

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristýna Janoušková

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ AMBROXOLU
V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

The Comparison of Methods for the Determination
of Ambroxol in Medical Formulations

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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, 18. června 2021.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané analytické metody pro stanovení obsahu ambroxolu v léčivých přípravcích z hlediska jejich pravdivosti, preciznosti a časové a finanční náročnosti. Pro stanovení byly vybrány tři metody: (1) UV spektrometrie s použitím metody kalibrační závislosti, (2) UV spektrometrie založená na metodě přídávku standardu, a (3) vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jako léčivé přípravky byly zvoleny dva typy sirupů, tablety a tobolky s prodlouženým uvolňováním. Přestože vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla časově i finančně nejnáročnější, poskytla nejvíce pravdivé výsledky. Oproti tomu obě UV spektrometrická stanovení byly sice finančně i časově nejméně náročná, ale metoda kalibrační závislosti byla nejméně pravdivá a metoda přídávku standardu byla nejméně precizní.

Klíčová slova: ambroxol, UV spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstract

This bachelor thesis aimed to compare selected analytical methods for determining the content of ambroxol in medicinal products in terms of trueness and precision of the measurement and measurement time and cost. Three methods were selected for the determination: (1) UV spectrometry using the calibration method, (2) UV spectrometry based on the standard addition method, and (3) high performance liquid chromatography. Two types of syrups, tablets, and prolonged-release capsules were chosen as tested medicinal products. Although high performance liquid chromatography was the most time and money-consuming, it gave the truest results. In contrast, both UV spectrometric determinations were the least costly and time-consuming, but the calibration line method was the least true and the standard addition method was the least precise.

Key words: ambroxol, UV spectrometry, high-performance liquid chromatography

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a hlavně trpělivost, se kterou ke mně přistupoval během zpracování této bakalářské práce. Také děkuji mé rodině a kamarádům za veškerou pomoc a podporu, které se mi od nich během celého studia dostávalo.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Cíl práce | 7 |
| 2 | Teoretický úvod..... | 8 |
| 2.1 | Ambroxol | 8 |
| 2.1.1 | Historie ambroxolu..... | 8 |
| 2.1.2 | Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti ambroxolu | 8 |
| 2.1.3 | Syntéza ambroxolu | 10 |
| 2.1.4 | Farmakologie ambroxolu | 11 |
| 2.1.5 | Lékové formy ambroxolu a jejich metabolismus | 12 |
| 2.2 | Metody pro stanovení ambroxolu..... | 12 |
| 2.3 | Principy vybraných metod pro stanovení ambroxolu | 13 |
| 2.3.1 | UV spektrometrie | 13 |
| 2.3.2 | Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 14 |
| 3 | Experimentální část | 16 |
| 3.1 | Analyzované léčivé přípravky | 16 |
| 3.2 | Použité chemikálie | 16 |
| 3.3 | Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod | 17 |
| 3.3.1 | UV spektrofotometrie..... | 17 |
| 3.3.2 | Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 20 |
| 3.4 | Statistické zpracování naměřených dat..... | 22 |
| 4 | Výsledky a diskuze..... | 24 |
| 4.1 | UV spektrometrie | 24 |
| 4.1.1 | Metoda kalibrační závislosti | 24 |
| 4.1.2 | Metoda přídavku standardu | 26 |
| 4.2 | Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 28 |
| 4.3 | Vyhodnocení pravdivosti a preciznosti vybraných metod stanovení ambroxolu | 31 |
| 4.4 | Vyhodnocení finanční a časové náročnosti vybraných metod stanovení ambroxolu | 33 |
| 5 | Závěr | 34 |

Použité symboly a zkratky

| | |
|---------------|---|
| A | plocha chromatografického píku [mAU min^{-1}] |
| A_{245} | absorbance při 245 nm |
| a | směrnice lineární regrese kalibrační závislosti |
| b | úsek lineární regrese kalibrační závislosti |
| c | hmotnostní koncentrace [mg cm^{-3}] |
| HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| l | tloušťka absorbujícího prostředí [cm] |
| m | hmotnost [mg] |
| V | objem [l] |
| w | hmotnostní zlomek [%] |
| λ | vlnová délka [nm] |
| ε | molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$] |

1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je porovnat tři různé analytické metody: (1) UV spektrometrie s použitím metody kalibrační závislosti, (2) UV spektrometrie založená na metodě přídavku standardu, a (3) vysokoúčinná kapalinová chromatografie pro stanovení účinné látky ambroxol ve čtyřech různých vybraných léčivých přípravcích (tablety, tobolky s prodlouženým uvolňováním a dva sirupy). Porovnání bylo provedeno z hlediska pravdivosti a preciznosti stanovení a jeho časových a finančních nároků.

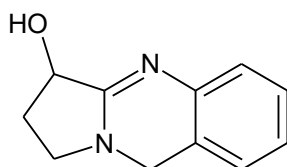
2 Teoretický úvod

2.1 Ambroxol

Ambroxol je sloučenina, která se používá v léčivých přípravcích pro léčbu akutních i chronických nemocí dýchacích cest spojených s poruchou transportu hlenu a s jeho abnormální sekrecí.

2.1.1 Historie ambroxolu

Po staletí se k léčbě onemocnění dýchacích cest používaly preparáty z indické rostliny *adhatoda léčivá* (*Justicia adhatoda* L.), ve které byl zjištěn jako hlavní účinná látka alkaloid vasicin (obr. 2.1). Tato látka dala v šedesátých letech 20. století podnět k přípravě jejích derivátů, z nichž se v léčivech jako první začal využívat bromhexin. Později během studia biotransformace bromhexinu byl objeven jeho účinnější metabolit a to právě ambroxol [1, 2].

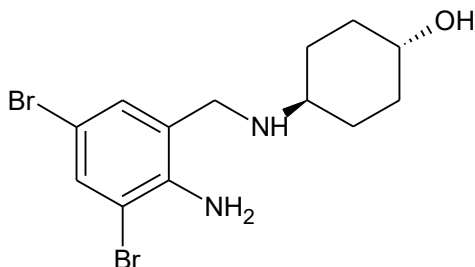


Obr. 2.1 Strukturální vzorec vasicinu

2.1.2 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti ambroxolu

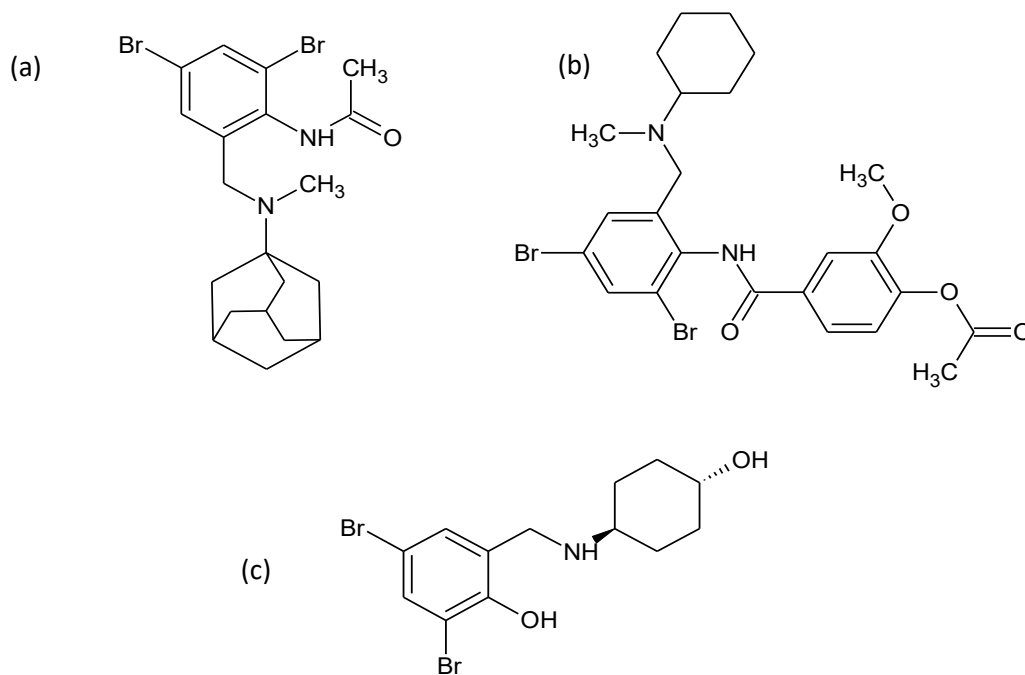
Ambroxol (obr. 2.2) je substituovaný benzylamin, jehož sumární vzorec je $C_{13}H_{18}Br_2N_2O$ a molární hmotnost je $378,107 \text{ g mol}^{-1}$. Systematický název látky je *trans*-4-[[[(2-amino-3,5-dibromfenyl)methyl]amino]cyklohexanol. Ambroxol je aktivním metabolitem bromhexinu, od kterého se liší absencí methylové skupiny na dusíku a adicí hydroxylové skupiny v *para-trans* poloze na cyklohexylu.

V léčivech ambroxol najdeme ve formě ambroxol hydrochloridu, krystalického bílého nebo nažloutlého prášku, který je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a prakticky nerozpustný v dichlormethanu [3]. Teplota tání ambroxol hydrochloridu je 233–234,5 °C [1].



Obr. 2.2 Strukturální vzorec ambroxolu

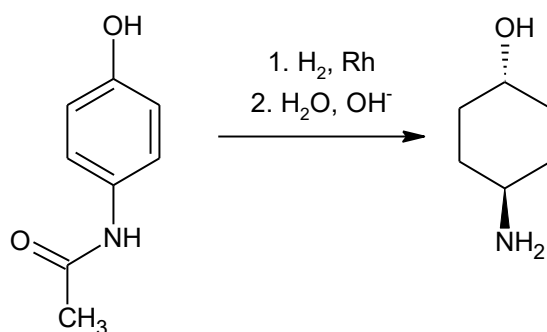
Za účinky ambroxolu je odpovědný 2-aminobenzylaminový skelet, který je na aromatickém jádře substituovaný halogeny. Bylo zjištěno, že účinek látky zůstává i po změně substituentu na dusíku benzylaminu a také po substituci aminoskupiny na aromatickém jádře. Existuje tak řada derivátů, které ve své struktuře obsahují tuto základní kostru a mají stejné nebo velmi podobné účinky na lidský organismus. Mezi takové látky patří například adamexin, brovanexin nebo derivát ambroxolu dembrexin (obr. 2.3), který se liší nahrazením aminoskupiny na aromatickém jádře hydroxylovou skupinou, a používá se dnes především ve veterinární medicíně [1].



Obr. 2.3 Strukturální vzorce (a) adamexinu, (b) brovanexinu a (c) dembrexinu

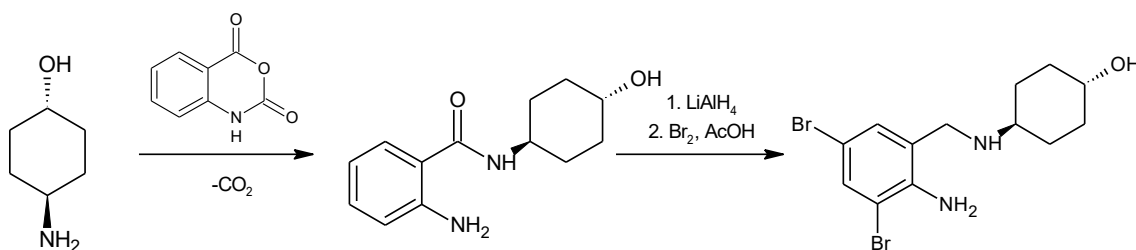
2.1.3 Syntéza ambroxolu

Poprvé ambroxol syntetizoval Keck v roce 1967 [4]. Jako výchozí látka se dnes pro přípravu ambroxolu používá paracetamol. Nejdříve se katalytickou hydrogenací zbaví aromatické jádro dvojných vazeb a poté alkalickou hydrolyzou vzniklého amidu získáme *trans*-4-aminocyklohexanol (obr. 2.4).

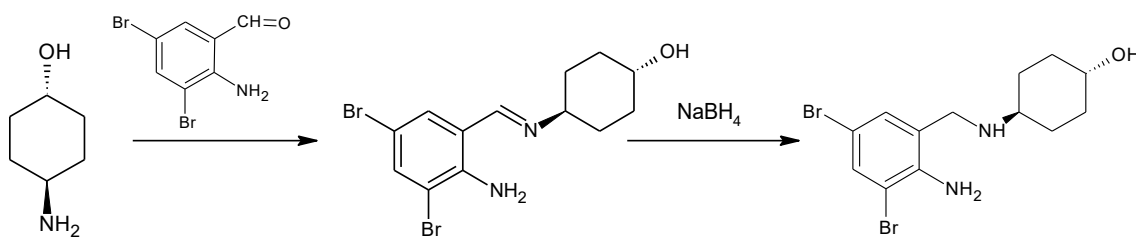


Obr. 2.4 První krok syntézy ambroxolu

Z připraveného *trans*-4-aminocyklohexanolu lze pak syntetizovat ambroxol dvěma cestami. První možností je nechat ho reagovat s anhydridem isatinové kyseliny a ze vzniklého amidu redukcí a následnou bromací připravit výsledný ambroxol (obr. 2.5). Druhou možností je příprava Schiffovy báze reakcí *trans*-4-aminocyklohexanolu s 2-amino-3,5-dibrombenzaldehydem a její redukce tetrahydridoboritanem sodným pro získání ambroxolu (obr. 2.6) [1, 5].



Obr. 2.5 Syntéza ambroxolu pomocí anhydridu isatinové kyseliny



Obr. 2.6 Syntéza ambroxolu přes Schiffovu bázi

2.1.4 Farmakologie ambroxolu

Ambroxol má na lidský organismus mnoho pozitivních účinků. Nejen že pomocí různých mechanismů usnadňuje odstranění hlenu z dýchacích cest, ale také u něj byly prokázány protizánětlivé [6], antioxidační [7] a anestetické [8] vlastnosti.

Z pohledu farmakologie řadíme ambroxol mezi expektorancia, tedy heterogenní skupinu léčiv, která podporují uvolnění a odstranění vazkého hlenu z dýchacích cest. Expektorancia lze dále dělit podle mechanismu jejich účinku na mukolytika, sekretolytika a sekretomotorika. Ambroxol působí mukolyticky a sekretomotoricky. Mukolytika mění fyzikálně-chemické vlastnosti hlenu a snižují tak jeho viskozitu, což usnadňuje pohyb hlenu a jeho odstranění. Sekretomotorické působení také napomáhá transportu hlenu a to aktivováním řasinkového epitelu [9, 10].

K odstranění nežádoucího hlenu z dýchacích cest také velmi pomáhají povrchově aktivní látky. Povrchově aktivní látka neboli surfaktant je složena z fosfolipidů, lipidů a hydrofobních i hydrofilních bílkovin [11]. Tyto povrchově aktivní látky zabraňují lepení hlenu na stěny plicních sklípků a průdušek a tím usnadňují jeho transport [12]. Jsou produkovány pneumocyty typu II a ambroxol tuto produkci podporuje [7]. Navíc se předpokládá, že zvyšování hladiny surfaktantu může být hlavním obranným mechanismem proti chřipce typu A [13, 14].

Dalším přínosem ambroxolu pro lidský organismus jsou jeho antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Jeho všeobecnou obranou proti oxidačnímu stresu je zachytávání volných radikálů, a tedy i reaktivních forem kyslíku. Je schopný zachytávat kyselinu chlornou, která má oxidační vlastnosti a v organismu napadá řadu biomolekul. Ambroxol je také inhibítozem peroxidasy lipidů a zabraňuje degradaci hyaluronové kyseliny, která je iniciovaná fentonovou reakcí [7, 15]. Bylo také zjištěno, že ambroxol snižuje syntézu molekul cytokinů, které jsou základní regulátory imunitního systému, a snižuje hladinu histaminu, který je zodpovědný za akutní imunitní reakci [16].

Další zjištěnou vlastností ambroxolu jsou jeho lokální anestetické účinky. Inhibuje napětově řízené sodné kanály v neuronech, které se účastní vzniku nervového vzruchu [17].

V minulosti bylo provedeno mnoho studií, které se zaměřily na možné pozitivní účinky ambroxolu v řadě závažných nemocí jako chronická obstrukční plicní nemoc [18], tuberkulóza [2] a cystická fibróza [19]. Pro úplné určení účinků ambroxolu na tyto nemoci je ovšem třeba další výzkum.

2.1.5 Lékové formy ambroxolu a jejich metabolismus

Ambroxol hydrochlorid se na trhu vyskytuje v různých lékových formách. Nalezneme ho nejen v podobě pevné látky ve formě tablet, pastilek, kapslí, čípků a tobolek s prodlouženým uvolňováním, ale také ve formě roztoků a sirupů. Nejčastěji se podává perorálně avšak některé roztoky lze podávat i inhalačně. Existuje také injekční roztok, který lze použít při intravenózním, intramuskulárním či subkutánním podání [20]. Množství účinné látky v léčivých přípravcích se obvykle pohybuje od 30 do 75 mg ambroxol hydrochloridu na jednu dávku.

Při perorálním podání plazmatická hladina ambroxolu dosahuje maxima za dvě hodiny a biologická dostupnost je zhruba 70 %. Celková plazmatická clearance je 660 ml min^{-1} , renální pak pouze 57 ml min^{-1} . Eliminace ambroxolu spočívá především v biotransformaci, kdy reakcemi první fáze se přeměňuje na 3,5-dibromanthranilovou kyselinu, která je renálně vylučována. Dalšími metabolity jsou také glukoronidy, které vznikají při reakcích druhé fáze biotransformace [1, 21].

2.2 Metody pro stanovení ambroxolu

Existuje řada metod pro stanovení ambroxolu, respektive ambroxol hydrochloridu, v léčivých přípravcích či v tělních tekutinách jako krev nebo moč. Mezi nejpoužívanější patří spektrometrické a separační metody s různými formami detekce, ale využívají se také některé elektroanalytické metody nebo acidobazická titrace.

Základní spektrometrickou metodou je spektrometrie v UV oblasti, ale byly použity i další metody jako derivační UV spektrometrie [22], Ramanova spektrometrie [23] nebo atomová absorpční spektrometrie [24]. Možností je také vytvořit barevný komplex ambroxolu s kationtem kovu jako železo či měď a ke stanovení použít spektrometrii ve viditelné oblasti [24, 25].

Separční metody se využívají v případě stanovení ambroxolu v heterogenních matricích nebo při přítomnosti dalších látek ve vzorku, které by mohly narušovat stanovení analytu a je tedy potřeba nejdříve tyto látky od analytu oddělit. Z takových metod je vhodné zmínit především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na reverzních fázích s použitím spektrofotometrické [26] či potenciometrické detekce [27]. Další možností stanovení je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií [28] nebo kapilární zónová elektroforéza [29].

Díky možnosti oxidace aminoskupiny na aromatickém jádře ambroxolu lze k jeho stanovení využít také elektroanalytické metody. Používá se voltametrie nebo adsorpční rozpouštěcí voltametrie [30, 31].

Dle Českého lékopisu 2017 [3] se ambroxol hydrochlorid stanovuje titračně. Vzorek se rozpustí v 96% ethanolu a okyslí 0,01 mol dm⁻³ kyselinou chlorovodíkovou. Poté lze takto připravený vzorek titrovat 0,1 mol dm⁻³ hydroxidem sodným a konec titrace určit potenciometricky.

2.3 Principy vybraných metod pro stanovení ambroxolu

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány dvě metody stanovení ambroxolu v různých lékových formách. Jsou jimi spektrometrie v UV oblasti, kde byla použita metoda kalibrační závislosti a metoda přídavku standardu, a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole.

2.3.1 UV spektrometrie

Molekulová spektrometrie je analytická metoda založená na schopnosti molekul stanovené látky absorbovat elektromagnetické záření určitých vlnových délek, které jsou pro danou látku specifické. Před dodáním energie se látka nachází v energeticky nejvýhodnějším základním stavu. Dodáním energie v podobě elektromagnetického záření dochází k excitaci, tedy k přechodu částic analytu do excitovaného stavu, během něhož látka absorbuje část dodaného záření. Při tomto procesu tedy dochází k zeslabení původního záření a míra zeslabení záření je závislá na koncentraci analytu.

Závislost míry zeslabení záření na koncentraci analytu kvantitativně popisuje Lambertův-Beerův zákon

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c l \quad (2.1)$$

kde A_{λ} je absorbance, ε_{λ} je molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$], c je molární koncentrace analytu [mol dm^{-3}] a l je tloušťka absorbujícího prostředí [cm]. Pro absorbanci pak platí následující vztah

$$A = \log(P_0/P) \quad (2.2)$$

kde A je absorbance, P je intenzita prošlého záření a P_0 je intenzita vstupujícího záření [32].

Pro stanovení obsahu ambroxolu v léčivém přípravku spektrometrií v UV oblasti záření byla vybrána metoda kalibrační závislosti a metoda přídavku standardu. Podle Českého lékopisu 2017 [3] jsou absorpční maxima ambroxol hydrochloridu při 245 a 310 nm. Z důvodu rozpustnosti se toto měření provádí v prostředí 0,1 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové.

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, kterou lze použít jak pro kvantitativní, tak i pro kvalitativní analýzu. Chromatografické metody jsou obecně založené na distribuci látek mezi stacionární a mobilní fází a lze je rozdělit podle uspořádání, typu fází, mechanismu separace a dalších kritérií.

V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie se jedná o kolonovou chromatografii, kdy kapalná mobilní fáze unáší analyzované látky kolonou, která je naplněna stacionární fází. Analyty jsou podle jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází zadržovány v koloně a poté eluovány. Eluované látky jsou pak detekovány a představují píky na chromatogramu, který nese kvalitativní i kvantitativní informace. Poloha maxima píku udává kvalitativní informaci o dané látce a plocha píku udává množství látky v analyzovaném vzorku [32].

Ambroxol hydrochlorid je jako většina léčiv polární látka a proto pro jeho stanovení byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích podle Koundourellis a kol. [26]. Jedná se o rozdělovací chromatografii (LLC tedy liquid-liquid chromatography), ve které je mobilní fáze polární a stacionární fáze nepolární. U této metody se používají stacionární fáze, které jsou chemicky vázané na inertní nosič a jako mobilní fáze se nejčastěji používají směsi pufru a organického rozpouštědla. V našem případě stacionární fáze byla oktadecylová skupina vázaná na silikagelu a mobilní fáze směs octanového pufru a methanolu. Analýza byla provedena izokratickou elucí.

3 Experimentální část

3.1 Analyzované léčivé přípravky

Pro stanovení obsahu ambroxolu byly použity následující léčivé přípravky:

1. sirup Ambrobene 15 mg/5 ml, Ratiopharm (Německo), číslo šarže V12836, použitelné do 05/2024
2. tablety Ambrobene 30 mg, Ratiopharm (Německo), číslo šarže V09731C, použitelné do 03/2024
3. sirup Mucosolvan 30 mg/5 ml, Sanofi-Aventis (Česká republika), číslo šarže 191235, použitelné do 10/2022
4. tvrdé tobolky s prodlouženým uvolňováním Mucosolvan long effect, Sanofi-Aventis (Česká republika), číslo šarže 905716, použitelné do 09/2022

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické nebo vyšší (HPLC) čistoty: kyselina chlorovodíková (35%, Lach-Ner), octan amonný (Lach-Ner), octová kyselina (99%, Lach-Ner) a methanol (Lach-Ner). K přípravě roztoků pro spektrofotometrická stanovení byla použita demineralizovaná voda a pro HPLC stanovení byla použita MilliQ voda. Ke kalibraci byl použit standard ambroxol hydrochloridu od firmy Sigma-Aldrich.

3.3 Pracovní postupy a vyhodnocení použitých metod

3.3.1 UV spektrofotometrie

Příprava zásobních roztoků

1. Zásobní roztok $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové byl připraven naředěním 4,4 ml 35% kyseliny chlorovodíkové demineralizovanou vodou do odměrné baňky o objemu 500,0 ml. Tento roztok byl připravován vždy čerstvý a byl použit při přípravě veškerých dalších roztoků.
2. Roztok standardu ambroxolu o koncentraci 1 g dm^{-3} byl připraven odvážením 0,2502 g standardu ambroxolu a jeho rozpuštěním v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině chlorovodíkové v 250,0 ml odměrné baňce.

Měření

Měření bylo prováděno na jednopaprskovém diode-array spektrofotometru Hewlett Packard 8453 (Hewlett Packard) v křemenné kyvetě s tloušťkou absorbující vrstvy 1 cm. Slepým vzorkem byl ve všech případech zásobní roztok kyseliny chlorovodíkové.

Metoda kalibrační závislosti

Pro stanovení ambroxolu metodou kalibrační závislosti byly ze zásobního roztoku standardu připraveny roztoky ambroxolu o koncentracích $1\text{--}20 \text{ mg dm}^{-3}$. Do odměrných baněk o objemu 10,00 ml bylo pipetováno 10, 50, 75, 100, 150, 175 a 200 μl roztoku standardu ambroxolu a následně byly doplněny po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové. Bylo změřeno jejich spektrum a u spektra určena jeho maxima, která náležela vlnovým délkám 245 a 305 nm. Kalibrační závislost byla sestrojena z hodnot absorbancí při vlnové délce 245 nm.

Nejprve bylo provedeno stanovení ambroxolu v sirupech. Do 50,00 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 150 μl sirupu Ambrobene a baňka pak byla doplněna po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové. Poté byla změřena absorbance takto připraveného roztoku při zvolené vlnové délce 245 nm. Stejný postup byl použit pro

sirup Mucosolvan, bylo ovšem odpipetováno pouze 75 μ l tohoto sirupu. Obě stanovení byla provedena třikrát.

Při stanovení ambroxolu v tabletách či kapslích bylo třeba nejprve tabletu či kapsli rozpustit a následně odstranit nerozpuštěné látky, které by měření rušily. Jak u tablet Ambrobene, tak u tobolek Mucosolvanu byl vždy jeden kus lékové formy vložen do 100,0 ml odměrné baňky a rozpuštěn v zásobním roztoku kyseliny chlorovodíkové za pomoci ultrazvukové lázně. Baňka pak byla doplněna po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové a její obsah byl přefiltrován přes filtrační papír Filtrak 388. Do 100 ml odměrné baňky byly odpipetovány 2,00 ml filtrátu roztoku tablety Ambrobene. V případě filtrátu z tobolek Mucosolvanu bylo pipetované množství 1,00 ml. Obsah banky byl doplněn po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové a byla změřena absorbance při vlnové délce 245 nm. Obě stanovení byla provedena třikrát.

Pro výpočet obsahu ambroxolu v analyzovaných vzorcích stanovených metodou kalibrační závislosti byly použity následující vztahy:

a) pro sirup Ambrobene

$$w_{amb} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A_{245} - b}{a} \cdot 0,05}{0,15} \cdot 100 \quad (3.1)$$

b) pro sirup Mucosolvan

$$w_{amb} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A_{245} - b}{a} \cdot 0,05}{0,075} \cdot 100 \quad (3.2)$$

c) pro tabletu Ambrobene

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A_{245} - b}{a} \cdot 0,1 \cdot 50}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

d) pro tobolek Mucosolvan

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{\frac{A_{245} - b}{a} \cdot 0,1 \cdot 100}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

kde w_{amb} je obsah ambroxolu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], c_{nalez} je hmotnostní koncentrace ambroxolu ve vzorku [mg cm^{-3}], c_{deklar} je hmotnostní koncentrace ambroxolu deklarovaná výrobcem [mg cm^{-3}], m_{nalez} je hmotnost ambroxolu ve vzorku [mg], m_{deklar} je hmotnostní obsah ambroxolu deklarovaný výrobcem [mg], A_{245} je naměřená absorbance vzorku, a je směrnice lineární regrese kalibrační závislosti a b je úsek lineární regrese kalibrační závislosti.

Metoda přidavku standardu

Pro oba vzorky sirupů byla do 100,00 ml odměrných baněk připravena sada pěti roztoků o různé koncentraci standardu ambroxolu. Do první sady baněk bylo pipetováno 75 μl sirupu Mucosolvanu a do druhé sady baněk bylo pipetováno 300 μl sirupu Ambrobene. Do obou sad bylo následně přidáno 0, 500, 750, 1000 a 1500 μl roztoku standardu ambroxolu. Všechny baňky poté byly doplněny po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové.

V případě lékových forem tablet či tobolek se na začátku postupovalo stejně jako u metody kalibrační přímky. Nejprve byl v jedné 100,00 ml odměrné baňce rozpuštěn jeden kus lékové formy v zásobním roztoku kyseliny chlorovodíkové za pomoci ultrazvukové lázně. Roztok byl zfiltrován přes filtrační papír Filtrak 388 a filtrát byl použit při přípravě roztoků o různé koncentraci standardu ambroxolu. Do pěti 100,00 ml odměrných baněk byly pipetovány 2,00 ml filtrátu roztoku tablety Ambrobene, resp. 10,00 ml filtrátu roztoku tobolek Mucosolvan. Do těchto dvou pětic baněk bylo přidáno 0, 500, 750, 1000 a 1500 μl roztoku standardu ambroxolu a poté byly doplněny po rysku zásobním roztokem kyseliny chlorovodíkové. Opět byla změřena absorbance při 245 nm.

Pro stanovení obsahu ambroxolu ve vzorcích byly použity získané kalibrační závislosti a následující vzorce:

a) pro sirup Ambrobene

$$w_{amb} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot \frac{0,1}{0,3}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

b) pro sirup Mucosolvan

$$w_{amb} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot \frac{0,1}{0,075}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

c) pro tabletu Ambrobene

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot 0,1 \cdot 50}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.8)$$

d) pro toboleku Mucosolvan

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot 0,1 \cdot 10}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

kde w_{amb} je obsah ambroxolu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], c_{nalez} je hmotnostní koncentrace ambroxolu ve vzorku [mg cm^{-3}], c_{deklar} je hmotnostní koncentrace ambroxolu deklarovaná výrobcem [mg cm^{-3}] m_{nalez} je hmotnost ambroxolu ve vzorku [mg], m_{deklar} je hmotnostní obsah ambroxolu deklarovaný výrobcem [mg], x je koncentrace ambroxolu zjištěná z rovnice regrese grafu závislosti absorbance na koncentraci přídatku standardu [mg dm^{-3}].

3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Příprava zásobních roztoků

1. Octanový pufr byl připraven navážením 1,9270 g octanu amonného a rozpuštěním v Milli-Q vodě v 500,0 ml odměrné baňce. Jeho pH bylo následně upraveno přidávkem koncentrované octové kyseliny na $\text{pH} = 3,51$.
2. Zásobní roztok ambroxolu byl připraven navážením 0,2502 g standardu ambroxolu a jeho rozpuštěním v methanolu v 250,0 ml odměrné baňce.

Stanovení

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla měřena na chromatografu UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko). K separaci byla použita kolona Kinetex 2.6u C18 100A (100×3.0 mm), která byla temperována na 30 °C. Byla použita izokratická eluce

mobilní fázi, kterou byl octanový pufr a methanol v poměru 30:70 (v/v). Průtok mobilní fáze byl $0,2 \text{ ml min}^{-1}$. Objem nástřiku vzorku byl $2 \text{ } \mu\text{l}$. Byla použita UV detekce při vlnové délce 245 nm .

Při úpravě pH vodné složky mobilní fáze byl použit pH metr 3510 (Jenway, UK) se skleněnou elektrodou HC103 (Theta, ČR). Elektroda byla před měřením kalibrována třibodovou kalibrací na standardní pufrů $\text{pH} = 3,00, 7,00 \text{ a } 10,00$.

Pro změření kalibrační závislosti byly ze zásobního roztoku standardu připraveny roztoky ambroxolu o koncentracích $10\text{--}200 \text{ mg dm}^{-3}$. Do $10,00 \text{ ml}$ odměrných baněk bylo odpipetováno $100, 250, 500, 750, 1000, 1500 \text{ a } 2000 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku standardu ambroxolu a jejich obsah byl doplněn po rysku methanolem. Pro samotné měření všech roztoků (včetně roztoků vzorků) v HPLC bylo vždy malé množství roztoku převedeno do 2 ml vialek, které byly uzavřeny víčkem se septem.

Pro stanovení obsahu ambroxolu v sirupu Ambrobene bylo do odměrné baňky o objemu $10,00 \text{ ml}$ odpipetováno $400 \text{ } \mu\text{l}$ sirupu a její obsah byl doplněn po rysku mobilní fázi. Celý postup byl proveden v triplikátech.

Pro stanovení obsahu ambroxolu v sirupu Mucosolvan bylo do odměrné baňky o objemu 10 ml odpipetováno vždy $200 \text{ } \mu\text{l}$ sirupu a její obsah byl doplněn po rysku methanolem. Celý postup byl proveden v triplikátech.

U pevných lékových forem byl jeden kus lékové formy nejprve rozpuštěn a roztok byl přefiltrován. Tableta Ambrobene byla rozdrcena v hladké třecí misce a kvantitativně převedena do $50,00 \text{ ml}$ odměrné baňky ve které byla za pomoci ultrazvukové lázně rozpuštěna v methanolu. Z roztoku tablety byly odpipetovány $2,00 \text{ ml}$ do $10,00 \text{ ml}$ odměrné baňky a ta byla doplněna po rysku mobilní fázi. Přes stříkačkový filtr CA $0,2 \text{ } \mu\text{l}$ bylo malé množství připraveného roztoku přefiltrováno přímo do 2 ml vialky pro HPLC měření. Celý postup byl proveden v triplikátech.

V případě tobolek Mucosolvan byla tobolka otevřena a její obsah byl rozdrcen v hladké třecí misce, poté kvantitativně převeden do $100,00 \text{ ml}$ odměrné baňky, kde byl za pomoci ultrazvukové lázně rozpuštěn v methanolu. Z tohoto roztoku byl odpipetován $1,00 \text{ ml}$ do $10,00 \text{ ml}$ odměrné baňky a její obsah byl doplněn po rysku mobilní fázi. Přes stříkačkový filtr CA $0,2 \text{ } \mu\text{l}$ bylo malé množství připraveného roztoku přefiltrováno přímo do 2 ml vialky pro HPLC měření. Celý postup byl opět proveden v triplikátech.

Pro stanovení obsahu ambroxolu ve vzorcích byly použity získané kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci ambroxolu a následující vzorce:

a) pro vzorky sirupů

$$w_{amb} = \frac{c_{nalez}}{c_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot \frac{V_2}{V_1 \cdot 1000}}{c_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.9)$$

b) pro tablety Ambrobene

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot 0,01 \cdot 25}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.10)$$

c) pro tobolky Mucosolvan

$$w_{amb} = \frac{m_{nalez}}{m_{deklar}} \cdot 100 = \frac{x \cdot 0,01 \cdot 100}{m_{deklar}} \cdot 100 \quad (3.11)$$

kde w_{amb} je obsah ambroxolu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu [%], c_{nalez} je hmotnostní koncentrace ambroxolu ve vzorku [mg cm^{-3}], c_{deklar} je hmotnostní koncentrace ambroxolu deklarovaná výrobcem [mg cm^{-3}], V_1 je objem pipetovaného vzorku [l] a V_2 je objem na který byl vzorek ředěn [l], m_{nalez} je hmotnost ambroxolu ve vzorku [mg], m_{deklar} je hmotnostní obsah ambroxolu deklarovaný výrobcem [mg] a x je koncentrace ambroxolu zjištěná z rovnice regrese grafu závislosti plochy chromatografického píku na koncentraci ambroxolu [mg dm^{-3}].

3.4 Statistické zpracování naměřených dat

Všechna naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95. Ke zpracování dat a sestrojení grafů byly použity programy OriginPro (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel pro Microsoft 365 (Microsoft Corporation, USA).

Výsledky stanovení ambroxolu získané metodou lineární regrese kalibrační závislosti jsou uváděny jako medián s intervalem spolehlivosti. V případě stanovení obsahu ambroxolu pomocí metody přidavku standardu jsou výsledky uváděny jako hodnota x_E , která byla odečtena z lineární regrese. Interval spolehlivosti byl vypočítán

jako násobek standardní odchylky hodnoty odečtené z lineární regrese s_{x_E} a kritické hodnoty Studentova t-testu, tedy $x_E \pm t s_{x_E}$. Hodnota standardní odchylky hodnoty odečtené z kalibrační přímky byla vypočítána z rovnice

$$s_{x_E} = \frac{s_{x/y}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3.12)$$

kde $s_{x/y}$ je standardní odchylka lineární regrese kalibrační přímky, b je směrnice této lineární regrese, n je počet bodů kalibrační přímky, \bar{y} průměr naměřených hodnot závislých proměnných, x_i hodnoty nezávislé proměnné a \bar{x} průměr naměřených hodnot nezávislých proměnných.

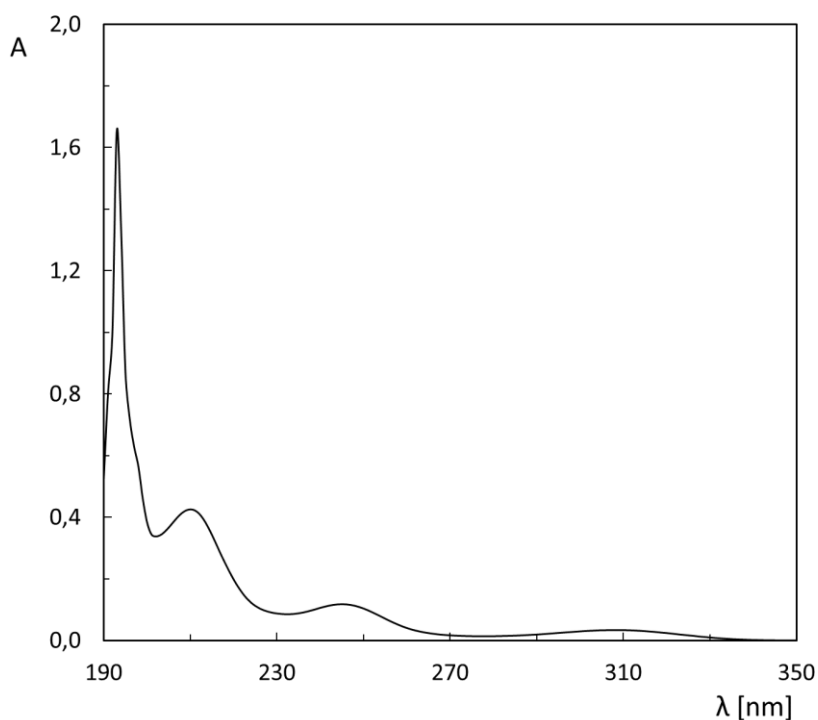
4 Výsledky a diskuze

4.1 UV spektrometrie

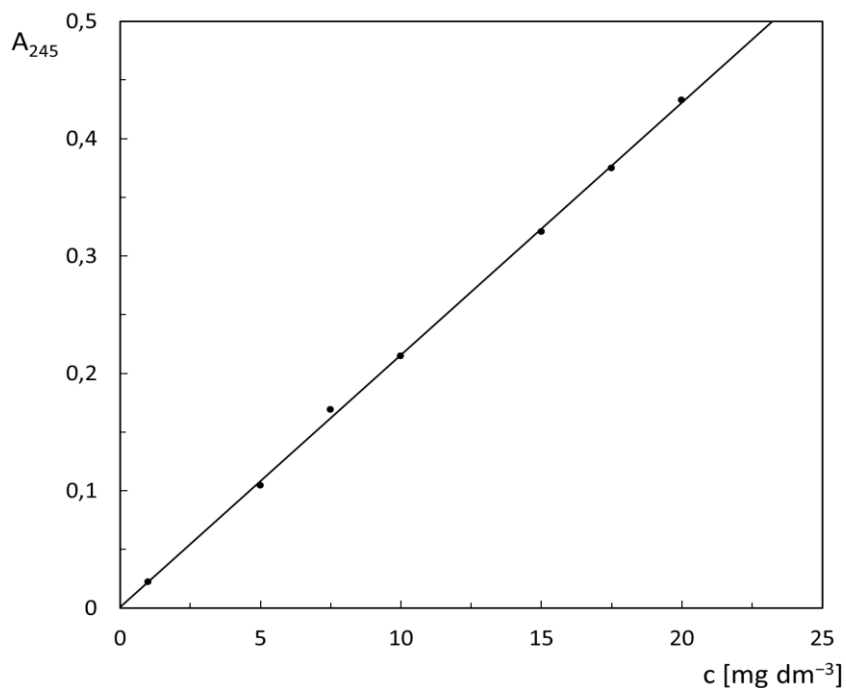
4.1.1 Metoda kalibrační závislosti

Metodu UV spektrometrie s kalibrační závislostí bylo možné použít u všech analyzovaných lékových forem ambroxolu, nicméně u tobolek s prodlouženým uvolňováním Mucosolvan toto stanovení neposkytlo uspokojivé výsledky. Pravděpodobně se nepodařilo z lékové formy uvolnit všechnu stanovovanou látku.

Na obr. 4.1 je uvedeno absorpční spektrum roztoku standardu ambroxolu o koncentraci 5 mg dm^{-3} a na obr. 4.2 je znázorněna závislost absorbance při vlnové délce 245 nm na koncentraci ambroxolu.



Obr. 4.1 UV spektrum roztoku standardu ambroxolu o koncentraci 5 mg dm^{-3} v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové (tloušťka absorbující vrstvy 1 cm)



Obr. 4.2 Kalibrační závislost absorbance při 245 nm na koncentraci ambroxolu v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové (tloušťka absorbující vrstvy 1 cm)

Výsledky stanovení ambroxolu v analyzovaných vzorcích v procentech deklarovaného obsahu ambroxolu v léčivém přípravku jsou uvedené v tab. 4.1 a tab. 4.2. Žádný výsledek nebyl podle Deanova-Dixonova testu vyloučen jako odlehlý. Na základě statistického zpracování získaných dat byl stanoven obsah ambroxolu v procentech deklarovaného obsahu v sirupu Ambrobene na $107,8 \pm 3,6 \%$, v sirupu Mucosolvan na $113,9 \pm 7,4 \%$, v tabletách Ambrobene na $109,3 \pm 2,5 \%$ a v tobolkách Mucosolvan na $70,3 \pm 9,8 \%$.

Tab. 4.1 Výsledky stanovení ambroxolu v sirupech pomocí UV spektrometrie metodou kalibrační závislosti. Zjištěná koncentrace ambroxolu ve vzorku a vypočítaný obsah ambroxolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

| vzorek (deklarovaný obsah) | stanovení | c [mg ml ⁻¹] | w [%] |
|-----------------------------|-----------|----------------------------|---------|
| sirup Ambrobene (15mg/5ml) | 1. | 3,23 | 107,6 |
| | 2. | 3,31 | 110,3 |
| | 3. | 3,23 | 107,8 |
| sirup Mucosolvan (30mg/5ml) | 1. | 7,14 | 119,0 |
| | 2. | 6,83 | 113,9 |
| | 3. | 6,80 | 113,4 |

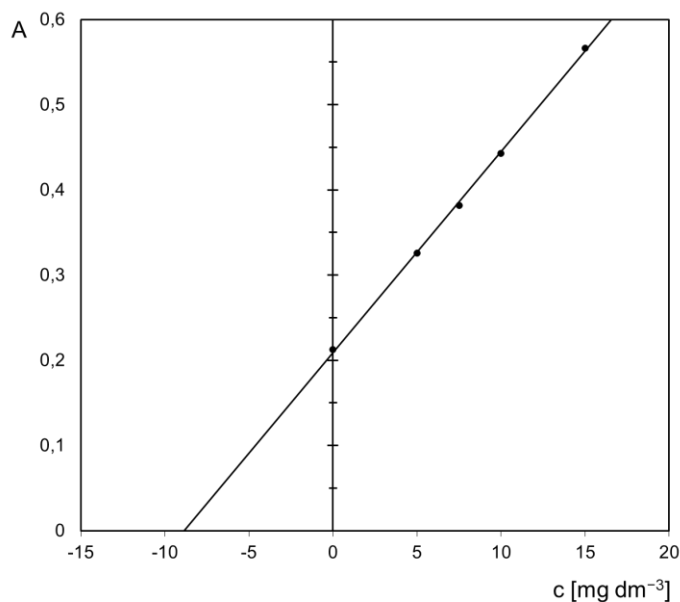
Tab. 4.2 Výsledky stanovení ambroxolu v pevných lékových formách pomocí UV spektrometrie metodou kalibrační závislosti. Zjištěné množství ambroxolu ve vzorku a vypočítaný obsah ambroxolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

| vzorek (deklarovaný obsah) | stanovení | m [mg] | w [%] |
|------------------------------------|-----------|----------|---------|
| tablety Ambrobene (30 mg/tableta) | 1. | 32,29 | 107,6 |
| | 2. | 32,87 | 109,6 |
| | 3. | 32,78 | 109,3 |
| tobolky Mucosolvan (75 mg/tobolka) | 1. | 52,76 | 70,3 |
| | 2. | 54,52 | 72,7 |
| | 3. | 48,89 | 65,2 |

4.1.2 Metoda přidavku standardu

Metodu UV spektrometrie s přidavkem standardu bylo možné provést u všech lékových forem ambroxolu, ale u tobolek s prodlouženým uvolňováním Mucosolvan toto stanovení neposkytlo uspokojivé výsledky. Pravděpodobně opět nedošlo k úplnému uvolnění stanovované látky.

Na obr. 4.3 je pro ilustraci znázorněna závislost absorbance při 245 nm na koncentraci přídatku standardu ambroxolu při stanovení obsahu ambroxolu v sirupu Ambrobene.



Obr. 4.3 Závislost absorbance při 245 nm na koncentraci přídatku standardu ambroxolu při stanovení obsahu ambroxolu v sirupu Ambrobene v prostředí 0,1 mol dm⁻³ kyseliny chlorovodíkové (tloušťka absorbující vrstvy 1 cm)

Vzorek každé lékové formy byl stanovován jednou a obsah ambroxolu byl vypočítán z křivky lineární regrese. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tab. 4.3 a v tab. 4.4.

Tab. 4.3 Výsledky stanovení ambroxolu v sirupech metodou přídatku standardu. Zjištěná koncentrace ambroxolu ve vzorku a vypočítaný obsah ambroxolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

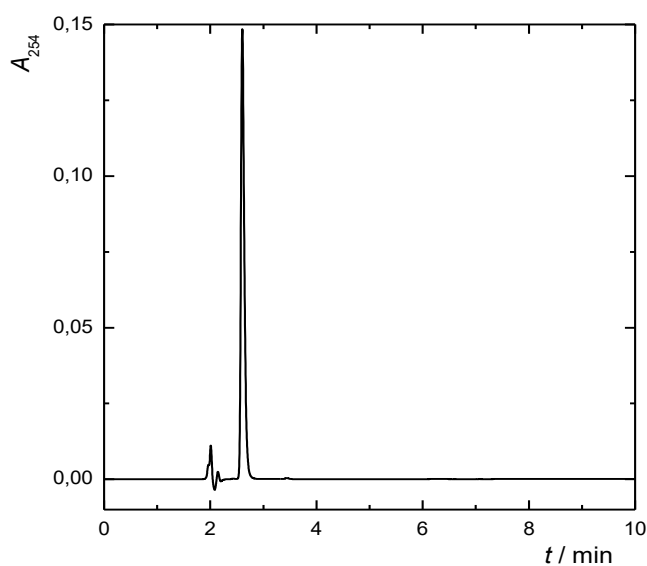
| vzorek (deklarovaný obsah) | c [mg ml ⁻¹] | w [%] |
|-----------------------------|----------------------------|------------|
| sirup Ambrobene (15mg/5ml) | 2,95±0,14 | 98,3±4,7 |
| sirup Mucosolvan (30mg/5ml) | 6,70±1,01 | 111,7±16,8 |

Tab. 4.4 Výsledky stanovení ambroxolu v pevných lékových formách metodou přidavku standardu. Zjištěná koncentrace ambroxolu ve vzorku a vypočítaný obsah ambroxolu ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

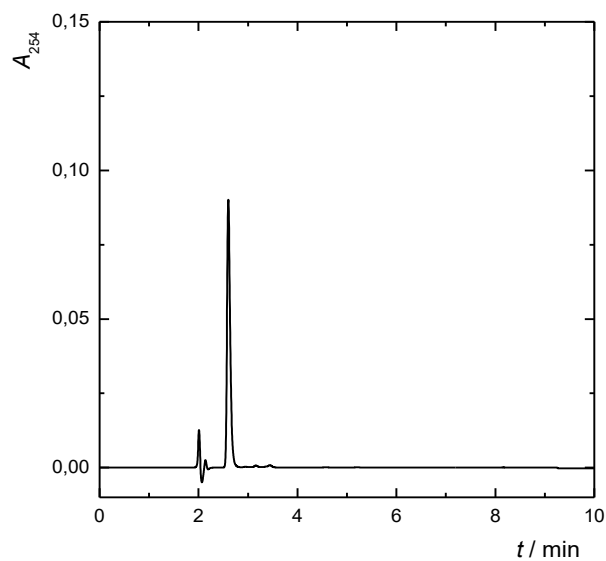
| vzorek (deklarovaný obsah) | m [mg] | w [%] |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|
| tablety Ambrobene (30 mg/tableta) | $30,6 \pm 0,98$ | $102,0 \pm 3,3$ |
| tobolky Mucosolvan (75 mg/tobolka) | $16,7 \pm 0,12$ | $22,3 \pm 0,2$ |

4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

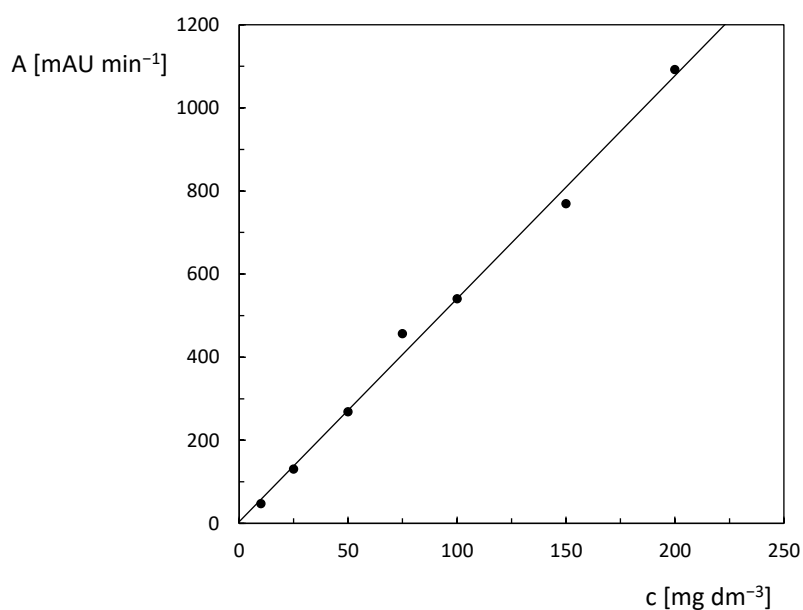
Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií bylo možné použít u všech lékových forem ambroxolu. Na obr. 4.4 je pro ilustraci uvedený chromatogram roztoku sirupu Ambrobene a na obr. 4.5 chromatogram roztoku tobolek Mucosolvan. Na obr. 4.6 je také znázorněna závislost plochy zaznamenaného chromatografického píku na koncentraci standardu ambroxolu.



Obr. 4.4 Chromatogram s UV detekcí roztoku sirupu Ambrobene. Podmínky měření: kolona Kinetex 2.6u C18 100A (100×3.0 mm), temperovaná na 30 °C. Izokratická eluce: octanový pufr a methanol 30:70 (v/v), průtok $0,2 \text{ ml min}^{-1}$. Nástřik vzorku $2 \mu\text{l}$.



Obr. 4.5 Chromatogram s UV detekcí roztoku tablety Mucosolvan. Podmínky měření: kolona Kinetex 2.6u C18 100A (100×3.0 mm), temperovaná na 30 °C. Izokratická eluce: octanový pufr a methanol 30:70 (v/v), průtok 0,2 ml min⁻¹. Nástřik vzorku 2 μl.



Obr. 4.6 Kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci standardu ambroxolu při HPLC stanovení. Podmínky měření: kolona Kinetex 2.6u C18 100A (100×3.0 mm), temperovaná na 30 °C. Izokratická eluce: octanový pufr a methanol 30:70 (v/v), průtok 0,2 ml min⁻¹. Nástřik vzorku 2 μl.

Stanovení všech lékových forem bylo provedeno třikrát. Výsledky jsou uvedené v procentech deklarovaného obsahu v tab. 4.5 a tab. 4.6. Na základě Deanova-Dixonova testu nebyl žádný výsledek vyloučen jako odlehlý. Statistickým zpracováním získaných dat byl stanoven obsah ambroxolu v procentech deklarovaného obsahu v sirupu Ambrobene na $103,8 \pm 2,8$ %, v sirupu Mucosolvan na $102,8 \pm 2,7$ %, v tabletách Ambrobene na $103,9 \pm 4,9$ % a v tobolkách Mucosolvan na $115,6 \pm 5,3$ %.

Tab. 4.5 Výsledky stanovení ambroxolu v sirupech metodou HPLC. Plocha zaznamenaného chromatografického píku, zjištěná koncentrace ambroxolu a vypočítaný obsah ambroxolu v procentech deklarovaného obsahu.

| vzorek (deklarovaný obsah) | stanovení | A [mAU min ⁻¹] | c [mg cm ⁻³] | w [%] |
|-----------------------------|-----------|------------------------------|----------------------------|---------|
| sirup Ambrobene (15mg/5ml) | 1. | 696,073 | 3,22 | 107,5 |
| | 2. | 672,357 | 3,11 | 103,8 |
| | 3. | 663,991 | 3,07 | 102,5 |
| sirup Mucosolvan (30mg/5ml) | 1. | 671,535 | 6,22 | 103,6 |
| | 2. | 665,979 | 6,17 | 102,8 |
| | 3. | 658,398 | 6,10 | 101,6 |

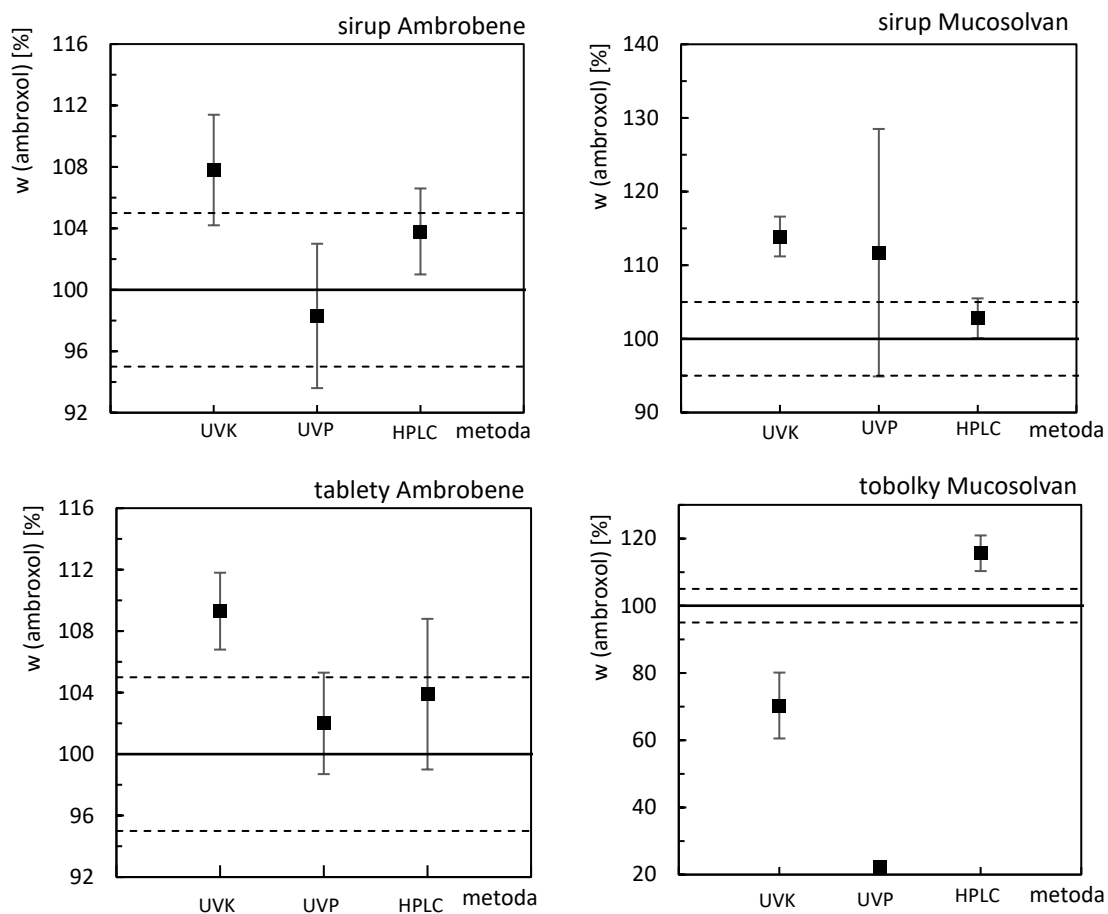
Tab. 4.6 Výsledky stanovení ambroxolu v pevných lékových formách metodou HPLC. Plocha zaznamenaného chromatografického píku, zjištěné množství ambroxolu a vypočítaný obsah ambroxolu v procentech deklarovaného obsahu.

| vzorek (deklarovaný obsah) | stanovení | A [mAU min ⁻¹] | m [mg] | w [%] |
|------------------------------------|-----------|------------------------------|----------|---------|
| tablety Ambrobene (30 mg/tableta) | 1. | 679,136 | 31,4 | 104,8 |
| | 2. | 673,101 | 31,2 | 103,9 |
| | 3. | 655,022 | 30,3 | 101,1 |
| tobolky Mucosolvan (75 mg/tobolka) | 1. | 469,413 | 86,7 | 115,6 |
| | 2. | 475,163 | 87,8 | 117,0 |
| | 3. | 458,663 | 84,7 | 112,9 |

4.3 Vyhodnocení pravdivosti a preciznosti vybraných metod stanovení ambroxolu

Pravdivosti stanovení pro jednotlivé analyzované léčivé přípravky byly porovnány graficky jako těsnosti shod mezi vypočítanými mediány při jednotlivých měřeních a referenčními hodnotami obsahu ambroxolu v jednotlivých lékových formách. Stanovení je pravdivé, pokud medián daného stanovení, vyobrazený černým čtvercem, leží v referenčních mezích, které jsou vyznačeny přerušovanými čarami. Podle Českého lékopisu 2017 [3] se obsah ambroxolu v léčivých přípravcích musí pohybovat v rozmezí od 95 % do 105 %. Z obr. 4.7 plyne, že nejpravdivější metodou stanovení ambroxolu v léčivých přípravcích byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pokud pomineme tobolky Mucosolvan, které při stanovení metodou kalibrační přímky a metodou přidavku standardu UV spektrometrie neposkytovaly relevantní data, tak nejméně pravdivou byla metoda kalibrační přímky UV spektrometrie, která poskytovala nadhodnocené výsledky.

Preciznosti stanovení ambroxolu v léčivých přípravcích byly vyhodnoceny také graficky jako těsnosti shod mezi naměřenými hodnotami stejnou metodou za stejných podmínek. Jsou udány jako intervaly spolehlivosti a jsou znázorněny chybovými úsečkami. Stanovení je tím více precizní, čím kratší je chybová úsečka. Pokud opět pomineme neuspokojivá měření tobolek Mucosolvan metodou kalibrační přímky a metodou přidavku standardu UV spektrometrie, pak nejméně precizní byla metoda přidavku standardu UV spektrometrie. Zbylé dvě metody byly z hlediska preciznosti zhruba na stejné úrovni.



Obr. 4.7 Grafické porovnání výsledků zvolených metod pro stanovení ambroxolu v různých léčivých přípravcích: (UVK) metoda UV spektrometrie s kalibrační závislostí, (UVP) metoda UV spektrometrie s přidavkem standardu, (HPLC) vysokoučinná kapalinová chromatografie. Výsledky jsou uvedeny jako mediány s intervalem spolehlivosti. Silná čára představuje deklarovaný obsah ambroxolu v léčivém přípravku a přerušovaná čára značí horní a dolní mez akceptovaného obsahu ambroxolu podle Českého lékopisu 2017.

4.4 Vyhodnocení finanční a časové náročnosti vybraných metod stanovení ambroxolu

Vzhledem k tomu, že čas přípravy roztoků pro finální analýzu byl zhruba pro všechny metody stejný a stejně tak byl i pro všechny vybrané metody stejně časově náročný výpočet procentuálního obsahu ambroxolu v léčivých přípravcích, tak tyto úkony nebyly zahrnuty do porovnání časové náročnosti stanovení vybranými metodami. Časová náročnost byla vyhodnocena jako průměrný čas potřebný k analýze jednoho vzorku analytickým přístrojem. Časově nejnáročnější metodou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kdy k analýze jednoho vzorku bylo potřeba 10 minut. K analýze jednoho vzorku pomocí UV spektrometrie pak bylo potřeba zhruba 10 sekund.

Finanční náročnost byla vyhodnocena jako finanční náklady na použité chemikálie, které byly potřeba ke stanovení jednoho vzorku. Do vyhodnocení nebyla zahrnuta pořizovací cena přístrojů ani cena stanovovaných vzorků či standardu. Ceny chemikálií byly převzaty z ceníku dodavatelské společnosti [33]. Průměrná cena spektrofotometrického stanovení jednoho vzorku činila zhruba 1 Kč a stanovení jednoho vzorku vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií zhruba 15 Kč.

5 Závěr

Záměrem předkládané bakalářské práce bylo porovnání tří analytických metod pro stanovení ambroxolu v léčivých přípravcích z hlediska pravdivosti, preciznosti, časových a finančních nároků.

Pro stanovení ambroxolu byly vybrány tři metody: UV spektrometrie za použití metody kalibrační závislosti a metody přídavku standardu a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV spektrometrickou detekcí. Jako nejpravdivější metoda se projevila vysokoúčinná kapalinová chromatografie, naopak metoda kalibrační závislosti UV spektrometrie ukazovala nadhodnocené výsledky. Z hlediska preciznosti byla nejhůře vyhodnocena metoda přídavku standardu UV spektrometrie, která měla největší rozptyl naměřených hodnot. Obě spektrometrická stanovení tobolek s prodlouženým uvolňováním Mucosolvan neposkytovala správné výsledky s porovnáním hodnot deklarovaným výrobcem. Pravděpodobně se nepodařilo účinnou látku z tobolek plně uvolnit, a tak metody poskytovaly podhodnocené výsledky.

Finančně i časově nejvýhodnějšími se ukázaly metody UV spektrometrie, naopak nejdražší i časově nejnáročnější byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která ovšem poskytovala nepravdivější výsledky.

Literatura

1. Borovanský, A., Csöllei, J. (2020) *Farmaceutická chemie (Farmakochemie), V. Léčiva s účinkem na respirační, gastrointestinální a vylučovací trakt*. Brno Veterinární a farmaceutická univerzita.
2. Grange, J.M., Snell, N.J.C. (1996) Activity of bromhexine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from the Indian shrub *Adhatoda vasica*, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **50**, 49–53.
3. (2017) *Český lékopis 2017*. Praha, Grada.
4. US Patent 3336308 (1964) *Novel amino halo-benzylamines*.
5. Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J. *Farmakochemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická.
6. Ottonello, L., Arduino, N., Bertolotto, M., Dapino, P., Mancini, M., Dallegri, F. (2003) In vitro inhibition of human neutrophil histotoxicity by ambroxol: evidence for a multistep mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 736–742.
7. Gillissen, A., Nowak, D. (1998) Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir. Med.* **92**, 609–623.
8. Weiser, T., Wilson, N. (2002) Inhibition of Tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na⁺ channels by the secretolytic ambroxol. *Mol. Pharmacol.* **62**, 433–438.
9. Vyhnánková L. (2006) Kašel při onemocnění horních cest dýchacích. *Pediatr. Praxi* **1**, 8–12.
10. Lincová D., Farghali H. (2007) *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Praha, Galén.
11. Musil J. (1994) *Molekulové základy klinické biochemie*. Praha, Grada.
12. Sanderson, R.J., Paul, G.W., Vatter, A.E., Filley G. F. (1976) Morphological and physical basis for lung surfactant action. *Respir. Physiol.* **27**, 379–392.
13. Kido, H., Okumura, Y., Yamada, H., Mizuno, D., Higashi, Y., Yano, M. (2004) Secretory leukoprotease inhibitor and pulmonary surfactant serve as principal defenses against influenza A virus infection in the airway and chemical agents up-regulating their levels may have therapeutic potential. *Biol. Chem.* **385**, 1029–1034.
14. Hartshorn, K., Crouch, E., White, M., Eggleton, P., Tauber, A., Chang, D., Sastry, K. (1994) Evidence for a protective role of pulmonary surfactant protein-D (sp-D) against influenza-A viruses. *J. Clin. Invest.* **94**, 311–319.
15. Stetinova, V., Herout, V., Kvetina, J. (2004) In vitro and in vivo antioxidant activity of ambroxol. *Clin. Exp. Med.* **4**, 152–158.
16. Gibbs, B.F., Schmutzler, W., Vollrath, I.B., Brosthardt, P., Braam, U., Wolff, H.H., Zwadlo-Klarwasser, G. (1999) Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. *Inflamm. Res.* **48**, 86–93.

17. Leffler, A., Reckzeh, J., Nau, C. (2010) Block of sensory neuronal Na⁺ channels by the secretolytic ambroxol is associated with an interaction with local anesthetic binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **630**, 19–28.
18. Malerba, M., Ponticiello, A., Radaeli, A., Bensi, G., Grassi, V. (2004) Effect of twelve-months therapy with oral ambroxol in preventing exacerbations in patients with COPD. Double-blind, randomized, multicenter, placebo-controlled study (the AMETHIST Trial). *Pulm. Pharmacol. Ther.* **17**, 27–34.
19. Varelogianni, G., Hussain, R., Strid, H., Oliynyk, I., Roomans, G.M., Johannesson, M. (2013) The effect of ambroxol on chloride transport, CFTR and ENaC in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Biol. Int.* **37**, 1149–1156.
20. Prováděcí rozhodnutí Komise o registracích humánních léčivých přípravků, které obsahují účinné látky „ambroxol“ nebo „bromhexin“, v rámci článku 31 směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/83/ES (2016). [https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=C\(2016\)226](https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=C(2016)226) [navštíveno 17. června 2021].
21. Malerba, M., Ragnoli, B. (2008) Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1119–1129.
22. Dinçer, Z., Basan, H., Göger, N.G. (2003) Quantitative determination of ambroxol in tablets by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 867–872.
23. Kim, J., Noh, J., Chung, H., Woo, Y.-A., Kemper, M.S., Lee, Y. (2007) Direct, non-destructive quantitative measurement of an active pharmaceutical ingredient in an intact capsule formulation using Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **598**, 280–85.
24. Levent, A., Senturk, Z. (2010) Colorimetric and atomic absorption spectrometric determination of mucolytic drug ambroxol through ion-pair formation with iron and thiocyanate. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **13**, 675–682.
25. Pai, S., Lalitha, N., Balakrishna, B., Rao, G. (2006) Determination of ambroxol hydrochloride using dithiocarbamic acid colorimetric method. *Indian J. Pharm. Sci.* **68**, 501–502
26. Koundourellis, J.E., Malliou, E.T., Broussali, T.A. (2000) High performance liquid chromatographic determination of ambroxol in the presence of different preservatives in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 469–75.
27. Bazylak, G., Nagels, L.J. (2003) Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 887–903.
28. Kim, H., Yoo, J.-Y., Han, S.B., Lee, H.J., Lee, K.R. (2003) Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 209–216.
29. PerezRuiz, T., MartinezLozano, C., Sanz, A., Bravo, E. (1997) Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **692**, 199–205.
30. Habib, I.H.I., Zayed, S.I.M. (2005) Adsorptive stripping voltammetric determination of ambroxol. *Pharm. - Int. J. Pharm. Sci.* **60**, 193–196.

31. Sun, J.J., Wu, Y., Song, J.F. (2014) Electrochemical oxidation mechanism of ambroxol and its voltammetric determination in the presence of dodecyl sulfate. *Electrochim. Acta* **115**, 386–392.
32. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2019) *Analytická chemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
33. <https://www.lach-ner.cz/> [navštíveno 17. června 2021].