

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Hynek Mácha

**POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ DIKLOFENAKU
VE FARMACEUTICKÝCH VZORCÍCH**

The Comparison of Methods for Determination of Diclofenac
in Pharmaceutical Samples

Bakalářská práce

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

Praha 2016

Prohlášení

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

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

V Praze dne 1. května 2016

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli, RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za odbornou pomoc, rady a trpělivost při vypracování této bakalářské práce. Dále děkuji svým rodičům za veškerou podporu při studiu.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat pět vybraných analytických metod pro stanovení diklofenaku v léčivých přípravcích z hlediska pravdivosti a preciznosti. Pro stanovení byly vybrány: titrace v nevodném prostředí, spektrofotometrické stanovení v UV oblasti, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s měďnatými ionty, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou a stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Pro stanovení byly zvoleny tři lékové formy: měkké tobolky, čípky a gel. Pro analýzu všech léčivých přípravků byla použitelná pouze HPLC. Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti bylo možné využít pro stanovení obsahu diklofenaku pouze v tobolkách a gelu. Titrace v nevodném prostředí bylo možné použít pouze u vzorku čípků. Obě spektrofotometrická stanovení ve viditelné oblasti se ukázala jako nepoužitelná. Všechny metody, které bylo možné na stanovení diklofenaku v léčivých přípravcích použít se ukázaly jako pravdivé. Nejpreciznějším stanovením se ukázala být titrace v nevodném prostředí a HPLC, naopak nejméně precizní byla spektrometrie v UV oblasti.

Klíčová slova: diklofenak, farmaceutické vzorky, HPLC, spektrofotometrie, titrace

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to compare five chosen analytical methods for the determination of diclofenac in pharmaceutical preparations in terms of measurement trueness and measurement accuracy. The following methods were chosen for the determination: titration in non-aqueous media, spectrophotometric determination in the UV region, spectrophotometric determination in the VIS region based on the formation of a complex of diclofenac with cupric ions, spectrophotometric determination in the VIS region area based on the formation of reaction product of diclofenac with nitric acid, and HPLC. Three dosage forms were selected for analysis: soft capsules, suppositories, and gel. HPLC was only applicable for the analysis of all medical forms. UV spectrophotometric determination was applicable to determine the content of diclofenac in capsules and gel only. Titration in non-aqueous solvents was applicable solely for suppositories. Both spectrophotometric determinations in the visible region have proved useless. All methods, which allow for determination of diclofenac in medical forms, have proven to be trueness. Titration in non-aqueous media and HPLC proved the most accurate determination; UV spectrophotometry was the least accurate.

Key words: diclofenac, HPLC, pharmaceutical preparations, spectrophotometry, titration

Obsah

1	Úvod a teoretická část	7
1.1	Cíl práce	7
1.2	Diklofenak, charakteristika léčiva	7
1.2.1	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti	7
1.2.2	Syntéza	8
1.2.3	Farmakologie a farmakokinetika	9
1.2.4	Způsoby podání a dávkování	10
1.3	Analytické metody pro stanovení diklofenaku	10
1.3.1	Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí	11
1.3.2	Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti	11
1.3.3	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s mědnatými ionty	12
1.3.4	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou	12
1.3.5	Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	12
2	Experimentální část	13
2.1	Analyzované léčivé přípravky, standard diklofenaku	13
2.2	Použité chemikálie	13
2.3	Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí	14
2.4	Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti	16
2.5	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s mědnatými ionty	17
2.6	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou	18
2.7	Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	19
2.8	Statistické zpracování naměřených dat	20
3	Výsledky a diskuse	21
3.1	Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí	21
3.2	Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti	23
3.3	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s mědnatými ionty	25

3.4	Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou	26
3.5	Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	28
3.6	Diskuse	30
4	Závěr	32
	Literatura	33

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>A</i>	absorbance
<i>c</i>	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
<i>E</i>	rovnovážné napětí [mV]
<i>f</i>	faktor odměrného roztoku
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<i>m</i>	hmotnost [g]
<i>M</i>	molární hmotnost [g mol^{-1}]
<i>P</i>	rozdělovací koeficient oktanol-voda
$\text{p}K_{\text{a}}$	záporný logaritmus disociační konstanty
RP	obrácené fáze
s_{r}	relativní směrodatná odchylka
<i>t</i>	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
UV	ultrafialová oblast záření
<i>V</i>	objem [dm^3]
VIS	viditelná oblast záření
<i>w</i>	obsah látky [%]
λ	vlnová délka [nm]

1 ÚVOD A TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Tato práce je zaměřena na porovnání pěti vybraných analytických metod (titrace v nevodném prostředí, UV spektrofotometrie, 2 různé metody VIS spektrofotometrie a HPLC) pro stanovení léčiva diklofenaku ve třech léčivých přípravcích (tobolky, čípky a gel) z hlediska pravdivosti a preciznosti.

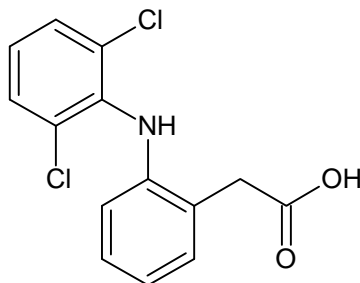
1.2 Diklofenak, charakteristika léčiva

Diklofenak je velmi rozšířené léčivo, patřící do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv, která zahrnuje více různých chemických sloučenin s různou silou, ale podobnými účinky na organismus [1, 2]. Nejčastěji je užíván pro léčbu revmatoidní artritidy. Kromě protizánětlivých účinků jsou uváděny také antipyretické a analgetické. Mezi jeho komerční názvy patří například Voltaren, Acaflon, nebo Diclomax. Poprvé byl syntetizován roku 1973 Alfrédem Sallmannem a Rudolfem Pfistem, společností se současným názvem Novartis [3].

1.2.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

Diklofenak (obr. 1.1), systematicky 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]benzenoctová kyselina, CASN [15307-86-5] je bílá krystalická látka s molární hmotností $296,15 \text{ g mol}^{-1}$, bodem tání $156\text{--}185 \text{ }^\circ\text{C}$, disociační konstantou $\text{p}K_a = 4,2$, rozdělovacím koeficientem oktanol-voda $\log P = 4,5$ (cit. [4–7]). Pro farmaceutické účely se z důvodu lepší rozpustnosti používá jeho sodná (případně draselná) sůl. Sodná sůl diklofenaku, CASN [15307-81-0] je bílý nebo slabě nažloutlý, hygroskopický, krystalický prášek bez

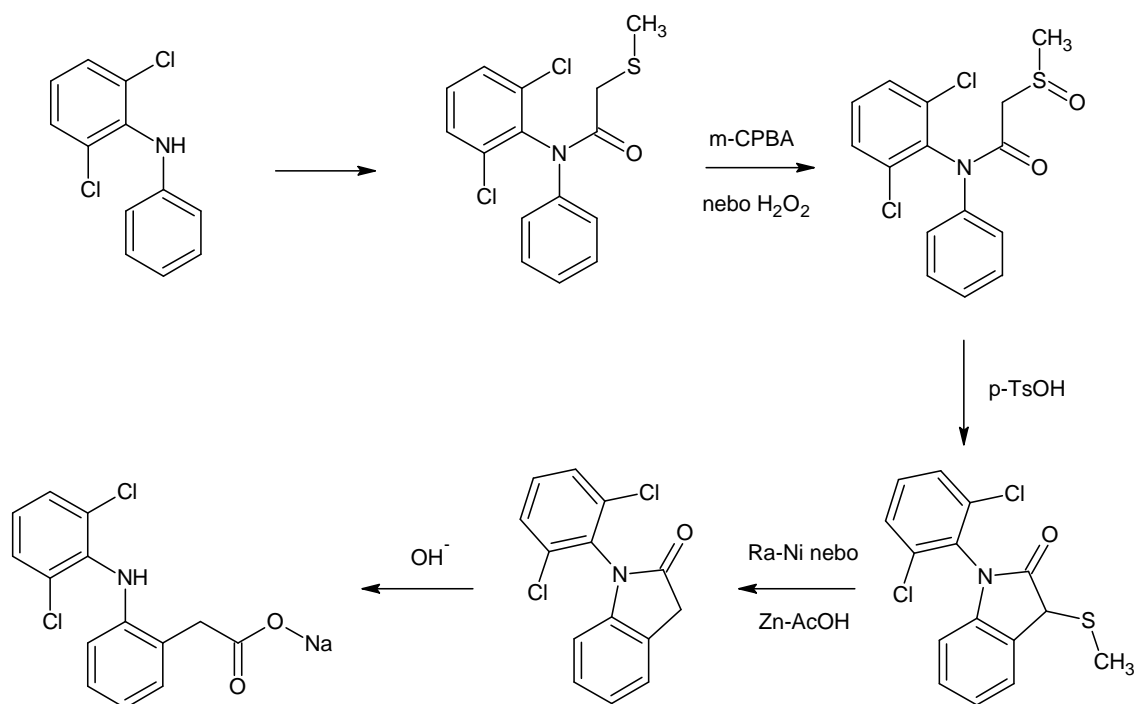
zápachu. Jeho molární hmotnost je $318,13 \text{ g mol}^{-1}$, bod tání $283\text{--}285 \text{ }^\circ\text{C}$. Rozpustnost ve vodě (při $25 \text{ }^\circ\text{C}$) je $>9 \text{ mg/ml}$, je snadno rozpustný v methanolu a prakticky nerozpustný v chloroformu, acetonitrilu a etheru.



Obr. 1.1 Chemická struktura diklofenaku

1.2.2 Syntéza

Diklofenak se připravuje synteticky [8]. Nejčastější syntéza (obr. 1.2) vychází z *N*-fenyl-2,6-dichloranilinu, jehož *N*-acylací vzniká α -(methylthio)acetanilid, ten se následně oxiduje *m*-chlorperoxibenzoovou kyselinou (nebo peroxidem vodíku) za vzniku α -(methylsulfinyl)acetanilidu. Jeho zahříváním s *p*-toluensulfonylovou kyselinou v benzenu dochází k cyklizaci a vzniklý produkt se desulfuruje buď Raneyovým niklem, nebo zinkovým prachem. Získaný oxindol je poté hydrolyzován v hydroxidu sodném za vzniku sodné soli diklofenaku.



Obr. 1.2 Syntéza sodné soli diklofenaku.

1.2.3 Farmakologie a farmakokinetika

Diklofenak se používá na léčbu revmatických onemocnění, revmatoidní artritidy, zánětu oka, biliární koliky, menorigie, akutních typů bolesti hlavy, migrény, horečky a akutním záchvatům dny [1]. Protizánětlivý účinek diklofenaku je spojen s inhibicí enzymu zvaného cyklooxygenasa-2, který způsobuje přeměnu arachidonové kyseliny na prostaglandiny, které v místě vzniku způsobují zánětlivou reakci. Je také prokázána inhibice ukládání krevních destiček, což má zřejmě za následek zmírnění otoku [2].

Při orálním podání se diklofenak velmi dobře absorbuje, nicméně jeho biologická dostupnost je asi 50 % v důsledku first-pass efektu [1, 8]. V krevní plazmě se z více jak 99 % váže na proteiny krevní plazmy. Jeho poločas eliminace v plazmě je 1–2 hodiny, v synoviální tekutině pak 3–6 hodin; clearance činí 4 ml/min/kg, distribuční objem 0,17 l/kg. Diklofenak je biotransformován na hydroxy deriváty, které se následně vylučují ve formě glukuronidů, nebo sulfátů do moči (asi 60 %) a do žluči (okolo 35 %). Vylučování do mateřského mléka je minimální a pro kojené dítě neškodné.

1.2.4 Způsoby podání a dávkování

Terapeutická koncentrace diklofenaku v plazmě se udává v rozmezí 0,1 do 2,2 mg l⁻¹ (cit. [4]). Nejčastěji se diklofenak podává orálně (ve formě tablet, potahovaných tablet, kapslí) nebo rektálně (ve formě čípků) v jednotlivých dávkách o obsahu sodné soli diklofenaku 70–150 mg obvykle čtyřikrát denně [1]. Maximální denní dávka by neměla přesáhnout 200 mg; hlavním vedlejším účinkem je podráždění žaludku a žaludeční vředy, které vznikají v důsledku inhibice cyklooxygenázy, která pomáhá udržovat stav žaludeční sliznice.

Diklofenak může být podáván i intramuskulární injekcí (zabránění first-pass efektu) v celkové denní dávce 75 mg. Případně lze použít i infusní podání ve fyziologickém roztoku nebo v 5 % glukose.

Lokálně se diklofenak podává ve formě gelů s obsahem 1 % diklofenaku, doba podávání by neměla přesáhnout jeden měsíc. Podobně se lokálně podává diklofenak v podobě očních kapek s obsahem 0,1 % diklofenaku.

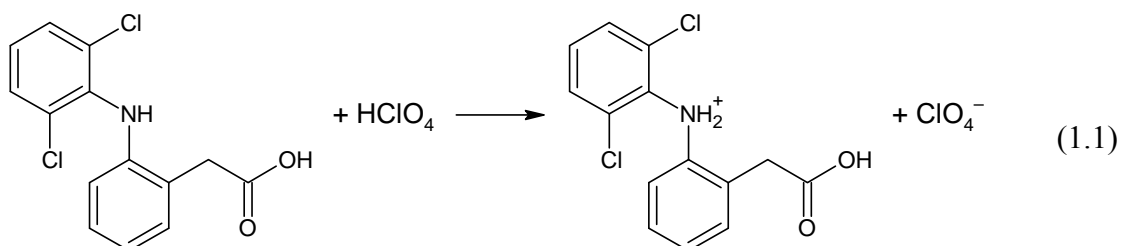
1.3 Analytické metody pro stanovení diklofenaku

Od roku 1975, kdy byl diklofenak uveden na trh, byla publikována celá řada metod pro jeho stanovení. Přehled starších metod (do roku 1990) podává monografie [8], přehled metod pro stanovení diklofenaku v biologických vzorcích pak monografie [4]. Lékopisným stanovením [5–7] je titrace kyselinou chloristou v prostředí bezvodé octové kyseliny. Nověji publikované metody zahrnují z elektrochemických metod potenciometrii [9–11], polarografii [12], voltametrii [13] a kapilární zónovou elektroforézu [14]. Dále byla popsána řada spektrofotometrických [15, 16] a spektrofluorimetrických [17, 18] stanovení. Bezesporu nejpopulárnějšími metodami pro stanovení diklofenaku jak v léčivých přípravcích, tak v biologických vzorcích jsou chromatografické metody, jako tenkovrstevná chromatografie [19], plynová chromatografie [13, 20] ale zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí [21] nebo hmotnostní detekcí [22].

Pro tuto práci bylo vybráno pět metod stanovení. Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí, spektrofotometrické stanovení v UV oblasti, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku barevného komplexu diklofenaku s mědnatými ionty, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti za využití produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou a stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

1.3.1 Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí

Titrace kyselinou chloristou v prostředí bezvodé octové kyseliny je lékopisy předepisována pro stanovení substance sodné soli diklofenaku [5–7]. Jde o klasickou titraci, při níž se projevuje nivelizující efekt protogenní octové kyseliny [23]. Vlastní princip spočívá ve stanovení aminoskupiny diklofenaku, která se díky bezvodému prostředí chová jako silná báze a jde velice snadno acidimetricky stanovit odměrným roztokem kyseliny chloristé



Bod ekvivalence se určí buď vizuálně pomocí krystalové violeti, nebo potenciometricky se skleněnou elektrodou.

1.3.2 Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti

Metoda využívá vlastnosti aromatických jader absorbovat záření v UV oblasti. Pro diklofenak byla změřena absorpční maxima při vlnové délce 276 nm [8]. Ve vodném prostředí byl zjištěn lineární dynamický rozsah metody $4 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} (cit. [24]).

1.3.3 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s měďnatými ionty

Stanovení bylo navrženo de Souza a Tubinem [25]. Principem je tvorba komplexu diklofenak-měďnaté ionty a prostředí acetátového pufru pH = 5,3 a následnou extrakcí komplexu do chloroformu. V tomto prostředí má vzniklý zelený komplex absorpční maximum při 680 nm. Kalibrační závislost je lineární v rozsahu 1,0 až 25,0 mg/l diklofenaku. Mez detekce je 0,2 mg/l a mez stanovitelnosti 0,7 mg/l diklofenaku.

1.3.4 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou

Stanovení navrhl Matin a kol. [26], jeho principem je nitrifikace amino skupiny diklofenaku. K diklofenaku je přidána koncentrovaná kyselina dusičná, a následně je proměřováno nažloutlé zbarvení vzniklého produktu při vlnové délce 380 nm. Za zbarvení je zřejmě zodpovědný nitrifikací vzniklý nitrobenzen z anilinové části diklofenaku. Kalibrační závislost je lineární v rozsahu 1 až 30 mg/l diklofenaku. Mez detekce je 0,45 mg/l diklofenaku.

1.3.5 Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Byla popsána řada metod pro HPLC stanovení diklofenaku [4, 8, 21, 22]. V této práci byla použita RP-HPLC lékopisná metoda [6, 7]. Jako stacionární fáze se při ní používá kolona RP-C18, mobilní fází je směs methanol u a 0,01 M fosfátového pufru ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 2,5) v poměru 70:30, detekce spektrofotometrická při vlnové délce 276 nm.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Analyzované léčivé přípravky, standard diklofenaku

Stanovení obsahu diklofenaku v léčivých přípravcích bylo provedeno na třech léčivých přípravcích:

- Voltaren[®] Rapid, měkké tobolky s deklarovaným obsahem 25 mg draselné soli diklofenaku. Výrobce Novartis, ČR. Číslo šarže: 37804A.
- Diclorem[®] 50, čípky s deklarovaným obsahem 50 mg sodné soli diklofenaku. Výrobce Alfa Wassermann, Itálie. Číslo šarže: 69085.
- Olfen, gel s deklarovaným obsahem 10 mg sodné soli diklofenaku v 1 g gelu. Výrobce Teva Pharmaceuticals, ČR. Číslo šarže: 028066P.

Jako standard diklofenaku byla použita sodná důl diklofenaku (Sigma-Aldrich, kat. č. D6899).

2.2 Použité chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly analytické čistoty (pokud není uvedeno jinak): anhydrid octové kyseliny (Penta, ČR), bezvodá octová kyselina 99% (Penta, ČR), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lachner), hydrogenftalan draselný (Lachema), hydroxid sodný (Lachner), chloroform (Penta), krystalová violet (Fluka), kyselina dusičná 63% (Penta), kyselina fosforečná 85% (Penta), kyselina chloristá 70% (Penta, ČR), methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich), octan měďnatý monohydrát (Sigma-Aldrich).

2.3 Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí

Příprava a standardizace 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé

Odměrný roztok 0,1M kyseliny chloristé byl připraven smíšením 14,4 ml 70% kyseliny chloristé s asi 30 ml anhydridu octové kyseliny v 1000 ml odměrné baňce, poté byla baňka po rysku doplněna bezvodou octovou kyselinou. Připravený roztok byl přelit do poloautomatické byrety se vstupy chráněnými chlorkalciovými rourkami.

Pro standardizaci připraveného 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé bylo do 100 ml kádinky odváženo asi 0,1 g hydrogenftalanu draselného přesně. Navážka byla rozpuštěna v asi 30 ml bezvodé octové kyseliny, dále bylo přidáno asi 5 ml anhydridu octové kyseliny, několik kapek 0,2% roztoku krystalové violeti v bezvodé octové kyselině (indikátor). Směs byla titrována z 10 ml byrety připraveným 0,1 M odměrným roztokem kyseliny chloristé z tmavě modré do žlutozelené barvy indikátoru. Z důvodu velké objemové roztažnosti octové kyseliny bylo nutné poznamenat teplotu standardizace.

Postup stanovení

Při stanovení diklofenaku ve zvoleném standardu bylo odváženo asi 0,2500 g látky přesně, rozpuštěno v asi 30 ml bezvodé octové kyseliny. Dále bylo přidáno asi 5 ml anhydridu octové kyseliny, několik kapek 0,2% roztoku krystalové violeti v bezvodé octové kyselině a roztok byl titrován z 10 ml byrety připraveným 0,1 M odměrným roztokem kyseliny chloristé z tmavě modré do žlutozelené barvy indikátoru.

Při stanovení diklofenaku v analyzovaných léčivých přípravcích bylo zjištěno, že vizuální indikace selhává, proto bylo použito potenciometrické indikace kombinovanou skleněnou elektrodou HC 103 (Theta, ČR); rovnovážné napětí bylo měřeno pH metrem Jenway 3510. Titrace byla prováděna ve 100 ml kádinkách, míchání roztoku bylo zajištěno magnetickým míchadlem. Vzorek byl rozpouštěn v asi 30 ml bezvodé octové kyseliny s přidavkem asi 5 ml anhydridu octové kyseliny. Titrováno bylo z 10 ml byrety připraveným 0,1M odměrným roztokem kyseliny chloristé. Při stanovení diklofenaku v tobolce byla rozpouštěna jedna celá tobolka. Při stanovení diklofenaku v čípku bylo

rozpuštění jednoho čípku prováděno na vodní lázni, aby se čípek rozpustil. Pro stanovení diklofenaku v gelu bylo odváženo asi 5 g vzorku přesně.

Vyhodnocení

Vzhledem k značné objemové roztažnosti bezvodé octové kyseliny bylo nutné korigovat faktor 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé na teplotu [23] podle vztahu

$$f_{t_2} = \frac{f_{t_1}}{1 + 0,0111(t_2 - t_1)} \quad (2.1)$$

kde f_{t_2} je korigovaný faktor odměrného roztoku na teplotu t_2 [° C] při titraci, f_{t_1} je stanovený faktor odměrného roztoku při teplotě t_1 [° C].

Obsah diklofenaku v analyzovaném standardu, vyjádřený v procentech, byl vypočítán podle vztahu

$$w = \frac{c_{\text{HClO}_4} f_{\text{HClO}_4} V_{\text{HClO}_4} M_{\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}}}{m_{\text{vzorek}}} \quad (2.2)$$

kde c_{HClO_4} je koncentrace odměrného roztoku kyseliny chloristé [mol dm^{-3}], f_{HClO_4} faktor odměrného roztoku kyseliny chloristé, V_{HClO_4} spotřeba odměrného roztoku kyseliny chloristé [dm^3], $M_{\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}}$ molární hmotnost sodné soli diklofenaku [$318,13 \text{ g mol}^{-1}$] a m_{vzorek} navážka analyzovaného standardu sodné soli diklofenaku.

Obsah diklofenaku v analyzovaných léčivých přípravcích, vyjádřený v procentech deklarovaného obsahu, byl vypočítán podle vztahu

$$w = \frac{c_{\text{HClO}_4} f_{\text{HClO}_4} V_{\text{HClO}_4} M_{\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}}}{m_{\text{deklar.}}} \quad (2.2)$$

kde c_{HClO_4} je koncentrace odměrného roztoku kyseliny chloristé [mol dm^{-3}], f_{HClO_4} faktor odměrného roztoku kyseliny chloristé, V_{HClO_4} spotřeba odměrného roztoku

kyseliny chloristé [dm^3], $M_{\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}}$ molární hmotnost sodné soli diklofenaku [$318,13 \text{ g mol}^{-1}$] (v případě tobolek draselné soli diklofenaku, $M = 334,24 \text{ g mol}^{-1}$) a $m_{\text{deklar.}}$ deklarovaný obsah sodné, nebo draselné soli diklofenaku v přípravku.

2.4 Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti

Příprava standardního roztoku diklofenaku

Zásobní standardní roztok sodné soli diklofenaku o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ byl připraven rozpuštěním $0,03181 \text{ g}$ standardu sodné soli diklofenaku v destilované vodě ve 100 ml odměrné baňce.

Postup stanovení

Stanovení bylo realizováno na jednopaprskovém diode-array spektrofotometru HP 8453 firmy Hewlett Packard v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm . Byla použita metoda standardního přídatku.

Při stanovení obsahu diklofenaku ve vzorku tobolky byla jedna tobolka rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě (za pomoci ultrazvuku). Poté se do pěti 10 ml odměrných baněk pipetovalo vždy $300 \mu\text{l}$ tohoto roztoku. Následně bylo přidáno do první $0 \mu\text{l}$ a do následujících čtyřech $250, 500, 750$ a $1000 \mu\text{l}$ zásobního roztoku sodné soli diklofenaku. Baňky byly doplněny po rysku destilovanou vodou a byla změřena jejich absorbance proti slepému pokusu při vlnové délce 279 nm .

Při stanovení obsahu diklofenaku ve vzorku čípku byl jeden čípek rozpuštěn ve 100 ml odměrné baňce v methanolu (za tepla). Poté se do pěti 10 ml odměrných baněk pipetovalo vždy $150 \mu\text{l}$ tohoto roztoku. Následně bylo přidáno do první $0 \mu\text{l}$ a do následujících čtyřech $250, 500, 750$ a $1000 \mu\text{l}$ zásobního roztoku sodné soli diklofenaku. Baňky byly doplněny po rysku methanolem a byla změřena jejich absorbance proti slepému pokusu při vlnové délce 276 nm .

Při stanovení obsahu diklofenaku ve vzorku gelu bylo odváženo asi $2,5 \text{ g}$ vzorku gelu přesně. Odvážené množství bylo rozpuštěno za tepla v asi 50 ml bezové octové kyseliny. Po vychladnutí byl roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn bezvodou kyselinou octovou po rysku. Poté se do pěti 10 ml odměrných baněk pipetovalo vždy $150 \mu\text{l}$ tohoto roztoku. Následně bylo přidáno do první $0 \mu\text{l}$ a do

následujících čtyřech 250, 500, 750 a 1000 μl zásobního roztoku sodné soli diklofenaku. Baňky byly doplněny po rysku destilovanou vodou a byla změřena jejich absorbance proti slepému pokusu při vlnové délce 276 nm.

Vyhodnocení

Koncentrace sodné (draselné) soli diklofenaku v naředěném vzorku byla zjištěna metodou standardního přídatku. Po přepočtení na hmotnost byl její obsah vyjádřen v procentech vůči deklarovanému obsahu v přípravku.

2.5 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s měďnatými ionty

Příprava roztoků

Zásobní standardní roztok sodné soli diklofenaku o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1,0000 g standardu sodné soli diklofenaku v destilované vodě ve 100 ml odměrné baňce.

Roztok octanu měďnatého o koncentraci 50 mg/l byl připraven rozpuštěním 12,5 g monohydrátu octanu měďnatého ve 250 ml odměrné baňce destilovanou vodou, před doplněním po rysku se přidalo 1,25 ml 2M octové kyseliny.

2M acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) o $\text{pH} = 5,3$ byl připraven ztitrováním 500 ml 2M octové kyseliny 2M roztokem hydroxidu sodného za potenciometrického měření pH.

Postup stanovení

Stanovení bylo realizováno na jednopaprskovém diode-array spektrofotometru HP 8453 firmy Hewlett Packard v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Byla použita metoda standardního přídatku.

Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky bylo pipetováno 2,00 ml roztoku s obsahem sodné soli diklofenaku v rozmezí 0,0–10,0 mg/ml, dále bylo přidáno 3,00 ml roztoku octanu měďnatého o koncentraci 50 mg/l, 4,00 ml acetátového pufru $\text{pH} = 5,3$ a 2,00 chloroformu. Směs byla třepána na třepačce po dobu 3 minut. Poté se do 5 ml odměrné baňky odebrala chloroformová fáze a k zbylému roztoku v Erlenmeyerově baňce bylo

přidáno 1,80 ml chloroformu a směs byla opět tři minuty třepána. Po odebrání organické fáze, která byla spojena s prvním extraktem, bylo ke zbylému roztoku v Erlenmeyerově baňce přidáno 1,00 ml chloroformu a směs byla opět tři minuty třepána. I třetí organická fáze byla spojena s předchozími extrakty a spojené extrakty byly v 5 ml odměrné baňce doplněny po rysku chloroformem a byla změřena jejich absorbance proti slepému pokusu při vlnové délce 680 nm.

Vzhledem k problémům s kalibrační závislostí (viz kap. 3.3) nebyla tato metoda stanovení použita na vzorky léčivých přípravků.

2.6 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou

Příprava standardního roztoku diklofenaku

Zásobní standardní roztok sodné soli diklofenaku o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1,0000 g standardu sodné soli diklofenaku v destilované vodě ve 100 ml odměrné baňce.

Postup stanovení

Stanovení bylo realizováno na jednopaprskovém diode-array spektrofotometru HP 8453 firmy Hewlett Packard v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Byla použita metoda standardního přídatku.

Do 10 ml odměrných baněk byly pipetovány 2,00 ml vzorku (o koncentraci diklofenaku v rozmezí 0–25 mg/l), přidáno 1,00 ml koncentrované kyseliny dusičné a doplněno po rysku. Absorbance takto připraveného roztoku byla změřena proti slepému pokusu při vlnové délce 380 nm.

Vzorky léčivých přípravků byly rozpouštěny za pomoci ultrazvuku. Při stanovení diklofenaku v tobolce byla rozpouštěna jedna celá tobolka ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě. Při stanovení diklofenaku v čípku bylo rozpouštění jednoho čípku ve 100 ml destilované vody prováděno na vodní lázni, aby se čípek rozpustil. Před vlastním stanovením byl tento roztok desetkrát zředěn. Pro stanovení diklofenaku v gelu bylo odváženo asi 1 g vzorku přesně, jako rozpouštědlo byla použita koncentrovaná octová kyselina. Před vlastním stanovením byl tento roztok dvakrát zředěn.

Vzhledem k problémům s reálnými vzorky (viz kap. 3.4) nebylo možné touto metodou obsah diklofenaku ve vzorcích stanovit.

2.7 Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Příprava roztoků

Zásobní standardní roztok sodné soli diklofenaku o koncentraci 10 mg/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství 50 mg standardu sodné soli diklofenaku v methanolu v 50 ml odměrné baňce a následným stonásobným naředěním.

0,01M fosfátový pufr o pH = 2,5 byl připraven rozpuštěním 0,78 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného v asi 800 ml destilované vody. Za potenciometrické indikace pH byla přidávána 85 % kyselina fosforečná (spotřeba 0,3 ml) až do dosažení pH = 2,5. Poté byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky objemu 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Postup stanovení

Stanovení bylo prováděno na kapalinovém chromatografu UHPLC Nexera XP Shimadzu. Stacionární fází byla kolona Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent). Mobilní fáze tvořila směs methanol-0,01M fosfátový pufr (H₃PO₄/NaH₂PO₄) o pH = 2,5 v poměru 70:30, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Detekce byla spektrofotometrická při vlnové délce 274 nm. Nástřik vzorku na kolonu byl 20 μl.

Kalibrační závislost byla sestrojena naředěním zásobního roztoku sodné soli diklofenaku mobilní fází v koncentračním rozsahu 0,5–1,5 mg/l.

Při stanovení diklofenaku v tobolce byla rozpouštěna jedna celá tobolka ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě. Tento roztok byl před stanovením zředěn 25krát destilovanou vodou a pak desetkrát mobilní fází. Při stanovení diklofenaku v čípku bylo rozpouštění jednoho čípku ve 100 ml methanolu prováděno na vodní lázni, aby se čípek rozpustil. Před vlastním stanovením byl tento roztok zředěn padesátkrát destilovanou vodou a pak desetkrát mobilní fází. Pro stanovení diklofenaku v gelu bylo odváženo asi 2,5 g vzorku přesně a rozpuštěno za pomoci ultrazvuku ve 100 ml methanolu. Tento roztok byl před stanovením zředěn 25krát destilovanou vodou a pak desetkrát mobilní fází.

Vyhodnocení

Koncentrace sodné (draselné) soli diklofenaku v naředěném vzorku byla zjištěna metodou kalibrační závislosti. Po přepočtení na hmotnost byl její obsah vyjádřen v procentech vůči deklarovanému obsahu v přípravku.

2.8 Statistické zpracování naměřených dat

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 (cit. [27]). U dat získaných jednotlivými stanoveními byl proveden Deanův-Dixonův test na odlehlost a výsledek byl poté vyjádřen jako medián s intervalem spolehlivosti.

Tvorba grafů a kalibračních rovnic byla prováděna prostřednictvím programu OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí

Faktor připraveného 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé v bezvodé kyselině byl pomocí čtyř měření stanoven jako $1,613 \pm 0,036$ ($s_r = 1,5 \%$) při teplotě 21,9 °C.

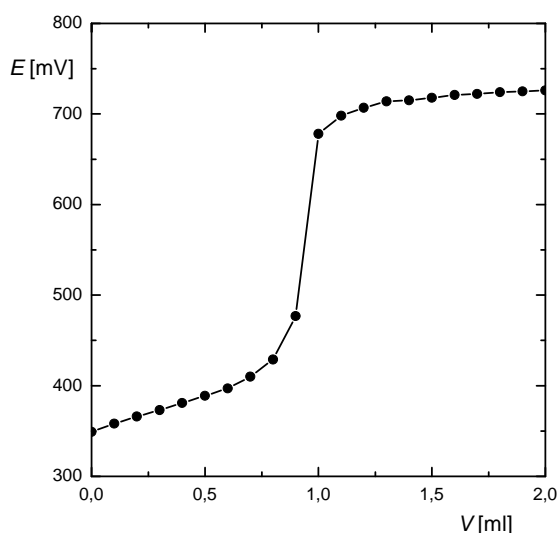
Nejprve bylo provedeno titrační stanovení zvoleného standardu sodné soli diklofenaku (tab. 3.1). V analyzovaném standardu sodné soli diklofenaku byl stanoven jeho obsah v procentech deklarovaného obsahu na $102,2 \pm 1,3 \%$ ($s_r = 0,86 \%$).

Tab. 3.1 Výsledky stanovení obsahu sodné soli diklofenaku ve zvoleném standardu metodou acidobazické titrace s vizuální indikací konce titrace: navážka vzorku, spotřeba 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé v bezvodé kyselině octové ($f = 1,647$ při teplotě stanovení 20,0 °C) a vypočítaný obsah sodné soli diklofenaku ve vzorku.

m [g]	$V(\text{HClO}_4)$ [ml]	w [%]
0,2677	5,18	101,4
0,2559	5,04	103,2
0,2572	5,04	102,7
0,2600	5,05	101,8

Při stanovení obsahu sodné soli diklofenaku v analyzovaných léčivých přípravcích se ukázalo, že vizuální indikace není použitelná, protože byly získávány velmi nadhodnocené výsledky (pravděpodobně vlivem interakce pomocných látek s indikátorem nebo titračním činidlem). S použitím potenciometrické indikace bylo možné stanovit obsah sodné soli diklofenaku pouze ve vzorku čípků. U želatinových tobolek i u gelu docházelo k nepravidlostem na titrační křivce, jednalo se pravděpodobně o vliv pomocných látek z těchto lékových forem.

Titračně bylo tedy možné stanovit pouze obsah sodné soli diklofenaku v čípcích. Na obr. 3.1 je pro ilustraci uvedena titrační křivka vzorku čípku Dicloream[®] 50. Spotřeby odměrného roztoku a výsledný obsah sodné soli diklofenaku uvádí tabulka 3.2. V analyzovaném vzorku čípku Dicloream[®] 50 byl stanoven obsah sodné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na $98,2 \pm 2,7$ % ($s_r = 1,9$ %).



Obr. 3.1 Titrační křivka titrace čípku Dicloream[®] 50 odměrným roztokem 0,1M kyseliny chloristé v bezvodé kyselině octové za použití kombinované skleněné pH elektrody.

Tab. 3.2 Výsledky stanovení obsahu sodné soli diklofenaku v čípcích Dicloream[®] 50 metodou acidobazické titrace: spotřeba 0,1M odměrného roztoku kyseliny chloristé v bezvodé kyselině octové ($f = 1,610$ při teplotě stanovení 22,0 °C pro stanovení 1–2; $f = 1,639$ při teplotě stanovení 20,4 °C pro stanovení 3–4) a vypočítaný obsah sodné soli diklofenaku ve vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

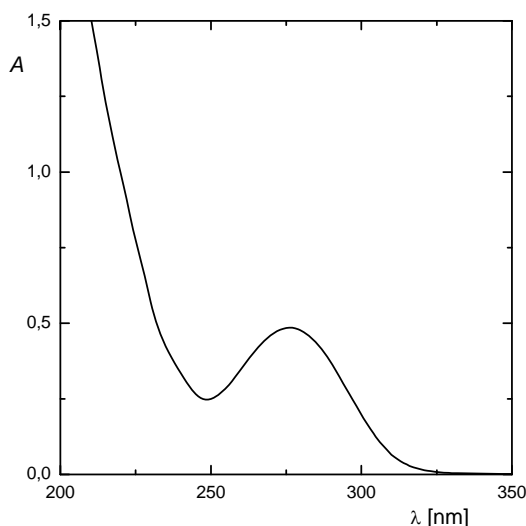
stanovení	$V(\text{HClO}_4)$ [ml]	w [%]
1	0,93	95,3
2	0,95	97,3
3	0,95	99,1
4	0,95	99,1

3.2 Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti

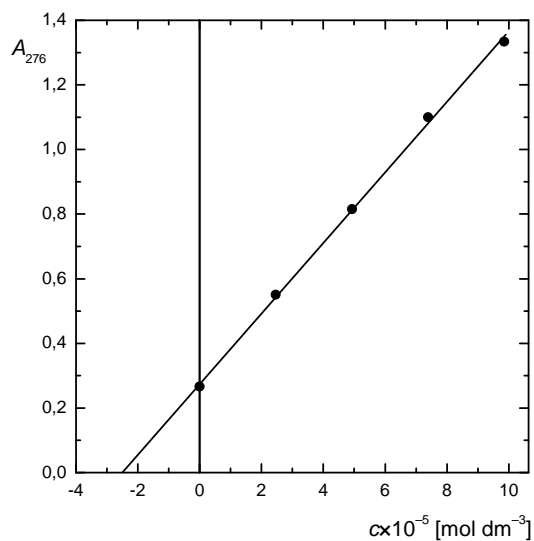
Před vlastním stanovením bylo proměřeno UV spektrum standardu sodné soli diklofenaku pro ověření vhodné vlnové délky absorpčního maxima (obr. 3.2), z něhož bylo pro další měření zvoleno absorpční maximum při vlnové délce 276 nm.

Spektrofotometrické stanovení sodné soli diklofenaku v UV oblasti bylo provedeno metodou standardního přídávku u všech analyzovaných léčivých přípravků, nicméně u vzorku čípků poskytovala stanovení zcela nekonzistentní výsledky, takže metodu nebylo možné použít. Na obr. 3.3 je znázorněna závislost absorbance při vlnové délce 276 nm na koncentraci standardního přídávku sodné soli diklofenaku při stanovení obsahu sodné soli diklofenaku ve vzorku gelu Olfen. Výsledky jednotlivých stanovení jsou uvedeny v tab. 3.3.

Po statistickém zpracování naměřených hodnot byl v analyzovaném vzorku tobolek Voltaren[®] Rapid stanoven obsah draselné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na 106 ± 24 % ($s_r = 11$ %). V analyzovaném vzorku gelu Olfen byl stanoven obsah sodné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na 103 ± 13 % ($s_r = 5,7$ %).



Obr. 3.2 UV absorpční spektrum sodné soli diklofenaku ($c = 4,93 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) v destilované vodě v kyvetě měrné délky 1 cm.



Obr. 3.3 Závislost absorbance při vlnové délce 276 nm na koncentraci standardního přídavku sodné soli diklofenaku při stanovení obsahu sodné soli diklofenaku ve vzorku gelu Olfen.

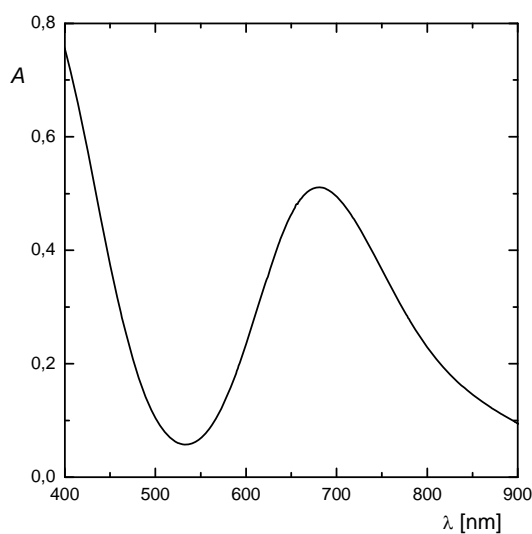
Tab. 3.3 Výsledky stanovení obsahu draselné/sodné soli diklofenaku v tobolkách Voltaren® Rapid a gelu Olfen: stanovené koncentrace draselné/sodné soli diklofenaku při metodě standardního přídavku a vypočítaný obsah draselné/sodné soli diklofenaku v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

léčivý přípravek	stanovení	$c \times 10^5$ [mol dm ⁻³]	w [%]
Voltaren® Rapid, tobolky	1	2,51	112
	2	2,37	106
	3	2,10	94
Olfen, gel	1	2,69	106
	2	2,54	103
	3	2,44	96

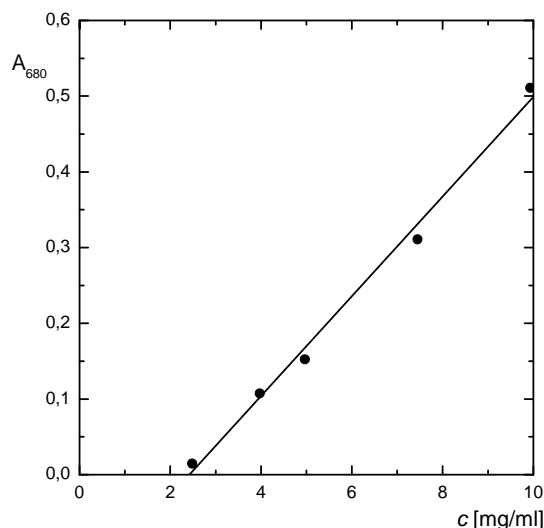
3.3 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s mědnatými ionty

Před vlastním stanovením bylo proměřeno VIS absorpční spektrum komplexu diklofenaku s mědnatými ionty pro ověření vhodné vlnové délky absorpčního maxima (obr. 3.4), z něhož bylo pro další měření zvoleno absorpční maximum při vlnové délce 680 nm.

Při ověřování použitelnosti metody byla nejprve naměřena kalibrační závislost pro standard sodné soli diklofenaku. Jak je patrné z obr. 3.5, měla regresní přímka velký záporný úsek. Přesto, že byla tato závislost opakovaně přeměřována, nepodařilo se tento problém odstranit. Z naměřených hodnot se zdá, že barevný komplex vytvořený mezi diklofenakem a mědnatými ionty od jistých malých koncentrací nepřechází do chloroformu, což vytváří záporný úsek kalibrační závislosti. Z tohoto důvodu nebylo přistupováno ke stanovení ve vzorcích léčivých přípravků.



Obr. 3.4 VIS absorpční spektrum komplexu diklofenaku s mědnatými ionty pro koncentraci sodné soli diklofenaku 10 mg/ml v kyvetě měrné délky 1 cm.



Obr. 3.5 Závislost absorbance komplexu diklofenaku s měďnatými ionty při vlnové délce 276 nm na koncentraci sodné soli diklofenaku v kyvetě měrné délky 1 cm.

3.4 Spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou

Před vlastním stanovením bylo proměřeno VIS absorpční spektrum produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou pro ověření vhodné vlnové délky absorpčního maxima (obr. 3.6), z něhož bylo pro další měření zvoleno absorpční maximum při vlnové délce 380 nm.

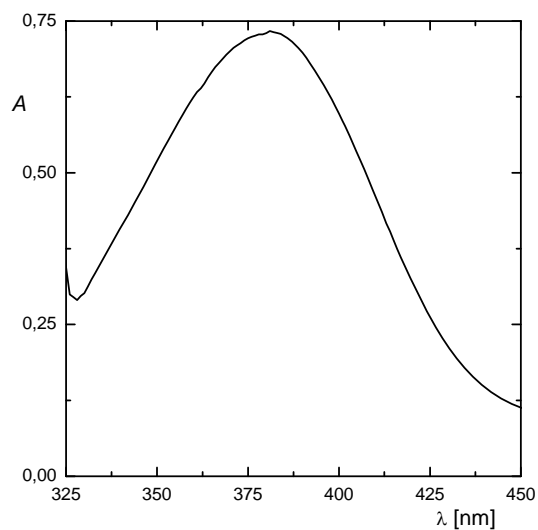
Při ověřování použitelnosti metody byla nejprve naměřena kalibrační závislost pro standard sodné soli diklofenaku (obr. 3.7), kterou lze popsat rovnicí

$$A_{380} = 0,036 c \quad (3.1)$$

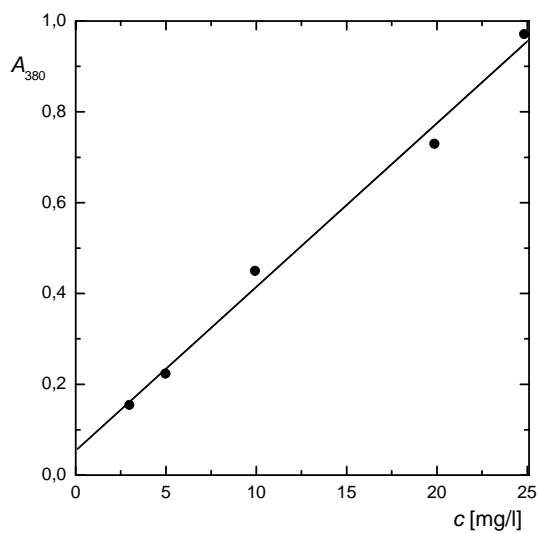
kde A_{380} je absorbance při vlnové délce 380 nm a c koncentrace [mg/l].

Při použití této metody na stanovení diklofenaku v reálných vzorcích bylo zjištěno, že metoda neposkytuje reprodukovatelné hodnoty absorbance, přesto, že byl postup stanovení dodržen naprosto přesně a pro každou koncentraci byla prováděna tři současná měření (u nichž se absorbance lišily i o více než desetinu absorbanční

jednotky). Při tomto stanovení mají zřejmě na reakci mezi kyselinou dusičnou a diklofenakem velký vliv pomocné látky obsažené v příslušné lékové formě.



Obr. 3.6 VIS absorpční spektrum produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou pro koncentraci sodné soli diklofenaku 20 mg/l v kyvetě měrné délky 1 cm.



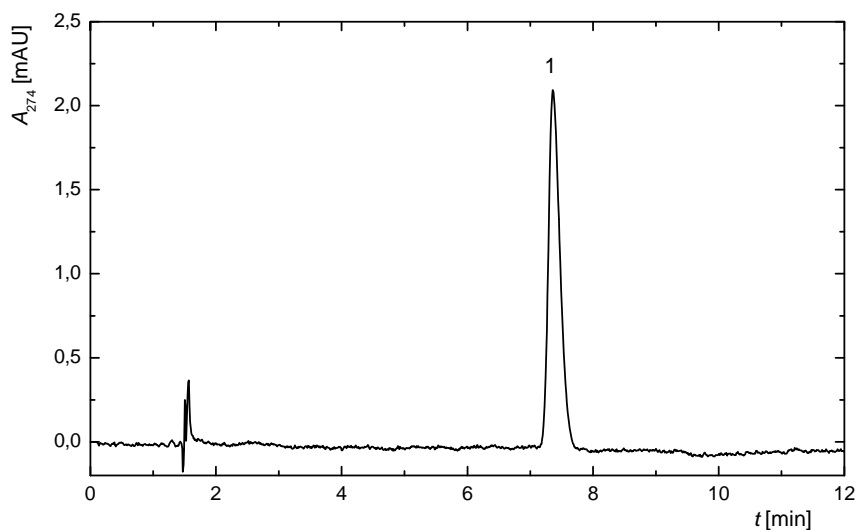
Obr. 3.7 Závislost absorbance produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou při vlnové délce 380 nm na koncentraci sodné soli diklofenaku v kyvetě měrné délky 1 cm.

3.5 Stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

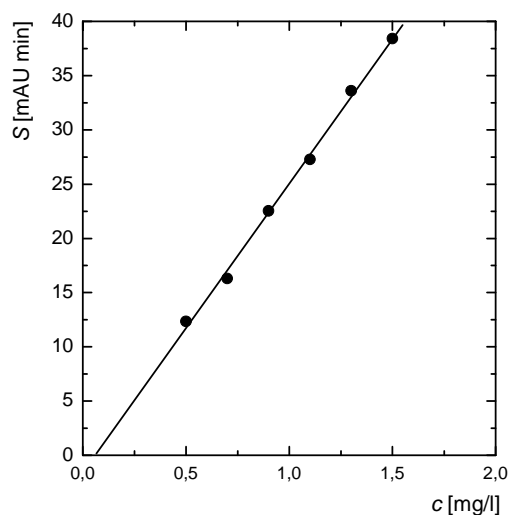
Byly proměřeny HPLC-UV chromatogramy standardu sodné soli diklofenaku za podmínek popsanych v kap. 2.7, bylo zjištěno, že retenční čas sodné soli diklofenaku je 7,36 minut (obr. 3.8). Na obr. 3.9 je znázorněna kalibrační závislost pro standard sodné soli diklofenaku sestavená na základě ploch píků. Tuto závislost lze popsat rovnicí

$$S = 27 c \quad (3.2)$$

kde S je plocha píku diklofenaku [mAU min] c je koncentrace [mg/l].



Obr. 3.8 HPLC-UV chromatogram sodné soli diklofenaku (pík 1) o koncentraci 1,1 mg/l na koloně Zorbax Eclipse C18 (150×4,6 mm, 3,5 μm; Agilent) v mobilní fázi methanol-0,01 M fosfátový pufr (H₃PO₄/NaH₂PO₄) o pH = 2,5 v poměru 70:30, průtok mobilní fáze 1 ml/min, detekce při 274 nm, nástřik vzorku 20 μl.



Obr. 3.9 Závislost plochy píku diklofenaku na koncentraci sodné soli diklofenaku při HPLC-UV stanovení.

Stanovení sodné (draselné) soli diklofenaku pomocí HPLC bylo provedeno metodou kalibrační závislosti u všech analyzovaných léčivých přípravků. Výsledky jednotlivých stanovení jsou uvedeny v tab. 3.4. Po statistickém zpracování naměřených hodnot byl v analyzovaném vzorku tobolek Voltaren[®] Rapid stanoven obsah draselné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na $93 \pm 2,3$ % ($s_r = 1,2$ %). V analyzovaném vzorku čípků Diclorem[®] 50 byl stanoven obsah sodné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na 94 ± 11 % ($s_r = 5,5$ %). V analyzovaném vzorku gelu Olfen byl stanoven obsah sodné soli diklofenaku v procentech deklarovaného obsahu na $98 \pm 3,0$ % ($s_r = 1,4$ %).

Tab. 3.4 Výsledky stanovení obsahu draselné/sodné soli diklofenaku metodou HPLC v tobolkách Voltaren® Rapid, čípcích Dicloream® 50 a gelu Olfen: stanovené koncentrace draselné/sodné soli diklofenaku při metodě kalibrační závislosti, vypočítaný obsah draselné/sodné soli diklofenaku v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

léčivý přípravek	stanovení	c [mg/l]	w [%]
Voltaren® Rapid, tobolky	1	0,93	93
	2	0,94	94
	3	0,92	92
Dicloream® 50, čípky	1	0,94	94
	2	0,90	90
	3	0,98	98
Olfen, gel	1	0,98	98
	2	1,00	100
	3	0,99	99

3.6 Diskuse

Bylo testováno pět vybraných analytických metod pro stanovení sodné (draselné) soli diklofenaku ve třech lékových formách. Ačkoliv se jednalo o metody popsané v literatuře, ukázalo se, že jejich skutečná použitelnost je velmi různá. Pro analýzu všech tří léčivých přípravků byla použitelná pouze jediná metoda: stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Spektrofotometrické stanovení v UV oblasti bylo možné využít pro stanovení obsahu sodné (draselné) soli diklofenaku v tobolkách a gelu, při stanovení v čípcích se negativně projevil obsah pomocných látek. Poslední použitelnou metodou byla titrace kyselinou chloristou v nevodném prostředí, kterou bylo naopak možné použít pouze na stanovení obsahu sodné soli diklofenaku v čípcích. Obě vybraná spektrofotometrická stanovení ve viditelné oblasti se při použití na vzorky léčivých přípravků ukázala (v rozporu s literaturou) jako nepoužitelná. I zde svoji negativní roli sehrály pomocné látky přítomné v příslušném léčivém přípravku.

V tab. 3.5 jsou pro porovnání uvedeny výsledky stanovení obsahu sodné (draselné) soli diklofenaku v analyzovaných léčivých přípravcích dosažené pomocí jednotlivých metod analýzy. Z tabulky je patrné, že pro výsledky dosažené pomocí různých metod

jsou dostatečně shodné. Z hlediska lékopisných parametrů [5–7] jsou všechna stanovení pravdivá, protože se nalezený obsah diklofenaku shoduje s obsahem deklarovaným v povolených mezích (pro tobolky a čípky $\pm 10\%$ deklarovaného obsahu, pro gel $\pm 5\%$ deklarovaného obsahu). Z hlediska preciznosti, hodnocené na základě relativní směrodatné odchylky stanovení, je preciznost stanovení titrací a kapalinovou chromatografií srovnatelná, stanovení pomocí UV spektrometrie je výrazně méně precizní.

Tab. 3.5 Výsledky stanovení obsahu draselné/sodné soli diklofenaku v tobolkách Voltaren® Rapid, čípcích Dicloream® 50 a gelu Olfen jednotlivými použitými metodami (v procentech deklarovaného obsahu)

léčivý přípravek	metoda	w [%]	s _r [%]
Voltaren® Rapid, tobolky	HPLC	93±2,3	1,2
	UV spektrometrie	106±24	11
Dicloream® 50, čípky	HPLC	94±11	5,5
	titrace	98,2±2,7	1,9
Olfen, gel	HPLC	98±3,0	1,4
	UV spektrometrie	103±13	5,7

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat pět vybraných analytických metod pro stanovení diklofenaku v léčivých přípravcích z hlediska pravdivosti a preciznosti. Pro porovnání byly vybrány: titrace v nevodném prostředí, spektrofotometrické stanovení v UV oblasti, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku komplexu diklofenaku s měďnatými ionty, spektrofotometrické stanovení ve VIS oblasti založené na vzniku produktu reakce diklofenaku s kyselinou dusičnou a stanovení vysokoučinnou kapalinovou chromatografií. Pro stanovení byly zvoleny tři lékové formy: měkké tobolky, čípky a gel. Aplikovatelnost stanovení na reálné vzorky byl poměrný problém u většiny metod. Titrací v nevodném prostředí bylo možné stanovit pouze čípek, spektrofotometrickým stanovením v UV oblasti pak pouze gel a tobolky. Všechny lékové formy bylo možné analyzovat pomocí HPLC. Spektrofotometrické metody ve VIS oblasti se ukázaly jako zcela nepoužitelné. Všechny metody, které bylo možné na stanovení diklofenaku v léčivých přípravcích použít se ukázaly jako pravdivé. Nejpreciznějším stanovením se ukázala být titrace v nevodném prostředí a HPLC, naopak nejméně precizní byla spektrometrie v UV oblasti.

Literatura

- [1] *Martindale. The Complete Drug Reference*. 36th Ed. S.C. Sweetman (ed.). London, Pharmaceutical Press 2009, p. 44–47.
- [2] *Basic & Clinical Pharmacology*. 11th Ed. B.G. Katzung, S.B. Masters, A.J. Trevor (eds.) New York, McGraw-Hill 2009, p. 626.
- [3] Altman R., Bosch B., Brune K., Patrignani P., Young C.: Advances in NSAID development. Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs* **75** (2015), 859–877.
- [4] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*. 4th Ed. J. Watts (ed.). London, Pharmaceutical Press 2011, p. 1238–1240.
- [5] *Český lékopis 2009*. Praha, Grada 2009, s. 1870–1871.
- [6] *The United States Pharmacopoeia 30. National Formulary 25*. Rockville, United States Pharmacopoeial Convention 2007.
- [7] *British Pharmacopoeia 2009*. London, British Pharmacopoeia Commission 2009.
- [8] *Analytical Profiles of Drug Substances. Volume 19*. K. Florey (ed.). San Diego, Academic Press 1990, p. 123–150.
- [9] Shamsipur M., Jalali F., Ershad S.: Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37** (2005), 943–947.
- [10] Santini A.O., Pezza H.R., Pezza L.: Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix. *Talanta* **68** (2006), 636–642.
- [11] Hassan S.S.M., Mahmoud W.H., Elmosallany M.A.F., Almarzooqiaet M.H.: Iron(II)-phthalocyanine as a novel recognition sensor for selective potentiometric determination of diclofenac and warfarin drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **39** (2005), 315–321.
- [12] Xu M.T., Chen L.F., Song J.F.: Polarographic behaviors of diclofenac sodium in the presence of dissolved oxygen and its analytical application. *Analytical Biochemistry* **329** (2004), 21–27.
- [13] Yilmaz B., Ciltas U.: Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by voltammetry and gas chromatography methods. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **5** (2015), 153–160.
- [14] Jin W., Zhang J.: Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* **868** (2000), 101–107.
- [15] Sastry C.P., Prasad T., Suryamarayana M.V.: Spectrophotometric method for determination of diclofenac sodium in bulk samples and pharmaceutical preparations. *Analyst* **114** (1989), 513–516.

-
- [16] Agrawal Y.K., Shivramchandra K.: Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **9** (1991), 97–100.
- [17] Marcela C., Liliana B.: Spectrofluorimetric determination of diclofenac sodium. *Analytical Sciences* **22** (2006), 431–434.
- [18] Carreira L.A., Rizk M., El-Shabrawy Y., Zakharib N.A., Toubarbet S.S.: Europium(III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **13** (1995), 1331–1337.
- [19] Seigel A., Schröck A., Hauser R., Spangenberg, B.: Sensitive quantification of diclofenac and ibuprofen using thin layer chromatography coupled with a vibrio fisheri bioluminescence assay. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **34** (2011), 817–828.
- [20] Siou A., Pommier F., Godbillon J.: Determination of diclofenac in plasma and urine by capillary gas chromatography–mass spectrometry with possible simultaneous determination of deuterium labeled diclofenac. *Journal of Chromatography A* **571** (1991), 87–100.
- [21] González J., Yuln G., Volonté M.G.: Determination of cyanocobalamin, betamethasone, and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **20** (1999), 487–492.
- [22] Abdel-Hamid M.E., Novotny L., Hamza H.J.: Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24** (2001), 587–594.
- [23] Šafařík L., Stránský Z.: *Odměrná analýza v organických rozpouštědlech*. Praha, SNTL 1982.
- [24] Bucci R., Magri A.D., Magri A.: Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **362** (1998), 577–582.
- [25] de Souza R.L., Matthieu Tubino M.: Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16** (2005) 1068–1073.
- [26] Matin A.A., Farajzadeh M.A., Jouyban A.: A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco* **60** (2005), 855–858.
- [27] Miller J.N., Miller J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th Ed. Harlow, Pearson Education 2005.