové eppendorfky o objeme 1,5 ml;
- Achátový mažiar s achátovou paličkou;
- Program OMNIC 9, vyhodnocovanie spektier a integrácia plôch;
- Softvér Microsoft Office Excel 2016, spracovanie dát;
- Program ORIGIN 2019, vyhodnocovanie a spracovanie dát.
- Program StatsDirect<sup>®</sup> 3.2.7 (StatsDirect Ltd., Cheshire, UK).

### 4.3 Postup merania vzoriek pre kalibračné krivky

#### 4.3.1 Príprava vzoriek

Pred prípravou samotných vzoriek boli zmerané ATR-FTIR spektrá samotných jednotlivých komponentov (paracetamol, mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý). Po očistení ATR kryštálu etanolom a po zmeraní pozadia (atmosférický vzduch) sa na ATR kryštál naniesli približne 2 mg jedného komponentu a prebehlo meranie. Na základe zmeraných spektier bolo skontrolované prekryvanie spektier a predbežne bola vybraná vhodná spektrálna oblasť resp. absorpčný pás pre kalibračnú krivku.

Na analytickej váhe boli navážené s presnosťou na 0,0001 g jednotlivé komponenty (mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý) s paracetamolom podľa Tabuľka 1. Najprv bola navážená látka s menším obsahom vo vzorku, aby sa ľahko mohlo korigovať prípadné naváženie väčšieho množstva, než bolo dané. Následne bol obsah v eppendorfke dosypaný príslušnou látkou na 0,2000 g. Finálne koncentrácie účinnej látky paracetamolu v mikrokryštalickej celulóze, škrobu a v stearátu horečnatom činili v hmotnostných percentách (hm. %) 5, 10, 20, 30, 50, 70 a 90. Vzorky na zostrojenie kalibračnej závislosti boli pripravené v troch opakovaniach, čiže celkovo bolo pripravených 63 vzoriek na meranie (sedem rôznych koncentrácií × tri rôzne komponenty × tri opakovania).

Tabuľka 1. Navážky paracetamolu a ostatných komponentov (mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý) na prípravu vzoriek pre zostrojenie kalibračných kriviek

Koncentrácia paracetamolu [hm. %]	Navážka paracetamolu [mg]	Navážka ostatných komponentov [mg]
5	10	190
10	20	180
20	40	160
30	60	140
50	100	100
70	140	60
90	180	20

#### 4.3.2 Inštrumentácia

Na samotné meranie pripravených vzoriek bol použitý prístroj Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spektrometer od firmy ThermoFisher Scientific (Obrázok 8). Ide o multirozsahové zariadenie so spektrálnym rozsahom 50–4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Analýza vzoriek je vykonávaná na jedno odrazovom kryštáli z technického diamantu. Zdrojom svetla je žeravá keramická doštička, ktorá má vysokú stabilitu a predĺženú životnosť. Prístroj obsahuje až tri detektory, pričom dochádza k automatickej výmene deličov lúčov v celom spektrálnom rozsahu do 30 sekúnd. FTIR spektrometer dokáže vyhodnotiť vzorky v rôznej skupenskej forme (gély, pasty, prášková alebo tekutá forma). Tento prístroj má veľké uplatnenie vo farmaceutickej a forenznej oblasti, v chémii a technológiách materiálov alebo v štúdiách polymérov [39].

Pred spustením samotného merania bolo potrebné pripraviť prístroj a nastaviť jeho parametre. V programe OMNIC bolo nastavené rozmedzie vlnočtu 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  s rozlíšením 8  $\text{cm}^{-1}$  a s celkovým počtom akumulovaných skenov 64. ATR kryštál bol očistený destilovanou vodou a následne etanolom. Ako pozadie bol zaznamenaný atmosférický vzduch laboratória, kde prebiehalo meranie. Po zaznamenaní pozadia prebehlo samotné meranie vzoriek.



Obrázok 8. Prístroj Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spektrometer od firmy ThermoFisher Scientific [39]

### 4.3.3 Meranie vzoriek

Vzorky boli namerané od najnižšej koncentrácie po najvyššiu koncentráciu paracetamolu vo vzorke. Každá eppendorfka s naváženými komponentmi bola pretrepávaná na vibračnom mlyne po dobu troch minút, aby sa obsah vnútri eppendorfky dostatočne zhomogenizoval. Následne boli špachtľou rovnomerne nanosené približne 2 mg vzorky na etanolom vyčistený ATR kryštál. Bolo skontrolované prilnutie vymeniteľnej hlavy prítlačného zariadenia na vzorku a prebehlo meranie. Zmeranie jednej vzorky trvalo približne jeden a pól minúty. Po skončení merania bola v programe OMNIC vykreslená závislosť absorpcie od vlnočtu. ATR kryštál sa opäť očistil od vzorky destilovanou vodou a etanolom. S týmto postupom sa meranie opakovalo ešte 62krát.

### 4.3.4 Spracovanie spektrálnych dát

Namerané dáta v programe OMNIC boli uložené a exportované do softvéru MS Excel. Namerané spektrá boli v programe ORIGIN upravené do grafu so závislosťou absorpcie (a.u.) od vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ). Zo spektier boli vybrané vhodné plochy absorpčných pásov na zostrojenie kalibračnej závislosti. Vyhodnotené spektrá a dáta boli ďalej exportované do programu ORIGIN, kde boli vytvorené kalibračné krivky závislosti plochy absorpčného pásu pri danom rozmedzí vlnočtov odpovedajúcich jednotlivým absorpčným pásom (-) na koncentráciu paracetamolu (hm. %).

Na základe vytvorených kalibračných kriviek boli zanalyzované merania a kalibračné krivky paracetamolu s mikrokryštalickou celulózu, stearátom horečnatým a škrobom. Pre analytické a grafické výstupy bol využitý softvér MS Excel 2016 (Microsoft Corporation) a StatsDirect® 3.2.7 (StatsDirect Ltd., Cheshire, UK). Boli vytvorené 95% predikčné intervaly pre merania a pre samotnú kalibračnú krivku. Vo všetkých prípadoch bolo testované na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  a výsledné hodnoty pravdepodobnosti P sú dvojstranné.

Podobným spôsobom boli spracované dáta všetkých komponentov (mikrokryštalická celulóza, stearát horečnatý a škrob).

## 4.4 Postup samotného merania vybraných liečivých prípravkov

### 4.4.1 Príprava vzoriek

Na prípravu vzoriek boli vybrané tri liečivé prípravky v tabletovej forme obsahujúce paracetamol, a to Panadol® Novum 500 mg od firmy GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Paralen® 500 mg od firmy Zentiva a Parapyrex® 500 mg od firmy Dr. Max Pharma s.r.o. Vybrané prípravky mali približne rovnaký dátum expirácie kvôli možnej degradácii účinnej látky paracetamolu v čase. Na meranie bolo vybraných z každého druhu prípravku 10 tabliet. Každá jedna tableta bola zvážená na analytických váhach na štyri desatinné čísla. Na prípravu vzoriek bola odlomená iba polovica tablety, keby náhodou nastali chyby v meraní a bolo by treba použiť druhú polovicu tej istej tablety na zopakovanie merania. Polovica tablety bola rozdrobená na prášok pomocou achátovej paličky v achátovom mažiari. Pomocou špachtle bol prášok tablety prenesený do plastovej eppendorfky. Keramický mažiar bol vyčistený destilovanou vodou a etanolom a pokračovalo sa v príprave ďalších vzoriek z tabliet.



Obrázok 9. Vzorky plnív s paracetamolom a vzorky tabliet liečivých prípravkov pripravené na meranie

### 4.4.2 Inštrumentácia a podmienky merania

Inštrumentácia a podmienky merania boli podobné ako pri meraní vzoriek na zostrojenie kalibračnej krivky. Bol opäť použitý rovnaký prístroj Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spektrometer a meranie prebehlo v rovnakej laboratórnej miestnosti. V programe OMNIC boli nastavené tie isté parametre ako predtým: vlnočet  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  s rozlíšením  $8\text{ cm}^{-1}$  a s celkovým počtom akumulovaných skenov 64. ATR kryštál bol poriadne očistený destilovanou vodou a etanolom. Ako pozadie bol zaznamenaný atmosférický vzduch laboratória. Po skontrolovaní nastavenia a po zaznamenaní pozadia prebehlo samotné meranie vzoriek.

### 4.4.3 Meranie vzoriek

Každá eppendorfka s práškovou formou liečivého prípravku bola bez prestávky pretrepávaná na vibračnom mlyne po dobu troch minút, aby sa obsah vnútri eppendorfky zhomogenizoval. Následne boli špachtľou rovnomerne nanosené približne 2 mg z jednej vzorky na etanolom vyčistený ATR kryštál. Bolo skontrolované priľnutie vymeniteľnej hlavy prítlačného zariadenia na vzorku ležiacu na ATR kryštáli a prebehlo meranie, ktoré približne trvalo jeden a pól minúty. Po skončení merania bola v programe OMNIC vykreslená závislosť absorpcie

od vlnočtu. ATR kryštál sa opäť očistil od vzorku destilovanou vodou a etanolom. Tento postup sa opakoval ešte 29krát.

#### **4.4.4 Spracovanie spektrálnych dát**

Spracovanie dát prebiehalo podobne ako u dát kalibračnej závislosti. Namerané dáta v programe OMNIC boli uložené a exportované do softvéru MS Excel. Namerané spektrá boli v programe ORIGIN upravené do grafu so závislosťou absorbancie (a.u.) od vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ). Následne boli u každej vzorky vypočítané plochy absorpčných pásov pri danom rozmedzí vlnočtov odpovedajúcich jednotlivým absorpčným pásom. Potom boli tieto plochy dosadené do regresných rovníc kalibračných kriviek jednotlivých komponentov a jednoduchými matematickými výpočtami bol dopočítaný priemerný obsah paracetamolu v tablete.

Na základe vypočítaných obsahov paracetamolu z kalibračných kriviek boli v softvéri MS Excel štatisticky analyzované výsledky daného merania. Prostredníctvom vyhodnocovacieho programu ORIGIN boli vytvorené krabicové grafy pre každý druh vybraného liečivého prípravku.

Podobným spôsobom boli spracované dáta u vybraných liečivých prípravkov Panadol® Novum 500 mg, Paralen® 500 mg a Parapyrex® 500 mg.

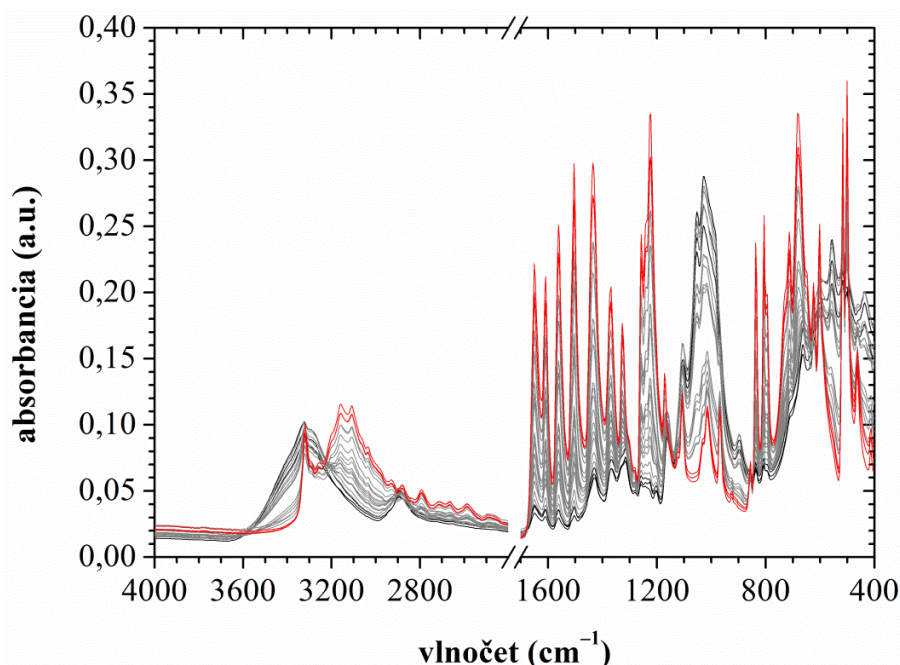


## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Voľba vhodného absorpčného pásu pre kalibračnú krivku

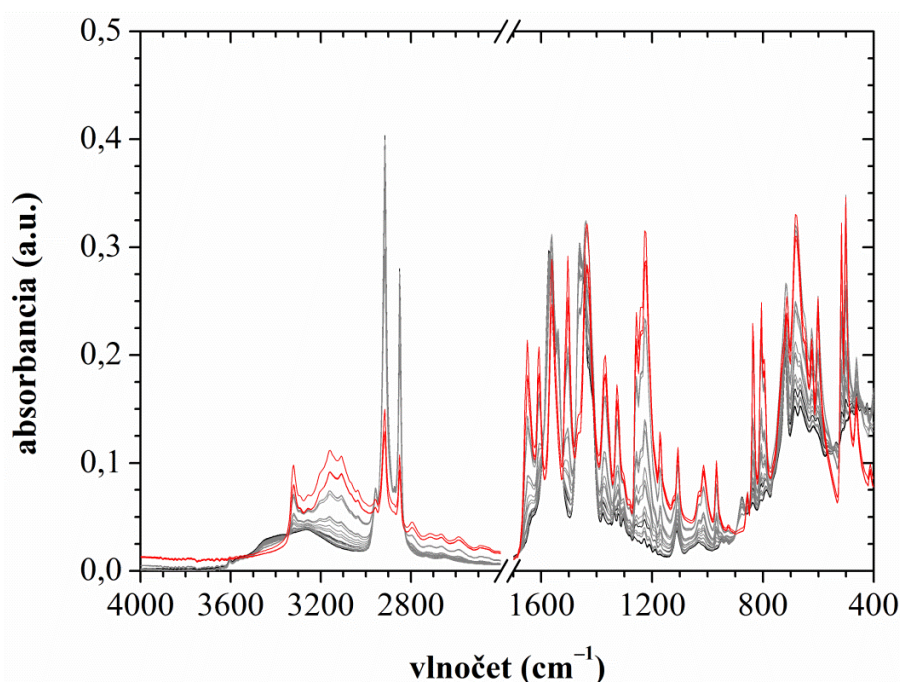
Na stanovenie obsahu paracetamolu v liečivom prípravku bolo najprv potrebné navážiť vzorky na kalibračnú krivku, ktoré boli tvorené z jedného druhu plniva (mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý) a z paracetamolu o rôznej hmotnostnej koncentrácii. Tieto vzorky boli pretrepávané po dobu troch minút na vibračnom mlyne. Pred spustením samotného merania bol pripravený prístroj a boli nastavené parametre merania. V programe OMNIC bolo nastavené rozmedzie vlnočtu 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  s rozlíšením 8  $\text{cm}^{-1}$  a s celkovým počtom akumulovaných skenov 64. Po skončení merania bola v programe OMNIC vykreslená závislosť absorbancie od vlnočtu. Z vykreslených spektier vzoriek boli určené vhodné spektrálne oblasti na vytvorenie kalibračnej závislosti plochy absorpčného pásu pri danom vlnočte od hmotnostnej koncentrácie paracetamolu.

Na Obrázok 10 sú uvedené ATR-FTIR spektrá štandardu mikrokryštalickej celulózy s prídavkom štandardu paracetamolu o rôznych hmotnostných percentách. Tieto dáta boli spracované a použité na vytvorenie kalibračnej krivky. Čierne zvýraznené spektrá predstavujú prvé tri merania vzoriek o najnižšej koncentrácii paracetamolu vo vzorke t. j. 5 hm. %. Červeno zvýraznené spektrá značia posledné tri merania vzoriek mikrokryštalickej celulózy s paracetamolom s koncentraciou 90 hm. %. Spektrá zvýraznené sivou farbou predstavujú vzorky s koncentraciou paracetamolu medzi 5–90 hm. %. Na základe spektier s najnižšou a najvyššou koncentraciou paracetamolu sa dá určiť vhodná spektrálna oblasť pre kalibračnú krivku, kde absorpcia štandardu mikrokryštalickej celulózy je minimálna vzhľadom k absorpcii účinnej látky t. j. vzhľadom k vybraným absorpčným pásom paracetamolu.



Obrázok 10. Zmerané ATR-FTIR spektrá štandardu mikrokryštalickej celulózy s paracetamolom o koncentracii 5 hm. % (čierna), 90 hm. % (červená) a 10–70 hm. % (sivá)

Na Obrázok 11 sú uvedené ATR-FTIR spektrá vzoriek tvorené stearátom horečnatým so štandardom paracetamolu o rôznych hmotnostných percentách. Tieto dáta tiež boli spracované a použité na vytvorenie kalibračnej krivky. Čierno zvýraznené spektrá predstavujú prvé tri merania vzoriek s najnižšou koncentráciou paracetamolu vo vzorke t. j. 5 hm. %. Červeno zvýraznené spektrá značia posledné tri merania vzoriek stearátu horečnatého s paracetamolom s koncentráciou 90 hm. %. Spektrá vykreslené šedou farbou predstavujú vzorky stearátu horečnatého a paracetamolu s koncentráciou 10–70 hm. %. Opäť na základe spektier s najnižšou a najvyššou koncentráciou paracetamolu sa dá vymedziť vhodná spektrálna oblasť pre kalibračnú krivku, kde absorpcia stearátu horečnatého je najnižšia a paracetamolu je najvyššia.



Obrázok 11. Zmerané ATR-FTIR spektrá štandardu stearátu horečnatého s paracetamolom o koncentrácii 5 hm. % (čierna), 90 hm. % (červená) a 10–70 hm. % (sivá)

Na Obrázok 12 je uvedené ATR-FTIR spektrum štandardu paracetamolu dodávaného spoločnosťou Sigma-Aldrich. Interpretácia absorpčných pásov bola vykonaná na základe odbornej literatúry [40]–[43]. Menej intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $2\,881\text{ cm}^{-1}$  je spravidla pripisovaný valenčnej asymetrickej vibrácii C–H väzieb v metylových skupinách. Z nameraného infračerveného spektra štandardu paracetamolu je zrejmé, že absorpčný pás pri  $2\,960\text{ cm}^{-1}$ , ktorý odpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C–H väzieb v metylových skupinách sa javí ako menej výrazný pík, čo je pravdepodobne spôsobené vyššími harmonickými vibráciami, tzn. *overtony* sekundárnych amidov a aromatických štruktúrnych jednotiek. Menej intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $3\,256\text{ cm}^{-1}$  jednoznačne odpovedá symetrickej valenčnej vibrácii N–H väzieb v sekundárnych amidoch. Intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $3\,108\text{ cm}^{-1}$  odpovedá vyšším harmonickým vibráciám N–H väzieb v sekundárnych amidoch. V prípade tohto absorpčného pásu prichádza do úvahy aj valenčná symetrická vibrácia C–H väzieb v aromatických jednotkách paracetamolu. Prítomnosť sekundárnych amidov bola v FTIR spektre vzorku paracetamolu, okrem iného,

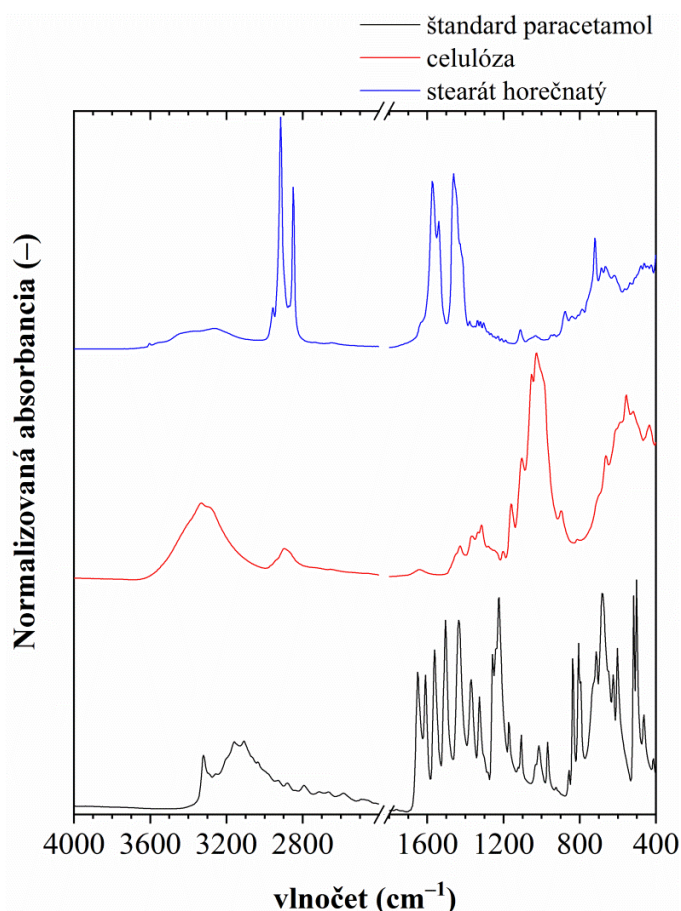
potvrdená aj dvoma intenzívnymi a ostrými absorpčnými pásmi, ktorých špecifická absorpcia nastáva pri  $1\,650\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,561\text{ cm}^{-1}$ . Prvý absorpčný pás odpovedá symetrickej valenčnej vibrácii C=O väzieb v sekundárnych amidoch. Druhý zmieneny absorpčný pás je spravidla pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii C–N a asymetrickej deformačnej vibrácii N–H väzieb v –NH–CO– funkčných skupinách. V oblasti tzv. otláčku prstu t. j.  $1\,500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  môžeme nájsť dublet intenzívnych absorpčných pásov pri  $713\text{ cm}^{-1}$  a  $681\text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú výlučne pripisované deformačnej rovinnej vibrácii N–H väzieb v sekundárnych amidoch. Tieto vibračné módy sú v odbornej literatúre označované ako *wagging*. V infračervenom spektre vzorky paracetamolu sa nedá nepovšimnúť dubletu absorpčných pásov pri  $3\,159\text{ cm}^{-1}$  a  $3\,108\text{ cm}^{-1}$ , ktoré odpovedajú symetrickej valenčnej vibrácii C–H väzieb v arómatoch. Prítomnosť aromatických konštitučných jednotiek bola rovnako potvrdená absorpčnými pásmi pri  $1\,610\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,504\text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú pripisované valenčnej symetrickej vibrácii C=C väzieb v arómatoch. Tieto vibračné módy sú bežne v literatúre označované ako dýchacie vibrácie, keďže pri vibráciách dochádza k rozťahovaniu zmieneny väzieb, čo sa prejavuje pulzovaním aromatických kruhov. Ostrý a intenzívny absorpčný pás identifikovaný pri  $1\,434\text{ cm}^{-1}$  je výlučne pripisovaný valenčným vibráciám C=C väzieb v aromatických jednotkách. V širokej oblasti vlnočtov, ktorá je vymedzená oblasťou  $1\,275\text{--}1\,000\text{ cm}^{-1}$ , s výnimkou absorpčného pásu pri  $1\,224\text{ cm}^{-1}$ , môžeme nájsť pásy, ktoré odpovedajú rovinnej deformačnej vibrácii C–H väzieb v aromatických jednotkách paracetamolu. O di-substituovaných aromatických jednotkách vypovedajú absorpčné pásy (triplet), ktoré boli lokalizované pri  $857\text{ cm}^{-1}$ ,  $836\text{ cm}^{-1}$  a  $806\text{ cm}^{-1}$ . Tieto pásy odpovedajú mimo-rovinným deformačným vibráciám C–H väzieb. Tento triplet absorpčného pásu je charakteristický pre 1,4– di-substituované aromatické jednotky tzn. arómát je substituovaný v para polohe. V infračervenom spektre sa nedá nepovšimnúť si ostrého absorpčného pásu pri  $3\,320\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je spravidla pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii O–H väzieb vo fenoloch. Táto funkčná skupina je rovnako potvrdená prítomnosťou ostrého a intenzívneho absorpčného pásu pri  $1\,224\text{ cm}^{-1}$ , ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb u vyššie zmieneny fenolických jednotkách paracetamolu.

Na zostrojenie kalibračnej krivky boli vybrané absorpčné pásy pri  $1\,503\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,224\text{ cm}^{-1}$ , ktoré zodpovedajú valenčnej symetrickej vibrácii C=C väzieb v aromatických jednotkách a valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb v hydroxylovej skupine substituované na Ar. Tieto absorpčné pásy boli vybrané predovšetkým kvôli ich vhodnej polohe v infračervenom spektre, kde nedochádza k ovplyvňovaniu týchto pásov ostatnými komponentmi t. j. mikrokryštalickou celulórou, škrobom, stearátom horečnatým atď. prítomnými v liečivých prípravkoch paracetamolu.

Ďalším študovaným plnivom, ktoré tvorí majoritnú časť vzoriek paracetamolu, bol štandard mikrokryštalickej celulózy. Na Obrázok 12 je uvedené infračervené spektrum mikrokryštalickej celulózy merané metódou ATR. Široký a pomerne intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $3\,332\text{ cm}^{-1}$  odpovedá valenčnej symetrickej vibrácii H–O väzieb v primárnych alkoholoch. Tieto funkčné skupiny boli potvrdené ďalšími intenzívnymi absorpčnými pásmi v oblasti otláčku prsta pri  $1\,334\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,315\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,280\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,052\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,027\text{ cm}^{-1}$  z ktorých prvé tri absorpčné pásy odpovedajú rovinnej deformačnej vibrácii C–OH väzieb v primárnych alkoholoch a ostatné pásy odpovedajú

valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb v odpovedajúcich konštitučných jednotkách mikrokryštalickej celulózy. Dublety absorpčných pásov pri  $1\,202\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,103\text{ cm}^{-1}$  sú obvykle pripisované valenčnej symetrickej vibrácii C–O–C väzieb v éteroch. Pomerne intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $2\,895\text{ cm}^{-1}$  je výhradne pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii C–H väzieb v =CH– skupinách. Tieto funkčné skupiny boli potvrdené dubletom absorpčných pásov pri  $1\,428\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,365\text{ cm}^{-1}$ , ktoré odpovedajú asymetrickej deformačnej vibrácii C–H väzieb v metylových skupinách.

Na vyhodnotenie paracetamolu bola na základe zmeraného spektra plniva tzn. mikrokryštalickej celulózy vybraná oblasť vlnočtov  $1\,530\text{--}1\,470\text{ cm}^{-1}$ , kde je absorpcia mikrokryštalickej celulózy minimálna.



Obrázok 12. Zmerané ATR-FTIR spektrum štandardu paracetamolu, mikrokryštalickej celulózy a stearátu horečnatého

Na Obrázok 12 je uvedené ATR-FTIR spektrum štandardnej látky stearátu horečnatého. V oblasti valenčných vibrácií bol identifikovaný dublet ostrých absorpčných pásov pri  $2\,915\text{ cm}^{-1}$  a  $2\,849\text{ cm}^{-1}$ , ktoré odpovedajú asymetrickej a symetrickej vibrácii C–H väzieb v –CH<sub>2</sub>– skupinách. Tieto alifatické skupiny boli rovnako potvrdené intenzívnym absorpčným pásom pri  $1\,461\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je spravidla pridelený deformačnej symetrickej vibrácii metylénových funkčných skupín. O dlhom lineárnom alifatickom reťazci vypovedá intenzívny absorpčný pás pri  $720\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je pripisovaný mimo-rovinnej deformačnej vibrácii C–H väzieb. Metylové funkčné skupiny boli pozorované pri vlnočte  $2\,956\text{ cm}^{-1}$

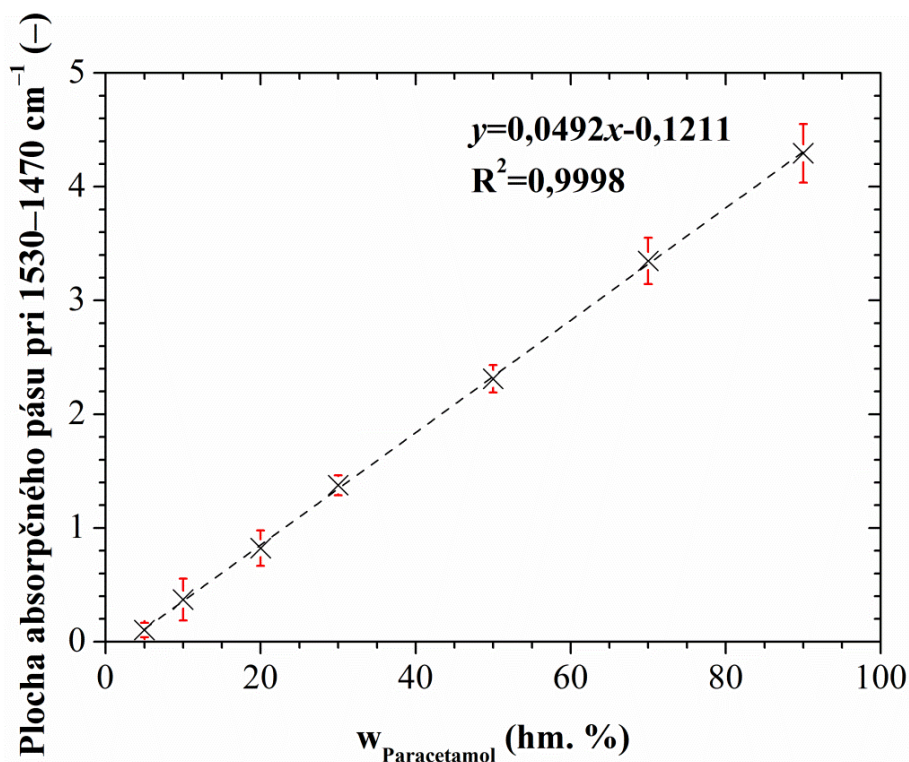
a vtedy sa jedná o asymetrickú valenčnú vibráciu C–H väzieb. V infračervenom spektre sa nedá nepovšimnúť si ostrého intenzívneho pásu lokalizovaného pri  $1\,572\text{ cm}^{-1}$ , ktorý odpovedá valenčnej symetrickej vibrácii karboxylátového aniónu.

K vyhodnoteniu paracetamolu bola na základe zmeraného spektra plniva tzn. stearátu horečnatého vybraná oblasť vlnočtov  $1\,276\text{--}1\,184\text{ cm}^{-1}$ , kde absorpcia stearátu horečnatého je minimálna.

## **5.2 Kalibračné krivky paracetamolu s mikrokryštalickou celulózu, stearátom horečnatým a so škrobom**

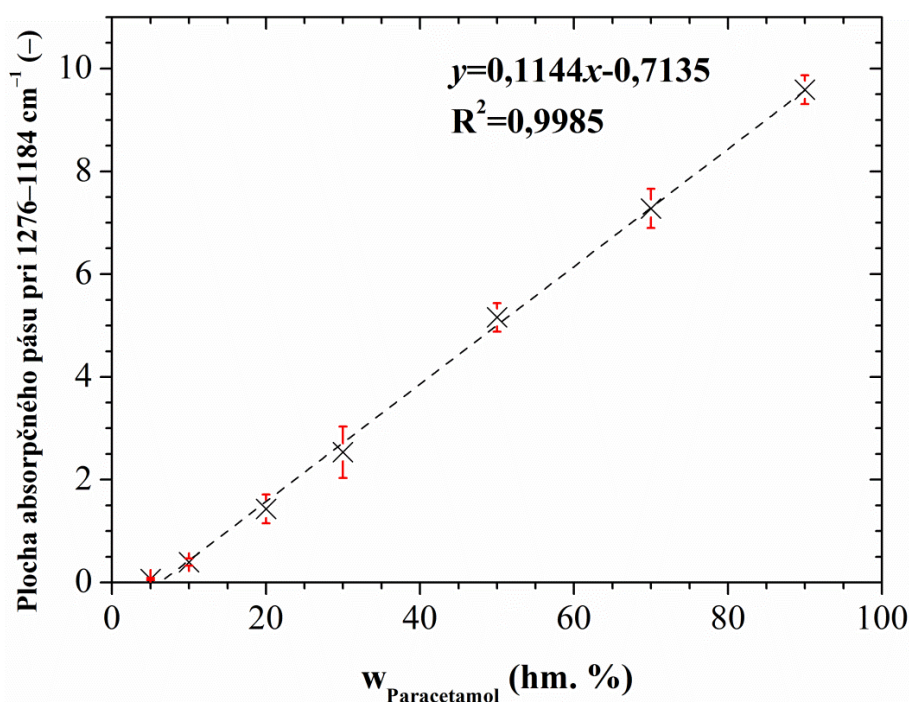
Na zostrojenie kalibračných kriviek boli použité vzorky tvorené vždy iba jedným druhom plniva (mikrokryštalická celulóza, škrob a stearát horečnatý) s paracetamolom rôznej hmotnostnej koncentrácie. Vzorky boli navážené, zhomogenizované na vibračnom mlyne po dobu troch minút a následne zmerané na prístroji Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spektrometer. Pomocou programu MS Excel a ORIGIN boli spracované dáta a spektrá všetkých vzoriek získané v programe OMNIC. Po vybraní vhodných spektrálnych oblastí pri danom vlnočte boli vytvorené kalibračné krivky paracetamolu so zvoleným štandardom (mikrokryštalická celulóza, stearát horečnatý a škrob) v závislosti plochy absorpčného pásu pri danom vlnočte od hmotnostnej koncentrácie paracetamolu. Pozorované závislosti v oblasti experimentálnych hodnôt boli lineárne, preto bol ako model pre fitovanie experimentálnych údajov zvolený model priamky.

Na Obrázok 13 je uvedená kalibračná priamka paracetamolu s mikrokryštalickou celulózu. Na vyhodnotenie množstva paracetamolu bola na základe zmeraného spektra plniva vybratá oblasť vlnočtov  $1\,530\text{--}1\,470\text{ cm}^{-1}$ , kde absorpcia mikrokryštalickej celulózy je minimálna. Kalibračná priamka mala hodnotu koeficientu determinácie  $R^2$  blízku 1, čo indikuje vysokú presnosť a použiteľnosť metódy na stanovenie paracetamolu v liečivých prípravkoch. Kalibračná priamka nebola obmedzená podmienkou prechodu bodom  $[0,0]$ , lebo v oblasti nízkych hmotnostných koncentrácií paracetamolu nastáva zníženie presnosti získania presných experimentálnych hodnôt pre kalibračnú krivku, a tým by došlo k zníženiu linearity smernice a k poklesu korelačného koeficientu a koeficientu determinácie  $R^2$ .



Obrázok 13. Kalibračná priamka paracetamolu s mikrokryštalicovou celulórou - závislosť plochy absorpčného pásu pri vlnočte 1 530–1 470 cm<sup>-1</sup> od hmotnostnej koncentrácie paracetamolu

Na Obrázok 14 je zostrojená kalibračná priamka štandardu stearátu horečnatého s paracetamolom. K vyhodnoteniu paracetamolu bola na základe zmeraného spektra plniva vybraná oblasť vlnočtov 1 276–1 184 cm<sup>-1</sup>, kde absorpcia stearátu horečnatého je nízka. Kalibračná krivka je lineárna s vysokou hodnotou koeficientu determinácie  $R^2 \sim 0,999$ , ktorý značí o presnosti merania (t.j. nízkej odchýlky nameraných hodnôt a hodnôt predpovedaných kalibračnou priamkou) a tým o použiteľnosti metódy na stanovenie paracetamolu v liečivých prípravkoch. Kalibračná priamka opäť nebola obmedzená prechodom cez bod [0,0], aby sa neznížila jej predikčná presnosť v oblasti získaných experimentálnych hodnôt hmotnostných koncentrácií paracetamolu.



Obrázok 14. Kalibračná priamka paracetamolu so stearátom horečnatým - závislosť plochy absorpčného pásu pri vlnočte 1 276–1 184 cm<sup>-1</sup> od hmotnostnej koncentrácie paracetamolu

Aj keď kalibračná priamka paracetamolu so škrobom mala veľmi uspokojivú hodnotu koeficientu determinácie  $R^2 \sim 0,99$ , mala najvyššiu hodnotu experimentálnej chyby a preto bola vylúčená z výsledkov ako nevhodná pre použitie na vyhodnotenie obsahu paracetamolu v liečivých prípravkoch. Dôvodom bola nízka hodnota lineárnej smernice kalibračnej krivky, ktorá je v priamej súvislosti s citlivosťou merania. V prípade vyhodnotenia obsahu paracetamolu pomocou tejto kalibračnej priamky by bolo vypočítané množstvo aktívnej látky vo vzorke veľmi nadhodnotené. Možným vysvetlením je, že škrob, ako zmes polymérnych reťazcov, je tvorený veľkým počtom D-glukózových jednotiek, ktoré obklopujú častice aktívnej látky paracetamolu a nedochádza k správne zhomogenizovaniu paracetamolu so škrobom.

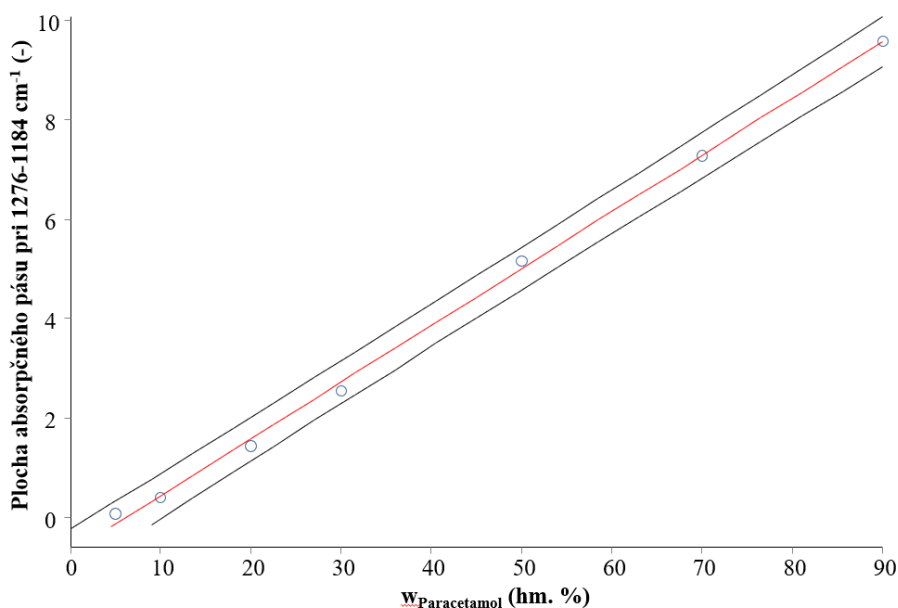
### 5.2.1 Regresná analýza kalibračných kriviek

Pre analytické a grafické výstupy bol využitý softvér MS Excel 2016 (Microsoft Corporation) a StatsDirect® 3.2.7 (StatsDirect Ltd., Cheshire, UK). Na základe vytvorených kalibračných priamok boli zanalyzované merania a kalibračné priamky paracetamolu s mikrokryštalickou celulórou, stearátom horečnatým a so škrobom. Boli vytvorené 95% predikčné intervaly pre merania a pre samotnú kalibračnú priamku.

Na Obrázok 15 je uvedený 95% predikčný interval pre samotné meranie plniva stearátu horečnatého s paracetamolom. Červená priamka predstavuje model lineárnej závislosti na ktorej ležia stredné odhady plochy absorpčných pásov. Stredný odhad znamená, že najpravdepodobnejšie hodnoty plôch absorpčných pásov pre dané koncentrácie paracetamolu ležia na červenej priamke. S rastúcou vzdialenosťou od priamky klesá pravdepodobnosť získania takého výsledku. Čierne zvýraznené priamky označujú hranice, v ktorých sa budú s 95% pravdepodobnosťou nachádzať hodnoty budúcich meraní. Modré krúžky v grafe

označujú naše experimentálne zistené hodnoty. Tento experiment a predikčná analýza teda umožňujú odhadnúť oblasť, kde za podobných experimentálnych podmienok bude ležať 95 % výsledkov. Inak povedané, pre každé jednotlivé meranie sa odhad plochy absorpčného pásu pod krivkou s 95% pravdepodobnosťou pohybuje medzi ohraničujúcimi čiernymi priamkami. Ďalej táto analýza hovorí, že pre všetky hmotnostné percentá paracetamolu je stredný odhad plochy absorpčného pásu určený súradnicou z červenej kalibračnej priamky.

Z Obrázok 15 sa dá pozorovať širšie rozmedzie čiernych čiar ako u regresnej analýzy paracetamolu s mikrokryštalickou celulózu (Príloha 3). To znamená, že namerané body budú rozmiestnené v páse s väčšou odchýlkou. Presnosť merania pri stearáte horečnatom teda bola o trochu nižšia ako u mikrokryštalickej celulózy.

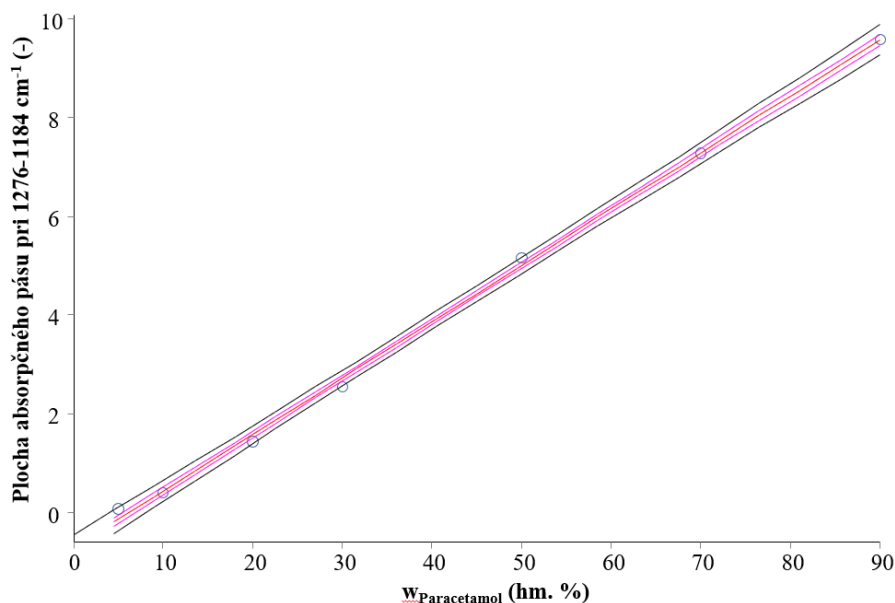


Obrázok 15. Kalibračná závislosť merania paracetamolu so stearátom horečnatým - spolu s pásom spoľahlivosti (95% predikčný interval) pre hodnotu plochy pod krivkou pre danú koncentráciu paracetamolu

Na Obrázok 16 je uvedená analýza regresnej priamky stearátu horečnatého s paracetamolom so štandardnou chybou a s 95% predikčným intervalom. Štandardná chyba udáva približne 68% interval spoľahlivosti (konfidencie). V tejto analýze ide o presnosť určenia parametrov samotnej kalibračnej priamky, smernice a priesečníka. Opäť čierne čiary ohraničujú hranice, v ktorých sa s 95% pravdepodobnosťou nachádza skutočná (ideálna) kalibračná priamka. Červená priamka predstavuje model lineárnej závislosti na ktorej ležia stredné odhady plochy absorpčných pásov a ružové priamky predstavujú smerodajnú chybu. Modré krúžky v grafe označujú naše experimentálne získané hodnoty.

Z Obrázok 16 sa dá pozorovať širší pás, kde môže ležať skutočná kalibračná krivka ako u regresnej analýzy paracetamolu s mikrokryštalickou celulózu (Príloha 4). To vypovedá o nižšej presnosti merania a stanovenia kalibračnej priamky stearátu horečnatého, než u mikrokryštalickej celulózy.



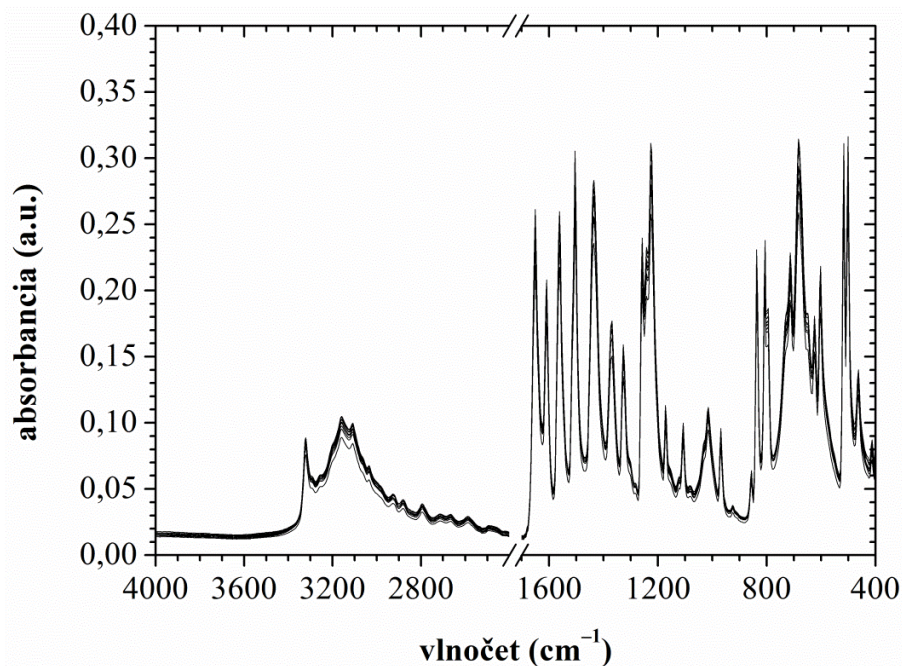


Obrázok 16. Štandardná chyba a 95% predikčný interval pre kalibračnú priamku paracetamolu so stearátom horečnatým

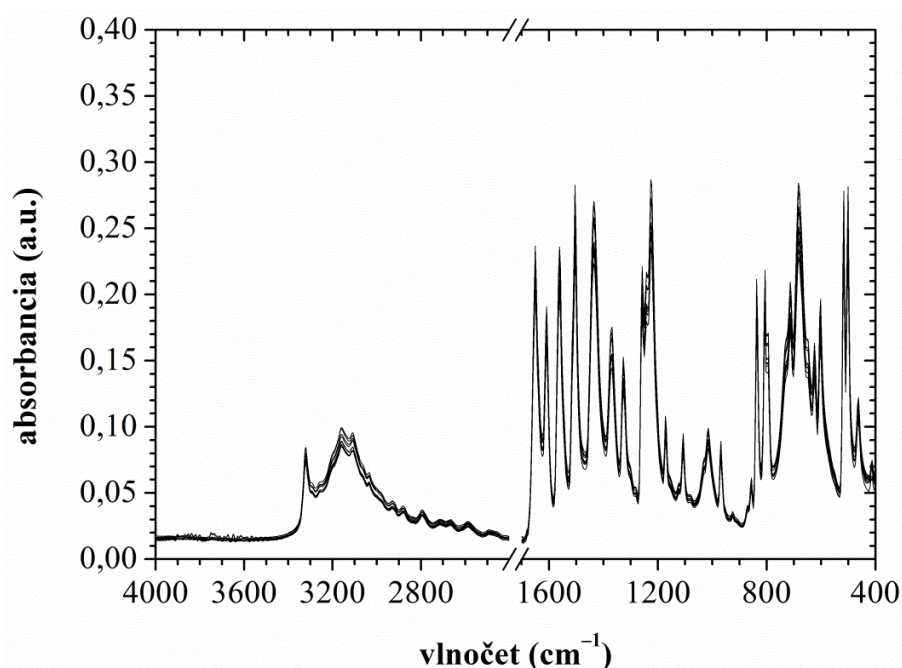
### 5.3 Vyhodnotenie jednotlivých meraní a stanovenie obsahu paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch

K vlastnému meraniu bolo použitých 10 tabliet z každého vybraného liečivého prípravku Panadol<sup>®</sup> Novum 500 mg, Paralen<sup>®</sup> 500 mg a Parapyrex<sup>®</sup> 500 mg. Tieto lieky mali veľmi podobný dátum expirácie, kvôli možnej degradácii účinnej látky paracetamolu v čase. Po zvážení tabliet na analytickej váhe bola polovica tablety rozdrvená achátovou paličkou v achátovom mažiari a pretrepaná na vibračnom mlyne po dobu troch minút. Meranie vzoriek prebehlo na prístroji za rovnakých podmienok nastavenia parametrov v programe OMNIC ako predtým: rozmedzie vlnočtu 4 000–400 cm<sup>-1</sup> s rozlíšením 8 cm<sup>-1</sup> a s celkovým počtom akumulovaných skenov 64. Pomocou programu MS Excel a ORIGIN boli spracované dáta a spektrá všetkých vzoriek získaných v programe OMNIC.

Na Obrázok 17 a Obrázok 18 sú na ukážku uvedené zmerané ATR-FTIR spektrá vybraných liečivých prípravkov vo forme tabliet, Paralen<sup>®</sup> 500 mg a Panadol<sup>®</sup> Novum 500 mg. FTIR spektrum prípravku Parapyrex<sup>®</sup> 500 mg je uvedené v kapitole PRÍLOHY, Príloha 2. Dáta z meraní boli spracované a ďalej použité pri vyhodnocovaní množstva účinnej látky paracetamolu vo vybraných liekoch. Zo spektier Paralen<sup>®</sup> 500 mg a Panadol<sup>®</sup> Novum 500 mg sa dá pozorovať ich podobný priebeh, tvárnosť a veľmi podobnú absorbovateľnosť účinnej látky paracetamolu pri istých vlnočtoch. U oboch liečivých prípravkov ten najvyšší ostrý pík spektier dosahoval absorbanciu okolo 0,30 pri vlnočte 1 224 cm<sup>-1</sup>, ktorý odpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb vo fenole.



Obrázok 17. Zmerané ATR-FTIR spektrá 10 tabliet liečivého prípravku Paralen® 500 mg



Obrázok 18. Zmerané ATR-FTIR spektrá 10 tabliet liečivého prípravku Panadol® Novum 500 mg

Po nameraní všetkých vzoriek nastalo vyhodnocovanie samotného merania. Zaznamenané spektrá sme interpretovali a vybrali sme vhodný absorpčný pás pri danom vlnočte, kedy plnivá, ako mikrokryštalická celulóza a stearát horečnatý absorbovali infračervené žiarenie najmenej a paracetamol práve najviac. Vybrali sme plochy absorpčného pásu mikrokryštalickej celulózy pri vlnočte  $1\ 530\text{--}1\ 470\ \text{cm}^{-1}$  a stearátu horečnatého pri vlnočte  $1\ 276\text{--}1\ 184\ \text{cm}^{-1}$ . Získané plochy absorpčných pásov sme dosadili do regresných rovníc kalibračných priamok pre paracetamol s mikrokryštalickou celulózou a pre paracetamol so stearátom horečnatým. Z rovníc sme vypočítali hmotnostnú koncentráciu paracetamolu

v jednej tablete liečivého prípravku. Pomocou matematickej metódy trojčlenky sme dopočítali množstvo účinnej látky paracetamolu v jednej tablete v mg. Následne sme dopočítali aritmetický priemer množstva paracetamolu v 10 tabletách daného lieku. Výsledky uvedené v Tabuľka 2 ukazujú, že najnižšia odchýlka od výrobcom uvádzaného a garantovaného množstva 500 mg paracetamolu vychádzala z kalibračnej priamky pre mikrokryštalickú celulózu s paracetamolom. Zistené množstvo paracetamolu sa pohybovalo od 493,5 do 505,5 mg v jednej tablete. Jedným z možných vysvetlení môže byť, že sa lepšie zhomogenizovala mikrokryštalická celulóza s paracetamolom, než sa zhomogenizoval stearát horečnatý s paracetamolom. Ďalej z Tabuľka 2 vyplýva, že zvolená metóda stanovovania obsahu paracetamolu v liečivom prípravku je vhodná, spoľahlivá a patrí medzi rýchlejšie metódy stanovovania paracetamolu. Avšak je potrebné dohliadnuť na parametre presnosti merania, aby bola dosiahnutá úspešnosť blízka 100%, t. j. nameraných presne 500 mg paracetamolu v jednej tablete.

Tabuľka 2. Vypočítané priemerné množstvá účinnej látky paracetamolu v 10 tabletách daných liečivých prípravkov pri plnivách mikrokryštalická celulóza a stearát horečnatý

Plnivo	Mikrokryštalická celulóza	Stearát horečnatý
Liečivý prípravok	$\bar{m}$ paracetamol [mg]	$\bar{m}$ paracetamol [mg]
Paralen <sup>®</sup> 500 mg	<b>493,5005</b>	<b>493,2709</b>
Panadol <sup>®</sup> Novum 500 mg	<b>505,5077</b>	<b>480,7499</b>
Parapyrex <sup>®</sup> 500 mg	<b>503,3934</b>	<b>497,2342</b>

### 5.3.1 Analýza výsledkov samotného merania

V softvéri MS Excel sme štatisticky analyzované výsledky meraní. Z vypočítaného obsahu paracetamolu (z kalibračnej priamky mikrokryštalickej celulózy s paracetamolom a stearátu horečnatého s paracetamolom) sme prostredníctvom vyhodnocovacieho programu ORIGIN vytvorili krabicové grafy pre každý druh vybraného liečivého prípravku. Krabicové grafy predstavujú informácie o rozložení dát a rozložení priemerov voči nameraným hodnotám. Táto analýza rozoberá rozloženie meraní v závislosti na použitej metóde kalibrácie. Ďalej táto analýza hodnotí presnosť merania s ohľadom na použitú metódu kalibrácie a s ohľadom na typ liečivého prípravku, ktorý je analyzovaný.

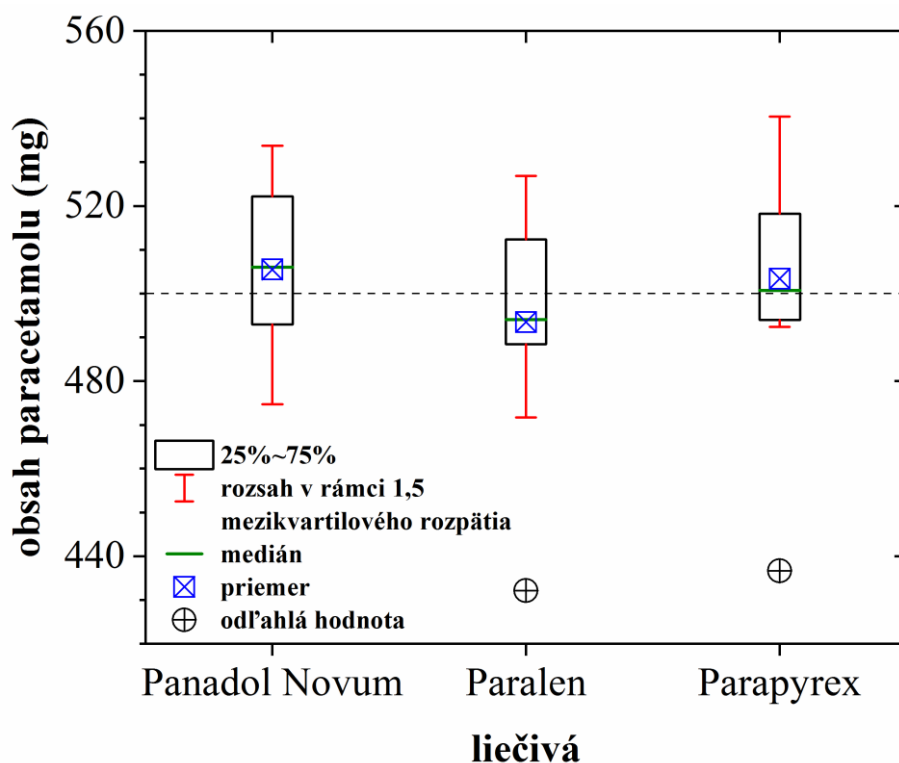
Na Obrázok 19 je vyobrazený krabicový graf z obsahov paracetamolu, ktoré boli vypočítané z kalibračnej priamky pre mikrokryštalickú celulózu s paracetamolom. Prerušovaná čiara určuje referenčnú úroveň t. j. 500 mg paracetamolu. Spodná časť čierneho boxu predstavuje prvý kvartil, ktorý oddeľuje prvých 25 % údajov. Druhý kvartil predstavuje medián a tretí kvartil, respektíve 75. percentil, sa nachádza v hornej časti čierneho boxu. Medzikvartilové rozpätie určuje rozsah medzi prvým kvartilom a tretím kvartilom. Rozsah v rámci 1,5 medzikvartilového rozpätia určuje hranice tolerancie, kde by sa ešte rozdelenie údajov dalo považovať za gaussovské, teda rozdelené normálne, čo je aj predpoklad použitia regresnej analýzy. Modrý box označuje aritmetický priemer množstva paracetamolu v 10 tabletách. Zelená čiara predstavuje medián, čiže strednú hodnotu nameraných hodnôt. Čierne kruhy s krížikom určujú minimálnu nameranú hodnotu množstva paracetamolu v tablete. Tým, že u lieku Paralen<sup>®</sup> 500 mg a Parapyrex<sup>®</sup> 500 mg je minimálna hodnota za

vypočítaným rozsahom, tak sa táto hodnota taktiež označuje ako odľahlá. Tieto odľahlé hodnoty ovplyvňujú aritmetický priemer. Napriek tomu, že sú pozorované odľahlé hodnoty, tak podľa P-hodnoty Shapiro-Wilkovho W testu normality sa dá považovať rozloženie dát za normálne rozloženie.

Z analýzy dát kalibračnej priamky pre mikrokryštalickú celulózu s paracetamolom konštatujeme, že u lieku Parapyrex® 500 mg bol najpresnejšie určený priemer blížiaci sa k referenčnej hodnote 500 mg, ale z hľadiska konzistentnosti a symetrickosti merania najpresnejšie meranie prebehlo u lieku Panadol® Novum 500 mg.

Všeobecné určenie presnosti aritmetického priemeru liečiva paracetamolu u kalibračnej priamky pre mikrokryštalickú celulózu s paracetamolom bolo charakterizované štandardnou chybou. Interval aritmetický priemer  $\pm$  štandardná chyba obsahuje u každého merania referenčnú líniu 500 mg, čo vypovedá o celkovej presnosti merania a určenia aritmetického priemeru.

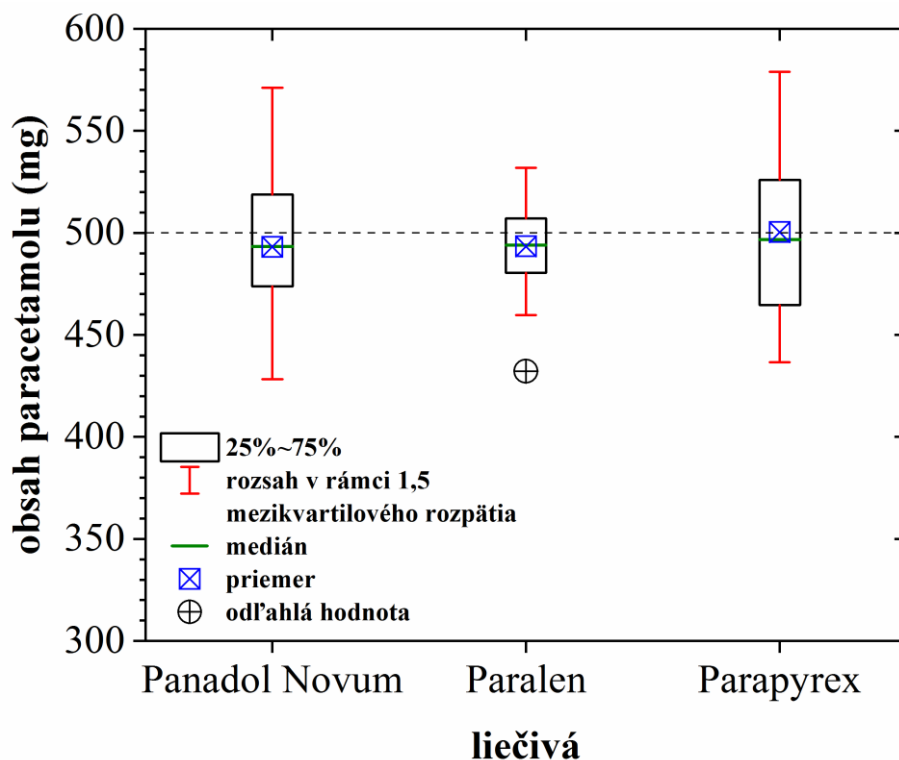
Pre daný typ kalibračnej priamky podľa stearátu horečnatého (Príloha 7) bol opäť najlepšie určený priemer u lieku Parapyrex® 500 mg, avšak taktiež sme pozorovali asymetriu rozloženia výsledkov. Najpresnejšie meranie prebehlo u lieku Paralen® 500 mg, kde boli merania konzistentné a precízne, čiže málo rozptýlené okolo referenčnej hodnoty.



Obrázok 19. Krabicový graf z dát kalibračnej priamky pre paracetamol s mikrokryštalickou celulózu

Na Obrázok 20 je uvedený súhrnný krabicový graf, ktorý obsahuje vypočítané obsahy paracetamolu ako z kalibračnej priamky pre mikrokryštalickú celulózu s paracetamolom, tak aj pre stearát horečnatý s paracetamolom. U všetkých troch liekov sa vypočítaný aritmetický priemer obsahu paracetamolu pohyboval okolo referenčnej úrovne 500 mg, avšak najpresnejšie určený priemer bol u lieku Parapyrex® 500 mg. Medián sa tiež u všetkých troch

liečivých prípravkov pohyboval okolo referenčnej úrovne a aj okolo priemeru. Aj keď u lieku Paralen® 500 mg bola nameraná jedna odľahlá hodnota, tak ostatné hodnoty výsledkov boli konzistentné a pohybovali sa okolo referenčnej úrovne 500 mg.



Obrázok 20. Krabicový graf z dát kalibračných priamok pre paracetamol s mikrokryštalickou celulózu a pre paracetamol so stearátom horečnatým

Pomocou metód aplikovanej štatistiky implementovaných v softvéri Microsoft Office Excel bol analyzovaný príspevok jednotlivých faktorov k celkovému rozptylu (ANOVA). Zistili sme, že výsledky merania nezávisia od typu kalibrácie, t. j. faktor „kalibrácia“ nemá vplyv na priemerné hodnoty obsahu paracetamolu bez ohľadu na typ lieku. Ďalej výsledky merania nezávisia od typu lieku, to znamená, že faktor „liek“ nemá vplyv na priemerné hodnoty obsahu paracetamolu bez ohľadu na typ kalibrácie. Ani test interakcie „kalibrácia × typ lieku“ nevyšiel významný. Záverom tejto analýzy je, že faktory medzi sebou neinteragujú, to znamená, že prispievajú k variabilite meraní nezávisle. Testy významnosti ale nepreukázali štatisticky významné rozdiely medzi typmi kalibrácie, ani medzi druhom lieku, preto v danom rozložení (variabilite) výsledkov dominovala experimentálna chyba, pričom v experimentálnej chybe môžeme rozlíšiť tri príspevky: jeden príspevok tvorí variabilita medzi samotnými tabletami („interindividuálne“ rozdiely), druhý príspevok zahŕňa chybu meracieho prístroja a tretí príspevok sú náhodné chyby, ktoré sú súčasťou postupov pri príprave vzorky a meraní.

Aby sme dokázali urobiť zovšeobecňujúci záver s ktorou kalibračnou priamkou, či pre mikrokryštalickú celulózu alebo pre stearát horečnatý s paracetamolom, sú merania presnejšie, a či táto presnosť závisí na type liečivého prípravku, je potrebné mať viac výsledkov a premerať viac tabliet z jedného balenia liečivého prípravku, prípadne z jednej šarže.

## 6 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na meranie, spracovanie a vyhodnotenie infračervených spektier vzoriek paracetamolu s príslušným plnivom (mikrokryštalická celulóza, stearát horečnatý a škrob) a vzoriek liečivých prípravkov Panadol<sup>®</sup> Novum 500 mg, Paralen<sup>®</sup> 500 mg a Parapyrex<sup>®</sup> 500 mg v tabletovej forme. Hlavnými úlohami práce bolo stanoviť obsah paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch pomocou ATR-FTIR spektrometrie a navrhnúť a optimalizovať stanovenie paracetamolu v liekových formách pomocou priameho merania vzorky tzv. suchou cestou.

Najprv sme overili, že ATR-FTIR spektrá plnív neovplyvňujú a neprekývajú spektrum štandardu paracetamolu. Následne boli zamerané vzorky paracetamolu s plnivom na vytvorenie kalibračnej priamky pre paracetamol s mikrokryštalickou celulóza, stearátom horečnatým a so škrobom. Z nameraných spektier boli vybrané vhodné oblasti vlnočtov, kde absorpcia mikrokryštalickej celulózy a stearátu horečnatého je minimálna. Na zostrojenie kalibračnej priamky boli vybrané absorpčné pásy paracetamolu pri  $1\,503\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,224\text{ cm}^{-1}$ . Na vyhodnotenie paracetamolu bola na základe zameraného spektra plniva tzn. mikrokryštalickej celulózy vybraná oblasť vlnočtov  $1\,530\text{--}1\,470\text{ cm}^{-1}$  a u zameraného spektra stearátu horečnatého bola vybraná oblasť vlnočtov  $1\,276\text{--}1\,184\text{ cm}^{-1}$ .

Kalibračné priamky pre paracetamol s mikrokryštalickou celulóza a paracetamol so stearátom horečnatým mali koeficient determinácie  $R^2$  blízky 1 a súčasne vysokú mieru zhody stanoveného obsahu paracetamolu s referenčnou hodnotou. Aj keď kalibračná priamka štandardu škrobu s paracetamolom mala veľmi uspokojivú hodnotu koeficientu  $R^2$ , pre systematický odklon nakoniec nebola použitá pre stanovenie obsahu paracetamolu vo vybraných liečivých prípravkoch. Dôvodom bola nízka hodnota lineárnej smernice kalibračnej priamky, ktorá je v priamej súvislosti s citlivosťou merania. Ďalej sme spravili regresnú analýzu kalibračných priamok, kde najpresnejšie meranie a určenie polohy kalibračnej priamky bolo prevedené u kalibračnej priamky pre paracetamol s mikrokryštalickou celulóza.

V ďalšej časti práce sme zmerali ATR-FTIR spektrá vzoriek tabliet vybraných liečivých prípravkov, vybrali vhodné oblasti vlnočtov a vyhodnotili plochy absorpčných pásov. Pomocou regresných rovníc kalibračných priamok pre paracetamol s mikrokryštalickou celulóza a paracetamol so stearátom horečnatým sme zistili hmotnostné percentá paracetamolu v jednej tablete. Následne sme vypočítali obsahy paracetamolu v jednotlivých zameraných tabletách a dopočítali aritmetické priemery pre jednotlivé liečivé prípravky. Najnižšia odchýlka od výrobcom uvádzaného a garantovaného množstva 500 mg paracetamolu vychádzala z kalibračnej priamky pre paracetamol s mikrokryštalickou celulóza. Zistené množstvo paracetamolu sa pohybovalo od 493,5 do 505,5 mg v jednej tablete. Z kalibračnej priamky pre paracetamol so stearátom horečnatým sa obsah paracetamolu v jednej tablete pohyboval od 480,8 do 497,2 mg. Odchýlky od referenčnej hodnoty 500 mg nepresiahli 1,5 % pre celulóza a 3,85 % pre stearát horečnatý.

Z analýzy výsledkov merania môžeme vyvodit' záver, že metóda ATR-FTIR spektrometrie je vhodná na kvantitatívne stanovenie účinnej látky paracetamolu v liekoch, pretože výsledky sú v medziach akceptovateľných pre prieskumné meranie. Konštatujeme, že ATR-FTIR spektrometria dokáže s dostatočnou presnosťou stanoviť paracetamol v tabletovej forme

pomocou priameho merania vzorky tzv. suchou cestou. Vyššiu presnosť experimentálneho stanovenia môžeme dosiahnuť premeraním viacerých tabliet z jedného balenia prípravku, prípadne z viacerých balení danej šarže.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] *Časopis českých lékárníků: měsíčník Stavovské lékárnické komory*. Praha, 2015, roč. 87, č. 2. ISSN 1211-5134.
- [2] PRESCOTT, Laurie F. *Paracetamol: Past, Present, and Future*. American Journal of Therapeutics [online]. 2000, roč. 7, č. 2, s. 143-148 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.1097/00045391-200007020-00011. ISSN 1075-2765. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00045391-200007020-00011>
- [3] JEFFERIES, S., S. MANOJ, P. YOUNG. *Paracetamol in critical illness: a review*. Crit Care Resusc. 2012, roč. 14, č. 1, s. 74–80 [cit. 2019-06-06]. ISSN 1441-2772.
- [4] *Vyhláška č. 128/2012 Z. Z. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky zo 12. apríla 2012 o požiadavkách na správnu výrobnú prax a požiadavkách na správnu veľkodistribučnú prax*.
- [5] HUBER, C., B. BARTHA, R. HARPAINTNER, P. SCHRÖDER. *Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate*. Environmental Science and Pollution Research [online]. 2009, roč. 16, č. 2, s. 206–213 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.1007/s11356-008-0095-z. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-008-0095-z>
- [6] GRANBERG, R., A. C. RASMUSON. *Solubility of paracetamol in pure solvents*. Journal of Chemical and Engineering Data [online]. 1999, roč. 44, č. 6, s. 1391-1395 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.1021/je990124v. ISSN 0021-9568. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/je990124v>
- [7] *Český lékopis 2009: Pharmacopoea Bohemica*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 9788024729947.
- [8] PubChem.com. *Acetaminophen* [online]. ©2004-2020 [cit. 2019-09-13]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen>
- [9] HAMPL, F., S. RÁDL, J. PALEČEK. *Farmakochemie*. 3. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2015. s. 81. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [10] FARSA, O. *Analgetika – antipyretika*. Brno, 2007 ©PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D. [cit. 2019-11-20]. Prezentácia. Veterinárna a Farmaceutická univerzita, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických liečiv.
- [11] EYNDE, J. J. V. *How efficient is my (medical) chemistry*. Pharmaceuticals [online]. 2016, roč. 9, č. 2 [cit. 2019-11-20]. DOI: 10.3390/ph9020026. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph9020026>
- [12] *sukl.sk. Čo je to liek?* [online]. ©2020 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: [https://www.sukl.sk/sk/registracia-humannych-liekov/mam-moj-produkt-registrovat-ako-liek/co-je-to-liek?page\\_id=960](https://www.sukl.sk/sk/registracia-humannych-liekov/mam-moj-produkt-registrovat-ako-liek/co-je-to-liek?page_id=960)



- [13] BEŇO, P., E. TRUPLOVÁ, V. OSTRAVSKÁ, M. STANKOVIČOVÁ. *Stabilita liečiv a liekov*. Bratislava: Veda, 2003, s. 9-10. ISBN 80-224-0765-8.
- [14] CARSTENSEN T. J., C. T. RHODES. *Drug stability: Principles and practices*. Journal of Pharmaceutical Sciences [online]. 1991, roč. 80, č. 1 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1002/jps.2600800127. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915484023>
- [15] GOLONKA I., A. KAWACKI, W. MUSIAL. *Stability Studies of a Mixture of Paracetamol and Ascorbic Acid, Prepared Extempore, at Elevated Temperature and Humidity Conditions*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research [online]. 2015, roč. 14, č. 8, s. 1315-1321 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.4314/tjpr.v14i8.1. ISSN 1596-9827. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/121683>
- [16] Edukafarm. *Panadol (paracetamol): profil léčivého přípravku* [online]. ©2020 [cit. 2019-11-21]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/c87-panadol-paracetamol-profil-leciveho-pripravku>
- [17] LINCOVÁ, D., H. FARGHALI, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-7262-373-0.
- [18] HODIS, J. *Nová fakta o paracetamolu, rizika předávkování, intoxikace a jejich zvládnání*. Praktické lékařství [online]. 2015, roč. 11, č. 3, s. 90-92 [cit. 2020-01-25]. ISSN 1801-2434. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/03/03.pdf>
- [19] SLÍVA, J.. *Paracetamol: hľadanie optimálnej dávky*. Paracetamol: hľadanie optimálnej dávky [online]. EduprofiPHARM, s. r. o., 2019 [cit. 2020-01-15]. ISBN: 978-80-973359-6-0. Dostupné z: <https://www.eduprofipharm.sk/userfiles/publications/10/brozura%20Paracetamol%20final%202019.pdf>
- [20] ADC.sk. *Paralen 500 mg* [online]. 1978, posledná revízia v septembri 2019 [cit. 2020-01-25]. Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/pil/paralen-500-611136.html>
- [21] VRANOVÁ, V. *Intoxikácia paracetamolom*. Paracetamol: hľadanie optimálnej dávky [online]. EduprofiPHARM, s. r. o., 2019, [cit. 2020-01-15]. ISBN: 978-80-973359-6-0. Dostupné z: <https://www.eduprofipharm.sk/userfiles/publications/10/brozura%20Paracetamol%20final%202019.pdf>
- [22] ČIŽMÁRIKOVÁ M., P. TAKÁČ. *Liekové formy a aplikačné cesty podávania liekov so zameraním na ich význam v humánnej medicíne*. 1. vydanie. Košice: Šafárik Press, 2019. ISBN 978-80-8152-754-8.
- [23] sukl.cz. *Talvosilen Forte* [online]. 2010 © SÚKL [cit. 2019-10-15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0086023>
- [24] KRŠIAK, M., J. ŠVIHOVEC, I. ZUPANETS, M. KRIŠKA. *Optimální dávkování paracetamolu při léčbě bolesti a horečky: Optimal dosage of paracetamol for treating*

*pain and fever*. *Pediatrics pre prax*. Bratislava: SOLEN, 2010, roč. 11, č. 1, s. 33-34 a 36-37. ISSN 1336-8168.

- [25] ADC.sk. *Theraflu* [online]. 2002, posledná revízia v auguste 2016 [cit. 2020-02-07]. Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/theraflu-prechladnutie-a-chripka-366524.html>
- [26] ADC.sk. *Coldrex* [online]. 1992, posledná revízia v novembri 2019 [cit. 2020-02-07]. Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/coldrex-horuci-napoj-citron-989824.html>
- [27] ADC.sk. *Paralen SUS* [online]. 2001, posledná revízia v septembri 2019 [cit. 2019-10-20]. Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/paralen-sus-649879.html>
- [28] SAVSAR, M. *Quality Assurance and Management*. Chorvátsko: InTech, 2012. DOI: 10.5772/2235. ISBN 978-953-51-0378-3.
- [29] FARDOUS, A. M., A. A. MOHAMED, M. S. SOAD. *Selective spectrophotometric determination of p-aminophenol and acetaminophen*. *Talanta* [online]. 1997, roč. 44, č. 1, s. 61-68 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1016/S0039-9140(96)02013-9. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914096020139>
- [30] SKOOG, D., D. M. WEST. *Fundamentals of analytical chemistry*. 2. vyd. London: Holt, Rinehart and Winston, 1972. ISBN 978-0495558286.
- [31] GOYAL, R. N., S. P. SINGH. *Voltammetric determination of paracetamol at C60-modified glassy carbon electrode*. *Electrochimica Acta* [online]. 2006, roč. 51, č. 15, s. 3008-3012 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.08.036. ISSN 00134686. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468605010261>
- [32] AN, J. H., H. J. LEE, B. H. JUNG. *Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Biomedical Chromatography* [online]. 2012, roč. 26, č. 12, s. 1596-1604 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1002/bmc.2737. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.2737>
- [33] DI GIROLAMO, A., W. M. O'NEILL a I. W. WAINER. *A validated method for the determination of paracetamol and its glucuronide and sulphate metabolites in the urine of HIV + / AIDS patients using wavelength-switching UV detection*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1998, roč. 17, č. 6-7, s. 1191-1197 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1016/S0731-7085(98)00084-3. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708598000843>
- [34] BABU, G. R., A. L. RAO a J. V. RAO. *Bioanalytical method development and validation for simultaneous estimation of paracetamol and cefixime by using RP-HPLC in rabbit plasma*. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2016, roč. 32, č. 1, s. 701-707 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.13005/ojc/320178. ISSN 0970020X. Dostupné z: <http://www.orientjchem.org/vol32no1/bioanalytical-method-development-and->

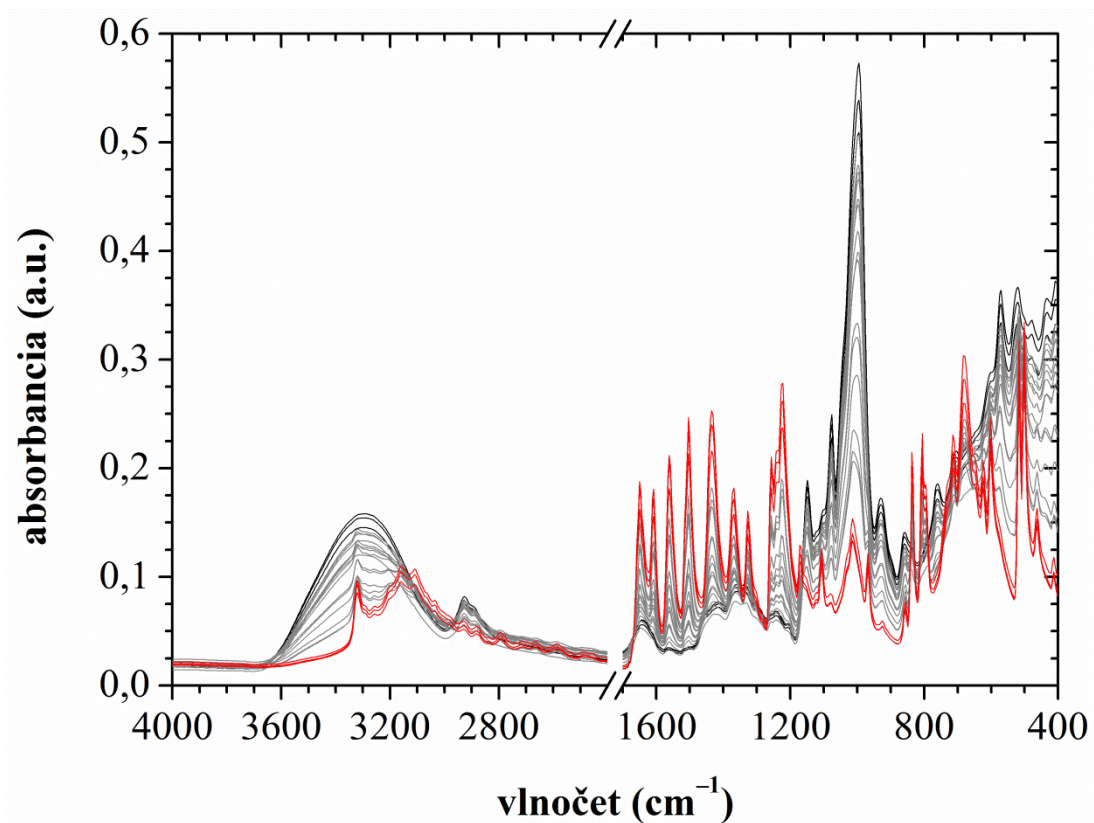
validation-for-simultaneous-estimation-of-paracetamol-and-cefixime-by-using-rp-hplc-in/

- [35] FLINT, R. B., P. MIAN, B. VAN DER NAGEL, N. SLIJKHUIS a B. C. P. KOCH. *Quantification of acetaminophen and its metabolites in plasma using UPLC-MS*. Therapeutic Drug Monitoring [online]. 2017, roč. 39, č. 2, s. 164-171 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000379. ISSN 0163-4356. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00007691-201704000-00011>
- [36] ZHAO, S., W. BAI, H. YUAN a D. XIAO. *Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection*. Analytica Chimica Acta [online]. 2006, roč. 559, č. 2, s. 195-199 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.11.071. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005019793>
- [37] GÜNZLER G., A. WILLIAMS. *Handbook of Analytical Techniques*. 1. vydanie. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3527301658.
- [38] LAWSON G., J. OGWU, S. TANNA. *Quantitative screening of the pharmaceutical ingredient for the rapid identification of substandard and falsified medicines using reflectance infrared spectroscopy*. PLOS ONE [online]. 2018, roč. 18, č. 8 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1371/journal.pone.0202059. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0202059>
- [39] ThermoFisher.com. *Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spectrometer* [online]. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/912A0760#/912A0760>
- [40] STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 2004, 1 vydání, Wiley & Sons. ISBN: 0-470-85427-8
- [41] COATES, J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Encyclopaedia of Analytical Chemistry. MEYERS, R.A., 2000, 1 vydanie, John Wiley & Sons, pp. 10815–10837.
- [42] BARTH, A. *Infrared Spectroscopy of Proteins*. Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics [online]. 2007, roč. 1767, č. 9, 1073-1101 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272807001375>
- [43] MOYNIHAN, H. A., I. P. O'HARE. *Spectroscopic characterization of the monoclinic and orthorhombic forms of paracetamol*. International Journal of Pharmaceutics [online]. 2002, roč. 247, č. 1-2, 179–185 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00420-9. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302004209>

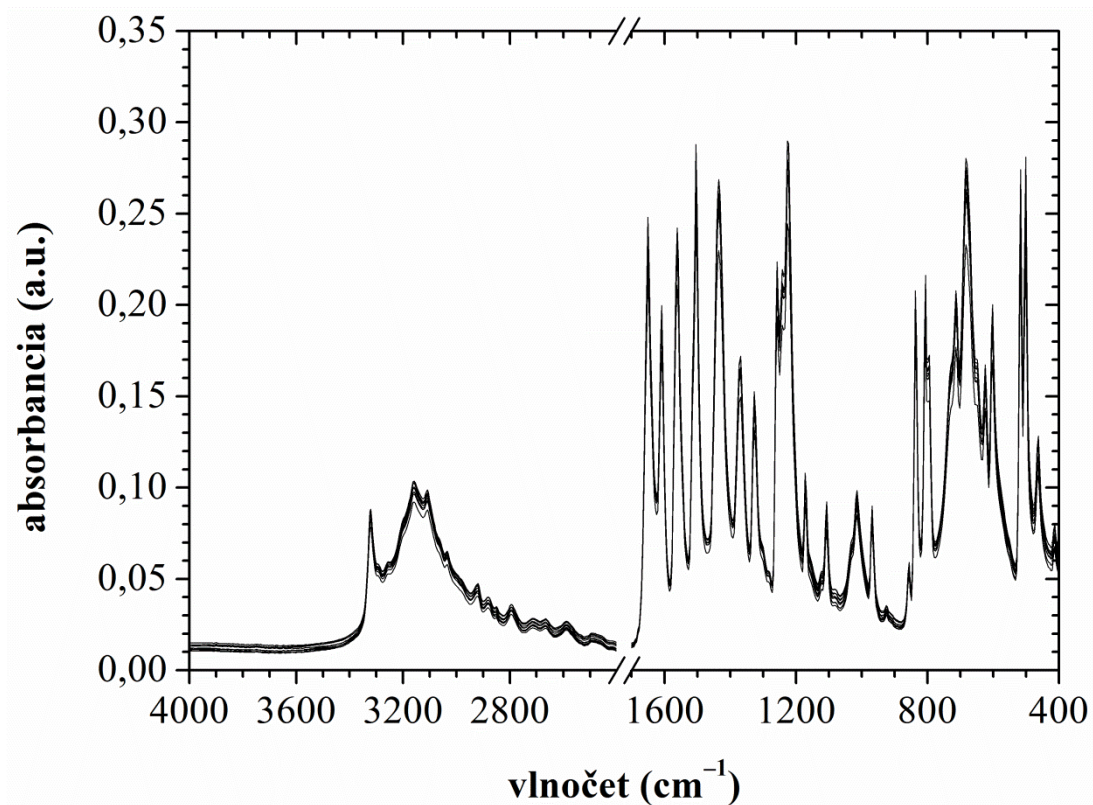
## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AIDS	Syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti
Ar	Aromatická
ATR-FTIR	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, metóda zoslabeného úplného odrazu
C <sub>18</sub>	Cyklický karbyn
COX	Cyklooxygenáza
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LC-MS/MS	Kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
MS	Hmotnostná spektrometria
MS Excel	Microsoft Excel
NAC	N-acetylcystein
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimín
RP-HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na nepolárnych adsorbentoch
SD	Štandardná odchýlka
SRM	Selected Reaction Monitoring
UV	Ultrafialová oblasť spektra elektromagnetického žiarenia
Vis	Viditeľná oblasť spektra elektromagnetického žiarenia

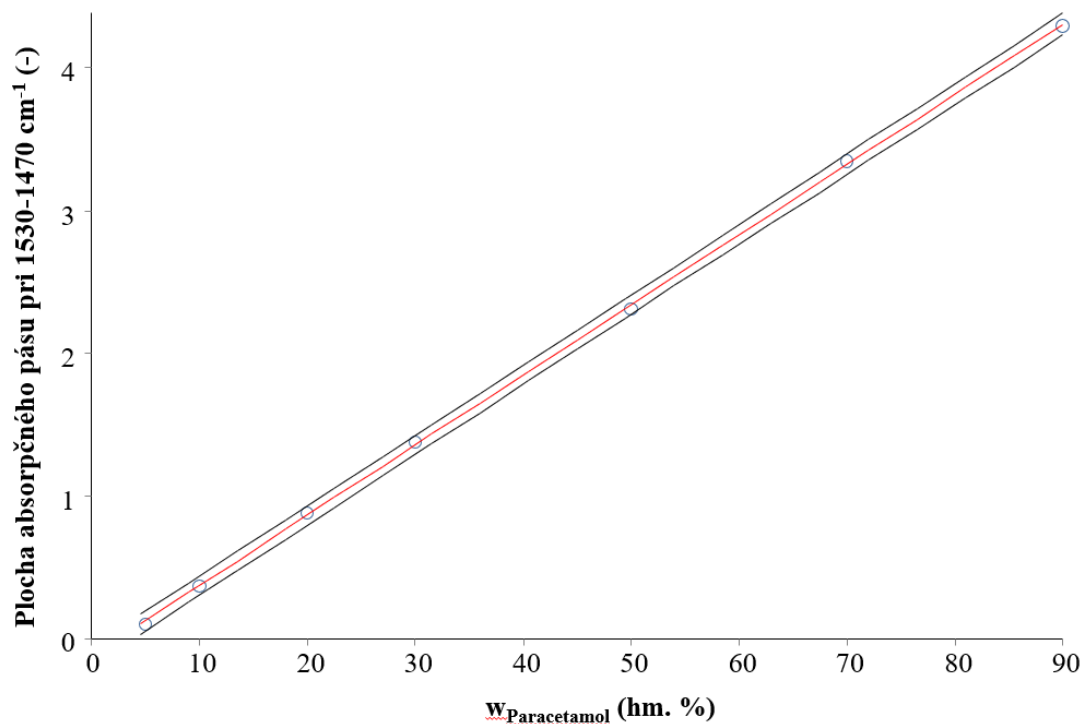
## 9 PRÍLOHY



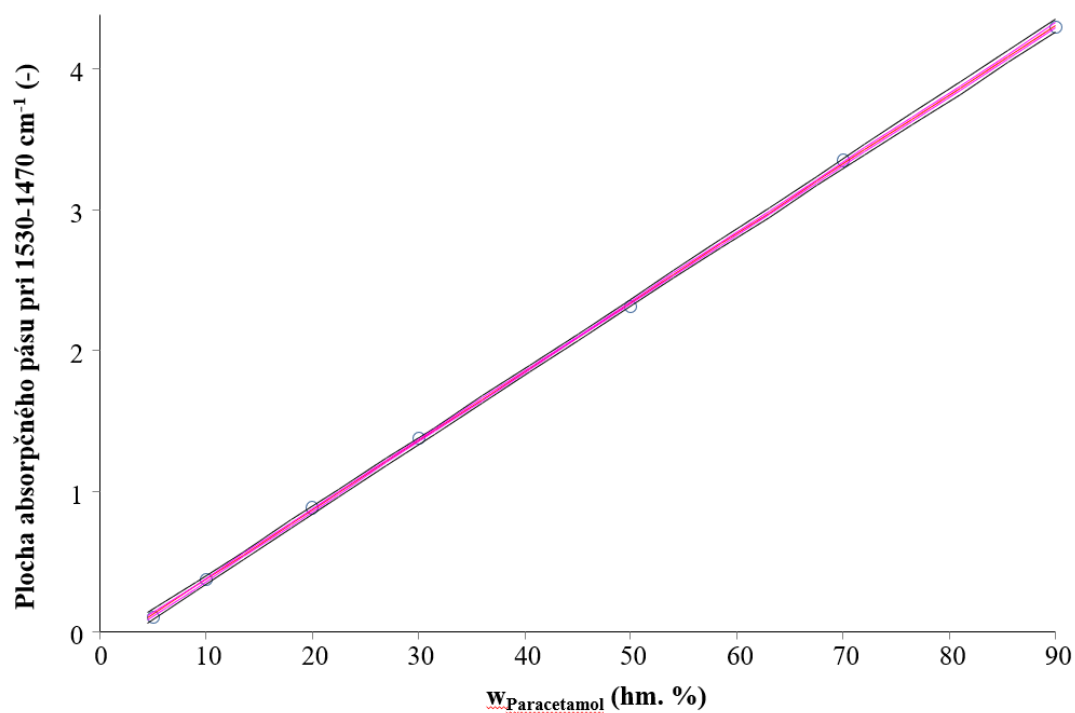
Príloha 1. Zmerané ATR-FTIR spektrá štandardu škrobu s paracetamolom o koncentrácii 5 hm. % (čierna), 90 hm. % (červená) a 10–70 hm. % (šedá)



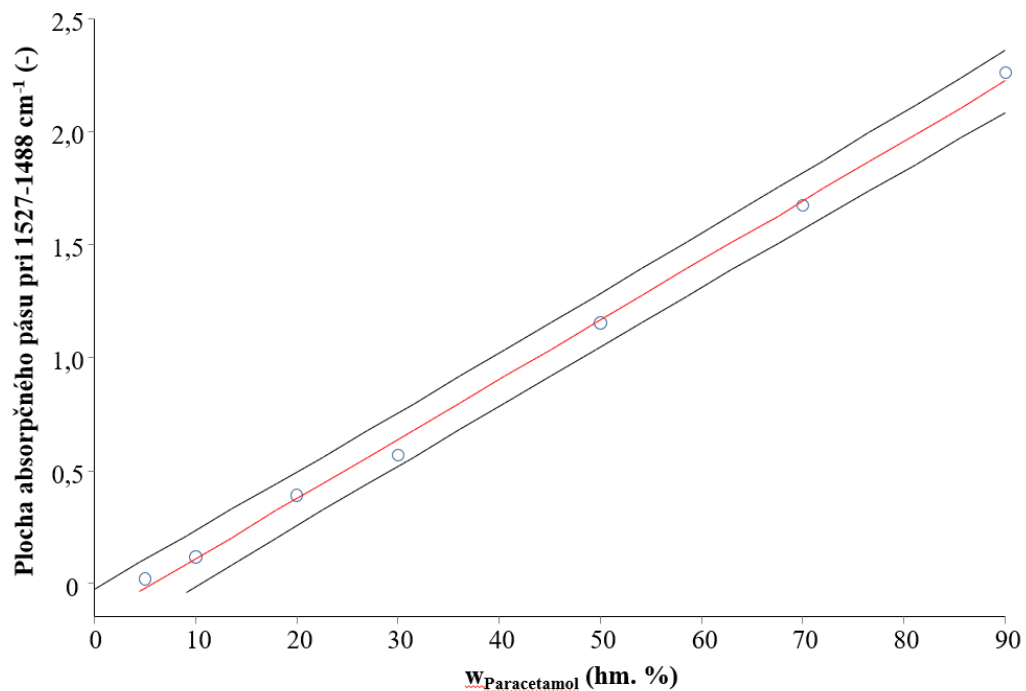
Príloha 2. Zmerané ATR-FTIR spektrá 10 tabliet liečivého prípravku Parapyrex® 500 mg



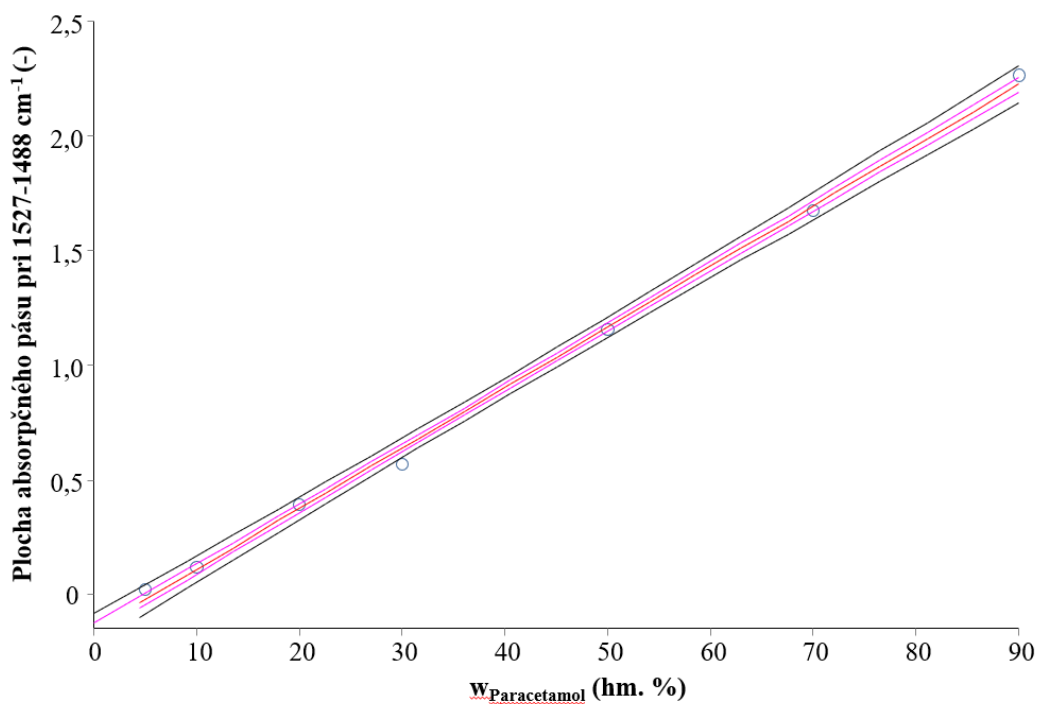
Príloha 3. Kalibračná závislosť merania mikrokryštalickej celulózy s paracetamolom – spolu s pásom spoľahlivosti (95% predikčný interval) pre hodnotu plochy pod krivkou pre danú koncentráciu



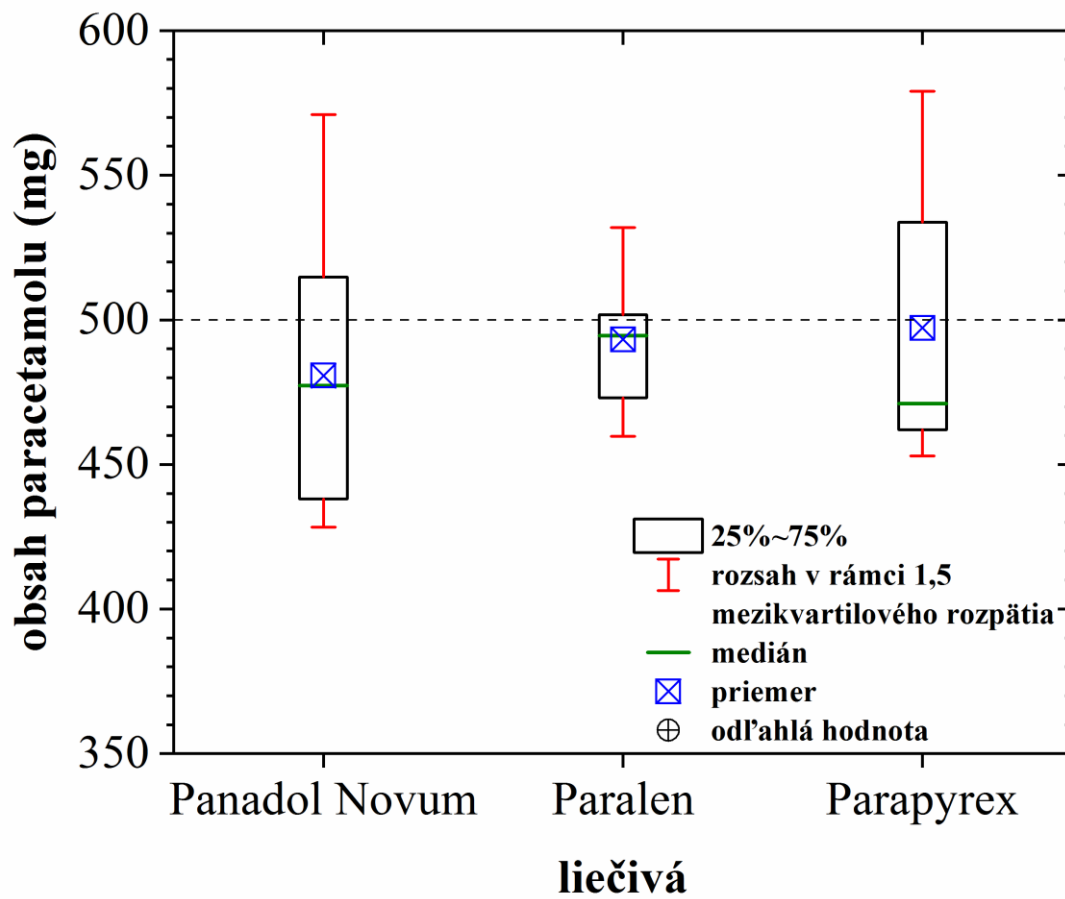
Príloha 4. Štandardná chyba a 95% predikčný interval pre kalibračnú priamku mikrokryštalickej celulózy s paracetamolom



Príloha 5. Kalibračná závislosť merania škrobu s paracetamolom – spolu s pásom spoľahlivosti (95% predikčný interval) pre hodnotu plochy pod krivkou pre danú koncentráciu paracetamolu



Príloha 6. Štandardná chyba a 95% predikčný interval pre kalibračnú priamku škrobu s paracetamolom



Príloha 7. Krabicový graf z dát kalibračnej priamky pre paracetamol so stearátom horečnatým