

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Kateřina Fuková

VOLTAMETRICKÉ A CHROMATOGRAFICKÉ SLEDOVÁNÍ
DEGRADACE LÉČIVÉ LÁTKY IBUPROFEN

Voltammetric and chromatographic monitoring of ibuprofen
degradation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5.5.2025

.....
Kateřina Fuková

Abstrakt

V rámci diplomové práce byla vyvinuta a částečně validována voltametrická metoda pro stanovení léčivé látky ibuprofen přímo v degrační cele. Byly optimalizovány podmínky, při kterých bylo možné provést elektrochemickou degradaci ibuprofenu a následně přímo v degrační cele online voltametricky stanovit koncentraci léčiva. Pro voltametrická měření byla použita metoda diferenční pulzní voltametrie (DPV) v tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla disková borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE), referenční elektroda byla argentchloridová a pomocnou elektrodu tvořil platinový plíšek. Jako základní elektrolyt byl použit roztok $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \% \text{ (obj.) ethanolu}$.

Byla vyvinuta a částečně validována UHPLC metoda pro stanovení ibuprofenu. Pro stanovení byla použita kolona Kinetex C₁₈, jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (složka A) a vody (složka B). Složení mobilní fáze se měnilo dle gradientového programu: 0–0,5 min 30 % A (obj.), 0,5–2 min 30 % → 80 % A (obj.), 2–4 min 80 % A (obj.), 4–5 min 80 % → 30 % A (obj.), 5–6 min 30 % A (obj.). Pro vyhodnocení byl použit PDA detektor pracující při vlnové délce 220 nm.

V rámci částečné validace vyvinuté voltametrické a chromatografické metody byla ověřena linearita metod, jejich opakovatelnost a byly stanoveny limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ).

Za využití vyvinuté chromatografické metody byly optimalizovány podmínky elektrochemické degradace léčivé látky ibuprofen. Pro degradaci bylo použito dvouelektrodové uspořádání, pracovní elektrodu tvořila BDDE (aktivní povrch $50,3 \text{ mm}^2$), jako pomocná elektroda byl použit platinový plíšek. Optimální degrační napětí bylo stanoveno na 2,0 V, optimální doba degradace byla 5 minut.

Na závěr byly porovnány stanovené koncentrace ibuprofenu v roztoku po degradaci měřené online voltametrickou metodou a off-line metodou chromatografickou.

Klíčová slova

Ibuprofen

Degradace

Diferenční pulzní voltametrie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstract

In this master thesis, a voltammetric method was developed and partially validated for the determination of ibuprofen directly in a degradation cell. Conditions were optimized to enable the electrochemical degradation of the drug, followed by an online voltammetric determination of ibuprofen concentration directly in the degradation cell. The differential pulse voltammetry (DPV) method was used in a three-electrode setup. The working electrode was a boron-doped diamond disk electrode (BDDE), the reference electrode was a silver chloride electrode, and the auxiliary electrode was a platinum plate. The supporting electrolyte consisted of a solution containing $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ \% ethanol}$ by volume.

A UHPLC method for the determination of ibuprofen was developed and partially validated. The analysis employed a Kinetex C_{18} column, the mobile phase was a mixture of acetonitrile (component A) and water (component B). The composition of the mobile phase was modified according to the gradient program: 0–0.5 min 30% A (v/v), 0.5–2 min 30% → 80% A (v/v), 2–4 min 80% A (v/v), 4–5 min 80% → 30% A (v/v), 5–6 min 30% A (v/v). A PDA detector operating at a wavelength of 220 nm was used for evaluation.

During the partial validation of the developed voltammetric and chromatographic methods, linearity, repeatability, and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were verified.

Using the developed chromatographic method, the conditions for the electrochemical degradation of ibuprofen were optimized. A two-electrode setup was used for degradation, with the BDDE (active surface area of 50.3 mm^2) as the working electrode and a platinum plate as the auxiliary electrode. The optimal degradation voltage was 2.0 V, and the optimal degradation time was 5 minutes.

Finally, the ibuprofen concentrations in the solution after degradation, measured using the online voltammetric method and the off-line chromatographic method, were compared.

Key words

Ibuprofen

Degradation

Differential pulse voltammetry

Ultra-high performance liquid chromatography

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala paní doktorce RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Velké poděkování jí také patří za vstřícnost a trpělivost při konzultaci všech získaných výsledků, ochotu zodpovědět každý dotaz a v neposlední řadě za spoustu cenných připomínek a rad v průběhu měření a sepisování práce.

Chtěla bych také poděkovat svému konzultantovi, panu RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D., za mnoho užitečných rad a nápadů, za ochotu konzultovat výsledky z elektrochemické části diplomové práce a za pomoc při řešení technických problémů v průběhu měření.

Ráda bych také poděkovala své rodině a příteli za trpělivost a podporu nejen v průběhu měření a sepisování diplomové práce, ale také během celého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratek a symbolů.....	9
1 Cíl práce	11
2 Teoretická část.....	11
2.1 Ibuprofen	11
2.2 Stanovení léčivé látky ibuprofen	12
2.2.1 Lékopisné stanovení léčiv látky ibuprofen.....	12
2.2.2 Stanovení léčivé látky ibuprofen pomocí kapalinové chromatografie	13
2.2.3 Elektrochemické stanovení léčivé látky ibuprofen.....	14
2.3 Degradční studie léčiv	16
2.4 Degradace léčivé látky ibuprofen	17
2.4.1 Elektrochemická degradace léčivé látky ibuprofen.....	20
2.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	21
2.6 Diferenční pulzní voltametrie	23
3 Experimentální část.....	24
3.1 Použité chemikálie, přístroje a materiál	24
3.1.1 Chemikálie.....	24
3.1.2 Přístroje a materiál.....	24
3.2 Příprava roztoků.....	25
3.2.1 Příprava roztoků ibuprofenu v ethanolu	25
3.2.2 Příprava roztoků kyseliny sírové	25
3.2.3 Příprava roztoku síranu sodného	25
3.2.4 Příprava roztok základního elektrolytu.....	25
3.2.5 Příprava kalibračních roztoků v základním elektrolytu.....	26
3.3 UHPLC metoda.....	26
3.4 Voltametrická metoda	27
3.5 Částečná validace vyvinutých metod	28
3.6 Elektrochemická degradace.....	29
4 Výsledky a diskuse	30
4.1 Příprava roztoku ibuprofenu.....	30
4.2 Vývoj voltametrické metody	30

4.2.1	Optimalizace složení základního elektrolytu.....	30
4.2.2	Pasivace a aktivace pracovní elektrody	35
4.2.3	Částečná validace voltametrické metody	37
4.3	Vývoj UHPLC metody.....	38
4.3.1	Podmínky separace	38
4.3.2	Ověření stability ibuprofenu.....	41
4.3.3	Částečná validace chromatografické metody	41
4.4	Elektrochemická degradace	42
4.4.1	Vliv materiálu těsnění na degradaci ibuprofenu.....	43
4.4.2	Optimalizace degradačního napětí.....	45
4.4.1	Vliv aktivace pracovní elektrody na účinnost degradace	46
4.4.1	Optimalizace degradační doby	46
4.5	Porovnání UHPLC a voltametrické metody pro sledování degradace ibuprofenu	48
5	Závěr.....	54
	Seznam použité literatury	56

Seznam použitých zkratk a symbolů

Seznam použitých zkratk

AOP	pokročilé oxidační procesy (z anglického Advanced Oxidation Process)
API	aktivní farmaceutická složka (z anglického Active Pharmaceutical Ingredient)
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda (z anglického Boron - Doped Diamond Electrode)
CV	cyklická voltametrie (z anglického Cyclic Voltammetry)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (z anglického Differential Pulse Voltammetry)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického High Performance Liquid Chromatography)
LOD	limit detekce (z anglického Limit of Detection)
LOQ	limit stanovitelnosti (z anglického Limit of Quantification)
PDA	detektor s diodovým polem (z anglického Photodiode Array Detector)
RSD	relativní směrodatná odchylka (z anglického Relative Standard Deviation)
TOC	celkový organický uhlík (z anglického Total Organic Carbon)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického Ultra - High Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialová oblast spektra (z anglického Ultraviolet)
UV-LED	dioda emitující světlo v UV oblasti (z anglického Ultraviolet Light – Emitting Diode)
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra (z anglického Ultraviolet – Visible)

Seznam použitých symbolů

c	molární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
h_n	rozpětí hodnot šumu základní linie
I	elektrický proud [A]
m	směrnice kalibrační přímky výšky píku
M	materiál anody
$\text{M}(\cdot\text{OH})$	hydroxylový radikál adsorbovaný na povrchu anody
$\text{p}K_{\text{A}}$	disociační konstanta
t	čas [min]
U	napětí [V]

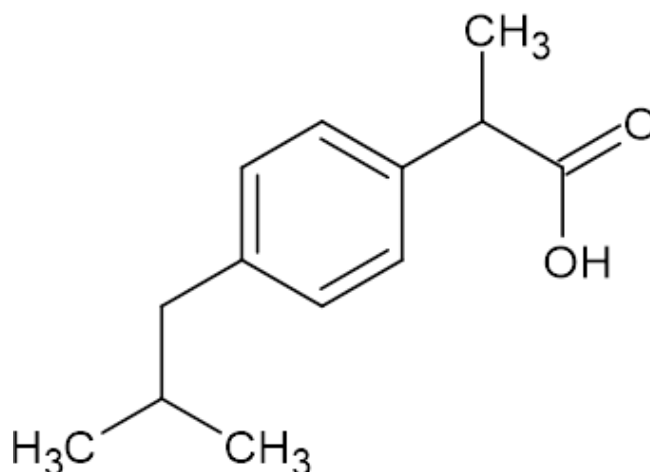
1 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo nalezení a optimalizace podmínek, za kterých by bylo možné současně provést elektrochemickou degradaci léčivé látky ibuprofen a voltametriky sledovat její úbytek přímo v degrační cele. Dalším cílem v rámci této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) pro kontrolní stanovení léčivé látky ibuprofen.

2 Teoretická část

2.1 Ibuprofen

Ibuprofen, neboli kyselina 2-(4-isobutylfenyl)propionová, je bílá krystalická látka s molární hmotností 206,28 g/mol a s molekulovým vzorcem $C_{13}H_{18}O_2$ [1]. Jedná se o monokarboxylovou kyselinu, jejíž hodnota pK_a je 4,91 (ve vodě při 20 °C) [1,2]. Ibuprofen je velmi málo rozpustný ve vodě, naopak je dobře rozpustný v alkoholech [1]. Jeho rozpustnost v čistém ethanolu roste v teplotním rozmezí 10 °C až 40 °C, při teplotě 25 °C je rozpustnost ibuprofenu v čistém ethanolu udána na hodnotu 1,13 g ibuprofenu/1,00 g ethanolu [3]. Léčivá látka je také dobře rozpustná v dalších organických rozpouštědlech, například v acetonu nebo v butanolu [4]. Struktura ibuprofenu je zobrazena na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Struktura ibuprofenu

Ibuprofen je nesteroidní protizánětlivá léčivá látka, která je často využívána ke snížení horečky a zmírnění bolesti. Tato látka byla objevena v šedesátých letech minulého století

jako alternativa k léčivému přípravku aspirin, ovšem s menšími vedlejšími účinky. Poprvé na trh byla uvedena v roce 1969 ve Spojeném království, následně v roce 1974 ve Spojených státech amerických [5].

Ibuprofen je v léčivé látce přítomen jako racemická směs [1]. Je jej možné zakoupit v mnoha lékových formách a od různých výrobců. Účinná látka (API) ibuprofen je v lékových formách stejná, může se ovšem lišit složení pomocných látek. Složení pomocných látek má také vliv na chemickou stabilitu API, při jejich nesprávném zvolení může dojít k zrychlení degradace a ztrátě účinnosti. Degradaci API také může podpořit nesprávné skladování léčiva či přítomnost kontaminantů v pomocných látkách [6].

Ibuprofen je velmi často používané volně prodejné léčivo. Následkem velké spotřeby této léčivé látky roste koncentrace ibuprofenu v odpadních vodách. Přibližně 15% orální dávky ibuprofenu člověk vyloučí v nezměněné formě. Čistírny odpadních vod nedokáží běžnými procesy účinně léčivou látku odstranit, což má za následek přítomnost léčiva v životním prostředí [7]. Přítomnost ibuprofenu ve vodním prostředí negativně ovlivňuje reprodukci vybraných vodních organismů [8]. Degradace ibuprofenu v životním prostředí, či za pomoci mikroorganismů, je kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem ibuprofenu velmi složitá, což vede k akumulaci léčivé látky [9].

2.2 Stanovení léčivé látky ibuprofen

V literatuře je popsáno velké množství metod pro stanovení ibuprofenu. Mimo metod využívajících kapalinovou chromatografii, které budou v rámci této práce probrány podrobněji, je možné pro stanovení použít také například kapilární zónovou elektroforézu [10], plynovou chromatografii [11] či stanovit ibuprofen spektrofotometricky [12].

2.2.1 Lékopisné stanovení léčiv látky ibuprofen

V anglickém lékopisu (British Pharmacopoeia), který byl vydán v roce 2023, jsou popsány vlastnosti ibuprofenu, jeho identifikace a zkoušky na čistotu. Identifikace ibuprofenu je prováděna pomocí několika metod. První z nich je měření bodu tání, který je pro molekulu ibuprofenu dle lékopisu stanoven na rozmezí hodnot 75 °C až 78 °C. Další metody, které se používají pro identifikaci ibuprofenu, jsou: viditelná a ultrafialová absorpční spektrofotometrie, tenkovrstvá chromatografie a infračervená absorpční spektrofotometrie [13].

Zkoušky na čistotu vzorku ibuprofenu je možné provést několika metodami. Při první z nich se rozpustí vzorek ibuprofenu v methanolu a opticky se zkoumá čistota vzorku (získaný roztok musí být čirý a bezbarvý). Také se měří úhel optické otáčivosti roztoku v rozmezí $-0,05^\circ$ až $+0,05^\circ$ [13].

Zkouška na čistotu je prováděna pomocí kapalinové chromatografie. Stacionární fáze kolony je tvořena oktadecylsilylanovým nosičem, mobilní fázi tvoří směs složky A (kyselina fosforečná, acetonitril a voda) a složky B (acetonitril). Poměr složek mobilní fáze se v průběhu separace mění dle gradientového programu. Detekce je prováděna pomocí spektrofotometru, který snímá spektrum při vlnové délce 214 nm. Retenční čas ibuprofenu je poměrně dlouhý, pohybuje se okolo 21 minut [13]. V dnešní době je již pro stanovení ibuprofenu v literatuře popsáno mnoho HPLC metod, které jsou rychlejší a účinnější, viz kapitola 2.2.2

V lékopise jsou popsány celkem čtyři určené nečistoty, a to nečistoty A, J, N a F. Pro identifikaci a stanovení nečistot A, J a N se využívá popsaná metoda kapalinové chromatografie, pro nečistotu F je v lékopise popsána metoda plynové chromatografie. Pro stanovení koncentrace ibuprofenu je v lékopise popsána metoda využívající acidobazickou titraci [13].

2.2.2 Stanovení léčivé látky ibuprofen pomocí kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie je ve farmaceutickém průmyslu hojně využívanou metodou. Používá se nejen pro kontrolu čistoty léčiv, ale také v rámci vývoje a v neposlední řadě pro kontrolu kvality léčiv. Největší zastoupení má chromatografie na reverzní fázi, která je vhodná pro stanovení nepolárních a mírně polárních látek [14]. Kapalinová chromatografie je pro analýzu ibuprofenu nejčastěji využívaná metoda [15].

Autoři A.I Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos a A. Jimenez [16] popsali metodu pro současné stanovení ibuprofenu a jeho degradačního produktu 4-isobutylacetofenonu. Pro stanovení byla použita oktadecylová kolona. V této studii probíhala separace izokratickou elucí, kdy jako mobilní fáze byla použita směs kyseliny fosforečné (pH 3,2) a acetonitrilu v poměru 50:50 obj. %. Pro vyhodnocení byl použit UV (ultrafialové záření) detektor, spektra byla vyhodnocována při vlnové délce 254 nm. [16].

Další studie, kterou provedl Ö. F. Koçak a A. Atila, se zabývala stanovením ibuprofenu ve farmaceutických přípravcích za pomoci ultra-vysokoúčinné kapalinové

chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Autoři prováděli separaci na oktadecylové koloně, jejíž teplota byla nastavena na 40 °C. Separace byla prováděna za pomoci izokratické eluce, kdy jako mobilní fáze byla použita směs 0,1% kyseliny mravenčí (obj.) a acetonitrilu v poměru 25:75 obj. %. Autoři ověřili linearitu vyvinuté metody v koncentračním rozsahu ibuprofenu 1-5000 ng·ml⁻¹ a následně ji použili pro stanovení ibuprofenu v léčivých přípravcích [17].

Metodu pro současné stanovení ibuprofenu a 17 příbuzných sloučenin (degradačních produktů a nečistot) popsal Z. Han a kolektiv. Pro stanovení použili oktadecylovou kolonu temperovanou na teplotu 40 °C. Mobilní fázi tvořila směs fosfátového pufru (pH 6,9) a acetonitrilu a separace probíhala v režimu gradientové eluce [18].

V literatuře je také popsáno mnoho HPLC metod pro současné stanovení ibuprofenu a další léčivé látky, například mefenesinu [19], pseudoefedrin hydrochloridu a chlorfeniramin maleátu [20], pamabromu [21], famotidinu [22], paracetamolu [23], ketoprofenu a hyoscinu [24] a pseudoefedrin-hydrochloridu [25].

Studie provedená P. Paígou a kol., se zabývala vývojem metody pro stanovení sedmi léčivých látek včetně ibuprofenu a dvou metabolitů ve slané mořské vodě. Autoři pro stanovení použili extrakci na pevné fázi v kombinaci s ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro chromatografickou separaci byla použita oktadecylová kolona Kinetex, která byla v průběhu separace temperována na 30 °C. Jako mobilní fázi autoři použili směs vody a acetonitrilu, jejichž poměr se v průběhu separace měnil dle gradientového programu. Vyvinutou metodu autoři následně použili pro analýzu mořské vody z Atlantského oceánu [26].

V literatuře jsou popsány také metody pro chromatografické stanovení ibuprofenu v tělních tekutinách, například v moči [27] či v plazmě [28].

2.2.3 Elektrochemické stanovení léčivé látky ibuprofen

Zájem o využití elektrochemických metod neustále roste. Elektrochemické metody jsou ve srovnání s jinými technikami rychlé, levné, a přesto vysoce citlivé [29].

Pro voltametrické stanovení ibuprofenu bylo vyzkoušeno použití několika materiálů pracovních elektrod, například borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) [30], elektroda ze skelného uhlíku [31] nebo sítotisková grafitová elektroda [32]. Velmi dobré výsledky poskytovala BDDE, která má široké potenciálové okno, nízké základní proudy,

nízký šum a ve srovnání s dalšími konvekčními elektrodami je méně náchylná k pasivaci. Elektrochemické vlastnosti BDDE jsou dány úrovní dopování [33, 34].

Amanda B. Lima a kolektiv [30] se ve své studii zabývali elektrochemickým stanovením ibuprofenu na BDDE, jejíž stupeň dopace byl přibližně 8000 ppm. Pro stanovení použili metodu diferenční pulsní voltametrie (DPV) a měření prováděli v tříelektrodevém uspořádání. Jako referenční elektroda byla použita elektroda argentchloridová a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek. Pro stanovení ibuprofenu autoři zvolili jako optimální základní elektrolyt roztok kyseliny sírové o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Ethanol byl do základního elektrolytu přidán z důvodu nízké rozpustnosti ibuprofenu v čisté vodě, přidání kyseliny do základního elektrolytu rozšířilo potenciálové okno ke kladnějším hodnotám potenciálů. Při těchto podmínkách byl detekován ibuprofen při potenciálu +1,65 V. V rámci této studie byl také zkoumán vliv katodické a anodické aktivace povrchu BDDE před měřením. Anodická úprava povrchu BDDE měla za následek mírné rozšíření potenciálového okna. Anodická úprava probíhala v roztoku $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Britton-Robinsonově pufru, kdy na elektrody byl vkládán proud 0,01 A po dobu 1000 sekund (plocha BDDE $0,50 \text{ cm}^2$) [30].

Ibuprofen je možné také stanovit pomocí DPV současně s léčivou látkou paracetamol. Pro stanovení bylo použito tříelektrodevé uspořádání, pracovní elektrodou byla BDDE, referenční elektroda byla argentchloridová a pomocná elektroda byla tvořena platinovým drátkem. Stanovení probíhalo v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny sírové + 10 % (obj.) ethanolu. Oxidační pík paracetamolu byl detekovaný při +0,85 V, pík patřící ibuprofenu při potenciálu +1,72 V [34].

V literatuře jsou popsány další studie, kdy byl ibuprofen stanoven za pomoci DPV na mnoha různých elektrodevých materiálech. Například stanovení ibuprofenu na elektrochemicky aktivované sítotiskové uhlíkové elektrodě v acetátovém pufru (pH $4,5 \pm 0,1$) [35], na sítotiskové uhlíkové elektrodě modifikované platformou na bázi oxidu manganu ve fosfátovém pufru (pH 7,0) [36] nebo na sítotiskových elektrodách na bázi uhlíkových nanomateriálů v acetátovém pufru (pH 5,5) [37].

Pro stanovení ibuprofenu je možné použít také elektrodu ze skelného uhlíku. Měření byla prováděna metodou „Square-wave stripping“ voltametrie. Jako optimální hodnota pH základního elektrolytu pro měření byla hodnota 1,0. Při tomto pH byl proudový signál

ibuprofenu nejvyšší a ibuprofen byl detekován při potenciálu +1,6 V. V rámci studie byla testována elektrochemická a mechanická předúprava elektrody [31].

Použití „Square-wave“ voltametrie pro stanovení ibuprofenu ve vodném roztoku popsali také S. Amin a kol., kteří pro stanovení použili sítotiskovou grafitovou elektrodu [32].

Pro současné stanovení více léčivých látek ve vodných roztocích se vyvíjí mnoho nových metod za použití různých elektrodových materiálů, například uhlíková pastová elektroda s fullereny a uhlíkovými nanovláknými, nebo uhlíková pastová elektroda s grafenem a uhlíkovými nanotrubicemi [38].

2.3 Degradční studie léčiv

Pokud léčivá látka není stabilní, může docházet k přeměně části molekul léčiva za vzniku degradačních produktů. To může mít za následek příjem nižší dávky léčivé látky pacientem, a tedy nižší účinek. Může ovšem také docházet ke vzniku degradačních produktů, které mohou být toxické [39]. Degradace léčivé látky je také jeden z hlavních zdrojů nečistot [40].

Obecně je stabilita léčiv nejčastěji ovlivněna oxidací či hydrolyzou molekuly léčivé látky. Hydrolyza je reakce molekuly léčiva s vodou, což má za následek rozštěpení vazby v molekule. Skupiny v molekule léčiva, které jsou k hydrolyze nejvíce náchylné, jsou estery a následně amidy, jelikož obsahují polarizovanou dvojnou vazbu mezi kyslíkem a uhlíkem. Při reakci těchto skupin s vodou dochází ke vzniku karboxylové kyseliny a alkoholu (z esteru) či aminu (z amidu). Hydrolyzu je možné katalyzovat pomocí kyseliny či zásady, rychlost reakce je tedy ovlivněna hodnotou pH vodného roztoku. Dalším faktorem, který ovlivňuje rychlost hydrolyzy, je teplota. Hydrolyzu léčivých látek je tedy možné minimalizovat několika způsoby, například modifikací struktury molekuly, změnou lékové formy či skladováním léčiva na chladném místě [41].

Oxidací léčiva dochází k odstranění elektronu z molekuly, nejčastěji navázáním molekuly kyslíku. Oxidaci léčiva je možné účinně eliminovat vhodným skladováním. Omezení přístupu kyslíku, tedy skladování léčiva v argonu či dusíku, snižuje oxidaci léčivé látky [41].

K určení stability léčiv je možno využít studií stability. Studie stability se dle délky trvání dělí na dlouhodobé a zrychlené. Dlouhodobé studie stability se provádějí po dobu

přibližně 12 měsíců, zrychlené studie stability trvají 6 měsíců. Stejně dlouhou dobu se provádí také studie mezistupňové. Oproti studiím zrychleným jsou mezistupňové studie stability prováděny za mírnějších podmínek [40].

Pro odhad stability léčiva je často využívána metoda stresové degradace neboli nucená degradace. Léčivá látka je vystavena extrémním stresovým podmínkám, čímž dochází ke vzniku degradačních produktů v řádu hodin až dní a je možné určit stabilitu molekuly v krátkém časovém úseku. Účelem nucené degradace je také sledování a získání informací o degradačních produktech, které mohou pomoci při studiu mechanismu rozkladu léčivé látky [40, 42].

Stresové podmínky, které se nejčastěji využívají ve studiích nucené degradace, jsou: kyselá a bazická hydrolýza, oxidace, tepelné a fotolytické podmínky. Pro nucené degradace léčivých látek je optimální hodnota degradace 5–20 % z původního množství účinné látky [40].

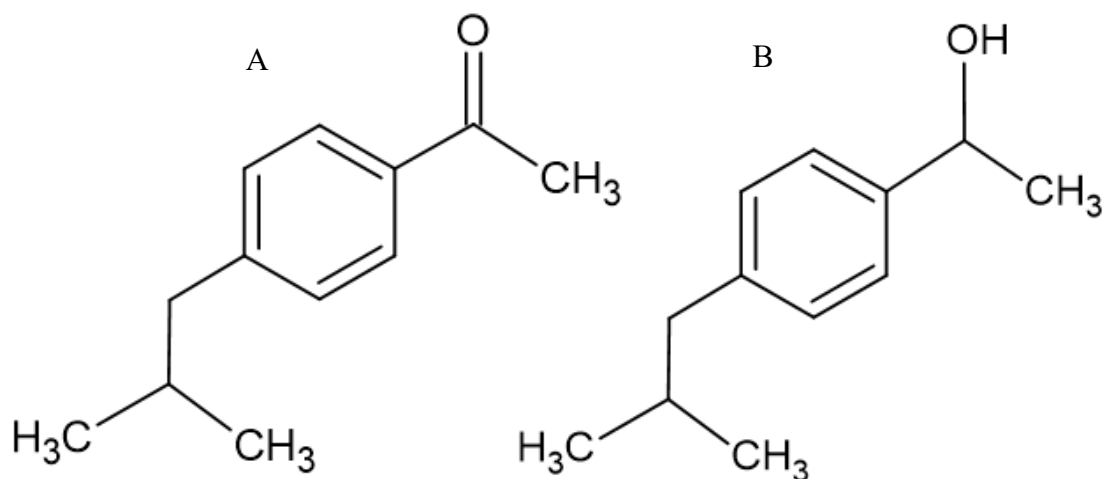
Studie nucené degradace jsou řízeny směrnicemi, které mohou být vydány například Mezinárodní radou pro harmonizaci technických požadavků na přípravky pro humánní použití, Evropskou agenturou pro léčivé přípravky a úřadem pro kontrolu potravin a léčiv [40, 43].

2.4 Degradace léčivé látky ibuprofen

Degradaci ibuprofenu je možno provádět pomocí pokročilých oxidačních procesů (AOP), kdy se využívá tvorby reaktivních kyslíkových forem, především hydroxylových radikálů. Ty díky svému vysokému oxidačnímu potenciálu dokáží oxidovat mnoho organických sloučenin. Využitím AOP je možné dosáhnout až úplné mineralizace, kdy jsou sloučeniny oxidací rozloženy na jednoduché anorganické látky. Dle způsobu oxidace jsou AOP rozděleny na chemickou, elektrochemickou, fotochemickou a sonochemickou oxidaci. Pro chemické oxidace je jako oxidační činidlo často využíván peroxid vodíku, jehož nevýhodou ovšem je nižší hodnota oxidačního potenciálu (+1,78 V). Z toho důvodu je jej možné kombinovat se zářením, ozonem či solemi kovů, čímž dojde k tvorbě více hydroxylových radikálů a zvýšení účinnosti degradace. Při ozonizaci je využíván ozon jako oxidační činidlo. Oxidační potenciál ozonu je udán na hodnotu +2,07 V, často však nedochází k úplné mineralizaci roztoku [44, 45].

V. M. Almeida a kol. [44] studovali oxidaci ibuprofenu pomocí ozonizace, oxidace peroxidem vodíku a kombinace těchto metod. V rámci studie autoři také testovali vliv katalyzátoru na zvýšení účinnosti oxidace. Výsledky studie ukázaly, že během 15 minut ozonizace došlo k úplnému odstranění ibuprofenu z roztoku, jelikož molekula ibuprofenu obsahuje aromatický kruh, který snadno podléhá reakci s molekulou ozonu. Naopak ani po 3 hodinách ozonizace nebylo dosaženo úplné mineralizace. V roztoku zůstávaly nasycené sloučeniny s krátkým uhlovodíkovým řetězcem (např. karboxylové kyseliny), které jsou odolné vůči reakci s molekulou ozonu. Oxidace ibuprofenu pomocí samotného peroxidu vodíku byla velmi neefektivní. Při použití kombinace obou oxidačních činidel (peroxid vodíku a ozon) bylo také po 15 minutách dosaženo úplného odstranění ibuprofenu z roztoku. Kombinace oxidačních činidel vedla k vyšší mineralizaci roztoku, což bylo způsobeno zvýšenou tvorbou hydroxidových radikálu. Hydroxylové radikály vznikaly působením ozonu na peroxid vodíku, který se rozpadal. Mineralizaci vyšší než 80 % se podařilo dosáhnout při použití kombinace ozonu a peroxidu vodíku v přítomnosti katalyzátoru. Jako katalyzátor byly použity uhlíkové nanotrubičky a uhlíkové nanotrubičky pokryté vrstvou oxidu železa. Přidání katalyzátoru nemělo vliv na samotnou oxidaci ibuprofenu, úplného odstranění léčiva z roztoku se podařilo dosáhnout opět po 15 minutách degradace [44].

Byla také provedena studie za účelem sledování oxidace a tepelné stability ibuprofenu. Oxidace byla sledována nejen v různých rozpouštědlech léčivé látky, ale také za použití několika druhů oxidačních činidel. Jako oxidační činidlo byl testován manganistan draselný, peroxid vodíku a dichroman draselný. Celkem bylo detekováno 13 degradačních produktů ibuprofenu. U dvou z nich, konkrétně u degradačních produktů 4-isobutylacetofenon (Obrázek 2A) a 1-[4-isobutylfenyl]-1-ethanol (Obrázek 2B), byly prokázány toxické účinky [46].



Obrázek 2 - Degradční produkty léčivé látky ibuprofen s toxickými účinky

Vliv fotodegradace na přímém slunečním světle osmi vybraných farmaceutik včetně ibuprofenu ve vodném prostředí zkoumal Hiroshi Yamamoto a kolektiv [47]. Výsledky studie ukázaly, že ibuprofen (spolu s dalšími čtyřmi léčivy) byl vůči slunečnímu světlu relativně stabilní [47].

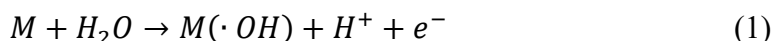
Bylo také testováno využití fotodegradace ibuprofenu pro odstranění léčiva z odpadních vod, kdy pro degradaci bylo použito monochromatické záření o vlnové délce 254 nm. Účinnost degradace stoupala s klesajícím objemem degradované kapaliny, s rostoucí délkou doby degradace a s vyšší hodnotou pH degradovaného roztoku. V případě, že pH degradovaného roztoku bylo vyšší než pK_a ibuprofenu a molekula ibuprofenu tedy byla v roztoku převážně v aniontové formě, účinnost degradace byla dvojnásobná [48].

Pro zvýšení účinnosti fotodegradace ibuprofenu oproti přímé UV-LED (dioda emitující ultrafialové světlo) fotolýze je možné použít kombinaci UV-LED/katalytických nebo UV-LED/oxidačních procesů. Při použití oxidu titaničitého nebo oxidu zinečnatého jako katalyzátoru je možné ibuprofen kompletně degradovat během 90 minut [49].

V literatuře je popsáno mnoho dalších metod, které se zabývají degradací léčivé látky ibuprofen. Mezi tyto studie se řadí například použití ultrazvukových vln při degradaci ibuprofenu [50], degradace ibuprofenu pomocí *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) [51], či degradace léčiva hydrodynamickou kavitací [52].

2.4.1 Elektrochemická degradace léčivé látky ibuprofen

Elektrochemická degradace je obecně založena na reakci hydroxylových radikálů s molekulou analytu. Hydroxylové radikály vznikají rozkladem vody na povrchu anody, která má vysoké přepětí pro tvorbu kyslíku. Mají vysoký standardní redoxní potenciál a jsou označovány jako druhé nejsilnější oxidační činidlo (nejsilnější oxidační činidlo je fluor). Reakce probíhá dle rovnice 1:



kde M je materiál anody, $M(\cdot OH)$ je hydroxylový radikál, který je adsorbovaný na povrchu anody [53, 54].

Proces je závislý především na materiálu použité anody. Pro elektrochemickou degradaci léčivých látek (včetně ibuprofenu) bylo testováno několik anod z různých materiálů, nejvyšších účinností degradace však bylo dosaženo při použití borem dopované diamantové elektrody jako anody [53].

A. Regalado-Méndez a kolektiv [2] provedli studii, ve které se zaměřili na elektrochemickou mineralizaci ibuprofenu pomocí dvou BDDE v elektrochemickém průtokovém reaktoru. Roztok použitý pro experiment obsahoval ibuprofen a síran sodný o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Během 7 hodin mineralizace ibuprofenu bylo dosaženo hodnoty účinnosti 91,6 % [2].

V rámci další studie byla degradace ibuprofenu prováděná na Ti/Pt/PbO₂ a Si/BDD elektrodách. Tyto zmíněné elektrody byly použity jako anody, katodu tvořila folie z nerezové oceli. Základní elektrolyt tvořil roztok síranu sodného o koncentraci $0,035 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Degradace ibuprofenu byla sledována pomocí UV-VIS spektrofotometru, měřením hodnoty celkového organického uhlíku a stanovením chemické spotřeby kyslíku. Bylo zjištěno, že mineralizace léčivé látky ibuprofen je velmi efektivní za použití obou typů materiálů anody [55].

Anodickou oxidaci ibuprofenu zkoumali také S. L. Ambuludi a kolektiv [53]. Pro měření využili platinu či borem dopovanou diamantovou elektrodu jako anodu, katodu tvořila uhlíková plst'. Při použití BDDE jako anody bylo dosaženo vyšší rychlosti degradace ibuprofenu, což bylo způsobeno tím, že na BDDE dochází k větší produkci hydroxylových radikálů. Hydroxylové radikály zůstávají na povrchu BDDE volné,

naopak na povrchu platiny jsou tyto radikály vázány chemisorpcí, což má za následek pomalejší a selektivnější reakci s molekulou analytu. Degradace ibuprofenu na borem dopované diamantové elektrodě probíhala dle kinetiky pseudoprvního řádu a bylo zjištěno, že rychlostní konstanta reakce rostla s vyšším aplikovaným proudem. Při vyšších aplikovaných proudech však docházelo také k zesílení vývoje kyslíku. Na rychlostní konstantu měla také pozitivní vliv výměna síranu sodného jako základního elektrolytu za chlorid sodný. Účinnost mineralizace ibuprofenu byla měřena hodnotou celkového organického uhlíku (TOC). Pro sledování a kvantifikaci meziproduktů reakce byly použity chromatografické metody. Aromatické meziprodukty reakce byly sledovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Autoři identifikovali v malém množství celkem čtyři aromatické meziprodukty, a to p-benzochinon, 4-isobutylfenon, 1-(1-hydroxyethyl)-4-isobutylbenzen a 4-isobutylacetofenon [53].

Za pomoci iontové chromatografie bylo také identifikováno pět karboxylových kyselin jako hlavních meziproduktů mineralizace. Jednalo se o kyselinu šťavelovou, glyoxalovou, mravenčí, octovou a pyrohroznovou, následně byly tyto karboxylové kyseliny mineralizovány na oxid uhličitý a vodu [53].

Byla také zkoumána degradace ibuprofenu za využití Fentonovy reakce. Tento proces využívá reakce peroxidu vodíku s železnatými ionty ke vzniku hydroxylových radikálů, které následně reagují s molekulou analytu. Autoři použili 3D grafitovou plstěnou elektrodu jako katodu, jako anoda byla vyzkoušena BDDE a platinová elektroda. Účinnost degradace ibuprofenu byla ovlivněna koncentrací železnatých iontů, velikostí aplikovaného proudu a také materiálem anody [56].

Ch. Wang a kolektiv [57] se zabývali degradací ibuprofenu na titanových elektrodách pokrytých třemi různými kovovými oxidy. Tyto elektrody byly použity jako anody, katodu tvořil čistý titan. Degradace probíhala vždy dle kinetiky pseudoprvního řádu. Autoři také navrhli možný mechanismus elektrochemické mineralizace léčiva a identifikovali šest aromatických meziproduktů reakce [57].

2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se řadí mezi separační analytické metody. Princip chromatografických technik spočívá v distribuci analytu mezi dvě nemísitelné fáze – tedy mezi stacionární fází a mobilní fází. Vzorek je unášen kapalnou mobilní fází

skrz fázi stacionární. K separaci dochází na základě rozdílné interakce jednotlivých složek vzorku se stacionární, respektive mobilní fází. Pokud složka vzorku tvoří silné interakce se stacionární fází, je silněji zadržována a prodlouží se její retence. Naopak složky vzorku, které netvoří žádné interakce se stacionární fází eluují s mrtvým časem [58].

Pro separaci se v dnešní době nejčastěji využívá chromatografie na reverzní fázi. Stacionární fáze má v tomto uspořádání nepolární charakter a interakce s analyty je zprostředkována slabými disperzními silami. Naopak jako mobilní fáze je využívána směs vody a polárního organického činidla, které je dobře mísitelné s vodou [58].

Pokud je separace prováděna pomocí izokratické eluce, složení mobilní fáze se v průběhu separace nemění, eluční síla mobilní fáze je tedy v celém průběhu separace konstantní. Další možností je provádět separaci za použití gradientové eluce. V tomto případě dochází v průběhu separace ke změně poměru jednotlivých složek mobilní fáze, což má za následek ovlivnění eluční síly. Gradientovou eluci je vhodné použít při separaci složitějších vzorků [58, 59].

HPLC je možné propojit s mnoha využívanými detekčními technikami, nejčastěji jsou ovšem využívány spektrofotometrické detektory a hmotnostní spektrometr. Mezi spektrofotometrické detektory se řadí také PDA (detektory s diodovým polem) detektory, které dokáží snímat celé UV-VIS spektrum v reálném čase, aniž by bylo nutné přerušit chromatografickou separaci. Princip těchto detektorů spočívá v měření nabíjecího proudu potřebného k nabíjení kondenzátorů jednotlivých fotodiod. Při dopadu světla na fotodiodu dojde k vybití kondenzátoru, kdy velikost vybití kondenzátoru je úměrná intenzitě dopadajícího světla [58].

UHPLC (ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie) se od klasické HPLC liší převážně velikostí částic stacionární fáze. Zatímco pro HPLC se obvykle využívá stacionárních fází s velikostí částic 3 μm a 5 μm , v UHPLC je velikost částic menší než 2 μm . Díky tomu je dosaženo vyšší účinnosti separace, zkrácení doby analýzy a také vyššího rozlišení píků. S klesající velikostí částic ovšem roste tlak v systému, separace je tedy prováděna za velmi vysokých tlaků [58].

2.6 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) se řadí mezi pulsní voltametrické metody. Princip těchto metod spočívá v měření proudu, který prochází elektrochemickým článkem, dle vloženého napětí. V průběhu měření vkládaný potenciál lineárně roste a jsou na něj vkládány napěťové pulsy. Tyto pulsy jsou velmi rychlé (v řádech desítek ms) a jejich amplituda je nejčastěji v rozmezí 10 mV až 100 mV. Procházející proud pak není měřen kontinuálně, ale jeho hodnota je zaznamenána těsně před vložením napěťového pulsu a následně těsně před jeho ukončením. Rozdíl těchto dvou hodnot procházejícího proudu je poté vynášen v závislosti na vloženém napětí. Získaný signál má tvar píku, jehož výška udává kvantitativní informaci o sledovaném analytu a poloha píku na potenciálové ose nese informaci kvalitativní. Výhodou DPV je minimalizace vlivu nabíjecího proudu a také vyšší citlivostí metody, která je dána větším poměrem signálu a šumu [59,60].

Pro voltametrická měření je využíváno převážně tříelektrodové zapojení, tvořené pracovní elektrodou, referenční elektrodou a elektrodou pomocnou. Potenciál pracovní elektrody je měněn s časem a její povrch by měl být co nejmenší, aby byla elektroda co nejvíce polarizovatelná. Proud tedy prochází mezi elektrodou pracovní a elektrodou pomocnou. Pomocnou elektrodu často tvoří platinový plíšek, jehož povrch by měl být naopak co největší, díky čemuž se pomocná elektroda stane prakticky nepolarizovatelnou. Jako referenční elektrody jsou využívány elektrody druhého druhu a jejich potenciál se v průběhu měření nemění [59, 61].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie, přístroje a materiál

3.1.1 Chemikálie

Ethanol >99,7 %, čistota pro HPLC, gradient grade, CHROMANORM, Francie

Acetonitril, čistota pro HPLC LC-MS, CHROMANORM, Spojené státy americké

Deionizovaná voda Milli-Q plus (18,2 MΩcm), Millipore, Spojené státy americké

Ibuprofen (kyselina 2-(4-Isobutylphenyl)propionová), Zentiva, Česká republika

Kyselina mravenčí >99 %, čistota pro LC-MS, CHROMANORM, Velká Británie

Kyselina sírová 96 % P.A., Lach:ner, Česká republika

Methanol, čistota pro LC-MS, CHROMANORM, Norsko

Síran sodný bezvodý, LACHEMA n.p. Brno (závod Neratovice), Česká republika

3.1.2 Přístroje a materiál

Analytické váhy, 262 SMA-FR, Sartorius, Švýcarsko

Borem dopovaná diamantová elektroda (L19021), plocha 1 cm², poměr dopování B/C = 230 000 ppm, Fyzikální ústav akademie věd České republiky (skupina Andrew Taylora) [62]

Borem dopovaná diamantová elektroda, průměr disku 3 mm, poměr dopování B/C 500-1000 ppm, BioLogic, SAS, Francie

Kapalinový chromatograf, Waters Acquity UHPLC H Class, Spojené státy americké (software Empower® 3)

Kolona Kinetex C₁₈, Phenomenex, 100×2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, Spojené státy americké

Laboratorní zdroj OWON, model P4603, Čína

pH metr, JENWAY 3540 pH/conductivity metr, Velká Británie

Platinová elektroda, plocha odhaleného povrchu 20 mm², Monokrystaly, Česká republika

Eco-Tribo Polarograf, Polaro-Sensors, Praha, Česká republika (software PolarPro verze 5.1)

Referenční argentchloridová elektroda mini ($c_{\text{KCl}} = 3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), Monokrystaly, Česká republika

Ultrazvukový sonikátor, Elma S15, Elmasonic, Německo

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava roztoků ibuprofenu v ethanolu

Do odměrné baňky o celkovém objemu 10 ml byl připraven zásobní roztok ibuprofenu v ethanolu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo odváženo 0,021 g ibuprofenu, odvážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno ultra čistým ethanolem po rysku.

Pro vývoj chromatografické metody byl použit roztok ibuprofenu v ethanolu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro přípravu tohoto roztoku byl použit již připravený zásobní roztok ibuprofenu v ethanolu ($c = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Do odměrné baňky bylo odpipetováno 100 μl zásobního roztoku a baňka byla doplněna ultra čistým ethanolem na celkový objem 10 ml.

Všechny připravené roztoky ibuprofenu v ethanolu byly uchovávány v lednici.

3.2.2 Příprava roztoků kyseliny sírové

Roztok kyseliny sírové o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven zředěním koncentrované 96% kyseliny sírové deionizovanou vodou. Do odměrné baňky o celkovém objemu 100 ml bylo odpipetováno 2,8 ml koncentrované kyseliny sírové a odměrná baňka byla doplněna na celkový objem deionizovanou vodou. Následně byl roztok přefiltrován přes mikrofiltr s velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$ (Econofiltr Nyln 25 mm).

3.2.3 Příprava roztoku síranu sodného

Byl připraven roztok síranu sodného o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bylo odváženo 3,551 g pevného síranu sodného, který byl v 50 ml odměrné baňce následně rozpuštěno ve zhruba 45 ml deionizované vody. Roztok byl poté vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně. Po vyjmutí z lázně byl roztok doplněn deionizovanou vodou na celkový objem 50 ml a přefiltrován přes mikrofiltr (velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$, Econofiltr Nyln 25 mm). Roztok byl uchováván v lednici

3.2.4 Příprava roztok základního elektrolytu

Jako základní elektrolyt byla použita směs $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo odpipetováno 10,0 ml roztoku $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny sírové (viz kap. 2.2.2), 10,0 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ síranu

sodného (viz kap. 2.2.3) a 5,0 ml ultra čistého ethanolu. Objem odměrné baňky byl doplněn deionizovanou vodou.

3.2.5 Příprava kalibračních roztoků v základním elektrolytu

Pro ověření linearity chromatografické metody byly připraveny kalibrační roztoky ibuprofenu v základním elektrolytu, a to v koncentračním rozsahu $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro přípravu byly použity odměrné baňky o celkovém objemu 5 ml. Kalibrační roztoky s koncentrací léčivé látky ibuprofen v rozsahu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny tak, že do každé baňky byl odpipetován 1,0 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$, 1,0 ml $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, potřebné množství zásobního roztoku ibuprofenu v ultra čistém ethanolu ($c = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a takové množství ethanolu, aby celkový objem ethanolu v odměrné baňce tvořil 10 % (obj.). Kalibrační roztoky o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny ředěním kalibračního roztoku o nejnižší koncentraci roztokem základního elektrolytu.

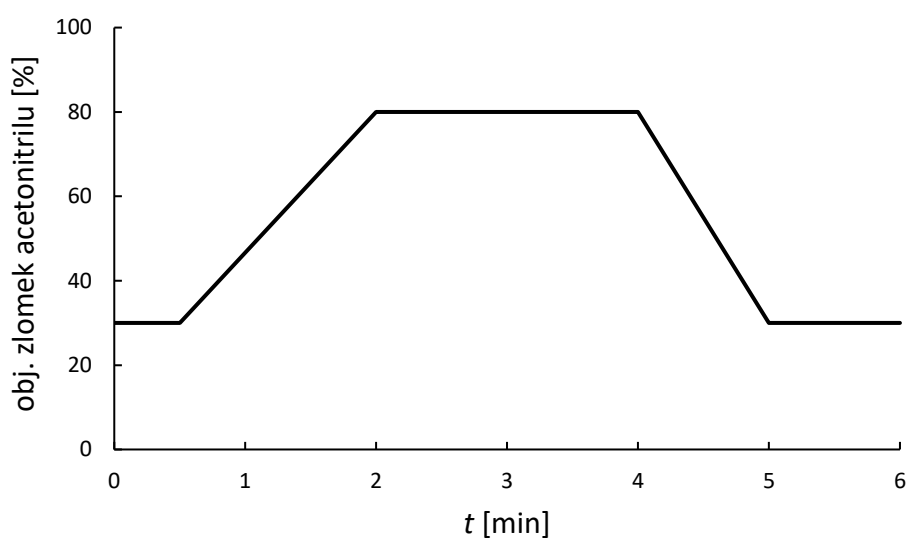
Pro ověření linearity voltametrické metody byly připraveny kalibrační roztoky pouze v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Příprava roztoků probíhala stejným způsobem, pouze ve dvojnásobném množství. Objem odměrných baněk byl 10 ml a všechna pipetovaná množství jednotlivých složek roztoku byla dvojnásobná. Všechny kalibrační roztoky byly uchovávány v lednici.

3.3 UHPLC metoda

Pro UHPLC metodu byla použita kolona Kinetex C₁₈ (Phenomenex), s rozměry 100×2,1 mm a s velikostí částic 1,7 μm. Mobilní fáze obsahovala organickou a vodnou složku. Jako organická složka byl použit acetonitril (složka A), vodnou složku tvořila deionizovaná voda (složka B). Poměr složek mobilní fáze se v průběhu stanovení měnil dle gradientového programu, který je zaznamenán v Tabulce 1 a na Obrázku 3.

Tabulka 1 - Průběh gradientového programu UHPLC metody

Čas [min]	Acetonitril [%] (obj.)	Voda [%] (obj.)
0-0,5	30	70
0,5-2	80	20
2-4	80	20
4-5	30	70
5-6	30	70



Obrázek 3 - Průběh gradientového programu UHPLC metody

Pro vyhodnocení byl použit PDA detektor, který snímal spektrum při vlnové délce 220 nm. Další nastavené podmínky chromatografického měření:

- Průtoková rychlost mobilní fáze: $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- Nástřik vzorku: $1 \mu\text{l}$
- Teplota kolony: laboratorní
- Teplota dávkovače vzorku: laboratorní
- Celková doba analýzy: 6 min

3.4 Voltametrická metoda

Voltametrické stanovení léčivé látky ibuprofen bylo prováděno v tříelektrodovém zapojení, kdy byla jako pracovní elektroda použita disková BDD elektroda (průměr disku 3 mm), referenční elektroda byla elektroda argentschloridová a pomocnou elektrodu tvořil

platinový plíšek (plocha odhaleného povrchu 20 mm²). Jako základní elektrolyt byl zvolen roztok obsahující 0,1 mol·dm⁻³ H₂SO₄, 0,1 mol·dm⁻³ Na₂SO₄ a 10 % (obj.) ethanolu.

Pro ověření oxidace ibuprofenu byla použita cyklická voltametrie (CV). Měření bylo prováděno v rozmezí potenciálového okna -400 mV až +2000 mV a rychlost skenu byla 100 mV·s⁻¹.

Pro vývoj voltametrické metody a stanovení léčivé látky ibuprofen byla využita metoda DPV. Nastavené parametry metody byly: výška pulzu +50 mV, šířka pulsu 100 ms, vzorkovací čas 20 ms, rychlost skenu 20 mV·s⁻¹ a rozmezí potenciálového okna +1000 mV až +1900 mV. Byla použita metoda s regenerací, kdy byl před každým měřením na elektrodu vložen potenciál +2,5 V po dobu 30 sekund. Regenerace pracovní elektrody probíhala v míchaném roztoku.

Pracovní elektroda byla na začátku dne před měřením vždy aktivována. Aktivace probíhala v míchaném roztoku základního elektrolytu a na elektrody byl vložen potenciál +2,5 V po dobu 10 minut.

3.5 Částečná validace vyvinutých metod

Vyvinuté metody (chromatografická a voltametrická metoda) pro stanovení léčivé látky ibuprofen byly částečně validovány. Byla měřena linearita, opakovatelnost, limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ) vyvinutých metod.

Linearita obou vyvinutých metod byla ověřena metodou kalibračních roztoků a pro vyhodnocení byl vždy použit medián získaných hodnot. Chybové úsečky v koncentrační závislosti odpovídají směrodatné odchylce měření. Linearita UHPLC metody byla ověřena v rozsahu koncentrací 2·10⁻⁶ mol·dm⁻³ až 1,3·10⁻⁴ mol·dm⁻³ a každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Linearita voltametrické metody byla ověřena pouze v rozsahu koncentrací 1·10⁻⁵ mol·dm⁻³ až 1,3·10⁻⁴ mol·dm⁻³, každá koncentrační hladina byla proměřena pětkrát.

Pro ověření opakovatelnosti vyvinutých metod byla vybraná koncentrační hladina kalibračního roztoku proměřena patnáctkrát a stanovené hodnoty koncentrace ibuprofenu byly statisticky vyhodnoceny.

Pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti vyvinutých metod byl použit vztah:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m}, \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m}, \quad (3)$$

kde h_n je maximální rozpětí hodnot šumu základní linie a m je směrnice kalibrační přímky z výšky píku [63].

3.6 Elektrochemická degradace

Elektrochemická degradace léčivé látky ibuprofen probíhala ve vsádkové cele a pro měření bylo použito dvouelektrodové uspořádání. Pracovní elektrodu tvořila BDDE, která byla zabudována na dno degradační cely. Efektivní povrch pracovní elektrody byl $50,3 \text{ mm}^2$ (úroveň dopování $230\,000 \text{ ppm}$ [62]). Jako pomocná elektroda byl použit platinový plíšek o ploše 20 mm^2 .

Pro sledování degradace ibuprofenu byl použit kalibrační roztok o nevyšší koncentraci léčiva, tedy roztok o složení: $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ + 10 % (obj.) ethanolu. Celkový objem roztoku v degradační cele byl 2,0 ml. Degradace léčiva probíhala v míchaném roztoku po dobu 5 minut při vloženém napětí +2,0 V. V případě, že nebylo možné vzorek zanalyzovat ihned po degradaci, byl vzorek před samotným stanovením uchováván v mrazáku.

Na začátku dne byla provedena aktivace pracovní elektrody. Aktivace probíhala v míchaném roztoku $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ při vloženém napětí +4,0 V po dobu 20 minut. Aktivace elektrody byla prováděna stejným způsobem také mezi jednotlivými degradacemi, doba aktivace byla ovšem pouze 5 minut.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Příprava roztoku ibuprofenu

Léčivá látka ibuprofen je prakticky nerozpustná ve vodě [13], bylo tedy nutné pro léčivo zvolit jiné vhodné rozpouštědlo. Na základě vysokých hodnot rozpustnosti ibuprofenu v ethanolu [3] a studie, kterou provedla A. B. Lima a kolektiv [30] a která se zabývala voltametrickým stanovením ibuprofenu na BDDE, byl jako rozpouštědlo ibuprofenu zvolen ultra čistý ethanol. Byl připraven zásobní roztok ibuprofenu v ethanolu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl následně použit pro přípravu kalibračních roztoků (příprava viz kapitola 3.2.1).

Stejným způsobem byl také připraven zásobní roztok ibuprofenu v methanolu o stejné koncentraci – tedy $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Cílem bylo otestovat, zda methanol nebude pro elektrochemické stavení léčiva stejně vhodný či dokonce lepší než ethanol. Roztok ibuprofenu v methanolu byl použit při optimalizaci složení základního elektrolytu v rámci vývoje voltametrické metody pro stanovení ibuprofenu.

4.2 Vývoj voltametrické metody

Pro voltametrická měření bylo na základě literární rešerše [30] zvoleno tříelektrodové uspořádání, kdy jako pracovní elektroda byla použita BDD elektroda.

Hlavním cílem v rámci vývoje voltametrické metody bylo nalézt podmínky, při kterých by bylo možné voltametricky stanovit množství léčiva a současně jej ve stejném roztoku elektrochemicky degradovat. Jako stěžejní tedy bylo především optimalizovat složení základního elektrolytu.

4.2.1 Optimalizace složení základního elektrolytu

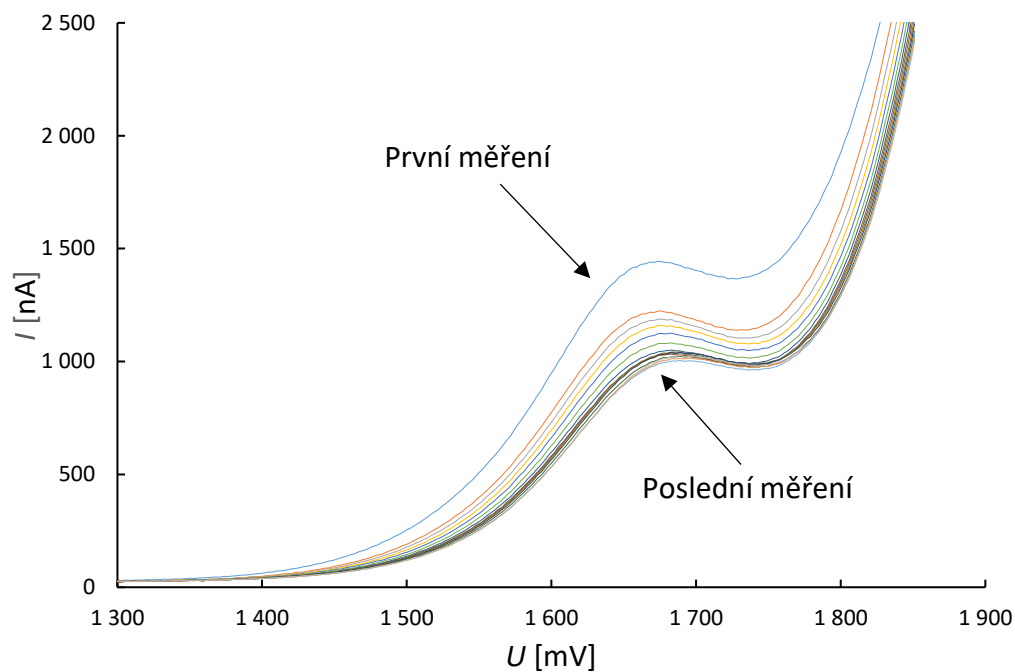
Při optimalizaci složení základního elektrolytu bylo vždy do měřicí cely odpipetováno 10,0 ml testovaného roztoku základního elektrolytu. Následně bylo přidáno 100 μl roztoku ibuprofenu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěného v daném rozpouštědle. Celková koncentrace ibuprofenu v měřicí cele tedy byla $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V průběhu optimalizace složení základního elektrolytu bylo vycházeno ze studií popisujících jak elektrochemickou degradaci ibuprofenu, tak také jeho voltametrické stanovení. A. B. Lima a kolektiv [30] popsali elektrochemické stanovení ibuprofenu na BDDE, kdy jako základní elektrolyt použili roztok složený z $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$

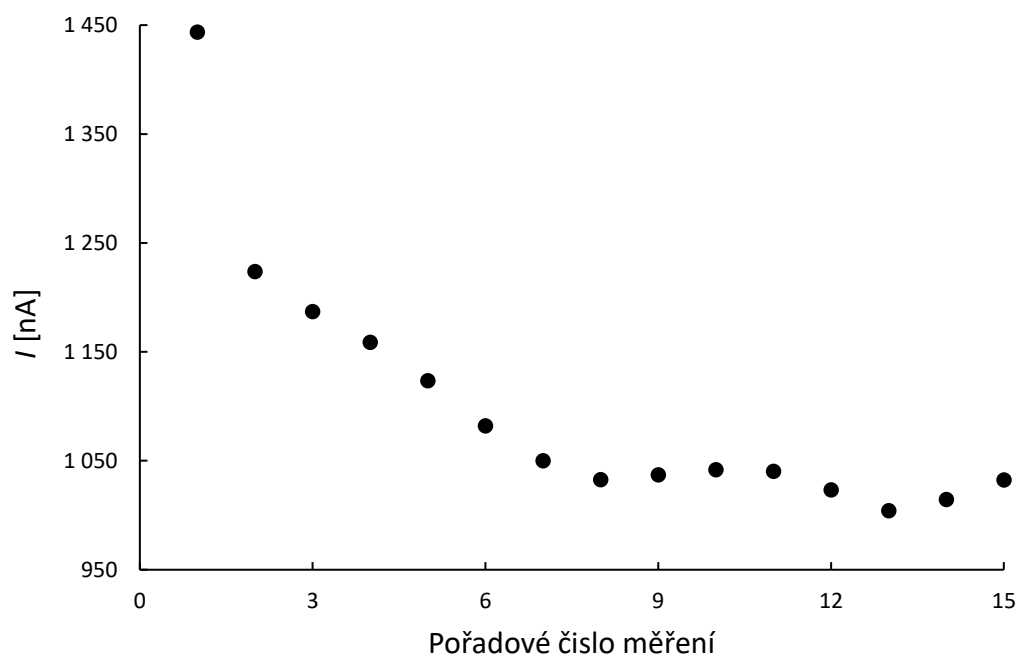
(obj.) ethanolu. První měření byla tedy provedená ve stejném základním elektrolytu. Oxidace ibuprofenu byla ověřena pomocí cyklické voltametrie, kdy byl oxidační pík náležící ibuprofenu v cyklickém voltamogramu detegován při potenciálu +1,8 V. Pro všechna další měření byla použita metoda DPV. Byl proveden experiment dle popsaných podmínek ve zmíněné studii [30] a bylo testováno, zda bude získán měřitelný signál, což by potvrzovalo funkčnost metody i přístroje. Pro měření byl použit ibuprofen rozpuštěný v methanolu a pík náležící léčivu byl detekován při potenciálu +1,7 V.

Ve studiích popisujících elektrochemickou degradaci ibuprofenu byl často jako základní elektrolyt použit roztok síranu sodného [2, 53, 55, 56], z toho důvodu byla další voltametrická měření provedena právě za použití síranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jako základního elektrolytu. Jako analyt byl použit ibuprofen rozpuštěný v methanolu.

Pík náležící ibuprofenu se nacházel při potenciálu +1,65 V. Oproti předchozímu měření, ve kterém byl jako základní elektrolyt použit roztok $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu, došlo k posunutí potenciálového okna k nižším hodnotám potenciálům, což vedlo k hůře odečitatelným píkům. Na vyhodnocení píku měl také negativní vliv měnící se obsah methanolu v měřící cele. Ibuprofen byl rozpuštěn v methanolu, s rostoucí koncentrací ibuprofenu tedy také rostl objem methanolu v základním elektrolytu, což mělo za následek zkrácení potenciálového okna k nižším hodnotám potenciálu. V průběhu patnácti měření také docházelo k pasivaci elektrody – viz Obrázek 4 a 5.



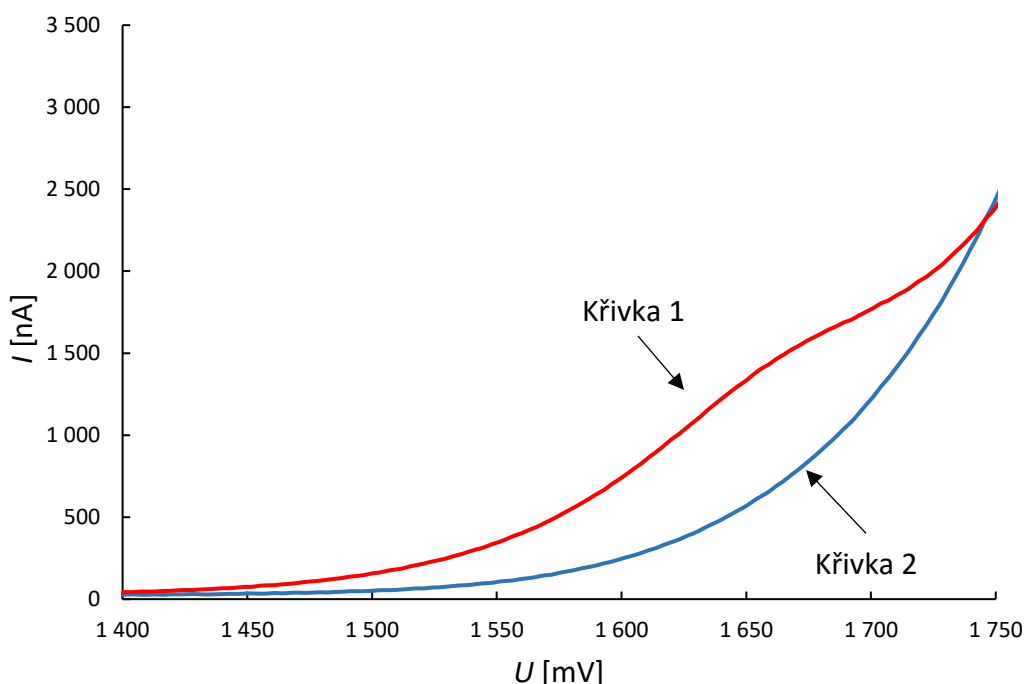
Obrázek 4 - DP voltamogramy $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu (rozpuštěný v methanolu) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ měřené na BDDE. Zobrazeno 15 opakovaných měření.



Obrázek 5 - Závislost proudu piku na pořadovém čísle měření

Aby nedocházelo k výrazné změně objemu methanolu v základním elektrolytu po přidávku roztoku ibuprofenu, bylo otestováno použití směsi obsahující $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) methanolu jako základního elektrolytu. Přidání methanolu do

základního elektrolytu mělo za následek další zkrácení potenciálového okna. Pík ibuprofenu již nebylo možné dobře vyhodnotit. Získaný voltamogram prvního měření je zobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6 - DP voltamogram $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu (rozpuštěný v methanolu) v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) methanolu – křivka 1. Křivka 2 - základní elektrolyt ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) methanolu). Měření na BDDE.

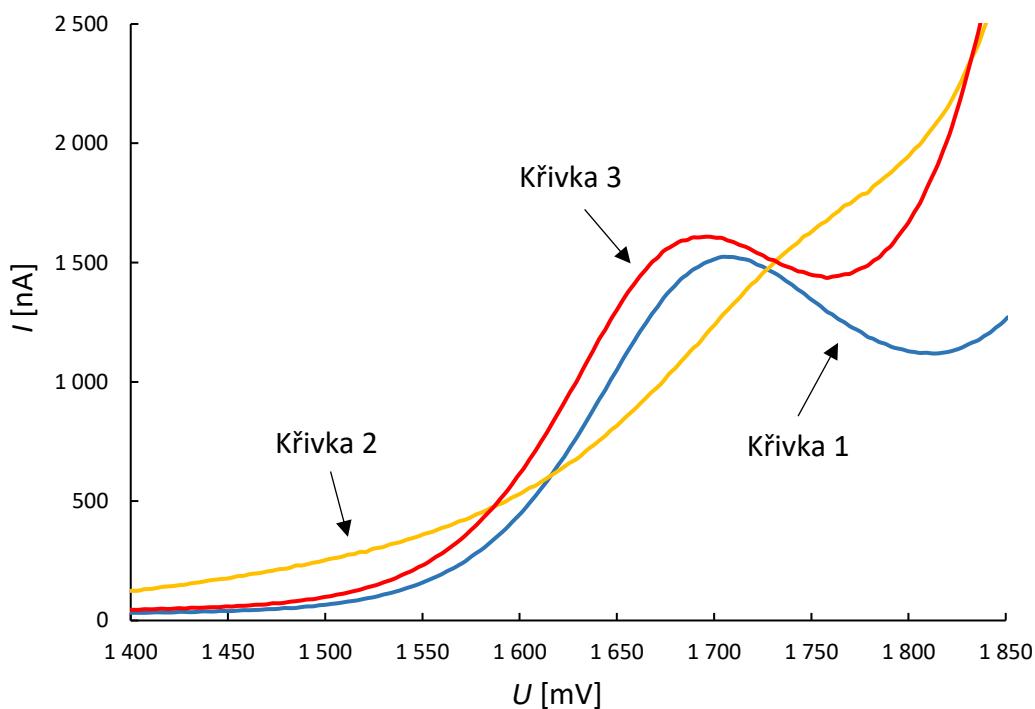
Při prvním měření (provedené dle popsání studie [30]), které ověřovalo funkčnost přístroje a metody, byly píky ibuprofenu dobře vyhodnotitelné. Jak již bylo zmíněno výše, autoři ve studii použili základní elektrolyt složený z $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Bylo tedy vyzkoušeno připravit roztok základního elektrolytu jako kombinaci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Při dání H_2SO_4 do základního elektrolytu bylo dosaženo rozšíření potenciálového okna k hodnotám vyšších kladných potenciálů a díky tomu bylo možné píky ibuprofenu lépe vyhodnotit.

Roztok základního elektrolytu obsahoval 10% (obj.) ethanolu, ibuprofen byl ovšem rozpuštěn v methanolu. V dalším kroku tedy bylo žádoucí sjednotit použitý alkohol. Z ekonomických důvodů bylo nejprve vyzkoušeno celé měření převést do methanolu. Byl připraven a proměřen základní elektrolyt o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) methanolu. Z důvodu posunu potenciálového okna k nižším

kladným hodnotám potenciálu nebylo možné pík náležící ibuprofenu spolehlivě vyhodnotit a nižší koncentrace ibuprofenu by nebylo možné vůbec detekovat.

Následně tedy bylo vyzkoušeno použít jako rozpouštědlo ibuprofenu i jako alkohol v základním elektrolytu ultra čistý ethanolu. Byl připraven zásobní roztok ibuprofenu rozpuštěného v ethanolu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a základní elektrolyt o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Pík náležící ibuprofenu se nacházel při potenciálu $+1,7 \text{ V}$ a ačkoli byl na konci potenciálového okna pracovní elektrody, bylo jej možné vyhodnotit.

Na Obrázku 7 jsou porovnány voltamogramy získané při optimalizaci použitého alkoholu jako rozpouštědla a složky základního elektrolytu, koncentrace ibuprofenu v roztoku byla vždy $c = 9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obrázek 7 – DP voltamogramy $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu získané při optimalizaci použitého alkoholu jako rozpouštědla ibuprofenu a složky základního elektrolytu. Křivka 1 - $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu (ibuprofen rozpuštěný v methanolu), křivka 2 - $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) methanolu (ibuprofen rozpuštěný v methanolu), křivka 3 - $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu (ibuprofen rozpuštěný v ethanolu). Měřené na BDDE.

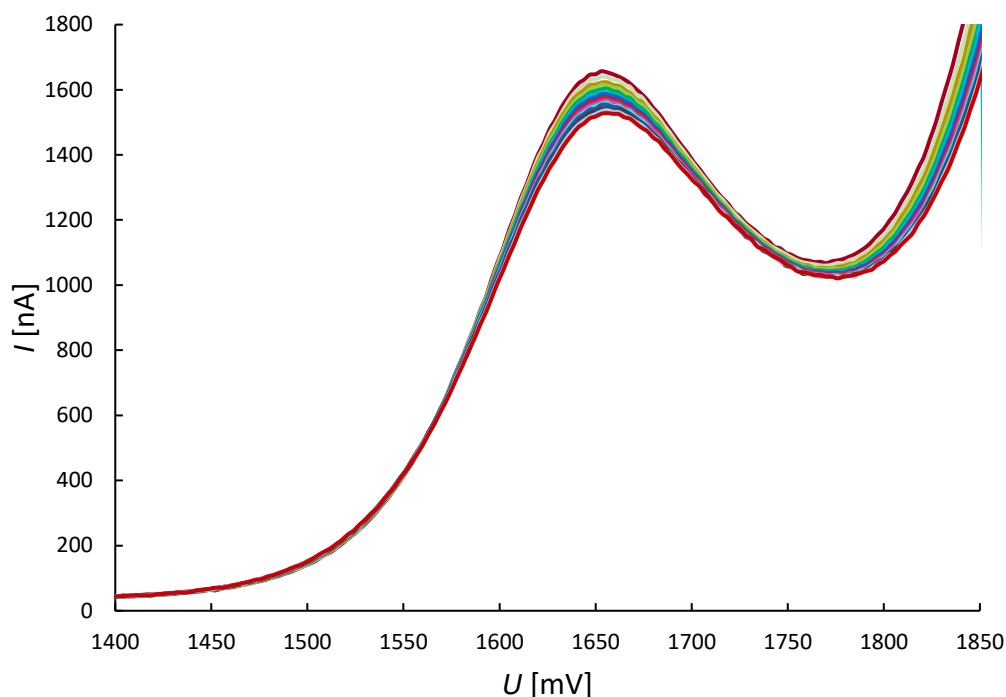
Jako další složení základního elektrolytu bylo vyzkoušeno proměřit roztok obsahující $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ a jako analyt byl použit ibuprofen rozpuštěný v ethanolu.

Na získaném voltamogramu nebyl pík ibuprofenu spolehlivě detekovatelný a vyhodnotitelný.

Nejlépe vyhodnotitelné píky ibuprofenu byly tedy získány při složení základního elektrolytu $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ \% (obj.) ethanolu}$ (viz Obrázek 7 – křivka 3). Následně byl studován vliv koncentrace H_2SO_4 v základním elektrolytu na polohu a vyhodnotitelnost píku. Byly testovány dvě koncentrace H_2SO_4 a to koncentrace $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Další složky základního elektrolytu byly neměnné, roztok tedy vždy obsahoval také $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ \% (obj.) ethanolu}$. Procházející proud náležící oxidačnímu píku ibuprofenu byl pro obě testované koncentrace H_2SO_4 v základním elektrolytu prakticky totožný. Při vyšší koncentraci kyseliny bylo pozorováno lehké prodloužení potenciálového okna. Získané píky náležící ibuprofenu v roztoku základního elektrolytu s koncentrací H_2SO_4 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly užší při základní linii, a i přes lehce kratší potenciálové okno pracovní elektrody byly píky ibuprofenu dobře vyhodnotitelné. Z toho důvodu byl jako optimální základní elektrolyt zvolen roztok, který obsahoval $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ \% (obj.) ethanolu}$.

4.2.2 Pasivace a aktivace pracovní elektrody

V průběhu několika následných měření docházelo k pasivaci elektrody, což mělo za následek, že měřený signál ibuprofenu se pro stejnou koncentraci léčiva ve vzorku postupně snižoval. Pro snížení vlivu pasivace elektrody bylo vyzkoušeno do metody měření vložit regeneraci pracovní elektrody. Regenerace probíhala před každým měřením přímo v analyzovaném roztoku. V průběhu regenerace elektrody byl roztok míchán. Na pracovní elektrodu byl vložen potenciál $+ 2,5 \text{ V}$ po dobu 30 sekund, následně byl potenciál snížen na počáteční hodnotu, bylo vypnuto míchání a po 5 sekundách bylo zahájeno měření. Pomocí regenerace pracovní elektrody bylo dosaženo výrazného snížení vlivu pasivace elektrody, a tedy snížení relativní směrodatné odchylky měření (viz Tabulka 2). Na Obrázku 8 jsou zobrazeny voltamogramy patnácti opakovaných měření pomocí metody s vloženou regenerací pracovní elektrody. Při sledování pasivace elektrody byla koncentrace ibuprofenu v měřící cele vždy $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obrázek 8 - DP voltamogramy patnácti měření $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu v roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu, měřeno metodou s regenerací BDDE

V Tabulce 2 jsou zaznamenány výsledky získané proměřením roztoku základního elektrolytu s koncentrací H_2SO_4 $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při použití metody s regenerací i metodou bez regenerace pracovní elektrody.

Tabulka 2 - Opakovatelnost proudu DP voltametričkého píku $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu v uvedených základních elektrolytech

$0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (v/v) ethanol		
	Průměrný proud [nA]	RSD [%]
metoda bez regenerace	425,8	25,4
metoda s regenerací	956,0	3,3
$1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (v/v) ethanol		
	Průměrný proud [nA]	RSD [%]
metoda bez regenerace	529,1	28,0
metoda s regenerací	951,2	4,5

Jako optimální základní elektrolyt pro voltametrické stanovení léčivé látky ibuprofen byl zvolen roztok o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Jako optimální metoda byla zvolena metoda s regenerací.

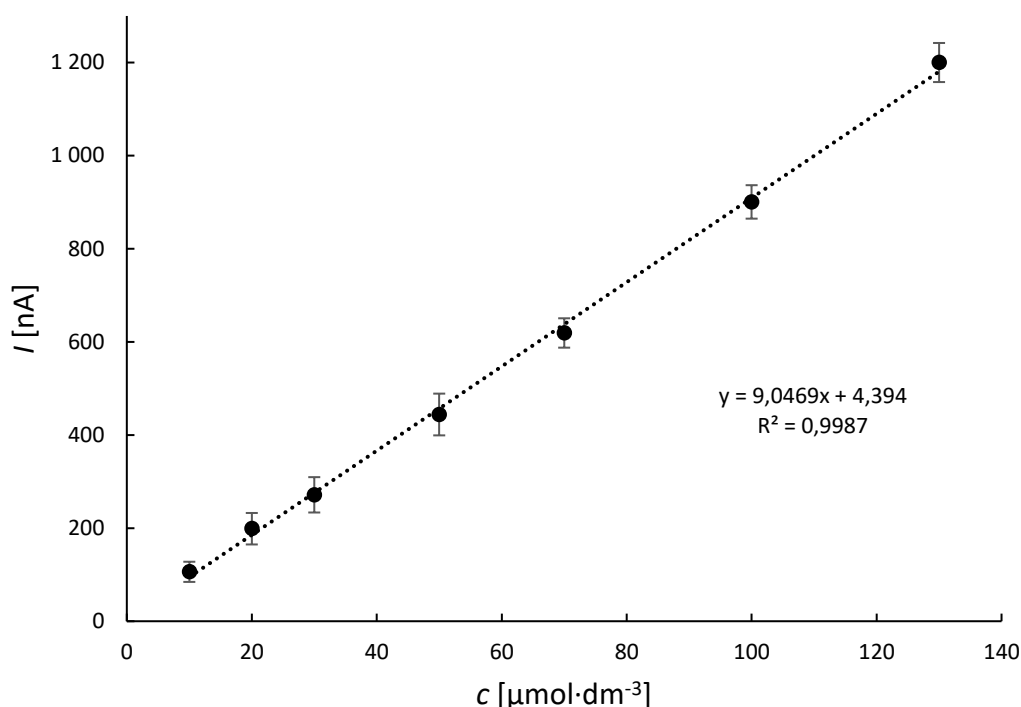
Pracovní elektroda byla aktivována vždy ráno před začátkem měření. Aktivace pracovní elektrody probíhala po dobu 10 minut při vloženém potenciálu +2,5 V. Při optimalizaci složení základního elektrolytu byl pro aktivaci na základě literatury ([30]) použit roztok obsahující $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Následně bylo ověřeno, že přítomnost $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ v aktivačním roztoku nemá negativní vliv na citlivost měření. Pro částečnou validaci voltametrické metody a všechna další měření byla aktivace pracovní elektrody prováděna přímo v optimalizovaném roztoku základního elektrolytu. Bylo také vyzkoušeno provést aktivaci elektrod v roztoku $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$, získané píky byli ovšem hůře vyhodnotitelné a oxidační proud léčiva byl nižší.

V průběhu optimalizace, částečné validace a také v průběhu samotného voltametrického měření bylo z technických důvodů použito několik druhů pracovních elektrod. Měření na různých pracovních BDDE od stejného výrobce poskytovala odlišné výsledky. Elektrody se lišily v rozsahu potenciálového okna, a jelikož byl oxidační pík ibuprofenu detekován při vysokých kladných potenciálech (+1,7 V), na některých elektrodách jej nebylo možné vyhodnotit. Citlivost stanovení ibuprofenu tedy závisela na použité pracovní elektrodě, což mělo vliv na stabilitu vyvíjené metody.

4.2.3 Částečná validace voltametrické metody

Opakovatelnost metody byla ověřena již v rámci optimalizace složení základního elektrolytu (viz Obrázek 8). Měření byla prováděna metodou s regenerací. Před začátkem měření byla pracovní elektroda aktivována v roztoku základního elektrolytu (+2,5 V, 10 minut), následně byl patnáctkrát proměřen roztok obsahující ibuprofen o koncentraci $9,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Získaná hodnota průměrného oxidačního proudu ibuprofenu byla stanovena na 956,0 nA, relativní směrodatná odchylka měření byla 3,3 %.

Linearita vyvinuté voltametrické metody pro stanovení ibuprofenu byla ověřena v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Získaná koncentrační závislost je zobrazena na Obrázku 9.



Obrázek 9 – koncentrační závislost léčivé látky ibuprofen v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu měřená pomocí DPV

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) voltametrické metody byl vypočítán ze šumu základní linie a pro výpočet byl použit vztah (2) a (3). Hodnota LOD byla stanovena na $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, hodnota LOQ na $25,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Všechny stanovené koncentrace kalibračních roztoků pro koncentrační závislost byly nad hodnotou limitu detekce metody. Dvě nejnižší koncentrace kalibračních roztoků ($1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byly pod limitem kvantifikace metody.

4.3 Vývoj UHPLC metody

V literatuře je popsáno velké množství metod pro stanovení ibuprofenu. Často se jednalo o metody, kdy bylo stanovováno více látek současně [19–25], nebo byl ibuprofen přítomen ve složité matici – například v krevní plazmě [28].

4.3.1 Podmínky separace

Většina publikovaných metod pro stanovení ibuprofenu bylo prováděno na oktadecylové koloně, pro stanovení tedy byla zvolena kolona Kinetex C_{18} . Pro vývoj UHPLC metody a pro optimalizaci podmínek chromatografického stanovení byl použit

roztok ibuprofenu v ethanolu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (příprava viz 3.2.1). Pro vyhodnocení byl použit PDA detektor, kdy vlnová délka snímaného spektra byla 220 nm. Při této vlnové délce byl signál léčivé látky maximální. Další nastavené parametry metody: průtok - $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nástřik vzorku - $1 \mu\text{l}$, teplota kolony - laboratorní.

Jako první testovaná mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody, stanovení probíhalo v režimu izokratické eluce. Poměr jednotlivých složek mobilní fáze byl nastaven na 50/50 objemových procent. Celkový čas analýzy byl 10 minut. Pík náležící léčivé látce ibuprofen eluoval s retenčním časem 3,2 min, měl však poměrně širokou základnu, nebyl symetrický a chvostoval. Z tohoto důvodu byla vyzkoušena gradientová eluce. Bylo testováno několik gradientových programů, které se lišily rychlostí změny složení mobilní fáze a celkovou dobou analýzy. Použití gradientové eluce vedlo ke snížení šířky píku při základní linii, což mělo za následek, že získaný pík ibuprofenu byl vyšší. Zvolený optimální gradientový program pro stanovení léčivé látky ibuprofen je zaznamenán v Tabulce 3.

Tabulka 3 – Gradientový program pro stanovení léčivé látky ibuprofen

Čas [min]	Acetonitril [%] (obj.)	Voda [%] (obj.)
0-0,5	30 %	70 %
0,5-2	80 %	20 %
2-4	80 %	20 %
4-5	30 %	70 %
5-6	30 %	70 %

Retenční čas ibuprofenu při optimálním gradientovém programu byl 3,7 minut, celkový čas analýzy byl 6 minut.

V literatuře byla také popsána metoda, kdy pro stanovení ibuprofenu byla jako mobilní fáze použita směs 0,1 % (obj.) kyselina mravenčí a acetonitrilu [17]. Léčivá látka ibuprofen obsahuje karboxylovou skupinu, která může v závislosti na pH disociovat. Hodnota pK_A karboxylové skupiny ibuprofenu je 4,91 [1]. V dalším měření tedy bylo vyzkoušeno použít jako mobilní fázi směs acetonitrilu + 0,1 % (obj.) kyselinu mravenčí a deionizované vody + 0,1 % (obj.) kyselinu mravenčí. Hodnota pH vodní složky mobilní

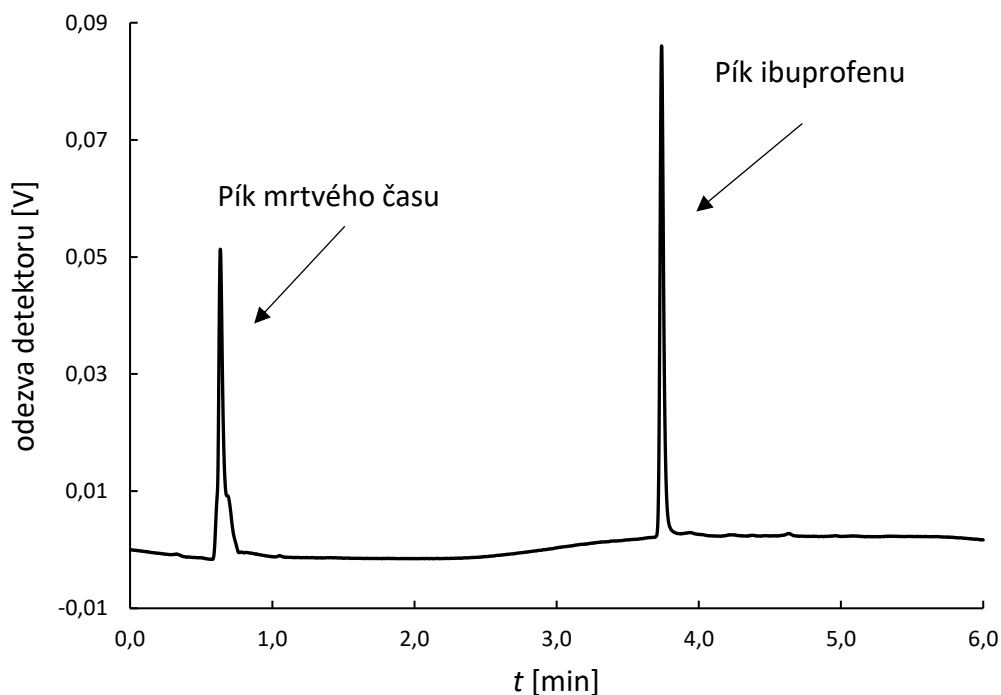
fáze byla stanovena na hodnotu 2,6. Při této hodnotě pH lze předpokládat, že karboxylová skupina ibuprofenu byla protonovaná.

První měření v mobilní fázi obsahující kyselinu mravenčí byla prováděna v režimu izokratické eluce. Poměr jednotlivých složek mobilní fáze byl nastaven na 50/50 % (obj.). Získaný pík ibuprofenu eluoval v retenčním čase 3,4 min., byl ovšem rozmytý a velmi široký při základní linii. Při porovnání s chromatogramem získaným při izokratické eluci bez přídavku kyseliny mravenčí do mobilní fáze nebyl ve tvaru píku pozorován žádný výrazný rozdíl.

Další měření byla prováděna pomocí gradientové eluce. Získané píky náležící ibuprofenu méně chvostovaly, byly ovšem také velmi podobné píkům získaných pomocí stejného gradientového programu bez použití 0,1 % kyseliny mravenčí v mobilní fázi. Přidání kyseliny mravenčí do mobilní fáze mělo však za následek více zvlněnou základní linii a větší šum. Jelikož přidáním kyseliny mravenčí do mobilní fáze nedošlo k výraznému zlepšení tvaru píku, ale došlo k většímu zvlnění základní linie a šumu, byla jako optimální mobilní fáze zvolena směs čistého acetonitrilu a deionizované vody. Jako optimální gradientový program byl zvolen gradientový program shrnutý v Tabulce 3.

Následně byl připraven a proměřen roztok ibuprofenu v základním elektrolytu, tedy v roztoku o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ \% (obj.) ethanolu}$. Na základě shody retenční časů bylo ověřeno, že získaný pík v roztoku základního elektrolytu náleží ibuprofenu. Další složky přítomné v roztoku základního elektrolytu eluovaly s mrtvým časem metody.

Na Obrázku 10 je zaznamenán získaný chromatogram roztoku ibuprofenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v základním elektrolytu při nastavených optimálních parametrech metody (napětí měřené detektorem je úměrné absorbanci záření při dané vlnové délce).



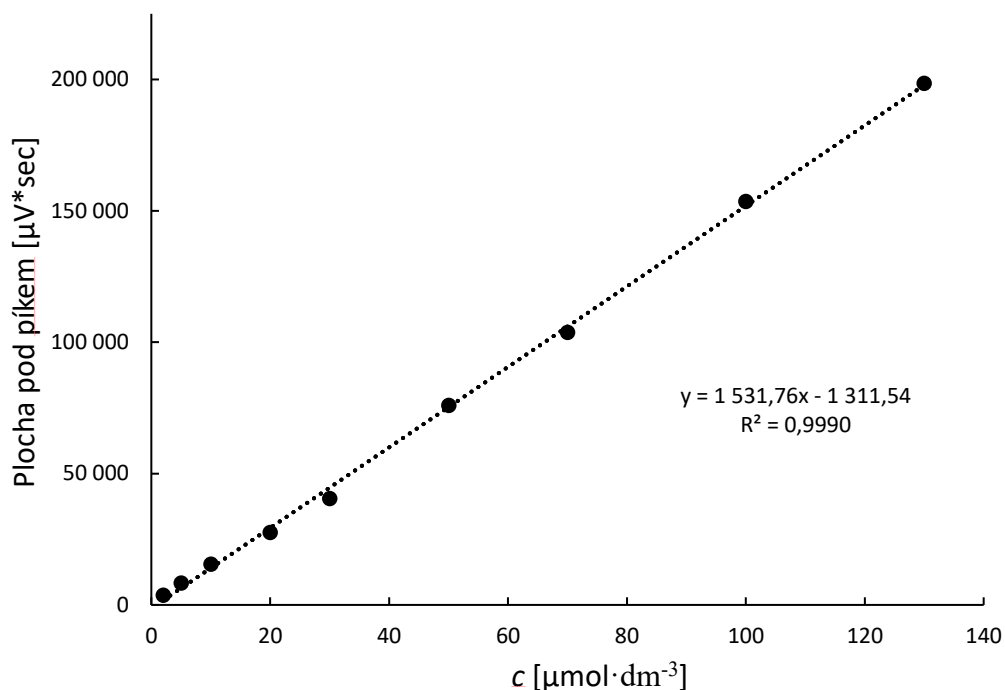
Obrázek 10 - Chromatogram $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ibuprofenu v roztoku $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu, měřeno za optimálních podmínek

4.3.2 Ověření stability ibuprofenu

Byla ověřena stálost ibuprofenu v roztoku základního elektrolytu po dobu 24 hodin. Pro ověření byl použit roztok o koncentraci ibuprofenu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla zjištěna koncentrace ibuprofenu a následně byl roztok ponechán po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí dané doby byla opět chromatograficky stanovena koncentrace ibuprofenu. Relativní změna stanovené koncentrace byla 3 %. Lze tedy předpokládat, že léčivá látka ibuprofen je po dobu 24 hodin v roztoku základního elektrolytu stabilní.

4.3.3 Částečná validace chromatografické metody

V rámci částečné validace vyvinuté chromatografické metody byla ověřena linearita metody v koncentračním rozsahu $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla použita metoda kalibračních roztoků a každá koncentrační úroveň byla proměřena třikrát. Pro vyhodnocení byl použit medián získaných hodnot. Získaná koncentrační závislost je zobrazena na Obrázku 11.



Obrázek 11 - Koncentrační závislost léčivé látky ibuprofen v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu měřená pomocí UHPLC

Pro ověření opakovatelnosti metody byl patnáctkrát proměřen kalibrační roztok o koncentraci ibuprofenu $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Relativní směrodatná odchylka získaných hodnot ploch pod píkem byla stanovena na hodnotu 0,3 %.

Dle vztahu (2) a (3) byl určen LOD a LOQ vyvinuté chromatografické metody. Limit detekce metody byl stanoven na hodnotu $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, limit kvantifikace na hodnotu $1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

4.4 Elektrochemická degradace

Pro elektrochemickou degradaci léčivé látky ibuprofen byla použita vsádková cela. Do degrační cely byly vždy odpipetovány 2,0 ml roztoku pro degradaci. Roztok pro degradaci obsahoval ibuprofen o koncentraci $1,3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} + 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu.

Při elektrochemické degradaci ibuprofenu probíhá současně oxidace léčiva na povrchu elektrody a oxidace hydroxylovými radikály i mimo difuzní vrstvu elektrody. Míra degradace je ovlivněna jak hodnotou vloženého napětí, tak i délkou degradace. Oba tyto parametry byly za využití vyvinuté UHPLC metody následně optimalizovány.

4.4.1 Vliv materiálu těsnění na degradaci ibuprofenu

V průběhu prvních měření bylo zjištěno, že koncentrace ibuprofenu v degradační cele výrazně klesla i v případě, že na elektrody nebylo vloženo degradační napětí. Koncentrace ibuprofenu se v degradační cele bez vloženého napětí po dvaceti minutách snížila až na 28 % původního množství. Z toho důvodu bylo předpokládáno, že k úbytku léčiva v roztoku docházelo vlivem dalšího fyzikálně-chemického děje.

Jako první byla vyloučena možnost samovolné oxidace ibuprofenu vlivem vzdušného kyslíku. Do kádinky bylo odpipetováno stejné množství roztoku pro degradaci a roztok byl míchán po dobu dvaceti minut. Následně byla stanovena koncentrace ibuprofenu v roztoku na hodnotu 94 % z původního množství. Lze tedy předpokládat, že oxidace vzdušným kyslíkem není hlavním zdrojem úbytku koncentrace léčiva v degradační cele.

V dalším kroku bylo vyzkoušeno odebrat z degradační cely pomocnou elektrodu. Koncentrace ibuprofenu v degradační cele po dvaceti minutách poklesla na 30 % původního množství. Přítomnost pomocné elektrody v cele tedy neměla vliv na pokles koncentrace léčiva. Úbytek ibuprofenu v degradační cele mohl být také způsoben adsorpcí léčiva na povrch BDDE. Zmíněná elektroda byla vyjmuta z degradační cely a spolu s roztokem byla míchána v kádince opět po stejnou dobu. Koncentrace ibuprofenu v roztoku byla následně stanovena na hodnotu 96 %, v roztoku tedy nedocházelo ani k adsorpci léčiva na povrch pracovní elektrody.

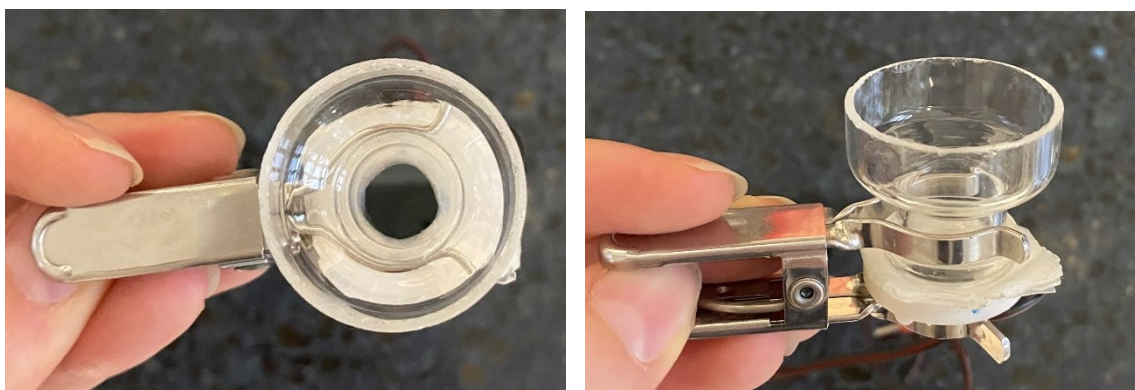
Poslední možností byla adsorpce ibuprofenu na materiál těsnění. Těsnění bylo vyjmuta z cely a ponecháno dvacet minut v míchaném roztoku pro degradaci. Po proměření UHPLC metodou byla koncentrace ibuprofenu v roztoku stanovena na hodnotu 5 %. Úbytek léčiva v průběhu degradace byl tedy způsoben převážně adsorpcí ibuprofenu na silikonové těsnění.

Pro sestavení degradační cely bylo potřeba použít těsnění z takového materiálu, který by neadsorboval léčivou látku. Bylo otestováno několik druhů materiálů těsnění a plastů, konkrétně Silicone 40A, Elastic 50A, Rigid 10K, Clear (Formlabs, Somerville, MA, USA), Parafilm (Amcor, Neenah, WI, USA), SBR pryž (Těsnění Nývlt, ČR) a silikonový špunt. Studovaný materiál byl vždy vložen do míchaného roztoku pro degradaci a ponechán po dobu dvaceti minut. Stanovené koncentrace ibuprofenu jednotlivých roztoků vyjádřené jako procentuální množství z původní koncentrace léčiva shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4 – Adsorpce ibuprofenu na materiál těsnění

materiál	A_{IBU} po degradaci / A_{IBU} před degradací [%]
Silicone 40A	5
Silikonový špunt	19
Elastic 50A	2
Parafilm	93
Pryž	14
Rigid 10K	96
Clear	49

Ze získaných výsledků vyplývá, že léčivo bylo nejméně adsorbováno na parafilm a plast Rigid 10K (materiály jsou označeny v Tabulce 4 barevně). Tyto dva materiály byly použity pro sestavení nové degradační cely. Pomocí plastu Rigid 10K byla pracovní BDD elektroda zabudována přímo do dna degradační cely. Jako těsnění bylo použito šest vrstev parafilmu. Parafilm byl vložen mezi jednotlivé díly degradační cely a pomocí horkovzdušné pistole byl lehce zahřát. Následně byly tlakem spojeny jednotlivé části degradační cely k sobě. Nově sestavená degradační cely je zobrazena na Obrázku 12.

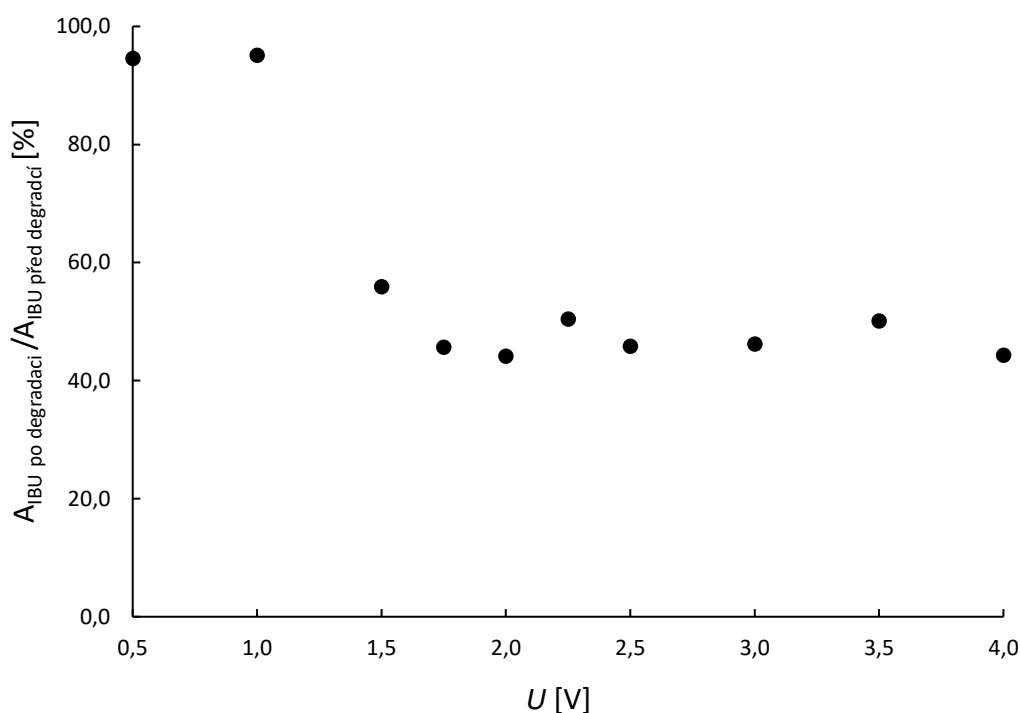


Obrázek 12 – degradační cely s pracovní BDD elektrodou zabudovanou na dně degradační cely, těsnění z vrstev parafilmu

Bylo ověřeno, že v takto připravené degradační cele nedochází k výraznému úbytku léčiva vlivem adsorpce. Do degradační cely byly odpipetovány 2,0 ml roztoku pro degradaci a po dvaceti minutách míchání (bez vloženého napětí) byla koncentrace ibuprofenu v roztoku stanovena na hodnotu 95 % z původního množství.

4.4.2 Optimalizace degradačního napětí

Vložené degradační napětí je zásadní parametr ovlivňující účinnost elektrochemické degradace. S rostoucí hodnotou vloženého napětí roste rychlost tvorby hydroxylových radikálů a lze očekávat, že se účinnost elektrochemické degradace bude zvyšovat. V průběhu optimalizace degradačního napětí byla doba degradace konstantní – dvacet minut. Testované hodnoty vkládaného napětí na elektrody byly 0,5; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5; 3,0; 3,5 a 4,0 V. Získané výsledky shrnuje Obrázek 13.



Obrázek 13 - Závislost plochy pod píkem ibuprofenu po elektrochemické degradaci vztažené k původnímu množství ibuprofenu na vloženém napětí při konstantní době degradace

Účinnost degradace rostla se zvyšujícími se hodnotami vloženého napětí v rozmezí od +0,5 V do +2,0 V. Další zvyšování velikosti vloženého napětí již nemělo zásadní vliv na účinnost degradace, která probíhala vždy zhruba z 45 %. Tento jev mohl být způsoben tím, že se BDDE řadí mezi neaktivní pracovní elektrody, kdy na povrchu těchto elektrody

nedochází pouze k oxidaci analytu hydroxylovými radikály, ale mohou probíhat také konkurenční reakce. Mezi zmíněné konkurenční reakce se řadí tvorba kyslíku, který může blokovat povrch elektrody, či peroxidu vodíku [64]. V průběhu zvyšování degradačního napětí v rozmezí +2,25 V až +4 V tedy mohlo docházet k nárůstu vedlejších reakcí, a tedy k většímu vývoji plynů. Následkem toho byla činnost degradace konstantní i přes vyšší hodnoty degradačního napětí. Jako optimální hodnota vloženého napětí byla tedy zvolena hodnota +2,0 V.

4.4.1 Vliv aktivace pracovní elektrody na účinnost degradace

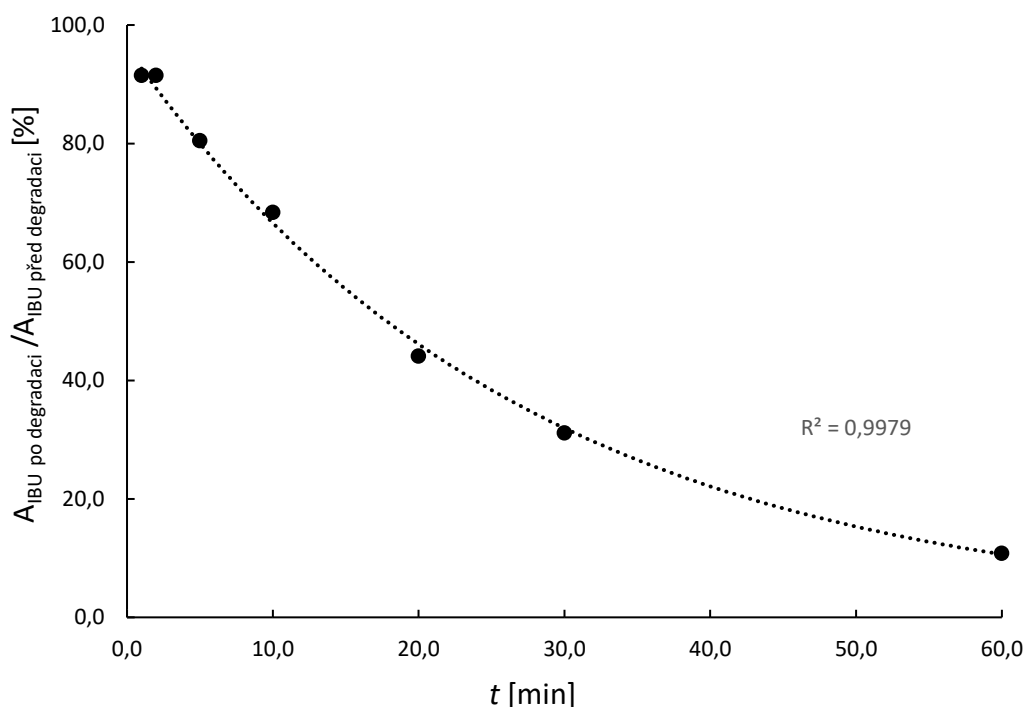
Při voltametričtém stanovení ibuprofenu byl testován vliv složení roztoku pro aktivaci na citlivost stanovení. Pro aktivaci byl jako optimální roztok zvolen přímo základní elektrolyt, tedy roztok o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 10 \%$ (obj.) ethanolu. Z toho důvodu byl také otestován vliv složení aktivačního roztoku na účinnost degradace. Aktivace byla prováděna postupně nejprve v roztoku $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$, následně bylo vyzkoušeno pro aktivaci použít roztok základního elektrolytu. V kyselině sírové byla hodnota aktivačního napětí +4,0 V, v roztoku základního elektrolytu bylo vyzkoušeno provést aktivaci při dvou hodnotách vloženého napětí, při +4,0 V a +2,5 V. Po aktivaci pracovní elektrody byla provedena elektrochemická degradace léčiva (+2,0 V, 20 minut).

Stanovené hodnoty koncentrace léčiva v roztoku po aktivaci a degradaci BDDE v $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a v roztoku základního elektrolytu při vloženém napětí +4,0 V byly prakticky totožné (44,2 % v H_2SO_4 a 44,9 % v základním elektrolytu). Při provedení aktivace elektrod v základním elektrolytu při nižším vloženém napětí (+2,5 V) byla degradace méně účinná (51,3 %). To mohlo být způsobeno tím, že při nižším vloženém napětí nebyl povrch BDDE plně vyčištěn. Nejlepší účinnosti degradace bylo dosaženo po aktivaci elektrod v $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a při vloženém napětí +4,0 V, z toho důvodu byl tento postup zvolen jako optimální.

4.4.1 Optimalizace degradační doby

Byla proměřena závislost účinnosti elektrochemické degradace ibuprofenu na době degradace. Testovaná doba degradace byla 1; 2; 5; 10; 20; 30 a 60 minut. Hodnota

vloženého napětí na elektrody byla konstantní, degradace léčiva probíhala při vloženém napětí +2,0 V. Získané výsledky jsou zaznamenány na Obrázku 14.



Obrázek 14 - Závislost plochy pod píkem ibuprofenu po elektrochemické degradaci vztažené k původnímu množství ibuprofenu na době degradace při konstantním vloženém napětí

Získaná časová závislost degradace léčiva byla proložena exponenciálou a ze získaných hodnot lze usuzovat, že v použitém základním elektrolytu při vloženém napětí +2,0 V degradace ibuprofenu probíhala dle kinetiky prvního řádu. Pro porovnání voltametrické a chromatografické metody pro sledování degradace léčiva byla jako optimální doba degradace zvolena doba 5 minut. Při zvolené době degradace klesla koncentrace ibuprofenu v roztoku o 19,5 %, bylo tedy dosaženo vhodného poměru mezi množstvími zdegradovaného ibuprofenu a časem potřebným k degradaci.

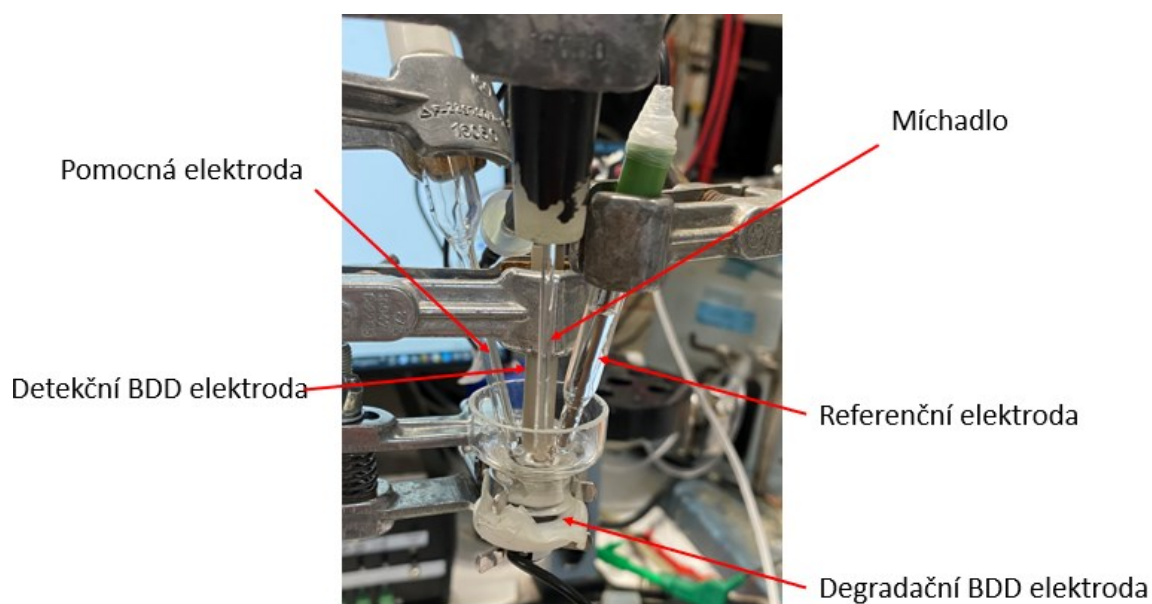
Při ověřování opakovatelnosti elektrochemické degradace na třech vzorcích byla účinnost degradace stanovena na hodnotu 32,9 %, RSD degradace byla do 1 %. V průběhu měření časové závislosti bylo ovšem po pěti minutách degradace dosaženo účinnosti pouze necelých 20 %. Měření časové závislosti a opakovatelnosti elektrochemické degradace ibuprofenu byly provedeny v poměrně velkém časovém rozestupu (zhruba 1,5 měsíce). Elektrochemická degradace je tedy dobře opakovatelná

v průběhu krátké časové doby. V případě, že jsou měření prováděna v delším časovém úseku, tak se jednotlivé výsledky získané v různých dnech liší. Účinnost elektrochemické degradace mohla být také ovlivněna historií pracovní elektrody, popřípadě teplotou v laboratoři.

4.5 Porovnání UHPLC a voltametrické metody pro sledování degradace ibuprofenu

Cílem diplomové práce bylo porovnat stanovené hodnoty koncentrace ibuprofenu v roztoku po elektrochemické degradaci pomocí UHPLC a voltametrické metody. Pro stanovení koncentrace ibuprofenu pomocí voltametrické metody byla z technických důvodů použita jiná pracovní elektroda než ta, na které byla proměřena koncentrační závislost. Pracovní elektroda byla na začátku dne aktivována po dobu deseti minut v roztoku základního elektrolytu. Byl pětkrát změřen vzorek obsahující ibuprofen. I přes vloženou regeneraci pracovní elektrody mezi jednotlivá měření docházelo v průběhu měření k výrazné pasivaci elektrody, a tedy k poklesu signálu. Z toho důvodu byla pro porovnání voltametrické a chromatografické metody pracovní elektroda aktivována vždy po proměření jednoho skenu. Aktivace probíhala opět v základním elektrolytu po dobu deseti minut.

Na Obrázku 15 je zobrazena aparatura pro voltametrické stanovení koncentrace léčiva přímo v degradační cele.



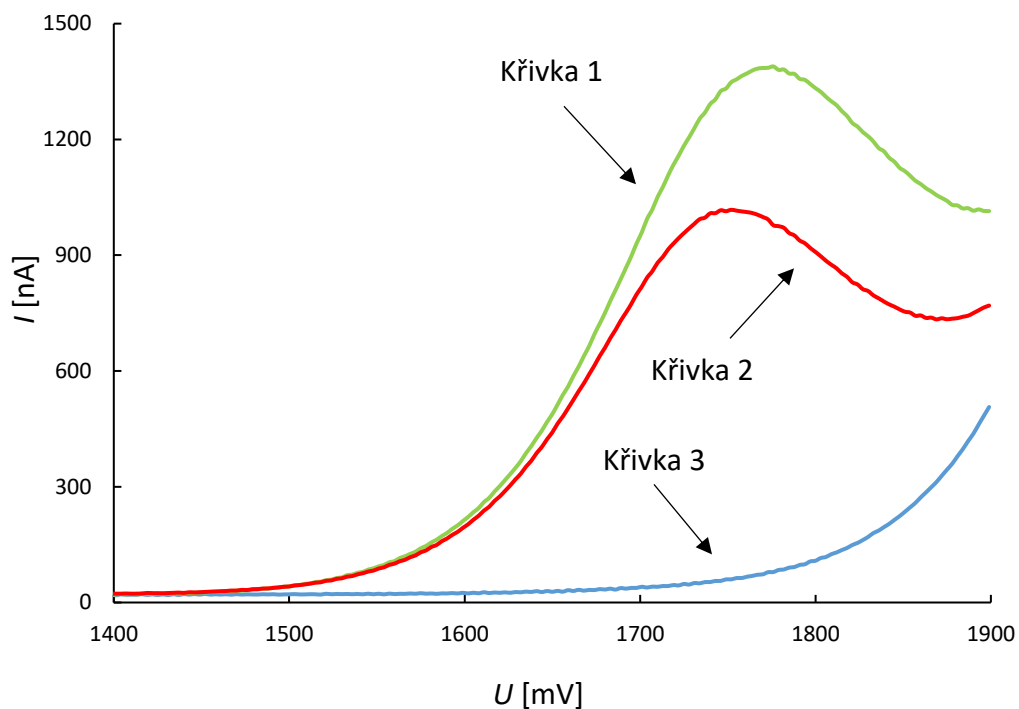
Obrázek 15 - Aparatura pro voltametrické stanovení koncentrace léčivé látky ibuprofen přímo v degradační cele

Do degradační cely byly odpipetovány 2,0 ml připraveného roztoku pro degradaci ($c_{\text{IBU}} = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Před zahájením samotné elektrochemické degradace byla voltametrickou metodou stanovena koncentrace léčivé látky ibuprofen v degradační cele. Následně byly z cely vyjmuty elektrody pro voltametrické stanovení – tedy referenční elektroda a pracovní BDD elektroda. V cele bylo ponecháno míchadlo, pomocná elektroda a zabudovaná pracovní elektroda pro degradaci. Optimalizovanou metodou elektrochemické degradace byl roztok degradován, elektrody pro voltametrické stanovení byly vloženy zpět do cely a byla stanovena koncentrace ibuprofenu v roztoku. Následně byl roztok odebrán a proměřen pomocí off-line UHPLC metody. Porovnání účinnosti degradace bylo provedeno na třech vzorcích, kdy koncentrace každého vzorku byla stanovena třikrát DPV metodou a třikrát chromatografickou metodou. Pro vyhodnocení byl použit medián hodnot. Získané výsledky shrnuje Tabulka 5.

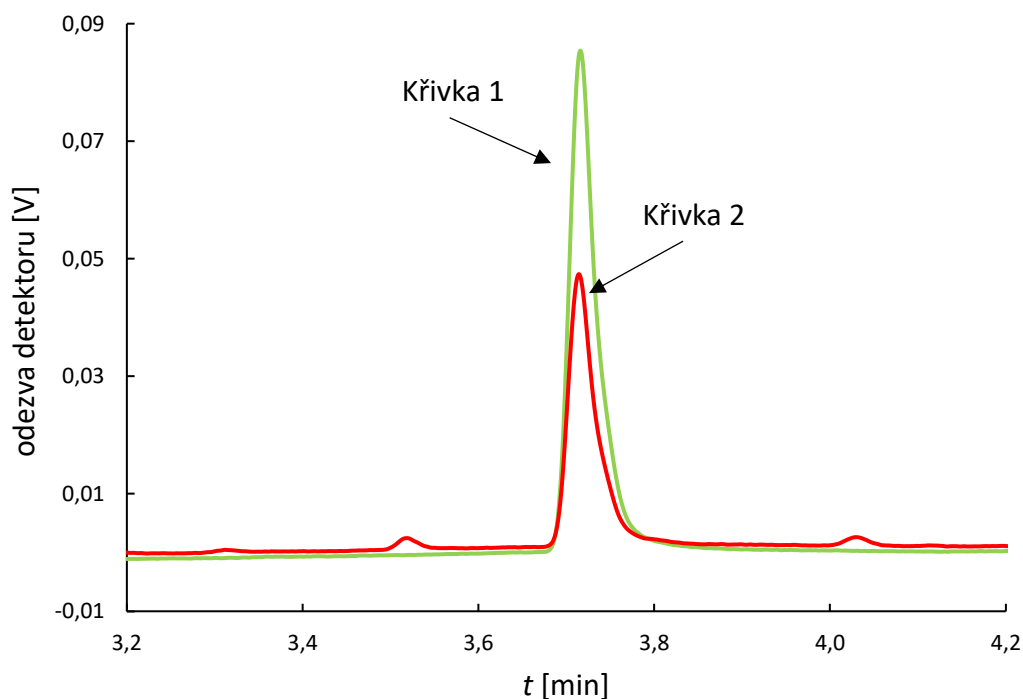
Tabulka 5 – Porovnání relativního poklesu koncentrace ibuprofenu při degradaci měřené voltametrickou a chromatografickou metodou. Složení roztoku pro degradaci: $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ IBU + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Na_2SO_4 + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ H_2SO_4 + 10 % (obj.) ethanolu. Doba degradace 5 minut, degradační napětí +2,0 V.

vzorek	c_{IBU} (DPV) [%]	c_{IBU} (UHPLC) [%]
1	78	61
2	61	56
3	71	54

Koncentrace ibuprofenu v roztoku po degradaci (vyjádřená jako procentuální zastoupení z původního množství léčiva) byla pomocí voltametrické metody stanovena na hodnotu $(71 \pm 22) \%$, stanovená koncentrace UHPLC metodou byla $(56 \pm 9) \%$. Na Obrázku 16 je zaznamenán voltamogram roztoku ibuprofenu v základním elektrolytu získaný proměřením vzorku 3 před elektrochemickou degradací a následně po elektrochemické degradaci. Pro stejný vzorek (vzorek 3) je na Obrázku 17 zobrazen získaný chromatogram.



Obrázek 16 – DP voltamogramy ibuprofenu v roztoku základního elektrolytu před elektrochemickou degradací (křivka 1), po elektrochemické degradaci (křivka 2) a roztok základního elektrolytu bez přídavku ibuprofenu (křivka 3). Měřené na BDDE



Obrázek 17 – Chromatogram ibuprofenu v roztoku základního elektrolytu před elektrochemickou degradací (křivka 1) a po elektrochemické degradaci (křivka 2)

Výsledky získané pomocí vyvinuté voltametrické metody mají poměrně velkou odchylku. Velikost odchylky měření mohla být negativně ovlivněna aktivací pracovní elektrody v roztoku základního elektrolytu mezi jednotlivými skeny, kdy během manipulace s elektrodami mohlo postupně dojít k lehkému ředění analyzovaného roztoku. Oproti hodnotám získaným UHPLC metodou jsou stanovené koncentrace ibuprofenu v roztoku vyšší. To mohlo být zapříčiněno tím, že v průběhu elektrochemické degradace mohlo docházet ke vzniku aromatických degradačních produktů, které následně poskytly signál při stejné hodnotě potenciálu jako sledovaný ibuprofen. Měřený signál tedy mohl být kombinací signálu ibuprofenu a jeho degradačního produktu. V rámci diplomové práce nebyly sledovány a identifikovány produkty elektrochemické degradace ibuprofenu. V literatuře jsou ovšem popsány studie, ve kterých autoři detekovaly aromatické produkty v průběhu degradace léčiva. Například ve studii provedené S. L. Ambuludi a kol. [50] byly popsány čtyři aromatické meziproducty, které v malém množství vznikají v průběhu elektrochemické degradace. Ciriaco L. a kolektiv [52] se zabývali elektrochemickou degradací v neutrálním a zásaditém pH a detekovali sloučeninu 2-[4-(karboxykarbonyl)fenyl]propanoát jako meziproduct degradace. Aromatické meziproducty byly také detekovány při studiu degradace pomocí pokročilých oxidačních procesů [41], při reakci léčiva s oxidačními činidly [43] či při elektrochemické degradaci ibuprofenu na titanových elektrodách pokrytých třemi různými kovovými oxidy [54]. Ke stanovení nižší koncentrace ibuprofenu UHPLC metodou mohl také přispět úbytek koncentrace léčiva po ukončení elektrochemické degradace, jelikož UHPLC měření byla prováděna s lehkým časovým odstupem.

Vyvinutá voltametrická metoda také nebyla příliš robustní, pík náležící léčivu ležel na konci potenciálového okna, což znesnadňovalo jeho vyhodnocení. Citlivost měření byla velmi ovlivněná historií použité pracovní elektrody. Celkovou chybu měření mohly také negativně ovlivnit technické problémy v průběhu měření, kdy bylo měření prováděno na několika různých pracovních elektrodách.

Voltametrická metoda není tedy úplně vhodná k stanovení přesné koncentrace léčivé látky v roztoku. Pomocí této metody je ovšem možné online monitorovat průběh degradace léčiva přímo v degradační cele a použít ji k přibližnému stanovení koncentrace ibuprofenu v roztoku.

Pro přesné stanovení koncentrace léčivé látky je vhodné použít metodu kapalinové chromatografie.

5 Závěr

V rámci diplomové práce byla vyvinuta a částečně validována chromatografická a voltametrická metoda pro stanovení léčivé látky ibuprofen. Vyvinuté metody byly použity pro sledování účinnosti elektrochemické degradace léčivé látky ibuprofen a získané výsledky pomocí jednotlivých metod byly porovnány. Voltametrické stanovení ibuprofenu bylo prováděno online přímo v dekadační cele, poté byl vzorek odebrán a koncentrace ibuprofenu byla stanovena off-line pomocí UHPLC.

Stanovení ibuprofenu UHPLC metodou bylo prováděno na oktadecylové koloně Kinetex. Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu a deionizované vody, stanovení probíhalo v režimu gradientové eluce. Pro vyhodnocení byl použit PDA detektor, který snímal spektrum při vlnové délce 220 nm. Linearita metody byla ověřena v koncentračním rozsahu $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla ověřena opakovatelnost vyvinuté metody (RSD 0,3 %), limit detekce metody byl stanoven na hodnotu $0,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, limit kvantifikace na hodnotu $1,3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při vývoji voltametrické metody bylo stěžejní především optimalizovat složení základního elektrolytu, aby bylo možné současně provést elektrochemickou degradaci ibuprofenu a jeho voltametrické stanovení. Jako optimální základní elektrolyt byl zvolen roztok o složení $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{SO}_4 + 10 \text{ } \%$ (obj.) ethanolu. Pík náležící ibuprofenu byl detekován při vloženém potenciálu 1,7 V a nacházel se na úplném konci potenciálového okna pracovní elektrody, což ovlivňovalo vyhodnocení píku. Vyvinutá voltametrická metoda byla částečně validována. Byla ověřena linearita metody v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, hodnota limitu detekce a limitu stanovitelnosti metody byly určeny na hodnoty $\text{LOD} = 7,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{LOQ} = 25,4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V rámci částečné validace metody byla také ověřena opakovatelnost metody (RSD 3,3 %).

Účinnost degradace byla sledována off-line pomocí vyvinuté UHPLC metody. Bylo zjištěno, že je závislá především na hodnotě dekadačního napětí a době trvání degradace. Oba tyto parametry byly v rámci práce dále optimalizovány. Optimální hodnota dekadačního napětí byla 2,0 V, optimální doba degradace byla 5 minut. Byla ověřena opakovatelnost elektrochemické degradace v rámci jednoho dne (RSD do 1 %), z dlouhodobého hlediska se účinnost degradace v jednotlivých dnech lišila.

Porovnání vyvinutých metod pro sledování účinnosti degradace bylo provedeno na třech vzorcích, kdy byla koncentrace každého vzorku pomocí UHPLC i DPV metody měřena třikrát. Koncentrace ibuprofenu v roztoku po degradaci (vyjádřená jako procentuální zastoupení léčiva z původního množství) byla metodou DPV stanovena na hodnotu (71 ± 22) %, hodnota koncentrace stanovená UHPLC metodou byla (56 ± 9) %.

Stanovená koncentrace ibuprofenu pomocí metody DPV byla značně vyšší, což mohlo být způsobeno přítomností elektrochemicky aktivního degradačního produktu, který poskytoval signál při stejné hodnotě vloženého potenciálu jako léčivá látka ibuprofen.

Seznam použité literatury

- [1] PubChem. *Ibuprofen* [Online]. National Center For Biotechnology Information. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>. [cit. 8. 10. 2024].
- [2] REGALADO-MÉNDEZ, A.; RUIZ, M.; HERNÁNDEZ-SERVÍN, J. A.; NATIVIDAD, R.; ROMERO, R.; CORDERO, M. E.; ESTRADA-VÁZQUEZ, C. a PERALTA-REYES, E. Electrochemical Mineralization of Ibuprofen on BDD Electrodes in an Electrochemical Flow Reactor: Numerical Optimization Approach. *Processes*. 2020, 8. DOI: 10.3390/pr8121666
- [3] RASHID, A; WHITE, E. T.; HOWES, T.; LITSTER, J. D. a MARZIANO, I. Effect of Solvent Composition and Temperature on the Solubility of Ibuprofen in Aqueous Ethanol. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2014, 59 (9), 2699–2703. DOI: 10.1021/je400819z.
- [4] WANG, S.; SONG, Z.; WANG, J.; DONG, Y. a WU, M. Solubilities of Ibuprofen in Different Pure Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2010, 55, 5283–5285. DOI: 10.1021/je100255z.
- [5] HALFORD, G. M.; LORDKIPANIDZÉ, M. a WATSON, S. P. 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. *Platelets*. 2011, 23 (6), 415-422. ISSN 1369-1635. DOI: 10.3109/09537104.2011.632032.
- [6] CORY, W. C.; HARRIS, C. a MARTINEZ, S. Accelerated degradation of ibuprofen in tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2010, 15(6), 636-643. ISSN 1083-7450. DOI: 10.3109/10837450903426518.
- [7] CHOPRA, S. a KUMAR, D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*. 2020, 6(6). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
- [8] YU, D.; ZENG, S. Z.; WU, Y. W.; LI, Y.; TIAN, H.; XIE, T. a YU, Y. Removal ibuprofen from aqueous solution by a noval Al-modified biochar. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023, 30,112734–112744. DOI: 10.1007/s11356-023-30245-w.
- [9] JAN-ROBLERO, J. a CRUZ-MAY, J. A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules*. 2023, 28(5). DOI: 10.3390/molecules28052097.

- [10] STEFANIK, O.; HORNIKOVA, A.; CIZMAROVA, I.; MATUSKOVA, M.; MIKUSOVA, V.; MIKUS, P. a PIESTANSKY, J. Enhanced Sample Throughput Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection in Hydrodynamically Closed System for Determination of Ibuprofen. *Separations*. 2022, 9(5). DOI: 10.3390/separations9050118.
- [11] KOVACS, E. D.; SILAGHI-DUMITRESCU, L.; KOVACS, M. H. a ROMAN, C. Determination of the Uptake of Ibuprofen, Ketoprofen, and Diclofenac by Tomatoes, Radishes, and Lettuce by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). *Analytical Letters*. 2020, 54(1-2), 314–330. DOI: 10.1080/00032719.2020.1779278
- [12] DAMIANI, P. C.; BEARZOTTI, M. a CABEZON, M. A. Spectrofluorometric determination of ibuprofen in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001,25(3-4), 679–683. ISSN 0731-7085. DOI: 10.1016/S0731-7085(00)00584-7.
- [13] European Pharmacopoeia 11.0. *Ibuprofen*. 01/2017:0721, 3062-3064.
- [14] D'ATRI, V.; FEKETE, S.; CLARKE, A.; VEUTHEY, J.-L. a GUILLARME, D. Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Analytical Chemistry*. 2019, 91 (1), 210-239. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05026.
- [15] BASHYAL, S. Ibuprofen and its different analytical and manufacturing methods: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018, 11 (7). DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i7.24484.
- [16] GASCO-LOPEZ, A.I.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R. a JIMENEZ, A. LC method development for ibuprofen and validation in different pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999, 21(1), 143-149. ISSN 0731-7085. DOI: 10.1016/S0731-7085(99)00127-2.
- [17] KOÇAK, Ö. F. a ATILA, A. Determination of Ibuprofen in Pharmaceutical Preparations by UPLC-MS/MS Method. *Turkish Journal of Nature and Science*. 2022, 11(2), 58-63. DOI: 10.46810/tdfd.1107889.
- [18] HAN, Z.; LU, L.; WANG, L.; YAN, Z. a WANG, X. Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Ibuprofen and 17 Related Compounds. *Chromatographia*. 2017, 80, 1353–1360. DOI: 10.1007/s10337-017-3358-3.

- [19] DIAS, L.; MALLYA, R. a PATANI, K. Development and Validation of New RP-HPLC Method for Estimation of Mephenesin and Ibuprofen. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. 7(12), 4971-4977. ISSN 0975-8232. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(12).4971-77
- [20] SARILMIŞER, H. K.; ÖZÇELİK, N. O.; ARSLAN, B. Ö.; GÖKALP, M.; USTAOĞLU, A.; DUDE, U. K. a KNEZEVIC, Z. Development and validation of a simple HPLC assay method for ibuprofen, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in syrup form. *Journal of chemical metrology*. 2017, 11:2, 1307-6183. ISSN 1307-6183. DOI: 10.25135/jcm.9.17.05.039.
- [21] JUN, H.-S.; KANG, J.-S.; PARK, J.-S. a CHO, Ch.-W. Simultaneous analysis of ibuprofen and pamabrom by HPLC. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2015, 45, 555–560. ISSN 2093-6214. DOI: 10.1007/s40005-015-0203-2.
- [22] PEIKOVA, L.; GEORGIEVA, M. a TSVETKOVA, B. RP-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and famotidine in pharmaceutical dosage form. *Pharmacia*. 2014, 61(2).
- [23] BORAHAN, T.; UNUTKAN, T.; ŞAHİN, A. a BAKIRDERE, S. A rapid and sensitive reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions. *Journal of Separation Science*. 2019, 42 (3), 638-777. ISSN 1615-9314. DOI: 10.1002/jssc.201801002.
- [24] SHAALAN, R. A.; HAGGAG, R. S.; BELAL, S. F. a AGAMI, M. Simultaneous Determination of Hyoscine, Ketoprofen and Ibuprofen in Pharmaceutical Formulations by HPLC – DAD. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013, 3(7), 038-047. ISSN 2231-3354.
- [25] LANGLOIS, M.-H.; DALLET, P.; KAUSS, T. a DUBOST, J.-P. Simultaneous Determination of Ibuprofen and Pseudoephedrine Hydrochloride in Pharmaceutical Tablets by Reversed-Phase HPLC. *Analytical Letters*. 2009, 42(18), 2951-2961. DOI: 10.1080/00032710903202006.
- [26] PAÍGA, P.; LOLIĆ, A.; HELLEBUYCK, F.; SANTOS, L. H.M.L.M.; CORREIA, M. a DELERUE-MATOS, C. Development of a SPE–UHPLC–MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and

- analgesic pharmaceuticals in seawater. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 106, 61-70. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.06.017.
- [27] CHAI, B.; MINKLER, P. E. a HOPPEL, Ch. L. Determination of ibuprofen and its major metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988, 430, 93-101. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)83137-0.
- [28] FARRAR, H.; LETZIG, L. a GILL, M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2002, 780(2), 341-348. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00543-3.
- [29] T,UCHIU, B.-M.; STEFAN-VAN STADEN, R.-I. a VAN STADEN, J. (K.) F. Recent Trends in Ibuprofen and Ketoprofen Electrochemical Quantification – A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 54(1), 61–72. DOI: 10.1080/10408347.2022.2050348.
- [30] LIMA, A. B.; FARIA, E. O.; MONTES, R. H. O.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. a dos SANTOS, W. T. P. Electrochemical Oxidation of Ibuprofen and Its Voltammetric Determination at a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*. 2013, 7, 1585–1588. DOI: 10.1002/elan.201300014.
- [31] SURESH, E.; SUNDARAM, K.; KAVITHA, B. a KUMAR, N. Senthil. Square wave voltammetry sensing of ibuprofen on glassy carbon electrode. *International Journal of PharmTech Research*. 2016, 9(8), 182-188. ISSN 2455-9563. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/309117632>.
- [32] AMIN, S.; SOOMRO, M. T.; MEMON, N.; SOLANGI, A. R.; SIRAJUDDIN; QURESHI, T. a BEHZAD, A. R. Disposable screen printed graphite electrode for the direct electrochemical determination of ibuprofen in surface water. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2014, 1-2, 8-13. ISSN 2215-1532. DOI: 10.1016/j.enmm.2014.07.001.
- [33] HRDLIČKA, V.; MATVIEIEV, O.; NAVRÁTIL, T. a ŠELEŠOVSKÁ, R. Recent advances in modified boron-doped diamond electrodes: A review. *Electrochimica Acta*. 2023, 456. ISSN 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142435.
- [34] LIMA, A. B.; TORRES, L. M. F. C.; GUIMARÃES, C. F. R. C.; VERLY, R. M.; da SILVA, L. M.; CARVALHO, Á. D. Júnior a dos SANTOS, W. T. P.

- Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Samples by Differential Pulse Voltammetry Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2014, 25(3), 478-483. DOI: 10.5935/0103-5053.20140005.
- [35] TYSZCZUK-ROTKO, K.; KOZAK, J. a WEZINSKA, A. Electrochemically Activated Screen-Printed Carbon Electrode for Determination of Ibuprofen. *Applied Sciences*. 2021, 9908, 11 (21). DOI: 10.3390/app11219908.
- [36] MOKABA, P. L.; MSAGATI, T. A. M.; NYONI, H.; MAMBA, B. B. a FELENI, U. Electro-Oxidation of Ibuprofen and Metoprolol Using a Manganese Oxide Platform. *ChemistrySelect*. 2024, 9 (38). ISSN 2365-6549. DOI: 10.1002/slct.202400385.
- [37] SERRANO, N.; CASTILLA, Ò.; ARIÑO, C.; DIAZ-CRUZ, M.S. a DÍAZ-CRUZ, J.M. Commercial Screen-Printed Electrodes Based on Carbon Nanomaterials for a Fast and Cost-Effective Voltammetric Determination of Paracetamol, Ibuprofen and Caffeine in Water Samples. *Sensors*. 2019, 19 (18). DOI: 10.3390/s19184039.
- [38] MOTOC, S.; MANEA, F.; BACIU, A.; VASILIE, S. a POP, A. Highly sensitive and simultaneous electrochemical determinations of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water using nanostructured carbon-based paste electrodes. *Science of The Total Environment*. 2022, 846. ISSN 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157412.
- [39] BRÜMME, H. How to approach a forced degradation study. *LIFE SCIENCE*. 2011, 31.
- [40] VENKATARAMAN, S. a MANASA, M. Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - a review. *Drug Invention Today*. 2018, 10(2), 137-146. ISSN 0975-7619.
- [41] The Pharmaceutical Journal. *Understanding the chemical basis of drug stability and degradation* [Online]. SNAPE, T. J.; ASTLE, A. M. a DAVIES, J..2010. Dostupné z: <https://pharmaceutical-journal.com/article/ld/understanding-the-chemical-basis-of-drug-stability-and-degradation>. [cit. 8. 11. 2024].
- [42] SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURM, M.; PARASHAR, N. a SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and

- products. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, 49, 71-88. ISSN 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.006.
- [43] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Seznam použitých zkratek – seminář č. 5 a 6 sekce registrací* [Online]. Dostupné z: <https://sukl.gov.cz/>. [cit. 9. 11. 2024].
- [44] ALMEIDA, V. M.; ORGE, C. A.; PEREIRA, M. F. R. a SOARES, O. S. G.P. O3 based advanced oxidation for ibuprofen degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2022, 42, 277-284. ISSN 1004-9541. DOI: 10.1016/j.cjche.2021.04.032.
- [45] KUMARI, P. a KUMAR, A. ADVANCED OXIDATION PROCESS: A remediation technique for organic and non-biodegradable pollutant. *Results in Surfaces and Interfaces*. 2023, 11. ISSN 2666-8459. DOI: 10.1016/j.rsurfi.2023.100122.
- [46] CAVIGLIOLI, G.; VALERIA, P.; BRUNELLA, P.; SERGIO, C.; ATTILIA, A. a GAETANO, B. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 30(3), 499-509. ISSN 0731-7085. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00400-4.
- [47] YAMAMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; MORIGUCHI, S. M.; NAKAMURA, Y.; HONDA, Y.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; HAYASHI, A. a SEKIZAWA, J. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Research*. 2009, 43 (2), 351-362. ISSN 0043-1354. DOI: doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.039.
- [48] IOVINO, P.; CHIANESE, S.; CANZANO, S.; PRISCIANDARO, M. a MUSMARRA, D. Ibuprofen photodegradation in aqueous solutions. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, 23, 22993–23004. DOI: 10.1007/s11356-016-7339-0.
- [49] WANG, Z.; SRIVASTAVA, V.; AMBAT, I.; SAFAEI, Z. a SILLANPÄÄ, M. Degradation of Ibuprofen by UV-LED/catalytic advanced oxidation process. *Journal of Water Process Engineering*. 2019, 31. ISSN 2214-7144. DOI: 10.1016/j.jwpe.2019.100808.

- [50] MÉNDEZ-ARRIAGA, F.; TORRES-PALMA, R.A.; PÉTRIER, C.; ESPLUGAS, S.; GIMENEZ, J. a PULGARIN, C. Ultrasonic treatment of water contaminated with ibuprofen. *Water Research*. 2008, 42(16), 4243-4248. ISSN 0043-1354. DOI: 10.1016/j.watres.2008.05.033.
- [51] MARCHLEWICZ, A.; GUZIK, U.; SMULEK, W. a WOJCIESZYŃSKA, D. Exploring the Degradation of Ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The New Pathway and Factors Affecting Degradation. *Molecules*. 2017, 22(10). DOI: 10.3390/molecules22101676.
- [52] MUSMARRA, D.; PRISCIANDARO, M. CAPOCELLI, M.; KARATZA, D.; IOVINO, P.; CANZANO, S. a LANCIA, A. Degradation of ibuprofen by hydrodynamic cavitation: Reaction pathways and effect of operational parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016, 29, 76-83. ISSN 1350-4177. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.09.002.
- [53] LOAIZA-AMBULUDI, S.; PANIZZA, M.; OTURAN, N.; ÖZCAN, A. a OTURAN, M. A. Kinetic behavior of anti-inflammatory drug ibuprofen in aqueous medium during its degradation by electrochemical advanced oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, 20, 2381–2389. DOI: 10.1007/s11356-012-1123-6.
- [54] BRILLAS, E.; GARCIA-SEGURA, S.; SKOUMAL, M. a ARIAS, C. Electrochemical incineration of diclofenac in neutral aqueous medium by anodic oxidation using Pt and boron-doped diamond anodes. *Chemosphere*. 2010, 79, 605-612. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.004.
- [55] CIRÍACO, L.; ANJO, C.; CORREIA, J.; PACHECO, M. J. a LOPES, A. Electrochemical degradation of Ibuprofen on Ti/Pt/PbO₂ and Si/BDD electrodes. *Electrochimica Acta*. 2009, 54(5), 1464-1472. ISSN 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2008.09.022.
- [56] LOAIZA-AMBULUDI, S.; PANIZZA, M.; OTURAN, N.; ÖZCAN, A. a OTURAN, M. A. Electro-Fenton degradation of anti-inflammatory drug ibuprofen in hydroorganic medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2013, 702, 31-36. ISSN 1572-6657. DOI: 10.1016/j.jelechem.2013.05.006.
- [57] WANG, Ch.; YU, Y.; YIN, L.; NIU, J. a HOU, L.-A. Insights of ibuprofen electro-oxidation on metal-oxide-coated Ti anodes: Kinetics, energy consumption and

- reaction mechanisms. *Chemosphere*. 2016, 163, 584-591. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.057.
- [58] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a ČESLA, P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. I. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [59] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. a CROUCH, S. R. *Analytická chemie*. Vydání: první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [60] BAREK, J.; OPEKAR, F. a ŠTULÍK, K. *Elektroanalytická chemie*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1146-5.
- [61] OPEKAR, F.; JELÍNEK, I.; RYCHLOVSKÝ, P. a PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1775-6.
- [62] BRYCHT, M.; BALUCHOVÁ, S.; TAYLOR, A.; MORTET, V.; SEDLÁKOVÁ, S.; KLIMŠA L.; KOPEČEK J. a SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ K. Comparison of electrochemical performance of various boron-doped diamond electrodes: Dopamine sensing in biomimicking media used for cell cultivation. *Bioelectrochemistry*. 2021, 137, 107646. ISSN 1567-5394. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107646.
- [63] Katedra analytické chemie. *Pokročilé Praktikum z Analytické Chemie*. Univerzita Karlova, 2020, str. 13-14.
- [64] MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. a BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. Online. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2009, 87(3-4), 105-145. DOI: 10.1016/j.apcatb.2008.09.017.