

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu v pevných lékových formách
pomocí FTIR spektroskopie

FTIR analysis of pentoxifylline and verapamil hydrochloride in solid drug forms

Klára Horníková

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Horníková**
Osobní číslo: **C15118**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Analýza pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu v pevných
lékových formách pomocí FTIR spektroskopie**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte stručnou literární rešerši na téma: metody FTIR spektroskopie vhodné k analýze pevných lékových forem.
2. Prostudujte FTIR spektra vybraných matricových tablet s pentoxifylinem a verapamil hydrochloridem a ověřte platnost Lambert-Beerova zákona pro účinné látky.
3. Na základě literárních a experimentálních dat posuďte možnost použití FTIR spektroskopie pro analýzu pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu ve studovaných léčivech.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Václav Lochař, Ph.D.

Katedra fyzikální chemie

Datum zadání bakalářské práce:

28. února 2018

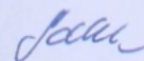
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 06. 2018

Klára Horníková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Ing. Václavu Lochařovi, Ph.D. za odborné vedení, veškerou pomoc a rady v průběhu zpracování této práce. Zároveň musím také poděkovat celé své rodině a přátelům za obrovskou podporu během celého svého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá studiem infračervených spekter pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu v pevných lékových formách. Pro měření byla využita transmisní metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Vzorky byly zpracovávány KBr technikou. Byla proměřena spektra samotných účinných látek i excipientů. Na základě interpretace jednotlivých spekter byl zvolen nejvhodnější absorpční pás, na kterém se dále prováděla kvantitativní analýza pomocí kalibračních přímek a byl ověřen Lambert-Beerův zákon.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pentoxifylin, verapamil hydrochlorid, infračervené spektrum, KBr tableta, Lambert-Beerův zákon

TITLE

FTIR analysis of pentoxifylline and verapamil hydrochloride in solid drug forms

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the study of infrared spectra of pentoxifylline and verapamil hydrochloride in solid drug forms. The transmission method of infrared spectroscopy with Fourier transform was used for the measurement. The samples were processed by KBr technique. The spectra of the active substances and excipients were measured and, based on their interpretation, the most appropriate absorption band was selected, on which quantitative analysis was further performed using calibration lines and the Lambert-Beer Law was verified.

KEYWORDS

Pentoxifylline, verapamil hydrochloride, infrared spectrum, KBr pellet, Lambert-Beer's law

OBSAH

Úvod.....	11
Cíl práce.....	13
1. Teoretická část	14
1.1 Pentoxifylin	14
1.2 Syntéza pentoxifylinu	14
1.3 Verapamil hydrochlorid.....	15
1.4 Syntéza verapamil hydrochloridu.....	16
1.5 Princip infračervené spektroskopie	16
1.6 Lambert-Beerův zákon.....	17
1.7 FTIR spektroskopie	17
1.8 KBr technika	18
1.9 Analýza spekter	18
2. Experimentální část	20
2.1 Chemikálie	20
2.2 Laboratorní přístroje a pomůcky	20
2.3 Příprava tablet-pentoxifylin/verapamil hydrochlorid	22
2.4 Příprava vzorku KBr technikou.....	22
2.5 Měření infračervených spekter.....	24
3. Výsledky	25
3.1 Interpretace spekter.....	25
3.2 Kvantitativní analýza	31
3.2.1 Kalibrace pentoxifylinu.....	31
3.2.2 Kalibrace verapamil hydrochloridu	37
4. ZÁVĚR.....	43
5. Použitá literatura	44

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura pentoxifylinu.....	14
Obrázek 2	Syntéza pentoxifylinu.....	14
Obrázek 3	Syntéza pentoxifylinu.....	15
Obrázek 4	Struktura verapamil hydrochloridu	15
Obrázek 5	Syntéza verapamil hydrochloridu	16
Obrázek 6	Hydraulický lis.....	20
Obrázek 7	Vibrační kulový mlýn.....	21
Obrázek 8	FTIR spektrofotometr.....	21
Obrázek 9	Srovnání tablety 500 mg a KBr tablety	23
Obrázek 10	Spektra excipientů	25
Obrázek 11	Spektrum pentoxifylinu	26
Obrázek 12	Spektrum verapamil hydrochloridu.....	27
Obrázek 13	Spektra formulací F1, F2, F3 s Ptx	29
Obrázek 14	Spektra formulací F1, F2, F3 s VH.....	30
Obrázek 15	Absorpční pás pentoxifylinu při 3119 cm ⁻¹	36
Obrázek 16	Absorpční pás verapamil hydrochloridu při 2236 cm ⁻¹	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Vlnočty charakteristických skupin ^[21, 22]	19
Tabulka 2	Složení tablet s pentoxifylinem	22
Tabulka 3	Složení tablet s verapamil hydrochloridem.....	22
Tabulka 4	Složení pro KBr tablety čistých látek	23
Tabulka 5	Složení KBr tablet pro ověření L.-B. zákona.....	24
Tabulka 6	Charakteristické vlnočty pro Ptx ^[23, 24]	28
Tabulka 7	Charakteristické vlnočty pro VH ^[25, 26]	28
Tabulka 8	Data pro kalibraci pentoxifylinu.....	31
Tabulka 9	Data pro kalibraci Ptx, F1	33
Tabulka 10	Data pro kalibraci Ptx, F2	33
Tabulka 11	Data pro kalibraci Ptx, F3	34
Tabulka 12	Data pro kalibraci verapamil hydrochloridu	37
Tabulka 13	Data pro kalibraci VH, F1	38

Tabulka 14 Data pro kalibraci VH, F2.....	39
Tabulka 15 Data pro kalibraci VH, F3.....	39

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrace pentoxifylinu.....	32
Graf 2 Kalibrační přímka Ptx pro F1	34
Graf 3 Kalibrační přímka Ptx pro F2	35
Graf 4 Kalibrační přímka Ptx pro F3	35
Graf 5 Kalibrace verapamil hydrochloridu.....	37
Graf 6 Kalibrační přímka VH pro F1	40
Graf 7 Kalibrační přímka VH pro F2.....	40
Graf 8 Kalibrační přímka VH pro F3.....	41

SEZNAM SYMBOLŮ

API	farmaceuticky účinná látka
E	energie záření [J]
h	Planckova konstanta; $6,626 \cdot 10^{-34}$ [J. s]
c_0	rychlost světla ve vakuu; $2,998 \cdot 10^8$ [m.s ⁻¹]
Φ	zářivý tok [W]
τ	transmitance
A	absorbance
ε_λ	molární absorpční koeficient při dané vlnové délce [l. mol ⁻¹ . cm ⁻¹]
l	tloušťka absorpční vrstvy [cm]
c	látková koncentrace [mol. l ⁻¹]
x	retardace
$I(x)$	interferogram
$\tilde{\nu}$	libovolná vlnová délka
$S(\nu)$	spektrum
Ptx	pentoxifylin
VH	verapamil hydrochlorid
a. p.	absorpční pás
SD	směrodatná odchylka

ÚVOD

Pro úspěšný vývoj konečného léčivého přípravku je rozhodující charakterizace farmaceuticky účinné látky (API) z hlediska jejích fyzikálních vlastností. Je již dlouho známo, že se farmaceutické pevné látky mohou vyskytovat ve více než jedné pevné formě a tyto formy vykazují výrazně odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, proto je nutná úplná charakterizace API. V minulosti byly využívány především metody optické mikroskopie, rentgenové práškové difrakce (XRPD) a různé tepelné techniky^[1]. Od počátku 50. let se začala uplatňovat infračervená (IR) spektroskopie, která je dnes jednou z nejpoužívanějších analytických technik. Největší výhodou této metody je, že je použitelná pro prakticky jakýkoli vzorek v prakticky jakémkoli stavu (kapaliny, roztoky, prášky, vlákna, plyny, atd.). Dříve byly spektra zaznamenávány pomocí tzv. disperzních technik, které využívaly nástroje typu mřížky nebo hranolů^[2]. Nejvýznamnějším pokrokem během konce 20. století bylo zavedení spektrofotometrů s Fourierovou transformací (FTIR spektroskopie), které využívají interferometr a matematický proces této transformace^[3].

Mezi nejvíce používané analytické metody pro charakterizaci pevných lékových forem v rámci infračervené spektroskopie patří transmisní infračervená spektroskopie s KBr, IR-ATR (attenuated total reflectance; zeslabený úplný odraz), NIR (blízká infračervená spektroskopie) a případně Ramanova spektroskopie.

Transmisní spektroskopie je nejstarší a nejjednodušší infračervená metoda. Analýzu vzorků lze kromě pevných forem provést i v kapalných a plynných fázích. Jedná se o velmi jednoduchou, rychlou a nedestruktivní techniku, která hraje velkou roli při rychlém určování různých složek v matricích. Nejčastější metodou odběru vzorku je příprava tablet s alkalickým hydroxidem (KBr nebo KCl). Transmisní spektroskopie se využívala hlavně pro kvalitativní analýzu, ale v posledních dvou desetiletích se rozvinula i v oblasti kvantitativní analýzy^[4]. Poloha absorpčního pásu udává struktury vyskytující se v molekule vzorku, intenzita pásu koncentraci molekul a šířka je citlivá na chemickou matici vzorku včetně pH a vodíkových vazeb^[5]. Díky této metodě je možná efektivní identifikace od výchozích surovin až ke konečnému produktu farmaceutických formulací. Kvantitativní spektrální analýza je dnes považována za rutinní nástroj během procesu monitorování kvantity a kvality léčiv bez nutnosti zapojení jakéhokoli rozpouštědla^[4].

FTIR (Fourier Transform-infrared) spektroskopické metody jsou rychlé a přesné, zejména v kombinaci s technologií ATR (Attenuated Total Reflectance). V oblasti farmacie lze tuto techniku použít pro charakterizaci struktury biologických systémů, neinvazivní studie uvolňování léčiv z polopevných formulací, měření difúze léčiv z příslušných farmaceutických systému, jako jsou polymery, filmy atd., charakterizaci interakce léčiv se syntetickými, semisyntetickými a nativními makromolekulami [6]. Kombinace FTIR v režimu ATR umožňuje současné měření distribuce různých složek v tabletě, např. účinné látky, polymeru a vody. Současnou standardní metodou pro analýzu uvolňování léčiva z tablet je disoluční test, ve kterém je koncentrace účinné látky v roztoku monitorována jako funkce času. Tyto testy rozpouštění neposkytují žádné informace o procesech, ke kterým dochází v rámci tablety, jako je sorpce vody, otok, eroze a difúze léčiv, a tím zabraňují přímému nahlédnutí do mechanismu uvolňování léčiva. FTIR zobrazování umožňuje současné získávání infračervených spekter z mnoha různých míst ve vzorku a poskytuje přesnou kvantifikaci všech složek v tabletě a diferenciaci mezi různými molekulárními formami látky. Kvůli vysoké absorpční schopnosti vody a dalších složek v kombinaci s dlouhou dráhou infračerveného světla je ve středním rozsahu infračerveného světla možné měřit pouze velmi tenké vzorky. Proto je velmi výhodné omezit délku dráhy světla skrz vzorek pomocí oslabeného celkového odrazu [7]. Důležitým aspektem vývoje a výroby léků je charakterizace polymorfismu v pevných léčivých formách. Změny v polymorfním chování léčiv mohou nepříznivě ovlivnit její chemické vlastnosti (míchání, mletí, zpracovatelnost), proto je důležité provést tuto analýzu v raných fázích vývoje léčiv. Původně byly získávány pouze kvalitativní spektrální údaje z vylisované KBr tablety než přímo z nativních pevných vzorků [8]. Další velmi rozšířenou oblastí použití je detekce léků v lidském těle, kdy nejsou potřeba žádné separační nebo extrakční postupy [4].

NIR je v současné době jednou z nejrychleji rostoucích a nejuniverzálnějších analytických metod ve farmaceutickém průmyslu. Poskytuje rychlou analýzu široké škály materiálů, což umožňuje získat velké množství chemických a fyzikálně-chemických parametrů. Mezi farmaceuticky důležité parametry z oblasti technologie tablet patří např. tvrdost, velikost částic, lisovací síla a rychlost rozpouštění. Všechny tyto parametry lze kvantitativně analyzovat pomocí NIR spektroskopie, další použití je založeno na jednoduché identifikaci účinné látky přítomné v léku. Podstatou je výběr některých charakteristických spektrálních pásem a porovnání se specifickým spektrem původního léčivého produktu s neznámým nebo pochybným vzorkem. Pro důležité analýzy padělání léčiv byly vytvořeny NIR knihovny. Mezi další oblasti využití patří porovnávání výrobních řad a šarží farmaceutických produktů.

Speciální farmaceutické excipienty vytvářejí jedinečnou kompozici, kterou lze jen velmi obtížně identifikovat pomocí klasických analytických metod. Mezi hlavní výhody NIR patří rychlost spektrálního měření, nízké náklady na analýzu, vzorek vyžaduje minimální nebo žádnou přípravu (sušení, broušení), možnost měřit současně několik složek stejného vzorku. Naopak jedním z hlavních nevýhod NIR ve farmaceutickém průmyslu je problém s roztoky léčivých přípravků, protože vysoká absorpce vody vede k širokému vrcholu spektra, a proto je limitována detekce pro jiné sloučeniny [4,9].

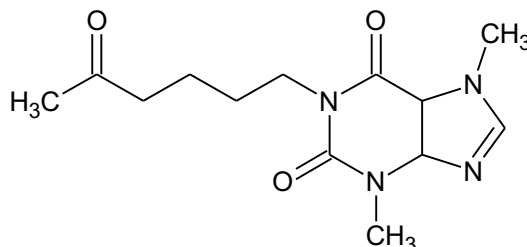
Při analýze a vyšetřování léků je využívána také technika Ramanovy spektroskopie, rezonanční Ramanova spektroskopie a mikro-Ramanova spektroskopie. Tyto metody jsou využívány jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní účely. Další využití zahrnuje studium struktury a interakcí, jako jsou vodíkové vazby, přenosy protonů, přenos náboje a přitahování intových molekul, které vysvětlují reaktivitu léků [10].

Cíl práce

Cílem této práce je proměřit infračervená spektra pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu ve studovaných léčivech a na základě experimentálních dat posoudit použití FTIR spektroskopie ke kvantitativní analýze. Dalším cílem je ověření platnosti Lambert-Beerova zákona pro jednotlivé účinné látky ve studovaných tabletách.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Pentoxifylin



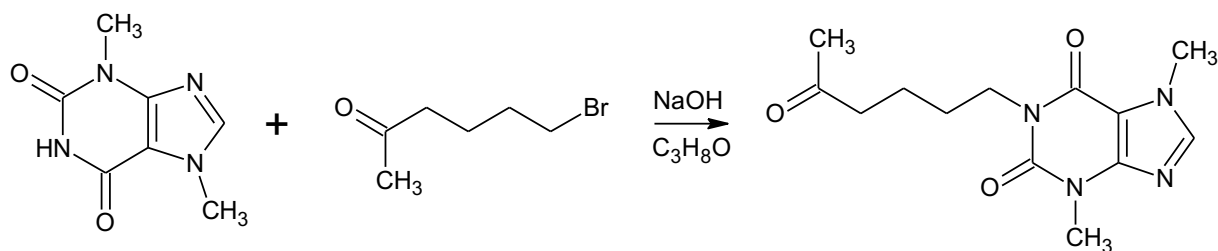
Obrázek 1 Struktura pentoxifylinu

Pentoxifylin je derivát methylxanthinu, který se používá perorálně pro léčbu onemocnění periferních cév. Primárně působí zvýšením pružnosti leukocytů, snížením viskozity krve a snížením potenciálu agregace trombocytů a s tím spojenou tvorbu trombů [11, 12].

Chemicky se jedná o heterocyklickou sloučeninu s její systematický název je 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion. Komerčně je dostupný jako léčivo zvané Trental [13]. Strukturně je podobný theofylinu a kofeinu (methylové deriváty xanthinu). Jeho sumární vzorec je C₁₃H₁₈N₄O₃ a molekulová hmotnost 278.312 g/mol. Běžně se vyskytuje v pevném skupenství jako bílý prášek s bodem tání 106 °C [14].

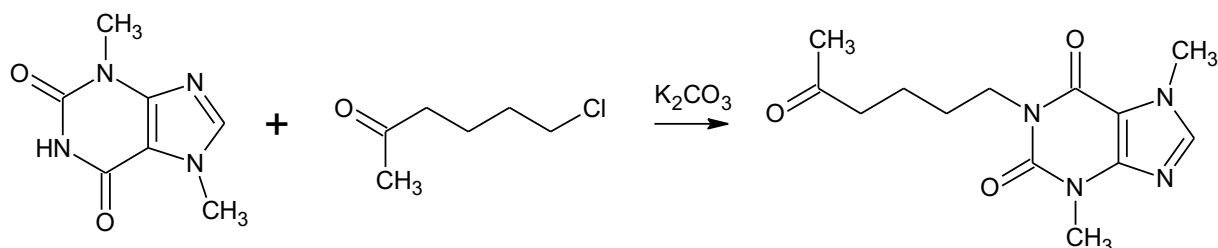
1.2 Syntéza pentoxifylinu

Theobromin reaguje s 6-brom-2-hexanonem a hydroxidem sodným v prostředí isopropylalkoholu (propan-2-olu) za vzniku požadovaného pentoxifylinu. Reakce probíhá při 120 °C a trvá zhruba 24 hodin [15].



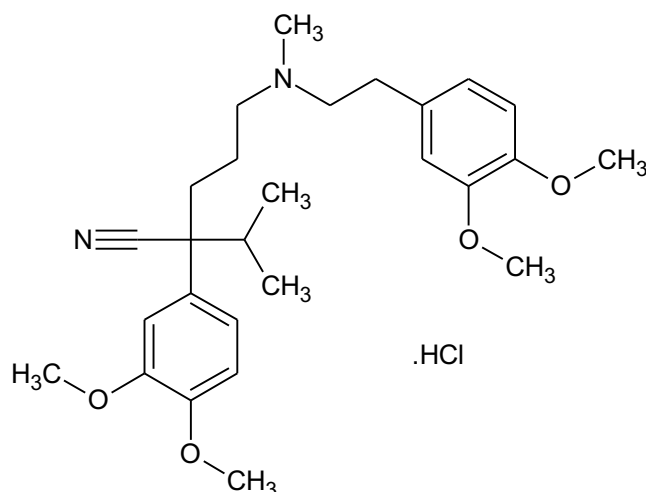
Obrázek 2 Syntéza pentoxifylinu

Další velmi podobná syntéza vychází opět z theobrominu, který reaguje s 6-chloro-2-hexanonem a uhličitanem draselným v prostředí N, N-dimethylformamidu. Tato reakce probíhá při 110 °C a trvá 18 hodin, avšak její výtěžek je menší [16].



Obrázek 3 Syntéza pentoxifylinu

1.3 Verapamil hydrochlorid



Obrázek 4 Struktura verapamil hydrochloridu

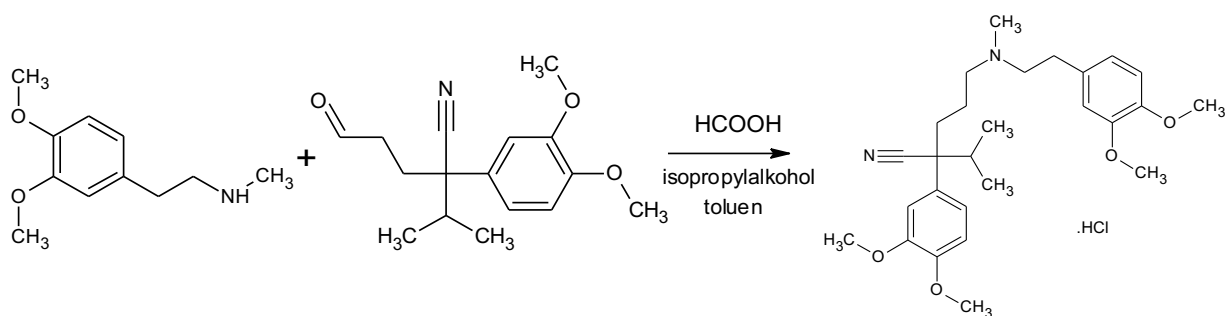
Verapamil je antiarytmická a antianginózní účinná látka. Jedná se o blokátor kalciových kanálů. Selektivně inhibuje transmembránový přítok extracelulárních vápenatých iontů do buněk hladkého svalstva myokardu a cév, což má za následek dilataci koronárních a systémových tepen. Používá se při léčbě hypertenze, anginy pectoris a některých poruch srdečního rytmu [17].

Jeho chemická struktura je uvedena na obrázku 4 a jedná se o hydrochlorid 2-(3,4-dimethoxyfenyl)-5-[[2-(3,4-dimethoxyfenyl)ethyl](methyl)amino}-2-(1-methylethyl)pentannitrilu. Tato sloučenina patří mezi fenylbutylaminy, které obsahují fenylovou skupinu

substituovanou na čtvrtém atomu uhlíku butan-1- aminem. Sumární vzorec je $C_{27}H_{39}ClN_2O_4$ a molekulová hmotnost 491.069 g/mol. Vyskytuje se ve formě bílého nebo prakticky bílého krystalického prášku, který je téměř bez zápachu a má hořkou chuť. Je rozpustný ve vodě a v chloroformu, naopak těžce rozpustný v alkoholu a prakticky nerozpustný v etheru. Bod tání je 142-145 °C [18].

1.4 Syntéza verapamil hydrochloridu

Syntéza vychází z 3,4-dimethoxy-N-methylfenerthylaminu (N-methylhomoveratrylamin), který reaguje s 2-(3,4-dimetroxyfenyl)-2-(3-oxopropyl)-2-isopropylacetonitrilem a s kyselinou mravenčí, v prostředí isopropylalkoholu a toluenu. Rekrystalizací z isopropanolu se získá produkt s 88 % výtežkem [19].



Obrázek 5 Syntéza verapamil hydrochloridu

1.5 Princip infračervené spektroskopie

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem. Energie fotonů infračerveného záření není dostatečně velká pro excitaci elektronů v molekulových orbitalech. Tato energie způsobuje změny vibračního či rotačního stavu molekuly v závislosti a změnách dipólového momentu. Výsledkem je infračervené spektrum, které zobrazuje funkční závislost energie na vlnové délce dopadajícího záření. Energie bývá vyjadřovaná v jednotkách absorbance nebo v procentech transmitance [20].

Energie záření E se popisuje pomocí frekvence ν , vlnové délky λ nebo vlnočtu σ a platí vztah:

$$E = h \nu = h \frac{c_0}{\lambda},$$

kde h je Planckova konstanta ($h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) a c_0 rychlost světla ve vakuu ($c_0 = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$) [3].

Zářivý tok představuje výkon přenesený nebo přijímaný ve formě záření a jednotkou je watt. Pomocí zářivého toku je definovaná transmitance τ jako poměr zářivého toku prošlého vzorkem Φ a zářivého toku dopadajícího na vzorek Φ_0 :

$$\tau = \frac{\Phi}{\Phi_0}.$$

Rozměr transmitance je jednotkový a její hodnoty se pohybují v rozmezí 0-1, resp. v procentuální škále 0-100 %.

Absorbance A je záporným logaritmem hodnoty transmitance. Udává, jak mnoho světla bylo pohlceno měřeným vzorkem. Jedná se bezrozměrnou veličinu, kterou popisuje vztah:

$$A = -\log \tau = -\log \frac{\Phi}{\Phi_0}.$$

1.6 Lambert-Beerův zákon

Lambert-Beerův zákon matematicky popisuje absorbanci a je základním vztahem využívaným v kvantitativní spektrometrické analýze. Platí obvykle jen pro nízké koncentrace, při vyšších koncentracích se objevují odchylky. Platnost Lambert-Beerova zákona je tedy vždy nutno experimentálně ověřit.

Nejčastěji bývá definován vztahem:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l c,$$

kde ε_{λ} je molární absorpční koeficient dané látky při vlnové délce λ ($\text{l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l je tloušťka absorpční vrstvy (cm) a c je látková koncentrace dané látky (mol. l^{-1}). Takto definovaná veličina je lineárně závislá na látkové koncentraci absorbující látky. Absorbance je aditivní, pokud je tedy ve vzorku více absorbujících složek, je celková absorbance daná sumou jednotlivých absorbancí [2].

1.7 FTIR spektroskopie

Fourierova transformovaná infračervená spektroskopie je založena na myšlence rušení záření mezi dvěma paprsky pro získání interferogramu. Dochází ke vzájemné reakci mezi

interferenční vlnou a vzorkem. Interferenční vlna je vytvářena v interferometru, nejběžnějším je Michelsonův [3].

K ovládní interferometru je používán počítač, který shromažďuje data a také provádí samotnou Fourierovu transformaci. Kolimovaný světelný paprsek z IR zdroje je směřován na Michelsonův interferometr, kde je dělen pomocí separátoru. Jedna polovina paprsku je odražena z pevného zrcadla a druhá polovina z pohyblivého se zrcadla. Tyto dva světelné paprsky se po návratu ze zrcadel rekombinují a díky tomu vzniká rekonstruovaný paprsek, který je opticky interferenční vlnou. Rušený světelný paprsek prochází vzorkem a je modifikován na základě jeho interakce se vzorkem [2].

Kompletní IR spektrum může být zrekonstruováno i po jediném cyklu pohybu zrcadel pomocí rychlého algoritmu Fourierovy transformace. Při dostatku času se provádí obvykle další skenování, po každém se vypočte průměrný interferogram, který je překládán do spektra (emisního, absorpčního, atd.). Interferogram je elektrický signál znázorněný jako funkce časového zpoždění dvou paprsků v interferometru.

Fourierova transformace je dekodovací postup, kterým je signál převedený z tzv. časové domény (signál je funkcí zpoždění) na frekvenční doménu (funkcí je frekvence). Potup vyjadřuje vzorec:

$$S(\nu) = 2 \int_0^{\infty} I(x) \cos(2\pi\nu x) dx ,$$

kde x je retardace, $I(x)$ je interferogram, ν libovolná vlnová délka a $S(\nu)$ spektrum [2].

1.8 KBr technika

KBr tablety jsou speciálně určené pro FTIR spektroskopické měření. Tato technika odběru vzorku spočívá v míchání vzorku v pevné fázi s alkalickým hydroxidem, v našem případě KBr, v poměru 1-2 hmotnostní % vzorku. Směs musí být homogenizována a pomocí hydraulického lisu jsou zhotovovány velmi tenké, skleněné tablety. Mezi hlavní výhody této techniky patří malá spotřeba vzorku (obvykle 1 mg) a rychlé získání kvalitního spektra [1].

1.9 Analýza spekter

Jakmile je zaznamenáno infračervené spektrum, přichází na řadu další krok experimentu - vyhodnocení spektra. Interpretace spektra je zjednodušená skutečností, že jednotlivé pásy

mohou být obvykle přiřazeny jednotlivým funkčním skupinám molekuly, které produkují známé skupinové frekvence.

V tabulce č.1 jsou uvedeny vlnočty charakteristických vibrací některých vazeb a skupin, které budou užitečné pro charakterizaci látek v léto práci [21, 22]. Tato data jsou pouze orientační. Existují spektrální databáze, které poskytují kompletní přehled charakteristických vibrací- SDBS, FDM Refence Spectra Databases, NIST chemistry webbook.

Tabulka 1 Vlnočty charakteristických skupin [21, 22]

Vlnočty cm⁻¹	Funkční skupina	Další charakteristický pás
3620-3500	H ₂ O v rozpouštědle	1645-1615
3590-3400	-OH, intramol. H-vazba	1140-1300
3550-3230	-OH, intermol. H-vazba	1440-1290
2895-2840	-(C)-CH ₃ , -(O)-CH ₃	1470-1385
2830-2810	-CHO	
2270-2200	-C≡N	
1800-1740	-COOH, monomerní forma	1380-1280
1750-1720	-CO-O-	1300-1150
1140-1325	-CHO	975-780
1395-1345	CH ₃ -(C)-, CH ₃ -(O)-	1255-1125
1385-1330	CH ₃ -(C=O)-, CH ₃ -(C=O)-O-	
1220-1190	>C(CH ₃) ₂	
1155-1060	-O-, alifat.ethery	1140-900
1140-1065	-O-, =C-O-C, alifat.ethery	
Okolo 1100	R-CO-R'	

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

- Pentoxifylin (dostupný od firmy SigmaAldrich)
- Verapamil hydrochlorid
- KBr
- Prosolv® SMCC (silikovaná mikrokrystalická celulóza)
- Stearát hořečnatý
- Compritol® 888 CG ATO (glycerol dibehenát)
- Parateck® (polyvinyl alkohol)
- ethanol

2.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

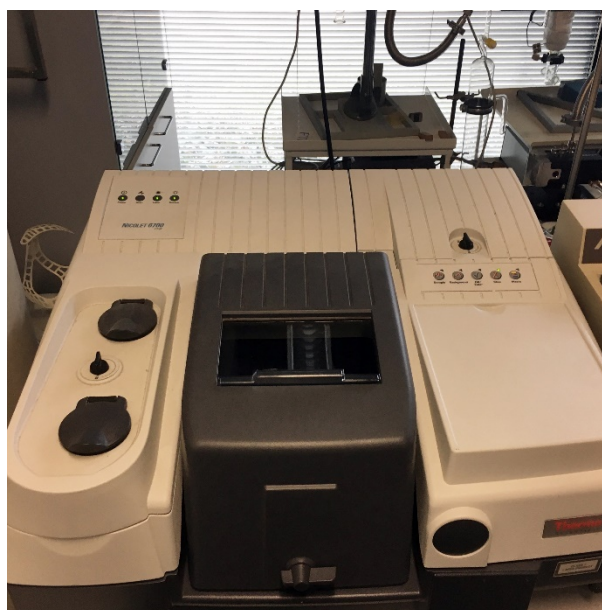
- skleněné lékovky
- analytické váhy
- skalpel
- mlecí komůrky (větší na klasické tablety, menší s kuličkou na KBr tablety)
- vibrační kulový mlýn-MM 200, Rentsch
- hydraulický lis-Trystom
- FTIR spektrometr-Nicolet 6700, Thermo Scientific



Obrázek 6 Hydraulický lis



Obrázek 7 Vibrační kulový mlýn



Obrázek 8 FTIR spektrofotometr

Program použitý pro měření, úpravu a vyhodnocování spekter-OMNIC Series Software, chemické struktury a reakční schémata byla vytvořena v programu ChemSketch a grafy v programu Origin.

2.3 Příprava tablet-pentoxifylin/verapamil hydrochlorid

Pro tuto práci byly použity vlastní vylisované tablety s pentoxifylinem a verapamil hydrochloridem o 3 různých složeních. Tablety byly lisovány na konečnou hmotnost 500 mg. Složení tablet je uvedeno v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2 Složení tablet s pentoxifylinem

<i>Formulace</i>	<i>Prosolv</i>	<i>Pentoxifylin</i>	<i>Stearát</i>	<i>Compritol</i>	<i>Parteck</i>
F1	395 mg	100 mg	5 mg	-	-
F2	345 mg	100 mg	5 mg	-	50 mg
F3	345 mg	100 mg	5 mg	50 mg	-

Tabulka 3 Složení tablet s verapamil hydrochloridem

<i>Formulace</i>	<i>Prosolv</i>	<i>Verapamil</i>	<i>Stearát</i>	<i>Compritol</i>	<i>Parteck</i>
F1	395 mg	100 mg	5 mg	-	-
F2	345 mg	100 mg	5 mg	-	50 mg
F3	345 mg	100 mg	5 mg	50 mg	-

Na analytických vahách bylo naváženo požadované množství chemikálií pro dané složení s přesností ± 1 mg. Látky byly kvantitativně převedeny do mlecí komůrky a umístěny do vibračního mlýnku. Na vibračním mlýnu byla nastavena série frekvencí vibrací 10, 13, 15; každá po dobu jedné minuty. Homogenizovaná směs byla převedena do lisovací formy a umístěna do hydraulického lisu. Směs byla podrobena tlaku 10 kN po dobu 5 minut. Poté byla tableta opatrně vyjmuta, zvážena a umístěna do skleněné lékovky.

2.4 Příprava vzorku KBr technikou

KBr tabletky byly lisovány na konečnou hmotnost 300 mg. Z 500 mg tablety s pentoxifylinem nebo verapamil hydrochloridem bylo skalpelem odříznuto a naváženo 15 mg, následně smícháno s 285 mg KBr. Takto připravená směs byla převedena do menší mlecí komůrky, která je vždy opatřena kuličkou, a poté umístěna do vibračního mlýnu. Frekvence vibrací pro KBr tablety je 25, po dobu 1 minuty. Z této směsi bylo odebráno 30 mg a doplněno 270 mg KBr, opět homogenizováno v mlýnu za stejné frekvence a mlecí doby.

V hydraulickém lisu byl nastaven tlak 40 kN po dobu 5 minut. S výslednými tabletami, viz obrázek 9, je nutné velmi opatrně zacházet, jsou velmi tenké a mají tendenci praskat.



Obrázek 9 Srovnání tablety 500 mg a KBr tablety

Pro identifikaci byly připraveny i KBr tablety čistých jednotlivých látek, které byly v této práci používány. Z důvodu vysoké intenzity některých pásů bylo nutno zvolit větší zředění směsi, jak je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Složení pro KBr tablety čistých látek

Látka	1.směs	KBr tableta
<i>Prosolv</i>	15 mg + 285 mg KBr	30 mg + 270 mg KBr
<i>Parateck</i>	15 mg + 285 mg KBr	30 mg + 270 mg KBr
<i>Stearát</i>	15 mg + 285 mg KBr	15 mg + 285 mg KBr
<i>Compritol</i>	15 mg + 285 mg KBr	10 mg + 290 mg KBr

Pro ověření Lambert-Beerova zákona byla připravena série KBr tablet se samotným pentoxifylinem/ verapamil hydrochloridem o hmotnostech 5, 10, 15 a 20 mg.

Při ověřování tohoto zákona v jednotlivých tabletách bylo nutno zvolit jiný poměr vzorku ku bromidu draselnému, jak je uvedeno v následující tabulce. Výchozí směs obsahovala 150mg vzorku tablety a 150 mg KBr. Z této směsi bylo postupně odebíráno uvedené množství a doplněno na konečnou hmotnost 300mg.

Tabulka 5 Složení KBr tablet pro ověření L.-B. zákona

Směs 150 mg tablety+150 mg KBr	KBr
5 mg	295 mg
10 mg	290 mg
15 mg	285 mg
20 mg	280 mg
25 mg	275 mg

2.5 Měření infračervených spekter

K měření byl používán jednopaprskový FTIR spektrometr Nicolet 6700 (obr.8) obsahující program OMNIC. V tomto programu byla vždy nastavena transmisní KBr metoda s intervalem 4000-400 cm^{-1} , 64 skenů, rozlišení 2.00 cm^{-1} . Výsledkem je závislost absorbance na vlnočetě. Po změření samotného vzorku následovalo vždy proměření okolní atmosféry-vzduchu. Tento postup bylo nutné dodržovat pro každé měření.

V programu OMNIC byl následně proveden odečet těchto dvou spekter. U každého spektra bylo nutno provést ruční baseline korekci. V případě kvantitativní analýzy, konkrétně u kalibračních řad, byla potřeba spektra vynásobit korekčním faktorem, čímž bylo docíleno srovnání rozdílných hmotností KBr tablet po slisování.

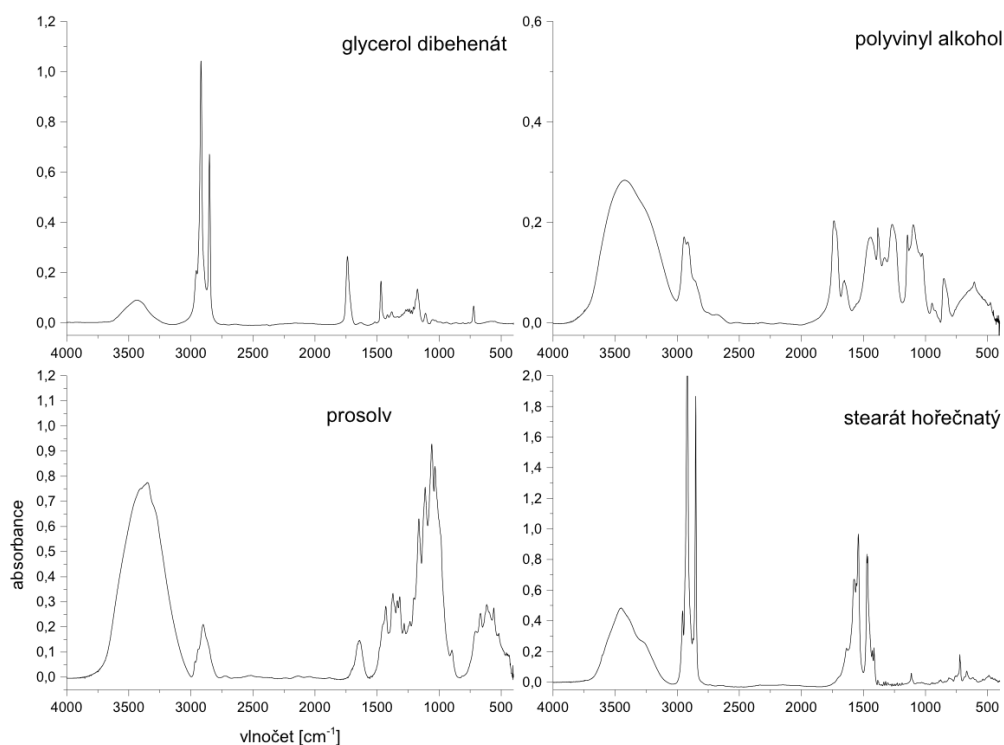
3. VÝSLEDKY

Byla proměřena spektra čistých účinných látek a čistých excipientů z důvodu identifikace jednotlivých pásů účinných látek. Dále byla změřena spektra vzorků všech připravených formulací s pentoxifylinem a verapamil hydrochloridem.

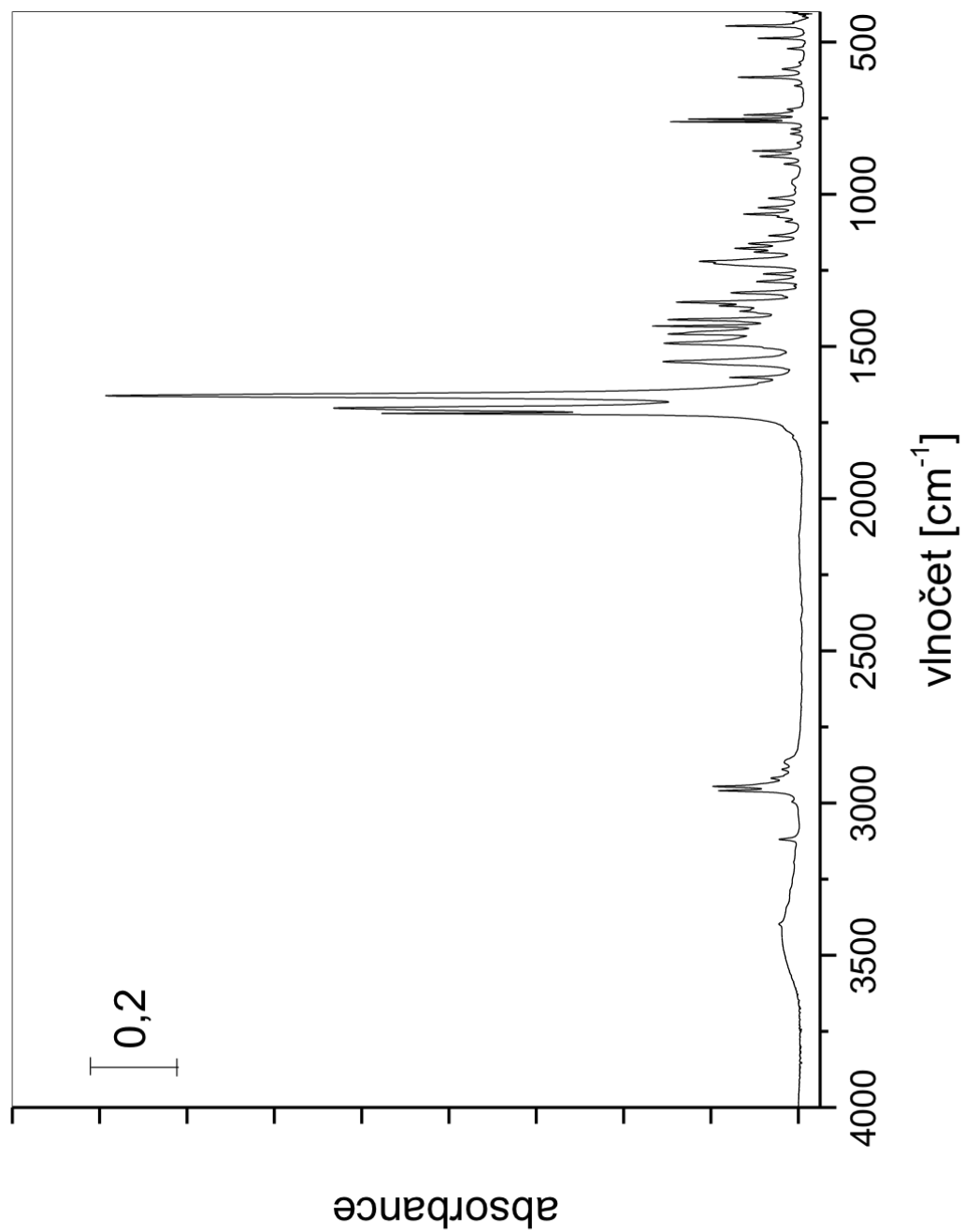
Na základě literárních dat byly vlnočty přiřazeny charakteristickým vazbám pro jednotlivé účinné látky a byl zvolen nejvhodnější absorpční pás pro kvantitativní analýzu.

3.1 Interpretace spekter

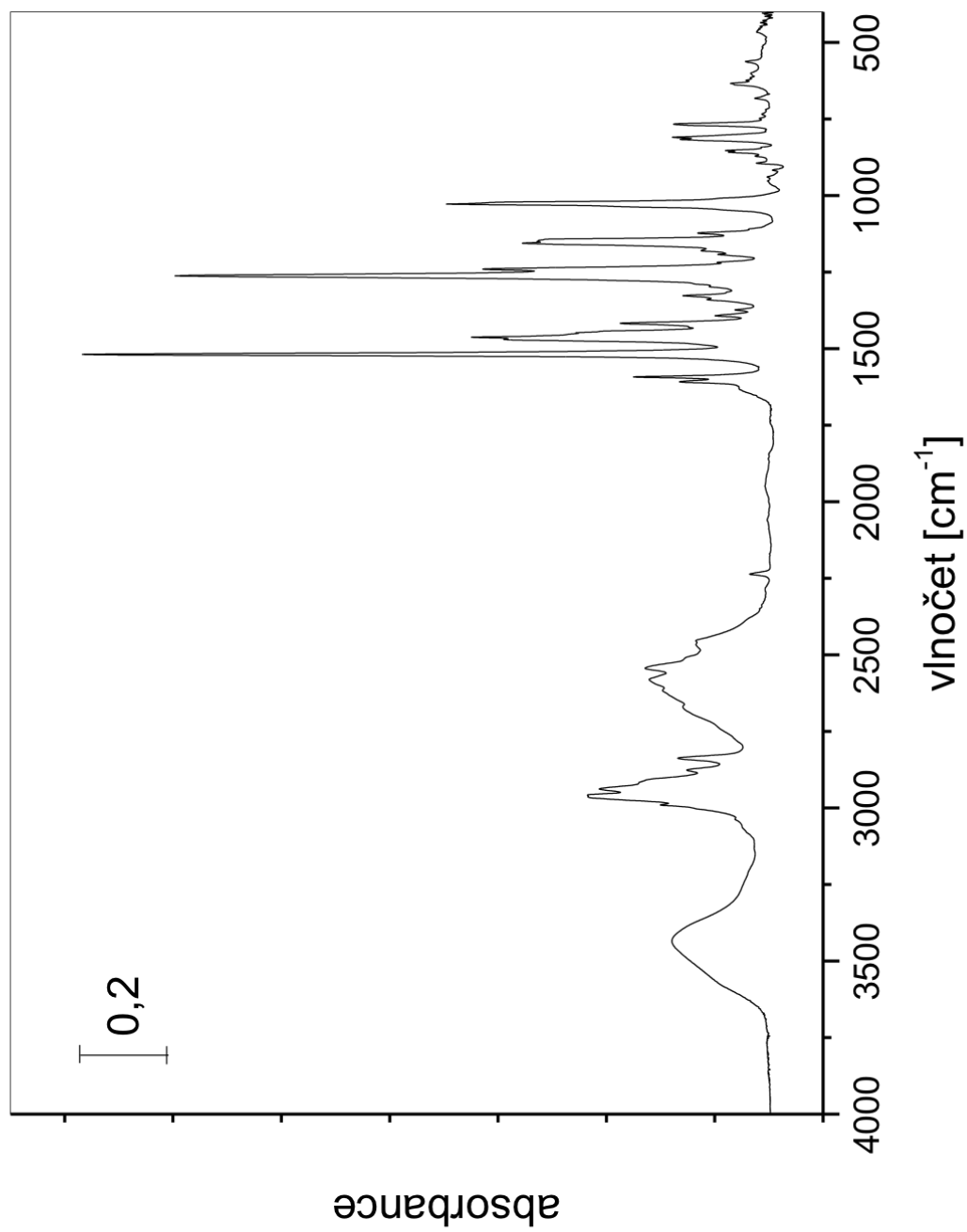
Pro interpretaci byla použita spektra čistých účinných látek a excipientů v rozmezí vlnočtů 4000-400 cm^{-1} . Na obrázku 10 jsou vidět spektra všech excipientů, které byly v průběhu práce používány.



Obrázek 10 Spektra excipientů



Obrázek 11 Spektrum pentoxifylinu



Obrázek 12 Spektrum verapamil hydrochloridu

Na základě literárních zdrojů bylo provedeno přiřazení jednotlivých vlnočtů odpovídajícím funkčním skupinám (vazbám). Vlnočty pro charakteristické skupiny vyskytující se v molekulách jednotlivých účinných látek jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6 Charakteristické vlnočty pro Ptx ^[23, 24]

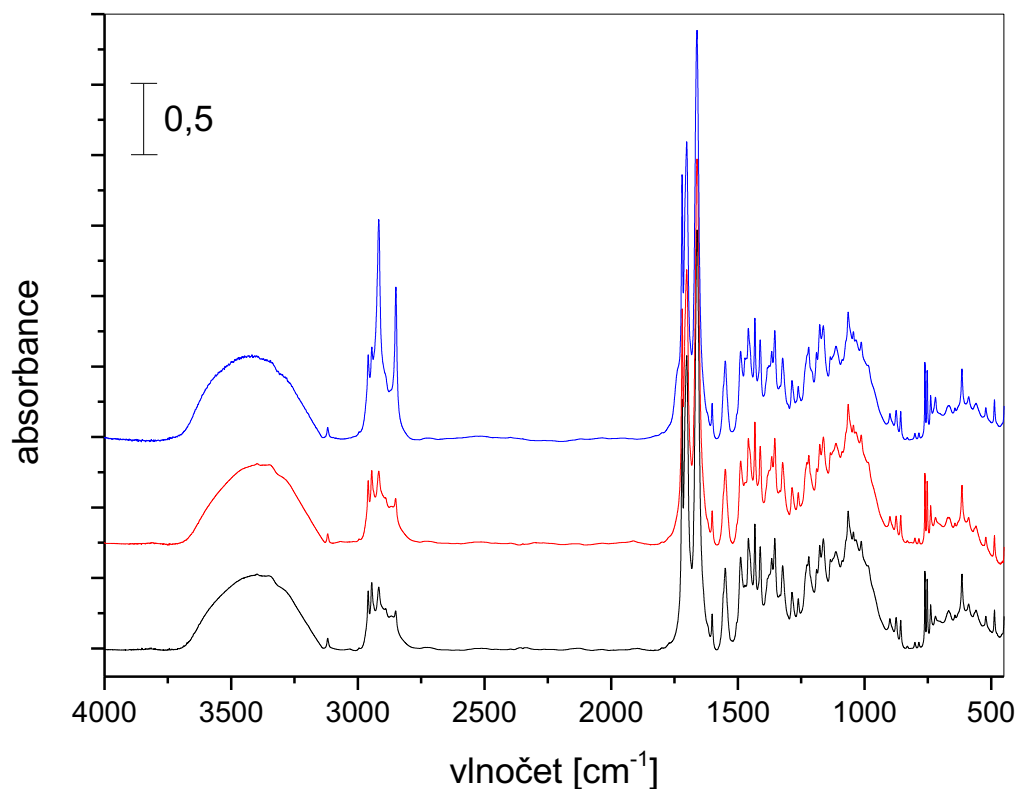
<i>Vlnočty [cm⁻¹]</i>	<i>Odpovídající vazba</i>
3119	aromatický kruh
2954-2945	C-H
1720, 1701	C=O
1658	amidická C=O
1650-1430	CH ₃
760, 750	-(CH ₂) _n

Tabulka 7 Charakteristické vlnočty pro VH ^[25, 26]

<i>Vlnočty [cm⁻¹]</i>	<i>Odpovídající vazba</i>
3030-2860	C-H vazby methylových a methylenových skupin
2840	C-H vazba methoxy skupin
2800-2300	N-H
2236	C≡N
1607, 1590, 1518	benzenový kruh
1262	C-O vazba u aromatických etherů

Na obrázku 11 je zobrazeno infračervené spektrum pentoxifylinu. Zcela nejintenzivnější je absorpční pás 1720 a 1701 cm⁻¹, který odpovídá vazbě C=O. V molekule pentoxifylinu se vyskytuje několik CH₂ vazeb za sebou, což se projevuje intenzitou v rozmezí 760 a 750 cm⁻¹. Za povšimnutí také stojí pásy 2954-2945 cm⁻¹, které odpovídají C-H vazbě. Pro kvantitativní analýzu byly zvažovány pásy 3119 a 615 cm⁻¹. Pás 615 cm⁻¹ je vhodný pro analýzu samotného pentoxifylinu. Ve směsích je tento pás ovlivněn přísadkami excipientů a není zcela jednoznačné jeho ohraničení, což je pro kvantitu velmi důležité. Na základě tohoto pozorování byl zvolen pro veškerou analýzu pentoxifylinu pás 3119 cm⁻¹.

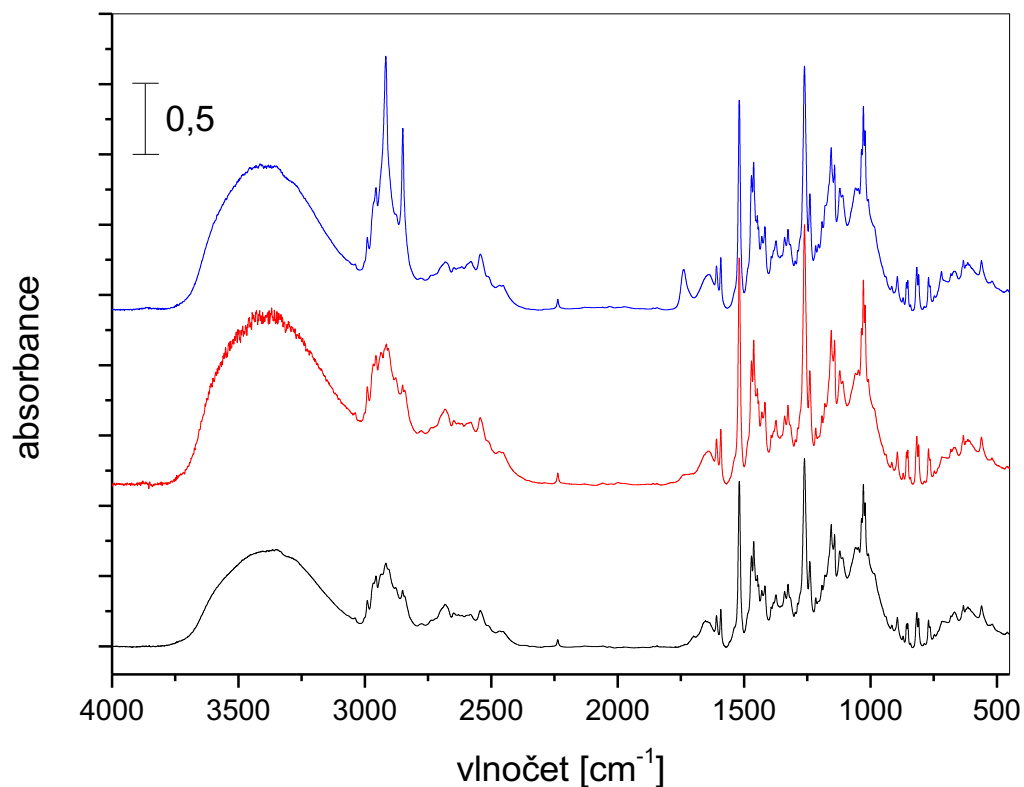
Na obrázku 12 lze vidět spektrum verapamil hydrochloridu. Zde jsou nejintenzivnější pásy 1607, 1590 a 1518 cm⁻¹. Tyto pásy jsou charakteristické pro benzenové jádro. Dále je nápadný také pás v rozmezí 2800-2300 cm⁻¹, který zachycuje N-H vazbu. Pro kvantitativní analýzu byl jednoznačně zvolen pás 2236 cm⁻¹ odpovídající trojně vazbě uhlík-dusík.



Obrázek 13 Spektra formulací F1, F2, F3 s Ptx

Na obrázku 13 jsou vidět spektra pentoxifylinu v konkrétních směsích. Černou barvou je označena formulace F1, červenou F2 a modrou F3. Přesné složení formulací je uvedeno v předcházející tabulce 2.

Nejlépe je vidět vliv compritolu (glycerol dibehenát) u formulace 3 (modrá barva ve spektru), projevující se výraznou intenzitou v oblasti kolem 2900 a 2800 cm^{-1} . Charakteristický pás pro pentoxifylin 3119 cm^{-1} je z jedné strany ovlivněn širokým pásem příslušející O-H vazbám u excipientů, a proto je nutné při kvantitativním zpracování tohoto pásu použít tříbodovou korekci.



Obrázek 14 Spektra formulací F1, F2, F3 s VH

Obdobně jako v případě pentoxifylinu jsou na obrázku 14 zobrazena spektra verapamil hydrochloridu ve směsích, černá je formulace F1, červená F2 a modrá F3. Detailní složení jednotlivých formulací je v tabulce 3.

V tomto případě je opět nejvýraznější vliv compritolu ve spektru (modré F3). Nejdůležitější je zde pás při vlnočtu 2236 cm^{-1} , který není zarušen vlivem žádných z použitých excipientů a má velmi jasné ohraničení, tudíž je skutečně vhodný pro použití v kvantitativní analýze.

3.2 Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní analýzu byl v případě pentoxifylinu i verapamil hydrochloridu vždy zvolen jeden a.p., u kterého se v programu OMNIC vyhodnocovala jeho výška. Při odečtu výšky pásu byla v obou případech provedena tříbodová korekce baseline. Z vyhodnocených dat byla sestrojena kalibrační přímka pro obě účinné látky v čisté formě.

3.2.1 Kalibrace pentoxifylinu

Kalibrace pentoxifylinu byla prováděna na absorpčním pásu 3119 cm^{-1} . Odebírané množství bylo 5,10,15 a 20 mg. Pro tyto hmotnosti byly provedeny následující základní výpočty hmotností, hmotnostních zlomků a korekčního faktoru, které jsou dále kompletně uvedeny v tabulce 8.

Výpočty:

$$\text{Korekční faktor: } f = \frac{m(\text{teoretická,tablety})}{m(\text{skutečná,tablety})} = \frac{0,3}{0,2788}$$

$$\text{Hmotnost Ptx ve směsi: } m = x(\text{Ptx ve směsi}) \times m(\text{odebraná ptx}) = \frac{15,5}{300,8} \times 0.0052$$

$$\text{Hmotnostní zlomek Ptx v KBr tabletě: } x = \frac{m(\text{Ptx ve směsi})}{m(\text{skutečná,tablety})} = \frac{2,6795 \times 10^{-4}}{0,2788}$$

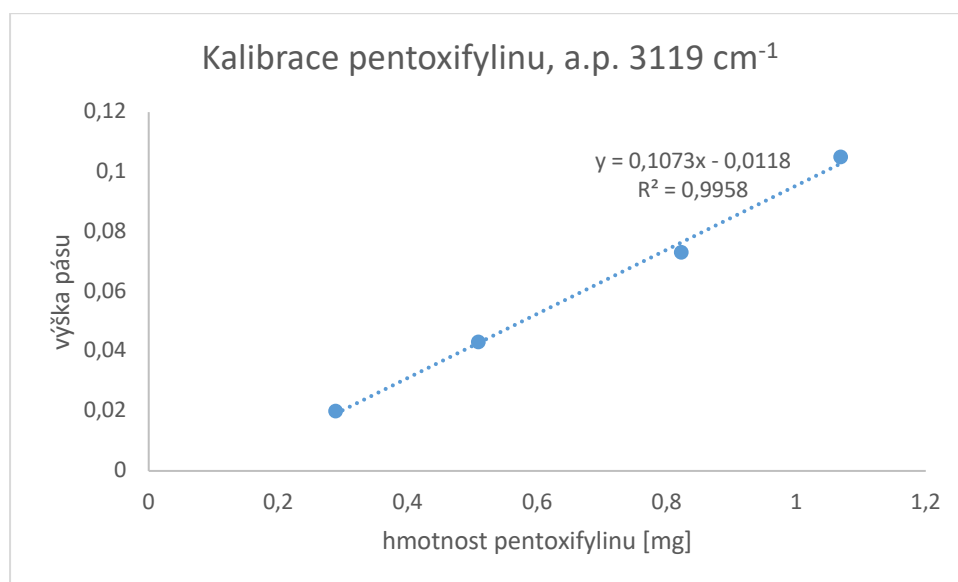
$$\text{Hmotnost Ptx v KBr tabletě: } m = x(\text{Ptx v tabletě}) \times m(\text{skutečná, tablety}) \times f = 9,61083 \times 10^{-4} \times 0,2788 \times 1,07604$$

Tabulka 8 Data pro kalibraci pentoxifylinu

Hmotnost směsi [mg]	Hmotnost pentoxifylinu ve směsi [g]	Hmotnost KBr tablety [g]	Hmotnostní zlomek pentoxifylinu v KBr tabletě	Korekční faktor	Hmotnost pentoxifylinu v KBr tabletě [mg]
5	$2,6795 \times 10^{-4}$	0,2788	$9,61083 \times 10^{-4}$	1,07604	0,288325
10	$4,9983 \times 10^{-4}$	0,2946	$1,69664 \times 10^{-3}$	1,01833	0,508995
15	$7,7809 \times 10^{-4}$	0,2839	$2,74072 \times 10^{-3}$	1,05671	0,822215
20	$1,0409 \times 10^{-3}$	0,2923	$3,56104 \times 10^{-3}$	1,02634	1,068308

Hodnoty hmotností pentoxifylinu ve 300 mg KBr tabletách byly využity pro sestavení kalibrační přímky, kde jsou vyneseny na ose x. Na ose y je zaznamenána výška a.p. 3119 cm⁻¹.

Výslednou kalibraci lze vidět v grafu 1. U rovnice této přímky je úsek velmi blízký nule a hodnota spolehlivosti R² je 0,9958.



Graf 1 Kalibrace pentoxifylinu

Kalibrace pentoxifylinu ve směsích

Pro každou formulaci byla provedena série třech měření. Výpočty hmotností, hmotnostních zlomků a korekčních faktorů jsou stejné jako v případě samotného pentoxifylinu a výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách 9, 10 a 11. Hodnoty byly v programu Origin zprůměrovány a směrodatná odchylka je vždy uvedena za jednotlivým výsledkem.

Výpočty:

$$\text{Hmotnostní zlomek Ptx ve směsi: } x = \frac{m(\text{Ptx v pův. tabletě})}{m(\text{původní tablety})} \times \frac{m(\text{odebraná z pův. tablety})}{m(\text{KBr směsi})} =$$

$$\frac{100}{500} \times \frac{150,1}{300,4}$$

$$\text{Hmotnost Ptx v KBr tabletě: } m = x(\text{Ptx ve směsi}) \times m(\text{odebraná Ptx}) = 0,1 \times 0,0057$$

$$\text{Hmotnostní zlomek Ptx v KBr tabletě: } x = \frac{m(\text{Ptx v KBr tabletě})}{m(\text{KBr tablety})} = \frac{5,6129 \times 10^{-4}}{0,2908}$$

Hmotnost Ptx v KBr tabletě: $m = x(\text{Ptx v KBr tabletě}) \times m(\text{KBr tablety}) \times f = 1,93015 \times 10^{-3} \times 0,2908 \times 1,03163 \text{ [g]}$

Tabulka 9 Data pro kalibraci Ptx, F1

Hmotnostní zlomek pentoxifylinu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi [g] ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost pentoxifylinu v KBr tabletě [mg] ± SD
0,100	0,005± 3,5355x10 ⁻⁴	0,292± 0,00191	1,027± 0,0067	0,550± 0,04075
0,100	0,01±0	0,290± 0,00269	1,034± 0,0096	1,037± 0,0096
0,100	0,015±1,4142x10 ⁻⁴	0,299± 0,00212	1,003± 0,0071	1,536± 0,00561
0,100	0,02±0	0,296± 0,00382	1,015± 0,0131	2,034± 0,02627
0,100	0,025±2,1213x10 ⁻⁴	0,297± 0,00665	1,009±0,02186	2,463± 0,00855

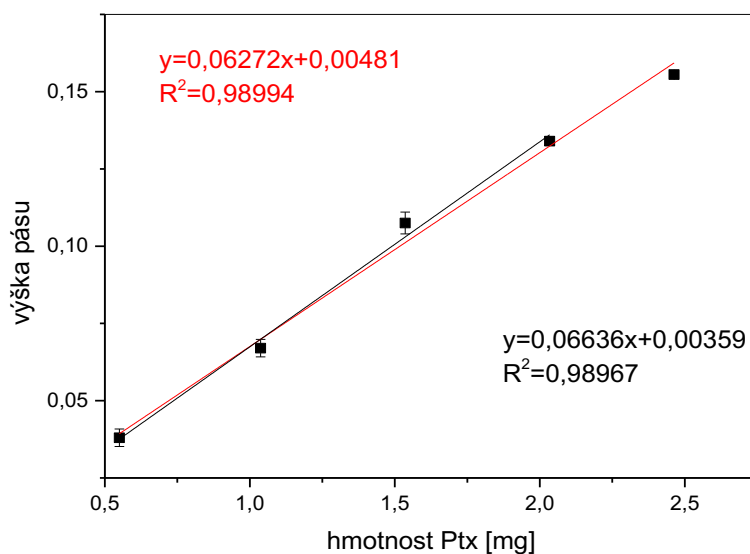
Tabulka 10 Data pro kalibraci Ptx, F2

Hmotnostní zlomek pentoxifylinu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi [g] ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost pentoxifylinu v KBr tabletě [mg] ± SD
0,09983	0,005±2,1213x10 ⁻⁴	0,294± 0,00156	1,021± 0,0054	0,516± 0,01131
0,09983	0,011±7,0711x10 ⁻⁵	0,293± 0,00276	1,022± 0,0096	1,087± 0,01742
0,09983	0,015±2,8284x10 ⁻⁴	0,297± 0,00622	1,011±0,02121	1,514± 0,0603
0,09983	0,020±7,0711x10 ⁻⁵	0,298±0	1,007±0	2,035± 0,00711
0,09983	0,025±2,1213x10 ⁻⁴	0,298± 0,00361	1,007± 0,01432	2,528± 0,05728

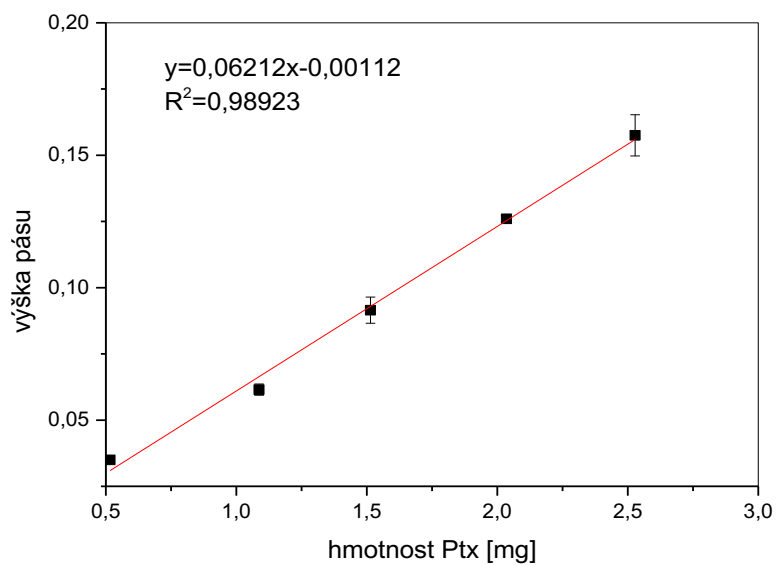
Tabulka 11 Data pro kalibraci Ptx, F3

Hmotnostní zlomek pentoxifylinu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost pentoxifylinu v KBr tabletě [mg] ± SD
0,09987	0,005±7,0711x10 ⁻⁵	0,295±4,949x10 ⁻⁴	1,017± 0,0017	0,502± 0,00637
0,09987	0,01±7,07107x10 ⁻⁵	0,289± 0,00417	1,037± 0,01496	1,030± 0,00761
0,09987	0,015±4,9497x10 ⁻⁴	0,298± 0,00509	1,007± 0,01722	1,523± 0,02374
0,09987	0,020±2,1213x10 ⁻⁴	0,292± 0,00382	1,027± 0,01342	2,088± 0,0504
0,09987	0,025±1,4142x10 ⁻⁴	0,298± 0,00552	1,006± 0,01863	2,553± 0,03303

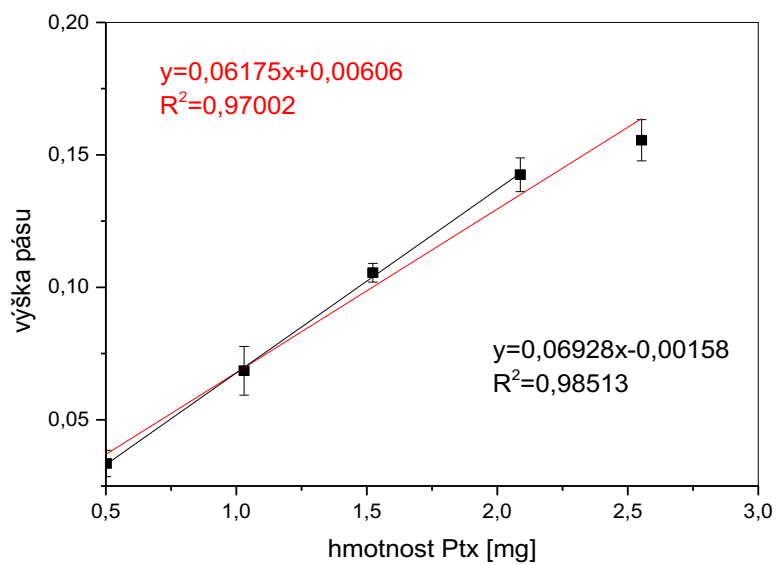
Výsledná hmotnost pentoxifylinu ve 300 mg KBr tabletě je vynesena na ose x, na ose y je zobrazena výška absorpčního pásu.



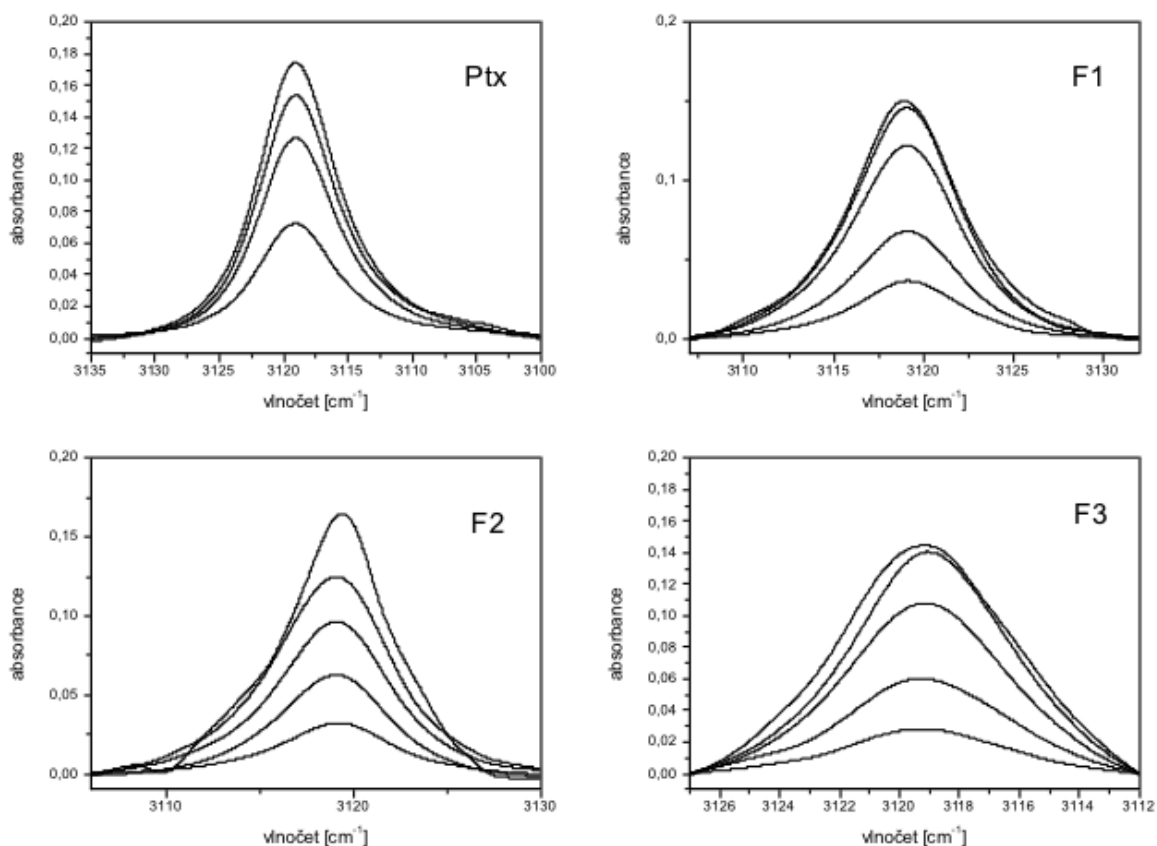
Graf 2 Kalibrační přímka Ptx pro F1



Graf 3 Kalibrační přímka Ptx pro F2



Graf 4 Kalibrační přímka Ptx pro F3



Obrázek 15 Absorpční pás pentoxifylinu při 3119 cm^{-1}

V jednotlivých grafech 2, 3 a 4 jsou opět vyneseny na ose x hmotnosti pentoxifylinu a na ose y výška absorpčního pásu. U formulace F2 je linearita se směrodatnými odchylkami z jednotlivých měření zachována a odpovídá tomu i výřez spektra na obrázku 15, kde lze vidět, jak se hodnoty absorbance s narůstající koncentrací zvětšují. U formulacích F1 a F3 poslední body kalibrační křivky, které odpovídají koncentraci 25 mg, narušují linearitu přímky. Tento problém je značně viditelný i na obrázku 15, kde je pro tuto koncentraci jen velmi malý rozdíl výšek pásu od předchozí 20 mg koncentrace. Navíc je spektrální křivka u složení F2 pro koncentraci 25 mg na spoustě místech zakřivená. U pentoxifylinu je tedy nejvhodnější dodržovat rozmezí koncentrací do 20 mg, kde je jasný nárůst absorbance a kalibrační přímka je pro všechny tyto koncentrace lineární.

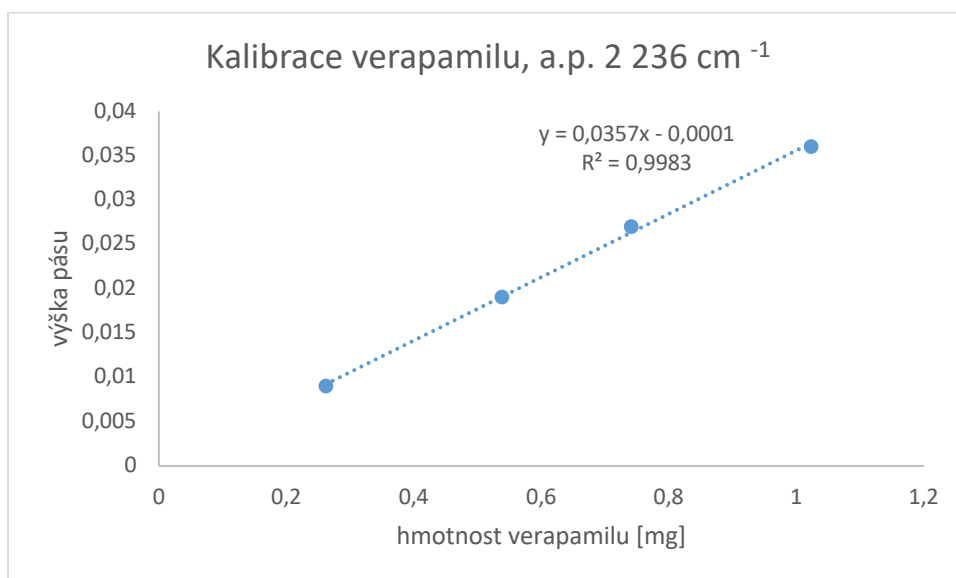
3.2.2 Kalibrace verapamil hydrochloridu

Kalibrace verapamil hydrochloridu byla provedena na absorpčním pásu 2236 cm⁻¹. Potřebné výpočty jsou stejné jako v předcházejícím případě u pentoxifylinu. Výsledná data jsou uvedena v tabulce 12.

Tabulka 12 Data pro kalibraci verapamil hydrochloridu

Hmotnost směsi [mg]	Hmotnost verapamilu ve směsi [g]	Hmotnost KBr tablety [g]	Hmotnostní zlomek verapamilu v KBr tabletě	Korekční faktor	Hmotnost verapamilu v KBr tabletě [mg]
5	2,6465x10 ⁻⁴	0,3036	8,71706x10 ⁻⁴	0,988	0,261474
10	5,2929x10 ⁻⁴	0,2952	1,79239x10 ⁻³	1,01626	0,537896
15	7,3402x10 ⁻⁴	0,2973	2,46895x10 ⁻³	1,009	0,740626
20	9,8868x10 ⁻⁴	0,290	3,40927x10 ⁻³	1,0345	1,022799

Opět byla provedena grafická závislost hmotnosti verapamil hydrochloridu na výšce absorpčního pásu 2236 cm⁻¹. V rovnici výsledné přímky je úsek téměř nulový a hodnota spolehlivosti R² je 0,9983.



Graf 5 Kalibrace verapamil hydrochloridu

Kalibrace verapamil hydrochloridu ve směsích

Výpočty:

$$\text{Hmotnostní zlomek VH ve směsi: } x = \frac{m(\text{VH v pův. tabletě})}{m(\text{původní tablety})} \times \frac{m(\text{odebraná z pův. tablety})}{m(\text{KBr směsi})} =$$

$$\frac{100}{500} \times \frac{150,8}{301,6}$$

$$\text{Hmotnost VH v KBr tabletě: } m = x(\text{VH ve směsi}) \times m(\text{odebraná VH}) = 0,1 \times 0,0053$$

$$\text{Hmotnostní zlomek VH v KBr tabletě: } x = \frac{m(\text{VH v KBr tabletě})}{m(\text{KBr tablety})} = \frac{5,3 \times 10^{-4}}{0,2916}$$

$$\text{Hmotnost VH v KBr tabletě: } m = x(\text{VH v KBr tabletě}) \times m(\text{KBr tablety}) \times f = 1,81756 \times 10^{-3} \times 0,2916 \times 1,0288 \text{ [g]}$$

Opět byla provedena série třech měření, výsledky a směrodatné odchylky pro každou formulaci jsou uvedeny v tabulkách 13, 14 a 15.

Tabulka 13 Data pro kalibraci VH, F1

Hmotnostní zlomek verapamilu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi [g] ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost verapamilu v KBr ve 300 mg tabletě [mg] ± SD
0,1	0,005±2,121×10 ⁻⁴	0,292± 0,00106	1,026± 0,00372	0,528± 0,02368
0,1	0,010±4,242×10 ⁻⁴	0,295± 0,0046	1,015± 0,0158	1,025± 0,02713
0,1	0,015±7,072×10 ⁻⁵	0,297± 0,00354	1,0081± 0,0120	1,555± 0,02963
0,1	0,020±2,121×10 ⁻⁴	0,294± 0,00262	1,018± 0,00905	2,063± 0,03994
0,1	0,025±2,121×10 ⁻⁴	0,299±3,53×10 ⁻⁴	1,004± 0,00119	2,539± 0,01124

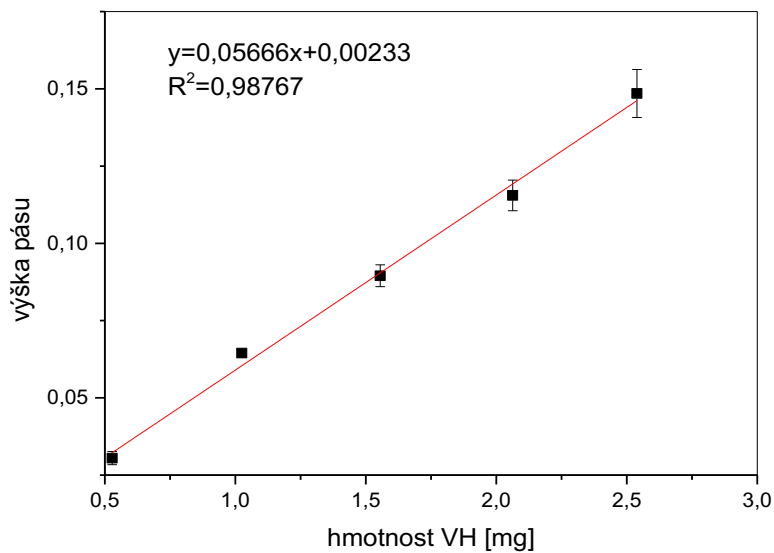
Tabulka 14 Data pro kalibraci VH, F2

Hmotnostní zlomek verapamilu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi [g] ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost verapamilu v KBr tabletě [mg] ± SD
0,10027	0,005±3,535x10 ⁻⁴	0,291± 0,00396	1,031± 0,01402	0,553± 0,03901
0,10027	0,010±3,535x10 ⁻⁴	0,293±9,192x10 ⁻⁴	1,024± 0,00321	1,051± 0,04846
0,10027	0,015±7,071x10 ⁻⁵	0,296± 0,00311	1,015± 0,01068	1,562± 0,02365
0,10027	0,020±4,949x10 ⁻⁴	0,293±7,071x10 ⁻⁵	1,023±2,48x10 ⁻⁴	2,085± 0,05239
0,10027	0,025±7,071x10 ⁻⁵	0,296± 0,00502	1,012± 0,01714	2,583± 0,05092

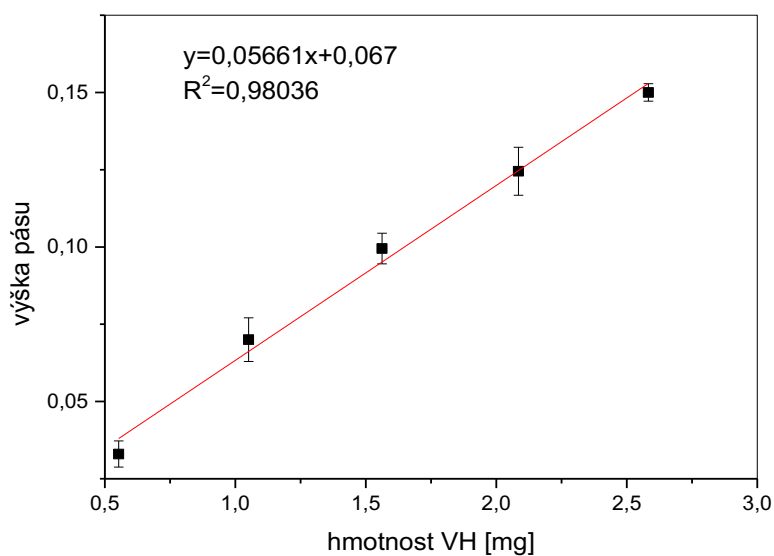
Tabulka 15 Data pro kalibraci VH, F3

Hmotnostní zlomek verapamilu ve směsi	Odebraná hmotnost směsi [g] ± SD	Hmotnost KBr tablety [g] ± SD	Korekční faktor ± SD	Hmotnost verapamilu v KBr tabletě [mg] ± SD
0,10029	0,005±2,828x10 ⁻⁴	0,291± 0,00134	1,031± 0,00479	0,569± 0,03186
0,10029	0,010±4,243x10 ⁻⁴	0,294± 0,00255	1,020± 0,00883	1,042± 0,03548
0,10029	0,015±0	0,298±9,899x10 ⁻⁴	1,005± 0,00332	1,553± 0,00517
0,10029	0,020±2,121x10 ⁻⁴	0,297± 0,00184	1,011± 0,00622	2,053± 0,03415
0,10029	0,025±2,828x10 ⁻⁴	0,294± 0,00361	1,022± 0,01257	2,592± 0,06013

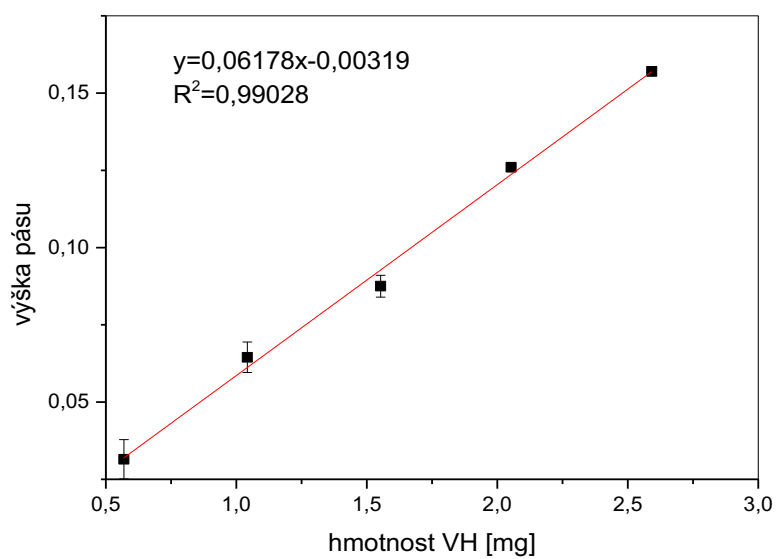
Výsledná hmotnost verapamil hydrochloridu ve 300 mg KBr tabletě je vynesena na ose x, na ose y je vyhodnocená výška absorpčního pásu.



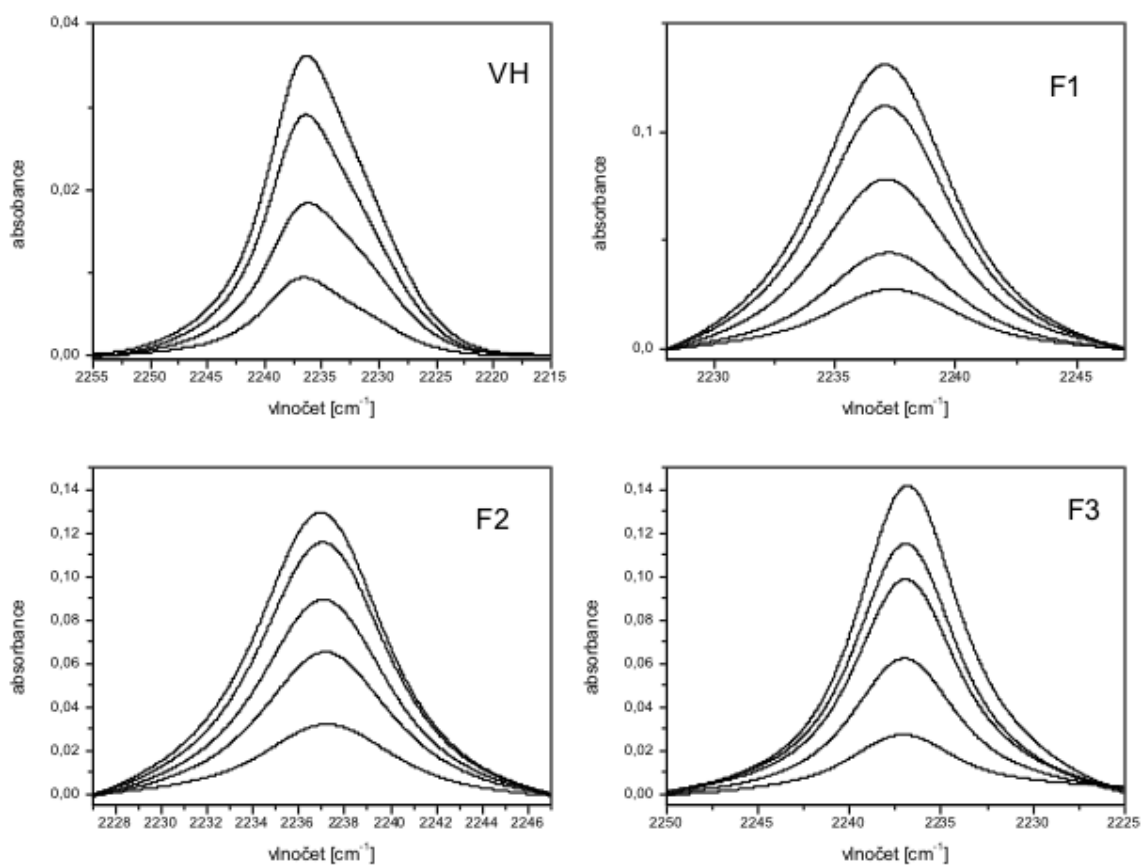
Graf 6 Kalibrační přímka VH pro F1



Graf 7 Kalibrační přímka VH pro F2



Graf 8 Kalibrační přímka VH pro F3



Obrázek 16 Absorpční pás verapamil hydrochloridu při 2236 cm⁻¹

V grafu 6, 7 a 8 jsou kalibrační přímky pro jednotlivé formulace u verapamil hydrochloridu. U formulací F1 a F3 je hodnota spolehlivosti R^2 blízká 1 a úsek v rovnici přímky je téměř nulový. U F2 je hodnota spolehlivosti o něco menší a i úsek v rovnici je větší, což naznačuje větší odchylku od Lambert-Beerova zákona než u ostatních dvou složení.

Detail na absorpční pás při 3119 cm^{-1} zachycuje obrázek 16. Na rozdíl od pentoxifylinu zde není problém s koncentrací 25 mg. U všech případů se hodnoty absorbance zvyšují s narůstající koncentrací a jednotlivé spektrální křivky jsou čisté. Pro kvantitativní analýzu verapamil hydrochloridu je tedy celé zvolené rozmezí koncentrací (do 25 mg) vhodné.

4. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium infračervených spekter pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu v pevných lékových formách. Byly zvoleny 3 různé formulace léčiv s danými účinnými látkami. K měření spekter byla využita metoda transmisní infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Vzorky byly zpracovány metodou KBr tablet. Byla proměřena jak spektra samotných účinných látek a excipientů, tak i spektra látek v daných směsích. Na základě interpretace spekter byl zvolen absorpční pás při vlnočtu 3119 cm^{-1} pro pentoxifylin a 2236 cm^{-1} pro verapamil hydrochlorid, na kterých se dále prováděla kvantitativní analýza. Pomocí metody kalibrační křivky byl ověřen Lambert-Beerův zákon a stanoveny jeho odchylky pro jednotlivá složení.

Bylo zjištěno, že Lambert-Beerův zákon v případě samotného pentoxifylinu a verapamil hydrochloridu platí jen s naprosto minimální odchylkou v rozmezí koncentrací 0-20 mg. Pentoxifylin v daných směsích prokazoval větší odchylky od L-B. zákona a nejvíce se to projevilo u formulací bez retardující složky a u formulace s retardující složkou compritolu, kde koncentrace 25 mg narušovala linearitu kalibrační přímky. V případě verapamil hydrochloridu bylo rozmezí koncentrací v pořádku, ale taky se zde objevily malé odchylky způsobené vlivem excipientů.

Vzhledem k tomu, že byl v této práci prozkoumán vždy pouze jeden absorpční pás pro každou účinnou látku, by bylo dobré se pokus najít další a stejným způsobem ověřit planost Lambert-Beerova zákona. U pentoxifylinu nastal problém s koncentrací 25 mg, tudíž by bylo také dobré se detailněji zaměřit na rozmezí koncentrací 20-25 mg a zjistit, kde přesně dochází k porušení linearity.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BUGAY, David E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, (48), 43-65.
- [2] FAIX, O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. LINN, Stephen Y. a Carlton W. DENCE. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science, 1992, s. 83-109. ISBN 978-3642740671
- [3] STUART, Barbara H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* [online]. Chichester, United Kingdom: John Wiley, 2004 [cit. 2018-03-06]. ISBN 9780470011140. Dostupné z : <http://www.kinetics.nsc.ru/chichinin/books/spectroscopy/Stuart04.pdf>
- [4] MALLAH, Muhammad Ali, Syed Tufail Hussain SHERAZI, Sarfaraz Ahmed MAHESAR a Abdul Rauf KHASKHELI. Simultaneous Quantification of Ibuprofen and Paracetamol in Tablet Formulations Using Transmission Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2012, **2012**(1), 503-511.
- [5] SMITH, Brian C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*. Second edition. CRC Press, 2011. ISBN 9781420069297.
- [6] SIEGFRIED, Wartewig a Reinhard H.H. NEUBERT. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **2005**(58), 1144-1170.
- [7] VAN DER WEERD, Jaap a Sergei G. KAZARIAN. Combined approach of FTIR imaging and conventional dissolution tests applied to drug release. *Journal of Controlled Release*. 2004, **2004**(98), 295-305.
- [8] SALARI, Amid a Richard E. YOUNG. Application of attenuated total reflectance FTIR spectroscopy to the analysis of mixtures of pharmaceutical polymorphs. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998, **1998**(163), 157-166.
- [9] JAMRÓGIEWICZ, Marzena. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, **2012**(66), 1-10.

- [10] HUONG, Pham V. Drug analysis by Raman and micro-Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1986, **1986**(4), 811-823.
- [11] SAMLASKA, Curt P. a Elizabeth A. WINFIELD. Pentoxifylline. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994, **1994**(30), 603-621.
- [12] WARD, Alan a Stephen P. CLISSOLD. Pentoxifylline: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic Efficacy. *Drugs*. 1987, **1987**(34), 50-97.
- [13] SAUER, Gordon C. Pentoxifylline (Trental) Therapy for the Vasculitis of Atrophie Blanche. *Archives of Dermatology*. 1986, **1986**(122), 380-381.
- [14] STEPANOV, Dmitrijs, Mara JURE a Liujmila N. KULESHOVA. Cocrystals of Pentoxifylline: In Silico and Experimental Screening. *Crystal Growth and Design*. American Chemical Society, 2015, **2015**(15), 3652-3660.
- [15] MADYASTHA, K.M. a G.R. SRIDHAR. Highly efficient C-8 oxidation of substituted xanthenes with substitution at the 1-, 3-, and 7- positions using biocatalysts. *Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions 1*. 1999, **1999**(6), 677-680. DOI: 10.1039/A900089E.
- [16] KANDULA, Mahesh. *COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF CHRONIC DISEASES AND INFLAMMATORY DISORDERS*. US2015087660 (A1). Uděleno 26.3.2015.
- [17] SINGH, Bramah N. a Gray ELLRODT. Verapamil: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use. *Drugs*. 1978, **1978**(15), 169-197.
- [18] JAMAMOTO, Norio. JP48123359. Uděleno 1976.
- [19] KASTNER, Gerhard, Hardo SIEGEL a Karl-Heinz GEISS. *Preparation of phenylacetone nitriles carrying basic substituents*. US4350636 (A). Uděleno 21.9.1982.
- [20] Infračervená spektroskopie. *Vscht.cz* [online]. Praha, 2014 [cit. 2018-03-28]. Dostupné z : <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [21] KANIA, Patrik. INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE. *Vscht.cz* [online]. Praha, 2014 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z : <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?re-directed>

- [22] COATES, John. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, 1*. John Wiley, 2006. ISBN 9780470027318.
- [23] TUNDE, Jurca, Eleonora MARIAN a Bogdan TITA. Thermal stability of pentoxifylline: active substance and tablets. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2013, (113), 1155-1158.
- [24] Pentoxifylline. FOREY, Klaus. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 17. Academic Press, 1988, s. 309-314. ISBN 978-0-12-260817-9.
- [25] EL MOSTAFA, El Kouid a V. A. GEORGIYANTS. *INFRARED SPECTROSCOPY FOR IDENTIFICATION OF VERAPAMIL HYDROCHLORIDE IN TABLETS* [online]. Kharkiv, Ukraine [cit.2018-06-23]. Dostupné z:
<http://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/11224/1/171.pdf>
- [26] Verapamil. FOREY, Klaus. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 17. Academic Press, 1988, s. 647-648. ISBN 978-0-12-260817-9.