

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Eliška Kočárová

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ TADALAFILU NA UHLÍKOVÉ KOMPOZITNÍ  
ELEKTRODĚ

Voltammetric Determination of Tadalafil on a Carbon Composite Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2024

# 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 dne 23. 8. 2024

# Poděkování

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za ochotu a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem vyučujícím během mého studia za trpělivost a podporu a mým rodičům za podporu během mého celého studia.

# Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá nalezením optimálních elektrochemických podmínek pro stanovení léčiva tadalafil (TAD). Tyto podmínky pak byly použity pro stanovení obsahu TAD v komerčně dostupném léku Tadalafil Teva 5 mg. Elektrochemické techniky použité pro stanovení byly diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV). Byla využita pracovní uhlíková kompozitní elektroda, referenční argentchloridová a pomocná platinová elektroda.

Jako optimální prostředí bylo stanoveno Brittonův-Robinsonův (BR) pufr o pH 4,0–ethanol (7:3). Lineární závislost byla získána v koncentračním rozmezí od  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l do  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l pro obě použité techniky. Pro DPV vyšla mez stanovitelnosti ( $L_Q$ )  $1,3 \cdot 10^{-5}$  mol/l a mez detekce ( $L_D$ )  $4,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Pro DCV vyšly  $L_Q = 2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $L_D = 6,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

Jako srovnávací analytická metoda k nově vyvinutým voltametriickým metodám byla použita UV–VIS spektrofotometrie s využitím metody standardního přídávku, pomocí které byl stanoven obsah TAD v léčivu Tadalafil Teva 5 mg.

---

## Abstract

The bachelor thesis deals with finding optimal electrochemical conditions for the determination of the drug tadalafil (TAD). These conditions were then used to determine the TAD content of the commercially available drug Tadalafil Teva 5 mg. The electrochemical techniques used for the determination were differential pulse voltammetry (DPV) and DC voltammetry (DCV). A working carbon composite electrode, an argentochloride reference electrode, and a platinum auxiliary electrode were used.

Britton-Robinson (BR) buffer at pH 4.0–ethanol (7:3) was determined as the optimal medium. The linear dependence was obtained over the range of concentration from  $5 \times 10^{-5}$  mol/L to  $1 \times 10^{-4}$  mol/L for both techniques used. The limit of quantification ( $L_Q$ ) and limit of detection ( $L_D$ ) for DPV were  $3.1 \times 10^{-5}$  mol/L and  $4.0 \times 10^{-6}$  mol/L, respectively. For DCV,  $L_Q = 2.0 \times 10^{-5}$  mol/L and  $L_D = 6.0 \times 10^{-6}$  mol/L.

UV–VIS spectrophotometry using the standard addition method was used as a comparative analytical method to the newly developed voltammetric methods to determine the TAD content of Tadalafil Teva 5 mg.

# Klíčová slova

Elektrochemie

Tadalafil

Diferenční pulzní voltametrie

DC voltametrie

Uhlíková kompozitní elektroda

Cialis

---

# Keywords

Electrochemistry

Tadalafil

Differential Pulse Voltammetry

DC Voltammetry

Carbon Composite Electrode

Cialis

## Seznam zkratek

$A$	absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [mol/l]
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
$c_{st}$	molární koncentrace standardu [mol/l]
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DCV	DC (direct current) voltametrie
$E$	elektrický potenciál [V]
ED	erektilní disfunkce
$E_p$	potenciál píku [V]
$I$	elektrický proud [A]
$I_p$	proud píku [A]
$L_D$	mez detekce [mol/l]
$L_Q$	mez stanovitelnosti [mol/l]
$n$	počet měření
PDE5	fosfodiesterasa typu 5
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
pH*	hodnota pH vodně-organického prostředí změřená pomocí kombinované skleněné elektrody (kalibrované na vodné pufr)
$r^2$	koeficient determinace
TAD	tadalafil
$\lambda$	vlnová délka [nm]

# OBSAH

1	Úvod.....	9
1.1	Stanovovaná látka .....	10
1.1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti.....	11
1.1.2	Lékopisné metody.....	12
1.2	Metody využité pro stanovení tadalafilu.....	12
1.2.1	Pracovní uhlíková kompozitní elektroda .....	13
2	Praktická část.....	14
2.1	Příprava reagensů .....	14
2.2	Aparatura a programy .....	14
2.3	Pracovní postup/zpracování výsledků.....	15
3	Výsledky a diskuze.....	17
3.1	Diferenční pulzní voltametrie .....	17
3.1.1	Výzkum voltametričeského chování .....	17
3.1.2	Měření stability tadalafilu.....	19
3.1.3	Zjištění optimálního pH.....	21
3.1.4	Opakovatelnost měření .....	24
3.1.5	Kalibrační závislost .....	26
3.1.6	Stanovení obsahu tadalafilu v léku.....	27
3.2	DC voltametrie.....	29
3.2.1	Výzkum voltametričeského chování .....	29
3.2.2	Měření stability tadalafilu.....	31
3.2.3	Zjištění optimálního pH.....	33
3.2.4	Opakovatelnost měření .....	36
3.2.5	Kalibrační závislost .....	38
3.2.6	Stanovení obsahu tadalafilu v léku.....	39
3.3	Spektrometrické stanovení.....	41
3.3.1	Měření stability.....	41
3.3.2	Stanovení obsahu tadalafilu v léku.....	42

4	Závěr.....	43
5	Literatura.....	44



# 1 ÚVOD

Cílem práce je určit optimální podmínky pro stanovení léčiva tadalafilu (TAD) voltametričnými technikami (DCV a DPV) na uhlíkové kompozitní elektrodě. Dále zkonstruovat kalibrační závislosti a pomocí metody standardního přídatku stanovit množství TAD v léčivu Tadalafil Teva 5 mg. Následně také spektrofotometričky stanovit pomocí metody standardního přídatku TAD v léčivu Tadalafil Teva 5 mg.

## 1.1 STANOVOVANÁ LÁTKA

TAD se také nazývá Cialis, IC135 nebo Pentadafil, využívá se k léčbě erektilní disfunkce (ED). Funguje jako reverzibilní kompetitivní inhibitor fosfodiesterasy 5 (PDE5). Tato inhibice pak zvyšuje hladinu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), což usnadňuje relaxaci hladkého svalstva, a to následně podporuje erektilní funkci<sup>1,2</sup>. Jelikož cGMP je konečný mediátor v dráze oxidu dusnatého, je aktuálně zkoumáno využití TAD na léčbu plicní arteriální hypertenze. Mezi známé léky využívané pro její léčbu patří totiž oxid dusnatý. U 53 % pacientů se zvýšila fyzická kapacita pozorovaná u šestiminutové chůze o 33 metrů<sup>3</sup>. Ukázalo se také, že TAD může zlepšovat kardiopulmonální hemodynamiku<sup>4</sup>. Při perorálním vstupu má 80% biologickou dostupnost<sup>5</sup>. Přes játra probíhá odstraňování TAD a vylučuje se převážně stolicí a méně pak močí. Vylučuje se hlavně ve formě metabolitů. Mezi hlavní metabolity TAD patří methylkatechol glukuronid<sup>1</sup>.

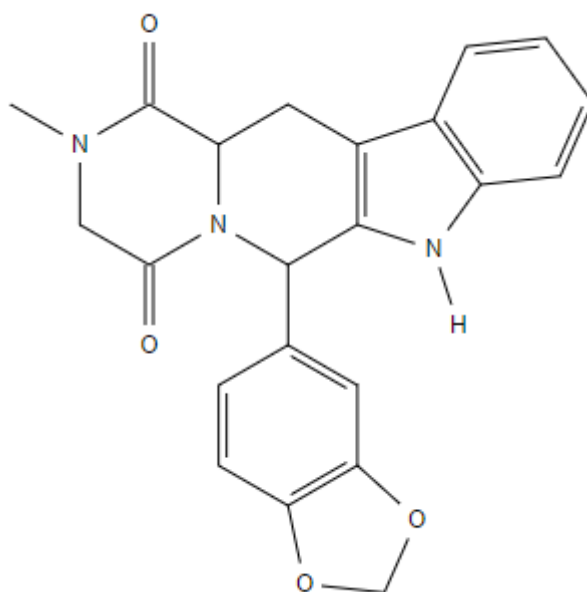
ED je neschopnost dosáhnout nebo udržet erekci. Onemocnění může být vyvolané dvěma způsoby: psychologickým nebo organickým (tento může být způsobený kardiovaskulárním, hormonálním, neurogenním a endokrinním onemocněním)<sup>6,7</sup>. Jedná se o velmi časté onemocnění. Vyskytuje se u 150 milionů mužů na celém světě a postihuje hlavně muže starší 40 let<sup>8</sup>. Mezi rizikové faktory pro ED patří konzumace alkoholu, kouření cigaret, diabetes mellitus a kardiovaskulární onemocnění. U mužů nad 40 let mohou tyto faktory zdvojnásobit až ztrojnásobit vznik ED<sup>2</sup>.

Při podání TAD v dávce 10 mg nebo 20 mg dochází ke zlepšení erektilní funkce oproti placebo. Dochází ke zlepšení při jakémkoliv zdroji ED, jak organickém, psychologickém, tak i jejich kombinaci<sup>8</sup>. U mužů užívajících 20 mg TAD došlo ke zlepšení v mezinárodním indexu erektilní funkce<sup>9</sup>. Účinky mohou nastat od 15 minut do 2 hodin. Poločas rozpadu TAD je 17,5 hodiny u zdravých mužů, se zvyšujícím se věkem se poločas rozpadu může prodloužit až na 21,6 hodiny<sup>5</sup>. Díky tomuto poločasu rozpadu má TAD terapeutické okno 36 hodin<sup>5,7</sup>.

Mezi nežádoucí účinky spojené s podáním TAD jsou bolesti hlavy (15 %) a zad (5 %), dyspepsie (8 %), myalgie (1 %) a příznaky rýmy (1 %)<sup>8,10</sup>. Neobjevily se žádné kardiovaskulární nežádoucí účinky<sup>10</sup>. Poruchy spojené s barevným viděním se u TAD objevily v méně než 1 % (cit. <sup>8</sup>), narozdíl od jiných inhibitorů PDE5 (Sildenafil a Vardenafil), kde kvůli jejich větší selektivitě pro PDE6 mohou vést k modrému vidění<sup>11</sup>. TAD má větší specifitu k PDE11 (jehož funkce není zatím známá), vyskytuje se v močovém měchýři, srdci, mozku, hypofýze a varlatech<sup>12</sup>. TAD nemá vliv na spermatogenezi<sup>13</sup>.

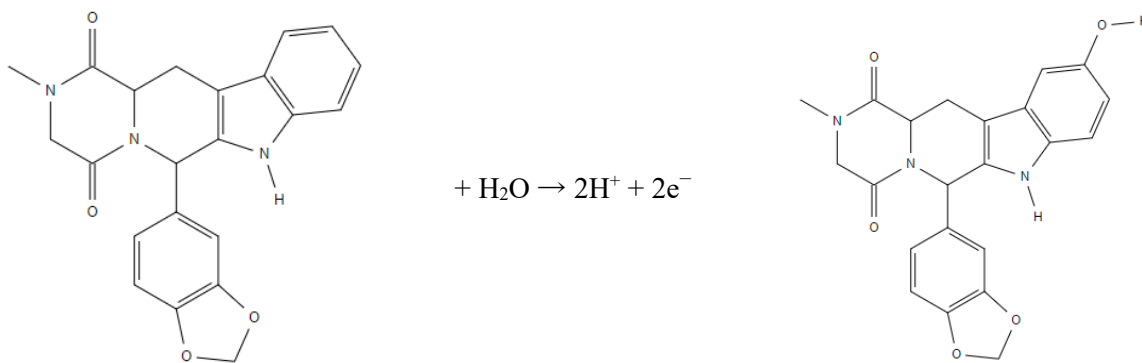
### 1.1.1 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI

TAD, systematickým názvem (6*R*,12*aR*)-6-(1,3-benzdioxol-5-yl)-2-methyl-2,3,6,7,12,12*a*-hexahydropyrazin[1',2':1,6]-pyridol[3,4-*b*]indol-1,4-dion, C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, je bílý prášek, skoro nerozpustný ve vodě, rozpustný v dimethylsulfoxidu a slabě rozpustný v methylchloridu<sup>14</sup>. TAD je z chemického hlediska zajímavý obzvláště svojí strukturou (obr. 1). Má heterocyklický zdvojený systém obsahující N s centrálním kruhem, což je stejné i u cGMP, tím pádem může vznikat kompetitivní vazba s PDE5<sup>8</sup>.



Obr. 1: chemická struktura tadalafilu (TAD)<sup>15</sup>

TAD je možné elektrochemicky oxidovat za vzniku struktury uvedené na obr. 2, což je jeho hydroxylovaná forma, za uvolnění dvou protonů a dvou elektronů<sup>15</sup>, čehož bylo využito v této bakalářské práci pro jeho voltametrické stanovení.



Obr. 2: oxidační reakce TAD<sup>15</sup>

Hodnota  $pK_a$  pro TAD byla stanovena potenciometricky na 3,52 a spektrofotometricky na 3,44 (tento rozdíl je však statisticky nevýznamný)<sup>16</sup>.

### 1.1.2 LÉKOPISNÉ METODY

Lékopisná identifikace TAD může být provedena pomocí kapalinové chromatografie, specifické optické rotace (otáčivost  $+78,0^\circ$  až  $+84,0^\circ$ ) anebo infračervenou spektrometrií<sup>14</sup>.

Jako lékopisná metoda pro stanovení TAD je doporučena kapalinová chromatografie. Jako mobilní fáze je použit acetonitril, průtoková rychlost 1,5 ml/min, doba trvání je dvojnásobek retenčního času, což je přibližně 4,5 min, vstříknut je zkušební roztok (složený z 50,0 mg látky rozpuštěné v 50,0 ml acetonitrilu a zředěné na 100,0 ml mobilní fázi; k 10,0 ml tohoto roztoku je přidáno 25,0 ml acetonitrilu a následně je zředěn na 50,0 ml mobilní fázi) a referenční roztok (rozpuštěno 50,0 mg TAD CRS (common reporting standard) v 50 ml acetonitrilu a zředěno na 100,0 ml mobilní fázi; k 10,0 ml tohoto roztoku je přidáno 25,0 ml acetonitrilu a následně je zředěno na 50,0 ml mobilní fázi). Výpočet procentuálního obsahu TAD je z deklarovaného obsahu TAD CRS<sup>14</sup>.

## 1.2 METODY VYUŽITÉ PRO STANOVENÍ TADALAFILU

Pro stanovení TAD bylo vyvinuto více elektrochemických metod. Mezi využitě elektrody pro tato stanovení patří např. borem dopovaná diamantová elektroda<sup>17</sup>, vícestěnná uhlíková nanotrubičková elektroda (MWCNTPE), vícestěnná uhlíková nanotrubičková pastová elektroda modifikovaná  $TiO_2$  ( $TiO_2$ -MWCNTPE)<sup>18</sup> nebo uhlíková elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná komplexem dvojmocného ruthenia<sup>15</sup>.

Mezi vyvinuté metody pro stanovení TAD patří metoda využívající borem dopovanou diamantovou elektrodu a cyklickou voltametrii. Zde byla lineární koncentrační závislost

stanovena mezi hodnotami 0,15–1,28  $\mu\text{mol/l}$  s mezí detekce ( $L_D$ ) = 42,3 nmol/l. Roztok byl připraven rozpuštěním TAD v acetonu a vhodně zředěn BR pufrům o pH 4. Stejně byl připraven roztok farmaceutického vzorku. Navrhovaná metoda se ukázala přesná na úrovni spolehlivosti 95 % (cit.<sup>17</sup>).

Pro vyvinutou metodu adsorpční rozpouštěcí voltametrie využívající MWCNTPE a  $\text{TiO}_2$ -MWCNTPE měla kalibrační závislost rozsah 3,6–8,1 a 12,7–61,1  $\mu\text{mol/l}$  s  $L_D = 0,08 \mu\text{mol/l}$  pro MWCNTPE a 0,27–15,2  $\mu\text{mol/l}$  s  $L_D = 0,11 \mu\text{mol/l}$  pro  $\text{TiO}_2$ -MWCNTPE. Jako prostředí bylo využito BR pufru o pH 3 a TAD byl rozpuštěn v acetonitrilu<sup>18</sup>.

Stanovení TAD diferenční pulzní voltametrií na elektrodě ze skelného uhlíku modifikovaného komplexem dvojmocného ruthenia vykazovalo  $L_D = 3,58 \mu\text{mol/l}$ . Výťažnost se pohybovala v rozmezí 80 a 120 % (cit.<sup>15</sup>).

### 1.2.1 PRACOVNÍ UHLÍKOVÁ KOMPOZITNÍ ELEKTRODA

Jako pracovní elektroda byla využita uhlíková kompozitní elektroda z ultračistého uhlíku (grafitu) (6.1204.180 ut, 00467032, Metrohm, Švýcarsko). Elektroda je znázorněna na obr. 3 (cit.<sup>19</sup>). Výhoda uhlíkové kompozitní elektrody je v možnosti očištění jejího povrchu pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (cit.<sup>20</sup>).



Obr. 3: uhlíková kompozitní elektroda<sup>19</sup>

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Pro zhotovení Brittonova-Robinsonova pufru byly připraveny 2 části, kyselá a bazická. Kyselá část se skládala z 2,70 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (85%, 1,7 g/ml, Lach:ner, Neratovice), 2,25 ml kyseliny octové (99,8%, 1,05 g/ml, Penta, Praha) a 2,473 g kyseliny borité (100,3%, Lach:ner, Neratovice) a byla doplněna na 1000 ml deionizovanou vodou. Kyselá část měla koncentraci 0,04 mol/l. Bazická část byla připravena rozpuštěním 8,1633 g pevného hydroxidu sodného (98%, Penta, Praha) a doplněna na 1000 ml deionizovanou vodou. Bazická část měla koncentraci 0,2 mol/l. Tyto dvě části byly uchovávány ve tmavých lahvích.

Ze standardu TAD 500 mg (Supelco, USA) byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l, odvážením 0,0387 g a rozpuštěním ve 99,8% ethanolu do 100ml odměrné baňky. Další použité koncentrace byly připravené z tohoto zásobního roztoku.

Byl připraven i druhý roztok odvážením 0,0195 g TAD a rozpuštěním v 50% ethanolu do 50ml odměrné baňky, ale v tomto prostředí se TAD špatně rozpouštěl. Po rozpuštění v ultrazvukové lázni se vzorek znovu srazil na malé vločky a po naředění na  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l ze zásobního roztoku se druhý den vysrážel v odměrné baňce za vzniku bílé sraženiny. Dále byl tedy používán pouze zásobní vzorek rozpuštěný v 99,8% ethanolu.

Pro leštění uhlíkové kompozitní elektrody byl využit oxid hlinitý o velikosti částic 0,5  $\mu\text{m}$  (Elektrochemické Detektory, Turnov).

Na stanovení obsahu TAD v léčivu Tadalafil Teva 5 mg byl připraven zásobní roztok o  $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Což znamená, že pro tabletu o hmotnosti 0,1235 g bylo odváženo 74,1 mg granulátu, tato navážka pak byla rozpuštěna v 10 ml 99,8% ethanolu za pomoci ultrazvuku.

### 2.2 APARATURA A PROGRAMY

Pro spektrometrické měření byl využit Agilent 8453. Výsledky byly vyhodnoceny v programu UV-Visible ChemStation 9,01 (Agilent Technologies, USA).

Pro voltametrické měření byl využit přístroj Mini and Microelectrode System UM $\mu\text{E}$ , do kterého byla umístěna pracovní uhlíková kompozitní elektroda (6.1204.180 ut, 00467032 Metrohm, Švýcarsko), referenční argentchloridová elektroda ETP-CZ-R00608 (v 3M KCl)

a pomocná platinová elektroda ETP-CZ-P004-05 (obě Elektrochemické Detektory, Turnov). Výsledky byly vyhodnoceny v programu Polar Pro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha).

Na přístroji Jenway 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou bylo měřeno pH. Výsledky a grafy byly zpracované v programu Excel 2024 (Microsoft Corporation, USA).

### 2.3 PRACOVNÍ POSTUP/ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Stabilita v ethanolu byla spektrometricky měřena pro dva roztoky TAD, jeden o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l a druhý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Tyto roztoky byly proměřeny v prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12. Pro každé prostředí se postupně zvyšovalo procentuální zastoupení ethanolu. Začalo se u poměru 9:1 a už u 8:2 byla změna počáteční a konečné absorbance měření menší než 10 %. Měřila se změna absorbance po jedné minutě po dobu 20 minut. Roztoky byly měřené proti blanku (roztok ethanolu o daném poměru a BR pufru o dané hodnotě). Měření bylo prováděno v křemenné kyvetě o délce 1,0 cm.

Voltametrické metody byly měřeny v tříelektrodevém zapojení. Pracovní elektroda byla uhlíková kompozitní elektroda, referenční elektroda byla argentchloridová a pomocná byla platinová elektroda.

Pro měření DPV i DCV byly nastaveny parametry – polarizační rychlost 20 mV/s, potenciálový krok 3 mV. U DVP byla ještě nastavena výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 100 ms, vzorkovací čas 20 ms a perioda pulzu 150 ms.

Do voltametrické nádoby bylo umístěno vždy 10 ml roztoku. Základní elektrolyt se skládal z BR pufru o pH 4 a ethanolu (7:3). Mezi jednotlivými měřeními byla elektroda leštěna ze začátku pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a pro kalibrační přímkou, opakovatelnost, mez stanovitelnosti a stanovení obsahu TAD v léčivu byla čištěna za pomoci ultrazvuku.

Při měření stability byl použit TAD  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v BR pufru o pH 4 v různém obsahu ethanolu. Byl měřen obsah ethanolu o hodnotách 10 %, 20 %, 30 %, 40 % a 50 %, z čehož bylo vybráno nejvhodnější prostředí pro další práci. Měření bylo zopakováno ve dvou sériích po pěti opakování.

Pro nalezení optimálního pH byl použit TAD o  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v BR pufru a ethanolu (7:3), prostředí měla rozmezí hodnot od pH\* 2,5 po 12,5. Před každým měřením byla

pracovní elektroda leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Měření bylo zopakováno ve dvou sériích po pěti opakováních.

Opakovatelnost byla měřena ve dvou potenciálových oknech od 0 do 1040 mV a od 600 do 1040 mV. Byla stanovována pro roztok TAD o  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v BR pufru o pH 4 a v ethanolu (7:3). Měření bylo zopakováno ve dvou sériích po pěti opakováních.

Pro měření kalibrační závislosti byl rozsah koncentrací TAD v rozmezí od  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l po  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l pro metodu DCV a DPV. Metody byly použity v prostředí BR pufru o pH 4 a ethanolu (7:3). Byla vypočtena hodnota meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ), jedná se o desetinásobek směrodatné odchylky deseti opakovaných voltametrických stanovení TAD o koncentraci, která odpovídá nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky, vydělený směrnici této kalibrační přímky. Také byla vypočtena hodnota meze detekce ( $L_D$ ), jedná se o trojnásobek směrodatné odchylky deseti opakovaných voltametrických stanovení TAD o koncentraci, která odpovídá nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky, vydělený směrnici této kalibrační přímky.

Stanovení TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg pro metodu DCV a DPV byla měřena v roztoku léku o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l v BR pufru o pH 4 a prostředí ethanolu (7:3). Bylo měřeno šest hodnot. První byla bez přídavku a následně bylo přidáváno 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$  a 500  $\mu\text{l}$  standartního roztoku (o  $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l). Konečná koncentrace byla  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Po každém měření byla elektroda leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Pro spektrofotometrické stanovení TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg bylo použito prostředí s roztokem léku o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  mol/l, BR pufr o pH 4 a ethanolu (7:3). Bylo změřeno pět hodnot. První byla bez přídavku a následně bylo přidáváno po 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$  standartního roztoku. Konečná koncentrace byla  $8 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Roztoky byly měřené proti blanku (BR pufru o pH 4 a roztoku ethanolu (7:3)). Měření bylo prováděno v křemenné kyvetě o délce 1,0 cm.

Výška všech píků byla odečtena od spojnice minim před píkem a za píkem.

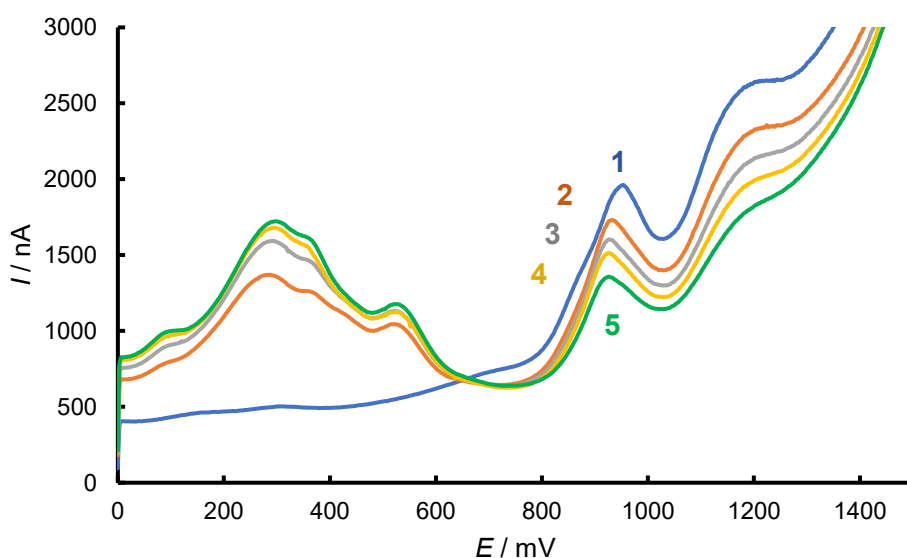


## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE

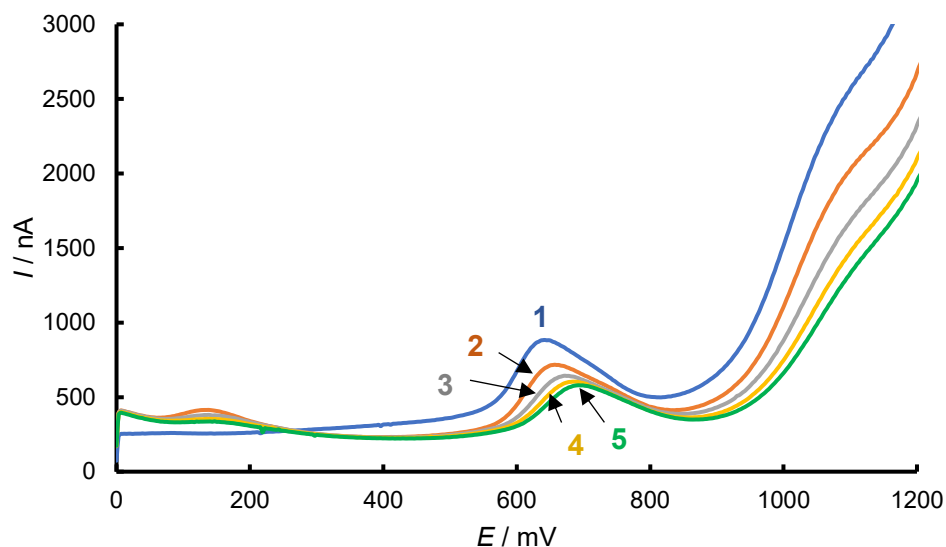
#### 3.1.1 VÝZKUM VOLTAMETRICKÉHO CHOVÁNÍ

Měření bylo provedeno podle podmínek uvedených v popisku na obr. 4. Toto prostředí bylo zvolené po proměření poměrů ethanolu od 10 % do 40 % a v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2, 7 a 12 s TAD o  $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l na spektrofotometru (kap. 3.3). Pro vybrání vhodného píku bylo toto měření provedeno voltametriky v pH 2 (obr. 4), 7 (obr. 5) a 12 (obr. 6), pro každé pH bylo provedeno pět opakování, mezi jednotlivými měřeními byla elektroda leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

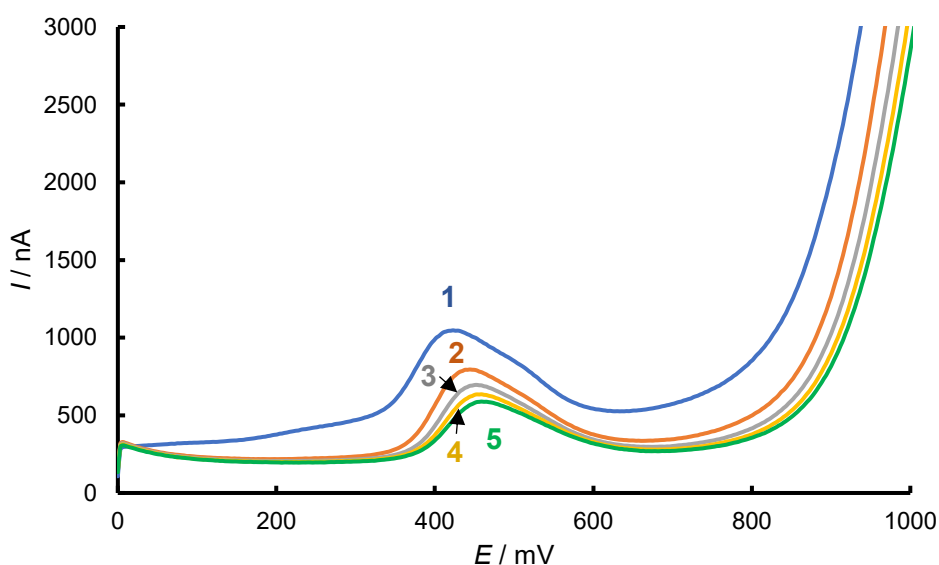


Obr. 4: DP voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření

Při měřeních od druhého do pátého opakování pozorujeme značný postupný úbytek výšky píku. To může být způsobené pasivací elektrody. Také pozorujeme vznik dalších čtyř vrcholů v rozmezí potenciálu 100–500 mV. Mohlo by se jednat o produkty vzniklé přechodní oxidací. TAD se oxiduje za uvolnění dvou protonů (vodíkových kationtů) a dvou elektronů prostřednictvím oxidační reakce znázorněné na obr. 2.



Obr. 5: DP voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 7–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření

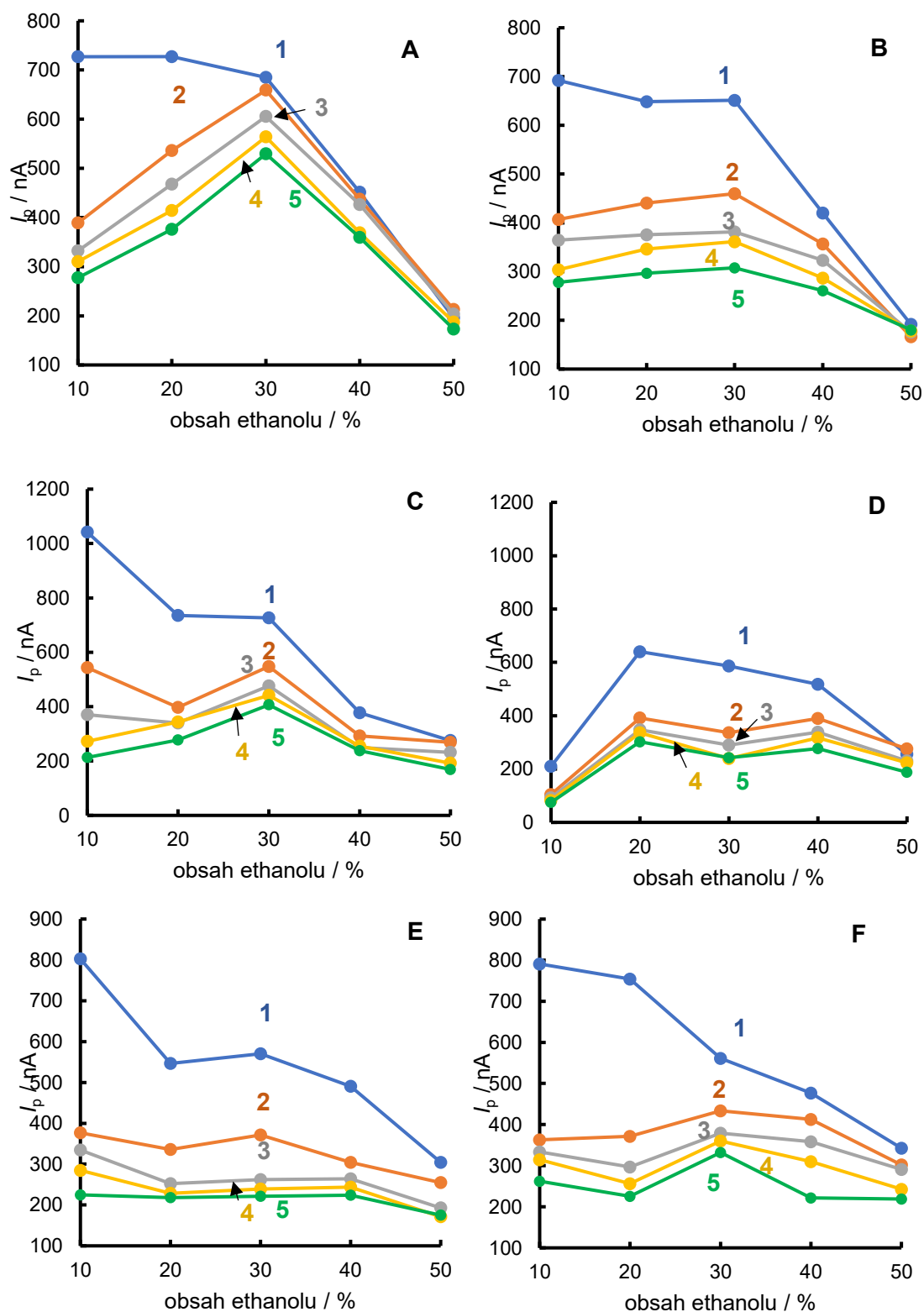


Obr. 6: DP voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 12–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření

Se zvyšujícím se pH pozorujeme posun potenciálu píku k nižším hodnotám. Pro všechny měření byl vybrán na vyhodnocení pík nacházející se na obr. 4 v okolí 900 mV. Tento pík při různých pH nemizí na rozdíl od píku nacházejícího se v obr. 4 v okolí 1200 mV a také se nachází ve všech opakováních narozdíl od píku v rozmezí potenciálů od 0 do 600 mV.

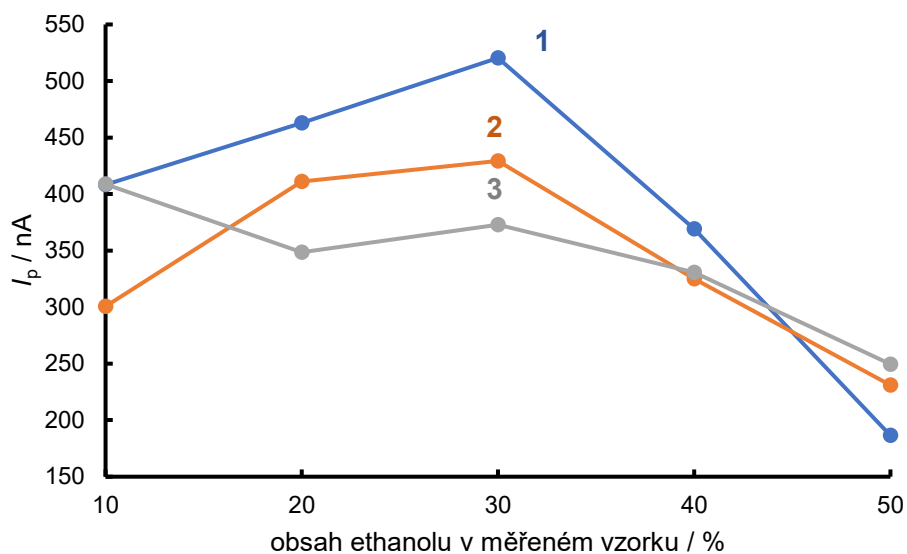
### 3.1.2 MĚŘENÍ STABILITY TADALAFILU

Byly proměřeny DPV záznamy pro zjištění optimálního množství ethanolu v základním elektrolytu. Měření bylo provedeno podle podmínek uvedených v popisku na Obr. 7. Každá série měření byla zopakovaná 2×. Každá série obsahovala 5 měření. Mezi jednotlivými sériemi byla pracovní uhlíková elektroda očištěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



Obr. 7: závislost výšky píku ( $I_p$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na obsahu ethanolu v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr-ethanol. (A) první a (B) druhá série měření při pH 2; (C) první a (D) druhá série měření při pH 7; (E) první a (F) druhá série měření při pH 12

Hodnoty z obr. 7 byly zprůměrovány (obr. 8), z nich pak bylo vybráno nejvhodnější procentuální zastoupení ethanolu.

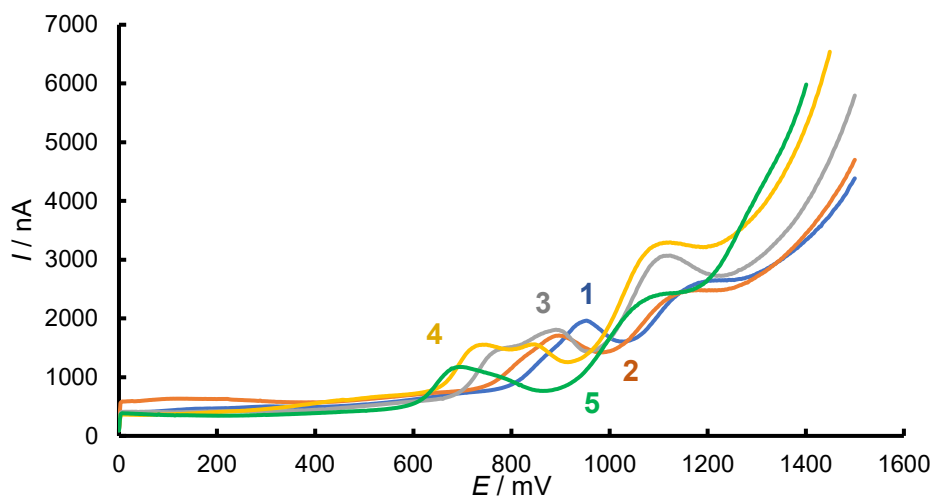


Obr. 8: závislost průměrných hodnot  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na obsahu ethanolu v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol. (1) pH 2, (2) pH 7, (3) pH 12

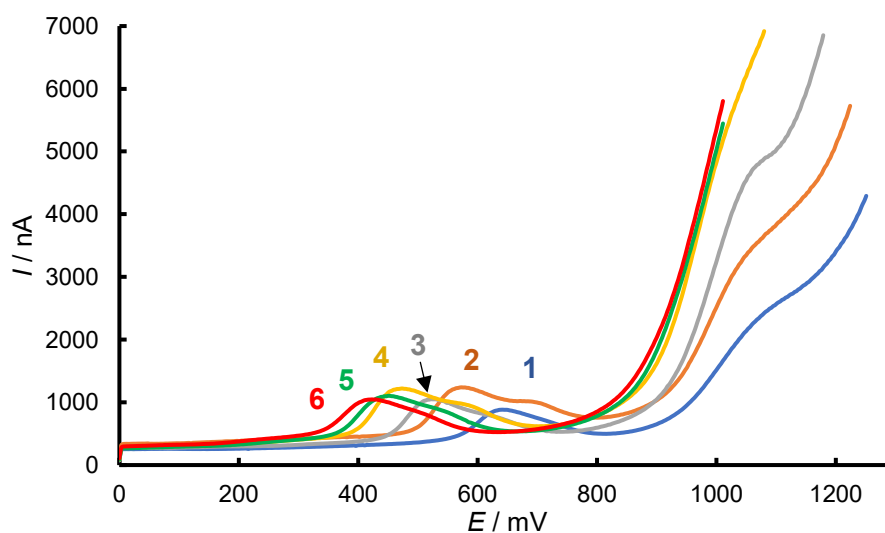
Nejvyšší průměrnou hodnotu proudu píku TAD vykazoval obsah 30 % ethanolu u většiny měření s výjimkou pH 12. Zde má nejvyšší hodnotu obsah 10 % ethanolu, ale u obsahu 30 % ethanolu došlo k viditelnému vzrůstu. Také bylo bráno v potaz měření stability na spektrofotometru (kap. 3.3), kde bylo zjištěno, že TAD začíná být stabilní v prostředí, které obsahuje alespoň 20 % ethanolu. Tím pádem byl vybrán jako nejvhodnější obsah ethanolu 30 %. Pro všechny následující měření pomocí DPV byl použit tento obsah ethanolu.

### 3.1.3 ZJIŠTĚNÍ OPTIMÁLNÍHO PH

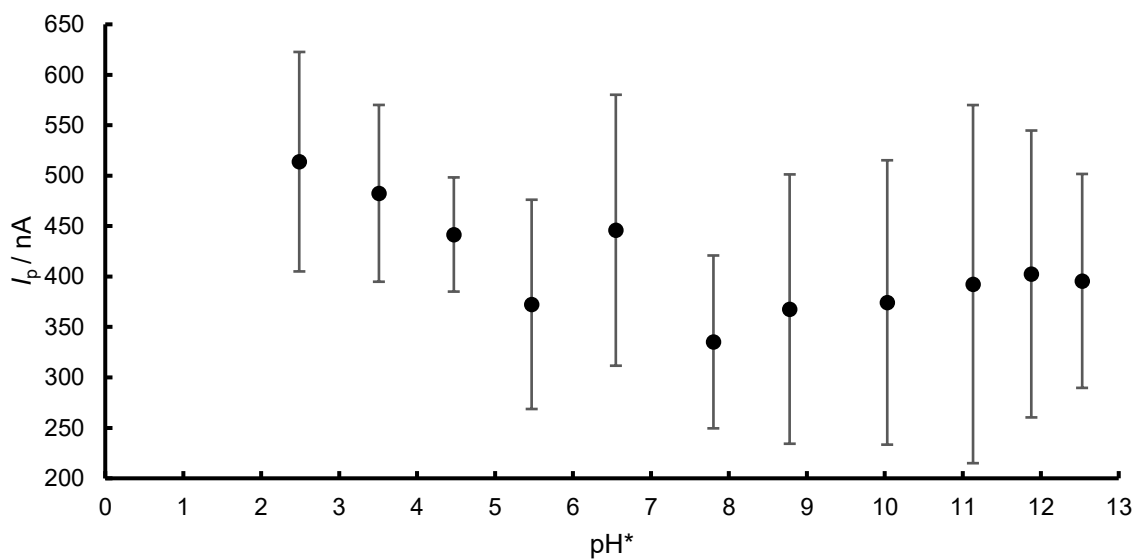
Technikou DPV bylo sledováno chování TAD v prostředích s  $\text{pH}^*$  od 2,5 do 12,5 (obr. 9 a 10). Vyhodnocení výšek a potenciálů píků je uvedeno na obr. 11 a 12. Prostředí je popsáno v popisku k obr. 9 a 10. Měření bylo provedeno ve dvou sériích po pěti opakováních. Mezi jednotlivými sériemi byla pracovní uhlíková kompozitní elektroda očištěna na pomoci  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



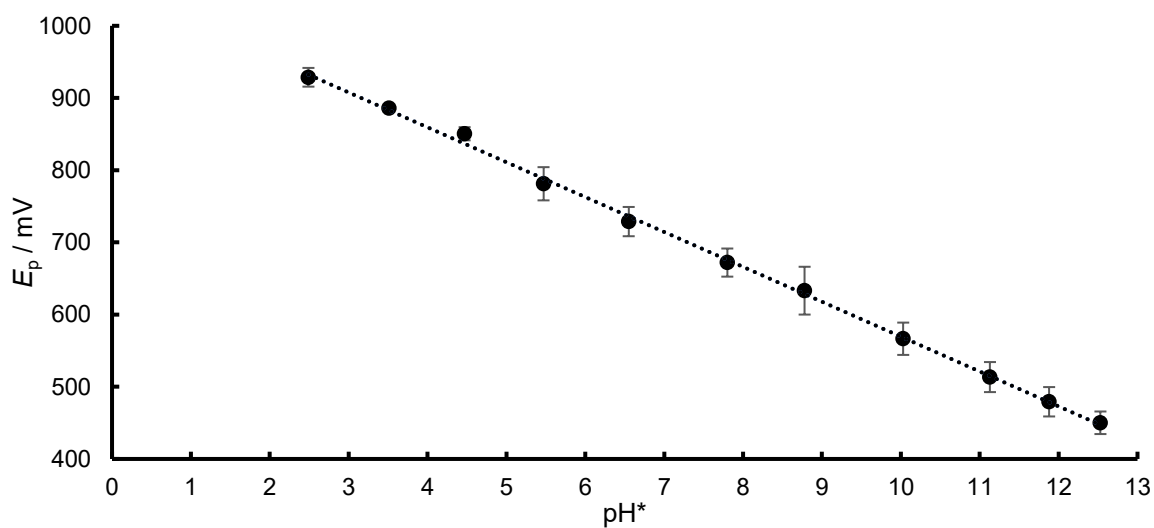
Obr. 9: DP voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3) při: (1) pH 2, (2) pH 3, (3) pH 4, (4) pH 5, (5) pH 6



Obr. 10: DP voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3) při: (1) pH 7, (2) pH 8, (3) pH 9, (4) pH 10, (5) pH 11, (6) pH 12



Obr. 11: závislost průměrných hodnot  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $pH^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3); odpovídající data v tab. 2



Obr. 12: závislost průměrných hodnot  $E_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $pH^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3); odpovídající data v tab. 1

Tab. 1: parametry přímky závislosti průměrných hodnot  $E_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3)

Směrnice [mV/pH*]	Úsek [mV]	$r^2$
-48,3	1053	0,9987

Tab. 2: hodnoty směrodatných odchylek průměrných hodnot  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3)

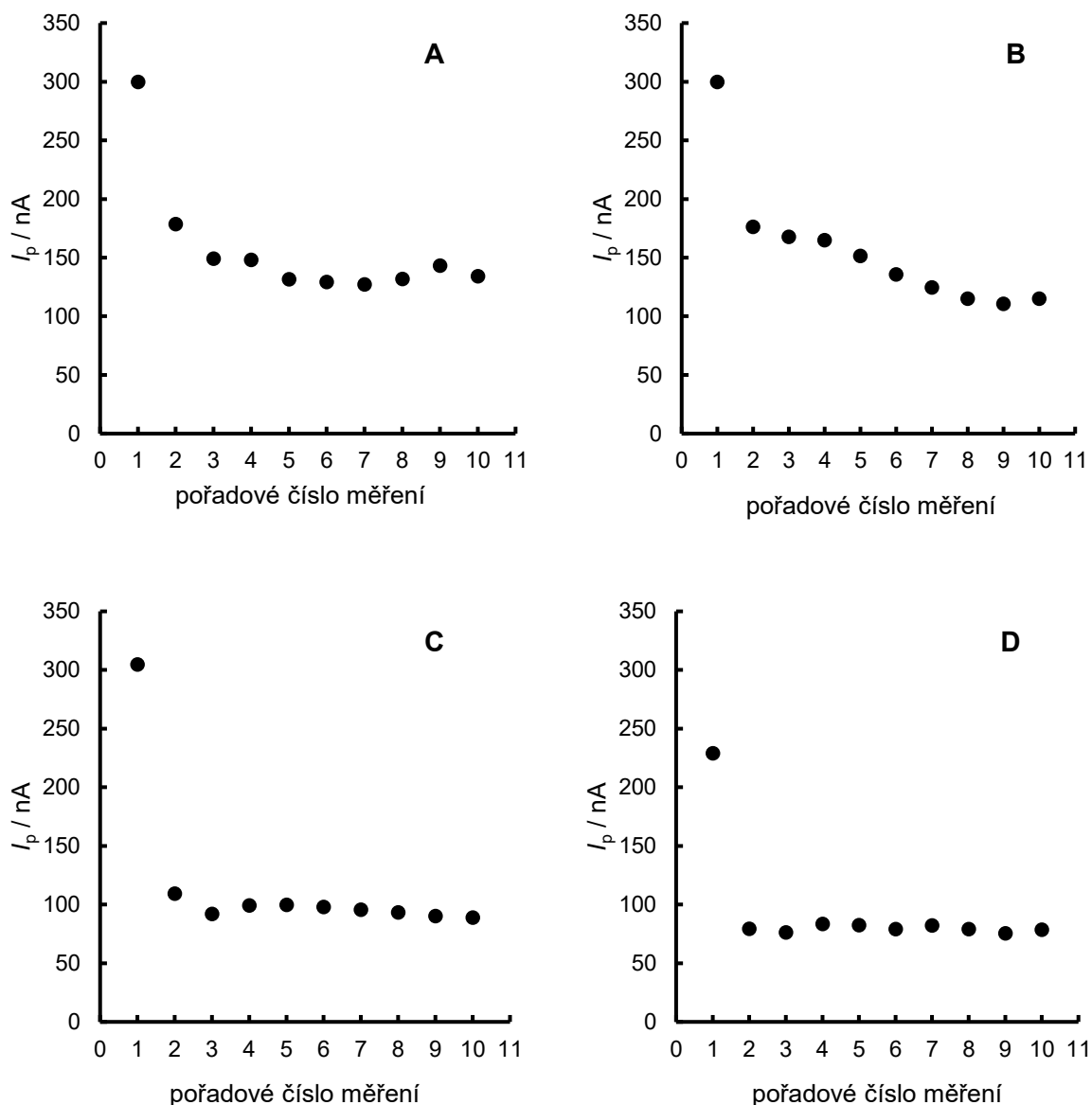
pH*	Směrodatná odchylka [nA]
2,5	109
3,5	87,6
4,5	56,6
5,5	104
6,6	135
7,8	85,7
8,8	134
10,0	141
11,1	178
11,9	142
12,5	106

Nejvhodnější prostředí pro další měření bylo vybráno jak na základě velikosti  $I_p$ , tak na základě velikosti směrodatné odchylky. Pro další práci byla zvolena jako optimální hodnota pH BR pufru 4. Při této hodnotě je směrodatná odchylka nejmenší a zároveň se  $I_p$  drží ve vyšších hodnotách (obr. 11). Stejně optimální pH prostředí bylo vybráno v práci autora Abu-Nameh E. S. z roku 2020 (cit. <sup>14</sup>) a v práci autora Sartori E. R. z roku 2017 (cit. <sup>16</sup>).

#### 3.1.4 OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ

Pro měření opakovatelnosti byla vybrána dvě potenciálová okna 0–1040 mV a 600–1040 mV. Podmínky měření jsou uvedeny v popisku obr. 13. Obě okna byla proměřena ve dvou sériích po pěti měřeních. Elektroda byla leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



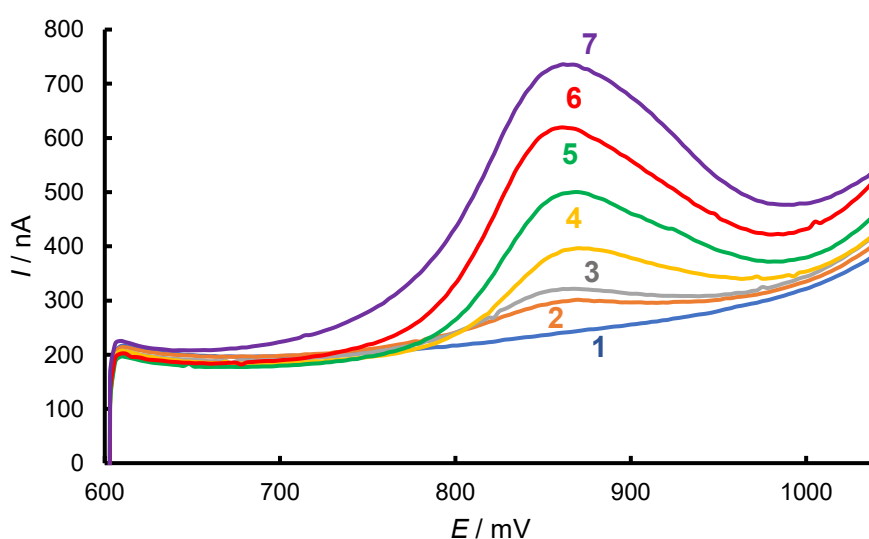


Obr. 13: závislost  $I_p$  TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pořadovém čísle měření; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3). (A) první a (B) druhá série měření pro potenciálové okno 0–1040 mV; (C) první a (D) druhá série měření pro potenciálové okno 600–1040 mV

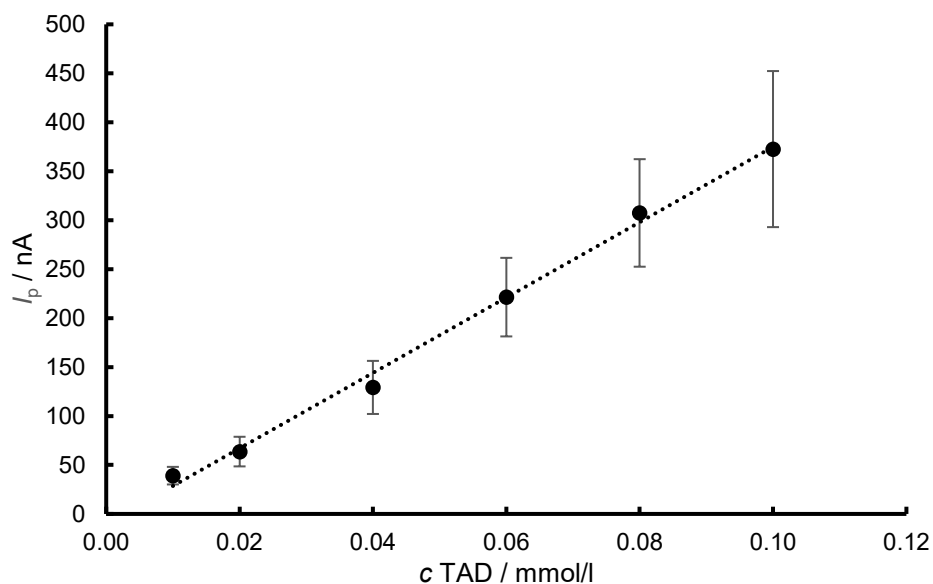
První měření v obou sériích nebylo započítáno do relativní směrodatné odchylky, jedná se o odlehlou hodnotu. V potenciálovém okně 0–1040 mV vyšla relativní směrodatná odchylka pro první sérii 10 % a pro druhou sérii měření 17 %. Pro potenciálové okno 600–1040 mV byla relativní směrodatná odchylka první série měření 6,1 % a v druhé sérii měření 3,2 %. Pro další měření bylo tedy využito potenciálové okno 600–1040 mV.

### 3.1.5 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST

Pro tvorbu kalibrační závislosti bylo využito prostředí popsané v obr. 14. Bylo změřeno pět opakování, z nichž byla vybrána jedna lineární závislost. Čištění elektrody bylo provedeno více způsoby, nejprve leštěním pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , kde sestavená kalibrační závislost měla malý koeficient determinace (0,9914 po odstranění dvou odlehlých hodnot). Takže byly přeměřeny různé způsoby leštění. Byla změřena kalibrační závislost s leštěním na mikrovlákně s ethanolem, kde koeficient determinace nebyl také zcela vhodný (0,9873). Následovalo přeměření po regeneraci na ultrazvuku (1 minuta), kde bylo dosaženo uspokojivého výsledku (obr. 15; odpovídající data v tab. 3).



Obr. 14: DP voltamogramy TAD zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3). (1) bez přídavku, (2)  $c_{\text{st}} = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (3)  $c_{\text{st}} = 2 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (4)  $c_{\text{st}} = 4 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (5)  $c_{\text{st}} = 6 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (6)  $c_{\text{st}} = 8 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (7)  $c_{\text{st}} = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l



Obr. 15: kalibrační závislost TAD; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

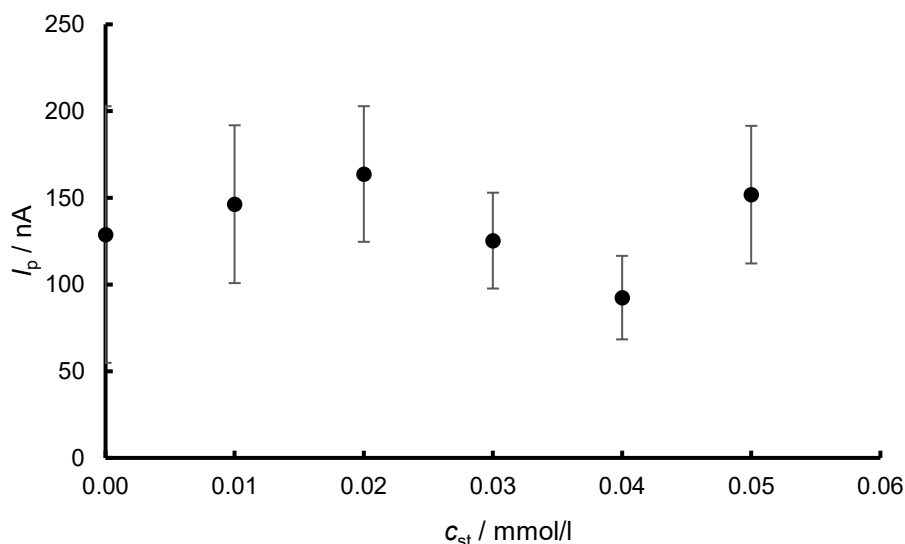
Tab. 3: parametry přímky kalibrační závislosti TAD; měřené technikou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Směrnice [nA·l/mmol]	Úsek [nA]	$r^2$
3850	-9,95	0,9952

Byly vypočítány hodnoty  $L_Q = 1,3 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $L_D = 4,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

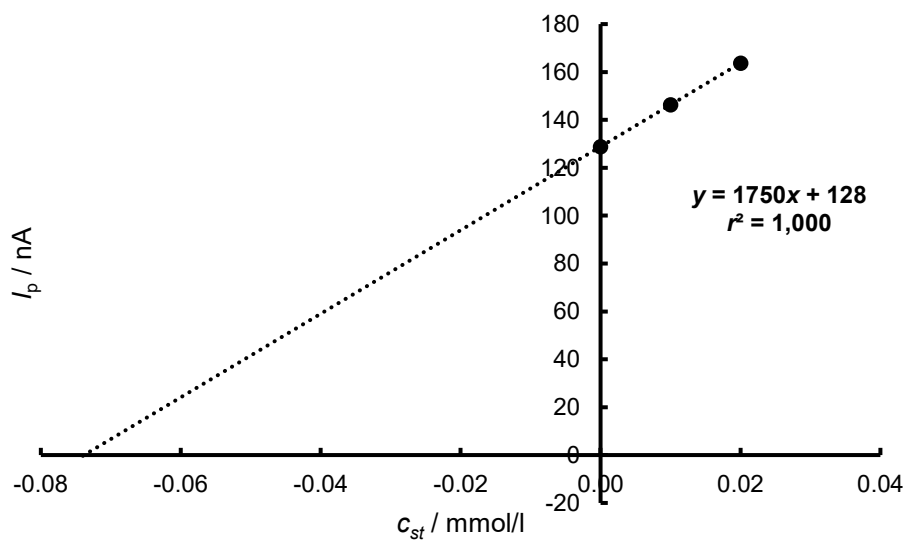
### 3.1.6 STANOVENÍ OBSAHU TADALAFILU V LÉKU

Pro stanovení množství TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg byla využita metoda standartního přídatku. Podmínky měření jsou popsány v popisku obr. 16 a odpovídající koncentrační závislost je zobrazena na obr. 17. Postup přípravy roztoků je uveden v kap. 2.1. Elektroda byla čištěna pomocí ultrazvuku (1 minuta).



Obr. 16: závislost  $I_p$  na  $c_{st}$  TAD; měřené metodou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Pro stanovení množství TAD byly využity jen první dva přídávky vykazující lineární trend. Byl proměřen i přídavek  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$  a  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, tyto přídávky však nevykazovaly lineární charakter, a proto s nimi nebylo dále pracováno.



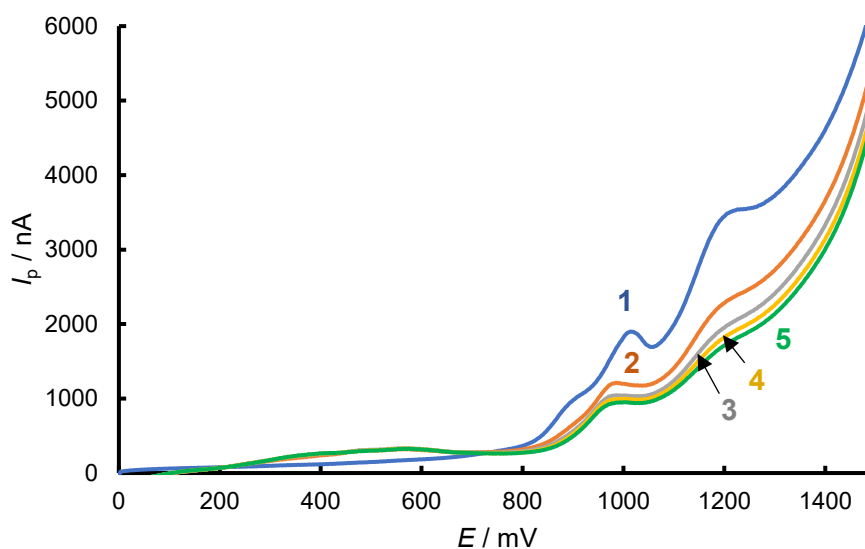
Obr. 17: závislost  $I_p$  na  $c_{st}$  TAD; měřené metodou DPV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Výsledek obsahu TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg zjištěný vyvinutou DPV metodou vyšel 148 %.

## 3.2 DC VOLTAMETRIE

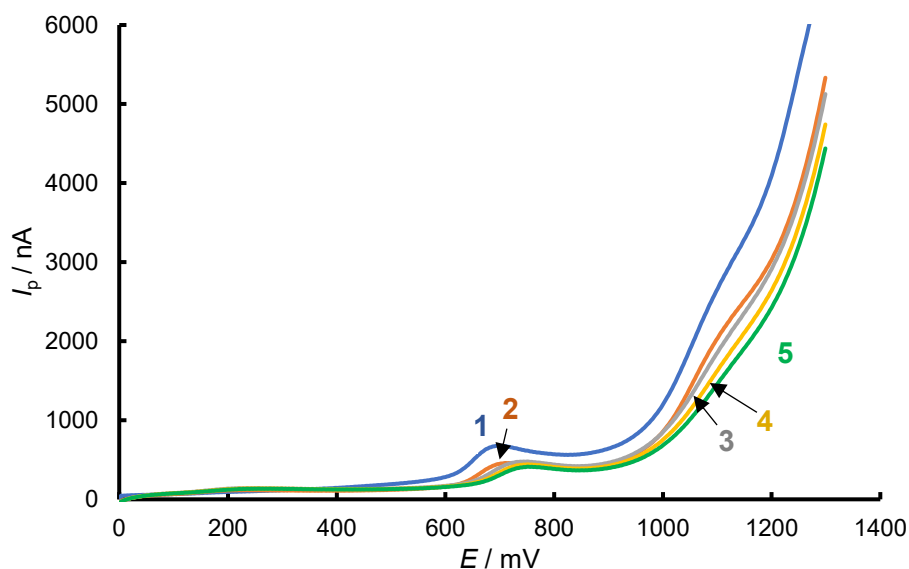
### 3.2.1 VÝZKUM VOLTAMETERICKÉHO CHOVÁNÍ

Měření bylo provedeno podle podmínek uvedených v popisku na obr. 18. Toto prostředí bylo zvolené po proměření poměrů ethanolu od 10 % do 40 % a v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2, 7 a 12 s TAD o  $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l na spektrofotometru (kap. 3.3). Pro vybrání vhodného píku TAD bylo toto měření provedeno voltametriky v pH 2 (obr. 18), 7 (obr. 19) a 12 (obr. 20), pro každé pH bylo provedeno pět opakování, mezi jednotlivými měřeními byla elektroda leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

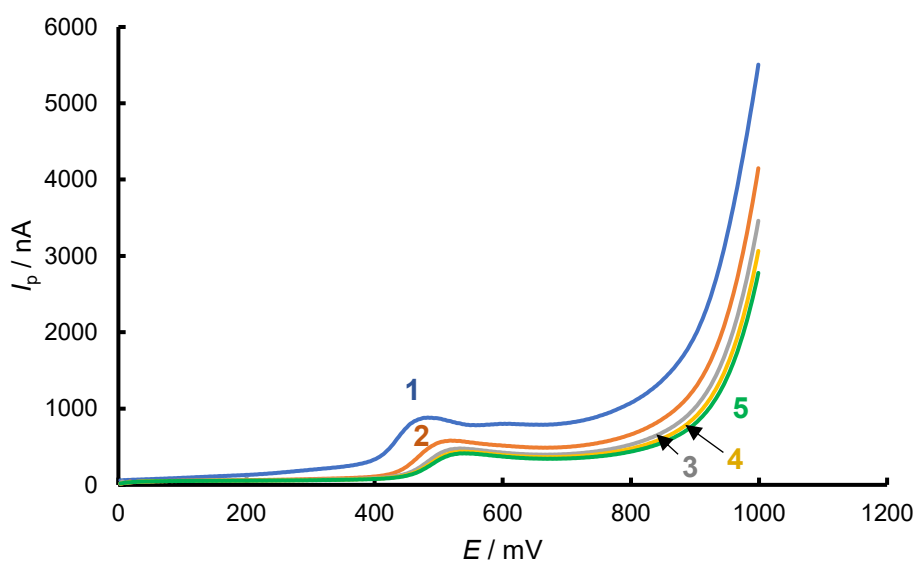


Obr. 18: DC voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření

Při měření od druhého do pátého opakování dochází ke snižování velikosti píku, což může být způsobeno pasivací elektrody.



Obr. 19: DC voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 7–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření



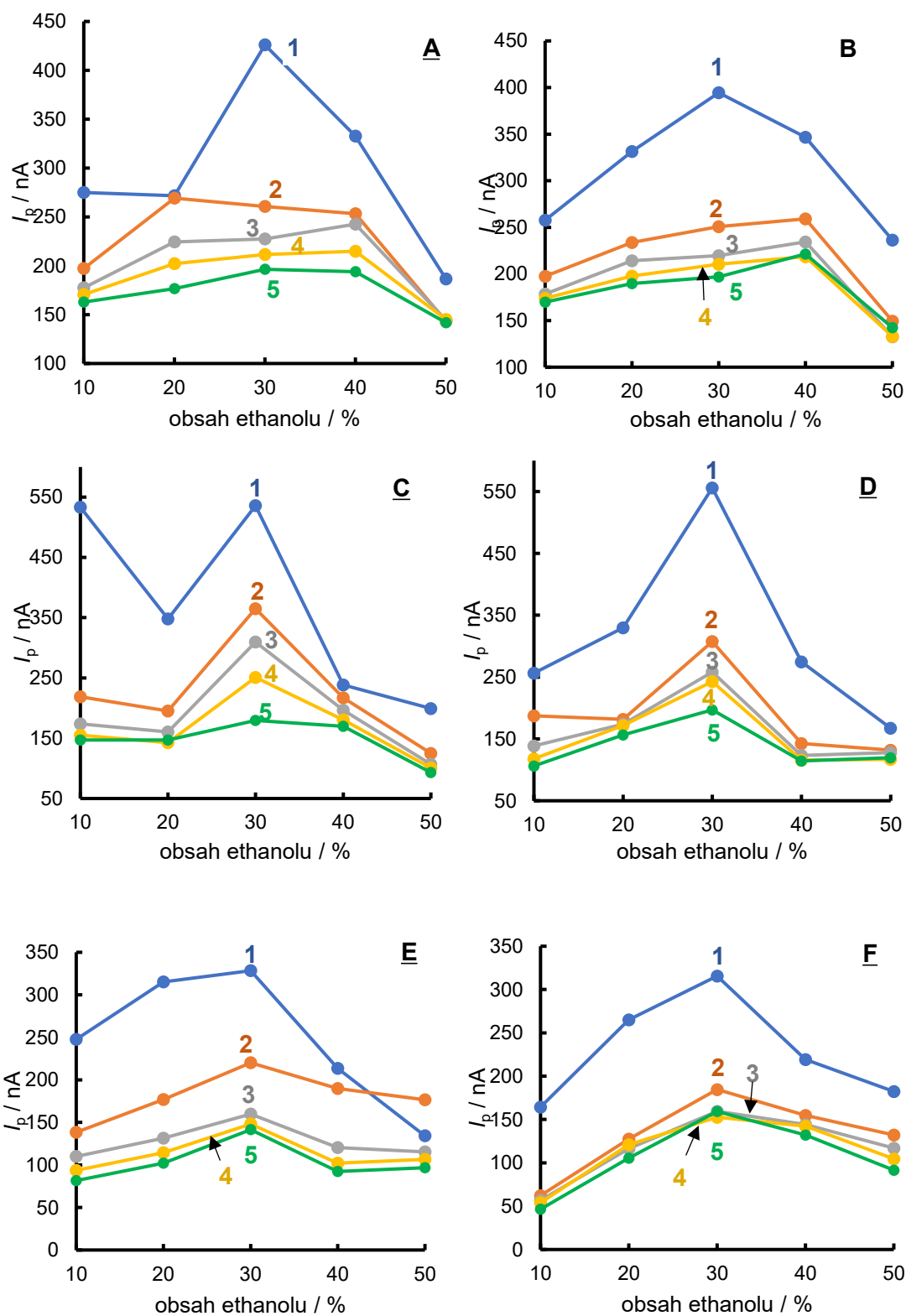
Obr. 20: DC voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 12–ethanol (7:3) pro pět za sebou jdoucích měření; křivky jsou označeny čísly tak, jak šla po sobě jednotlivá měření

Se zvyšujícím se pH pozorujeme posun potenciálu píku k nižším hodnotám. Pro vyhodnocení byl využit pík, který se nachází na obr. 18 okolo 1000 mV. Tento pík se vyskytuje ve všech pH (nemízi jako pík, který se nachází v rozmezí od 1100 mV do 1300 mV

na obr. 18). Dochází také ke vzniku píku pro druhé až páté měření v rozmezí od 200 mV do 700 mV. Zřejmě jde o produkt vzniklý oxidační reakcí jako u metody DPV.

### 3.2.2 MĚŘENÍ STABILITY TADALAFILU

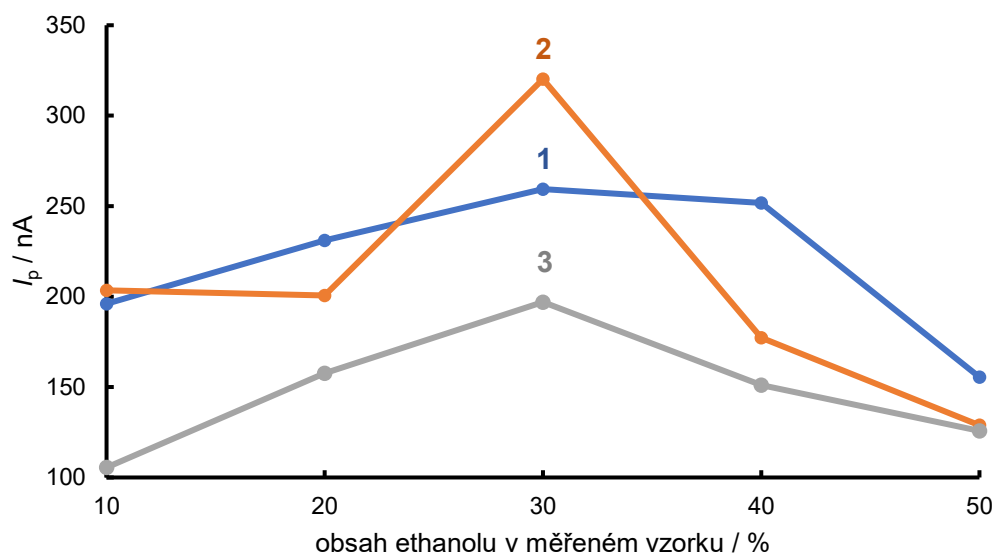
Byly proměřeny DCV záznamy pro zjištění optimálního množství ethanolu v základním elektrolytu. Měření bylo provedeno podle podmínek uvedených v popisku na obr. 21 pro obsah ethanolu 10 %, 20 %, 30 %, 40 % a 50 %. Každá série měření byla zopakovaná 2×. Každá série obsahovala 5 měření. Mezi jednotlivými sériemi byla pracovní uhlíková elektroda očištěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



Obr. 21: závislost  $I_p$  TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na obsahu ethanolu v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr-ethanol. (A) první a (B) druhá série měření při pH 2; (C) první a (D) druhá série měření při pH 7; (E) první a (F) druhá série měření při pH 12



Ze všech hodnot z obr. 21 byl vypočítán průměr a vyneseno do obr. 22.

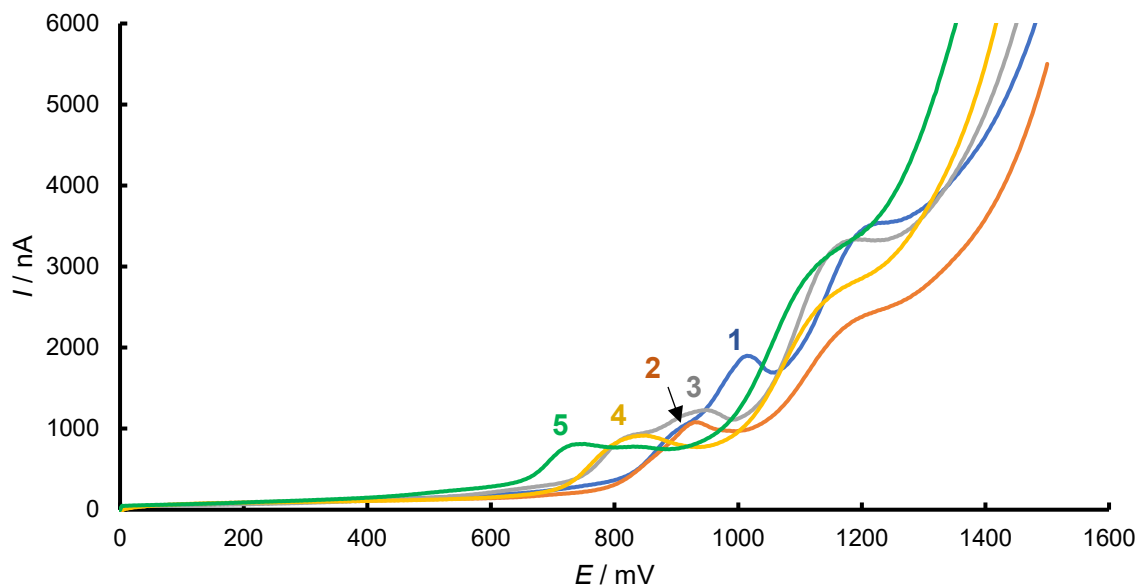


Obr. 22: závislost  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na obsahu ethanolu v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol. (1) pH 2, (2) pH 7, (3) pH 12

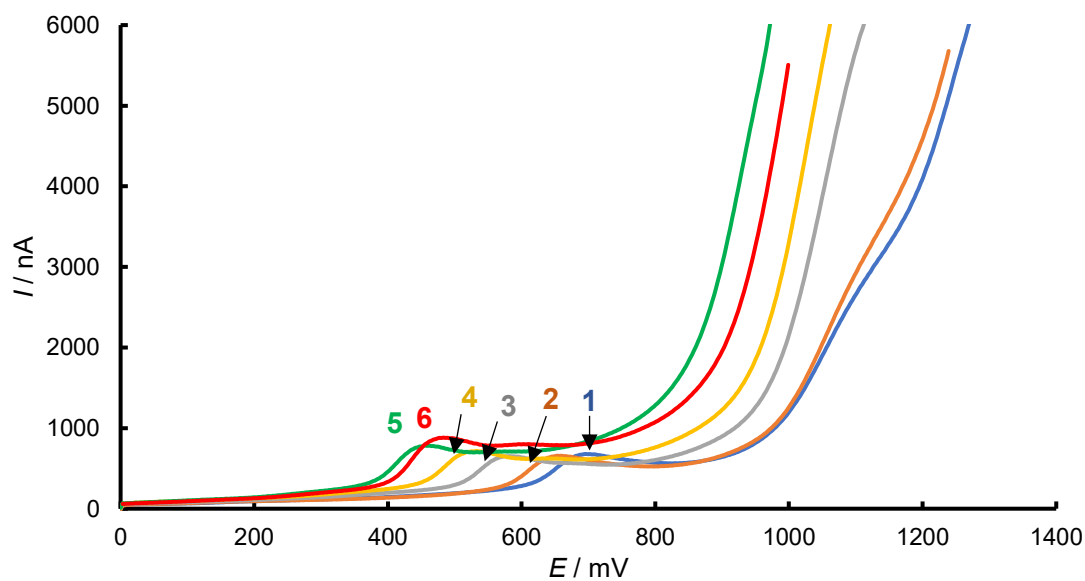
Z grafů vyplývá, že nejvyšší hodnoty proudu píku TAD dosahoval vždy vzorek s obsahem 30 % ethanolu. Byl tedy vybrán jako nejvhodnější. Pro následné měření pomocí DCV byl použit tento obsah ethanolu.

### 3.2.3 ZJIŠTĚNÍ OPTIMÁLNÍHO PH

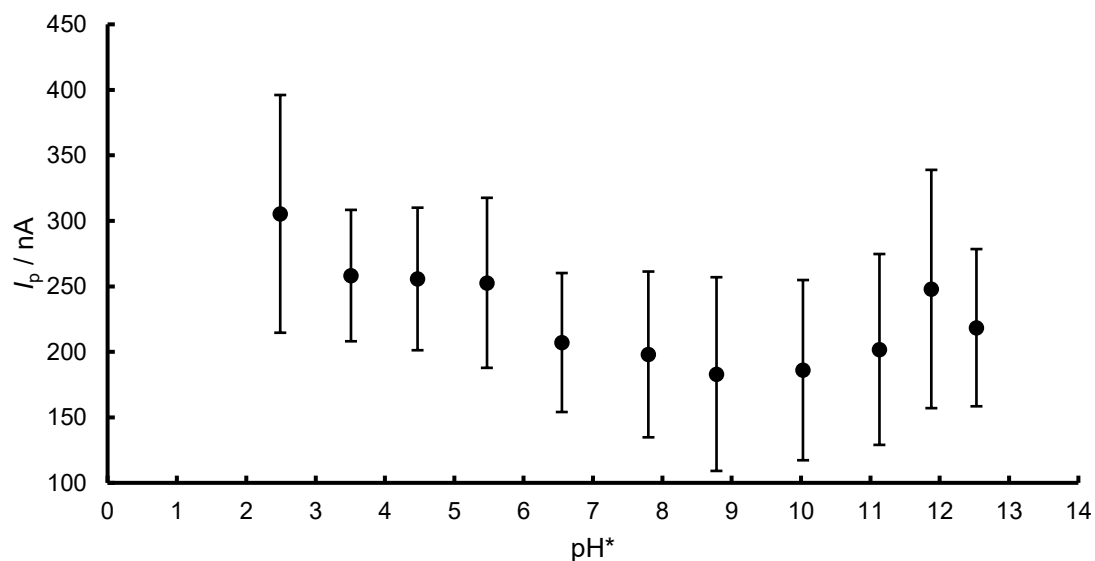
Technikou DCV bylo sledováno chování TAD v prostředí pH\* od 2,5 do 12,5 (obr. 23 a 24). Vyhodnocení výšek a potenciálů píků je uvedeno na obr. 25 a 26. Prostředí je popsáno v popisku k obr. 23 a 24. Měření bylo provedeno ve dvou sériích po pěti opakováních. Mezi jednotlivými sériemi byla pracovní uhlíková kompozitní elektroda očištěna na pomoci  $Al_2O_3$ .



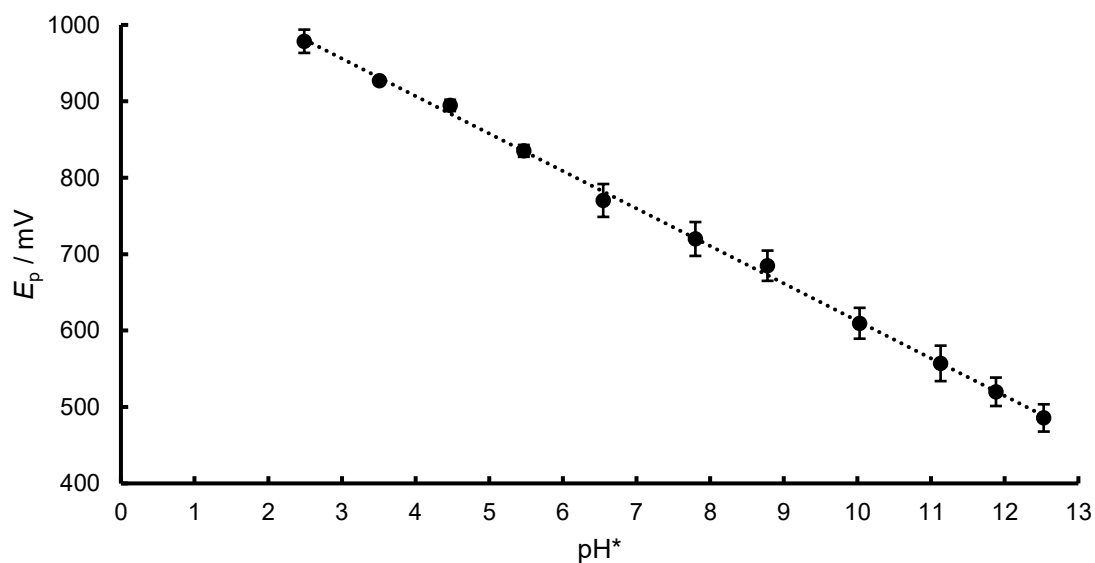
Obr. 23: DC voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3) při: (1) pH 2, (2) pH 3, (3) pH 4, (4) pH 5, (5) pH



Obr. 24: DC voltamogramy TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3) při: (1) pH 7, (2) pH 8, (3) pH 9, (4) pH 10, (5) pH 11, (6) pH 12



Obr. 25: závislost průměrných hodnot  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3); odpovídající data v tab. 5



Obr. 26: závislost průměrných hodnot  $E_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3); odpovídající data v tab. 4

Tab. 4: parametry přímky závislosti průměrných hodnot  $E_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3)

Směrnice [mV/pH*]	Úsek [mV]	$r^2$
-49,1	1103	0,9985

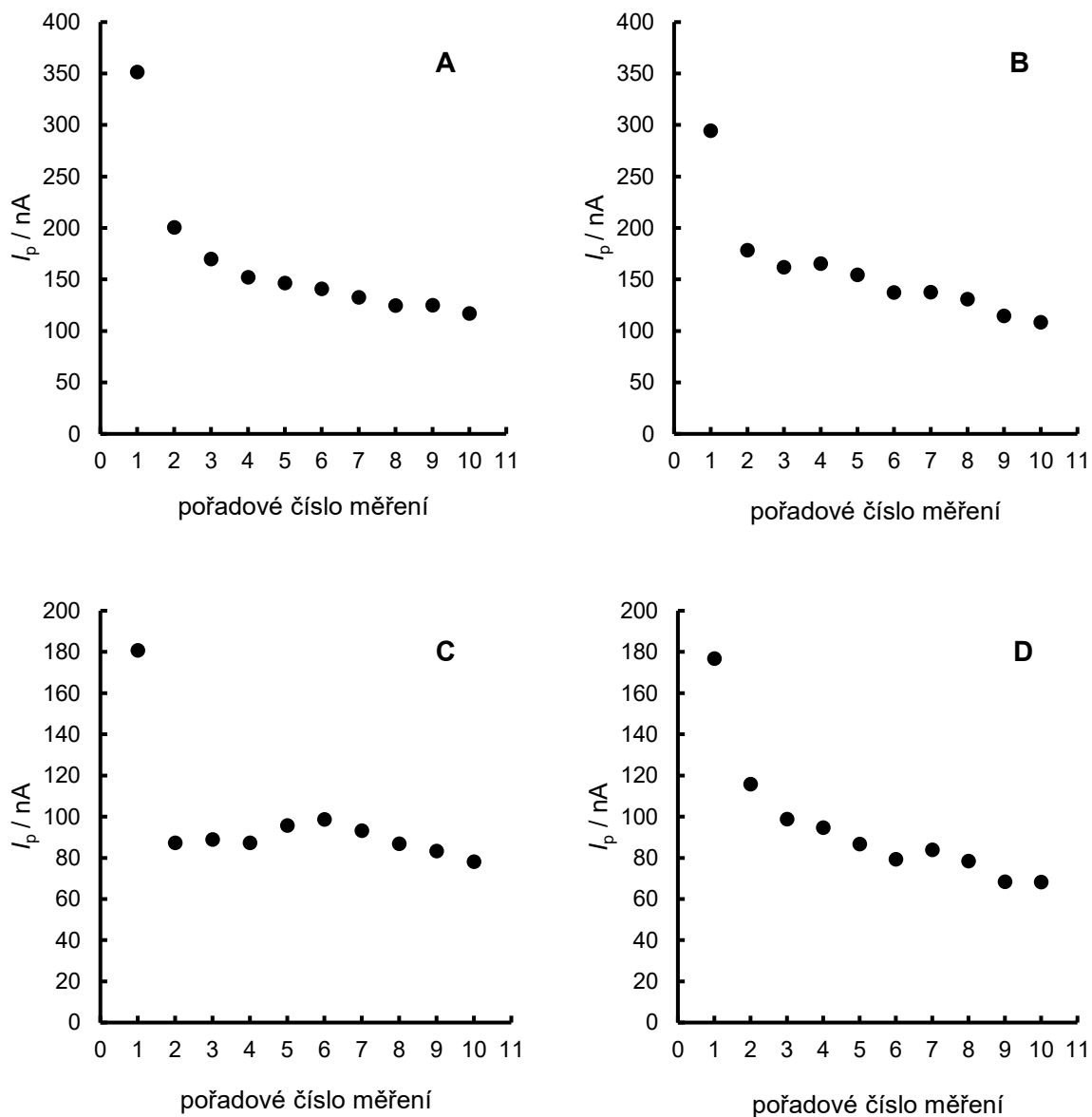
Tab. 5: hodnoty směrodatných odchylek průměrných hodnot  $I_p$  ( $n = 10$ ) TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na  $\text{pH}^*$  v základním elektrolytu; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr–ethanol (7:3)

pH*	Směrodatná odchylka [nA]
2,5	90,7
3,5	50,1
4,5	54,4
5,5	64,9
6,6	53,1
7,8	63,3
8,8	73,9
10,0	68,8
11,1	72,9
11,9	90,9
12,5	60,0

Nejvhodnější prostředí pro další měření bylo vybráno na základě velikosti směrodatné odchylky (tab. 5) a  $I_p$  (obr. 25). Nejmenší směrodatnou odchylku má  $\text{pH}^*$  3,5 a 4,5 při porovnání s  $I_p$  má vyšší proud  $\text{pH}^*$  4,5. Proto bylo i toto  $\text{pH}^*$  vybráno pro další práci jako nejvhodnější. Stejně optimální pH prostředí bylo vybráno v práci autora Abu-Nameh E. S. z roku 2020 (cit. <sup>14</sup>) a v práci autora Sartori E. R. z roku 2017 (cit. <sup>16</sup>).

### 3.2.4 OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ

Pro měření opakovatelnosti byla vybrána dvě potenciálová okna 0–1040 mV a 600–1040 mV. Podmínky měření jsou uvedeny v popisku obr. 27. Obě okna byla proměřena ve dvou sériích po pěti měřeních. Elektroda byla leštěna pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



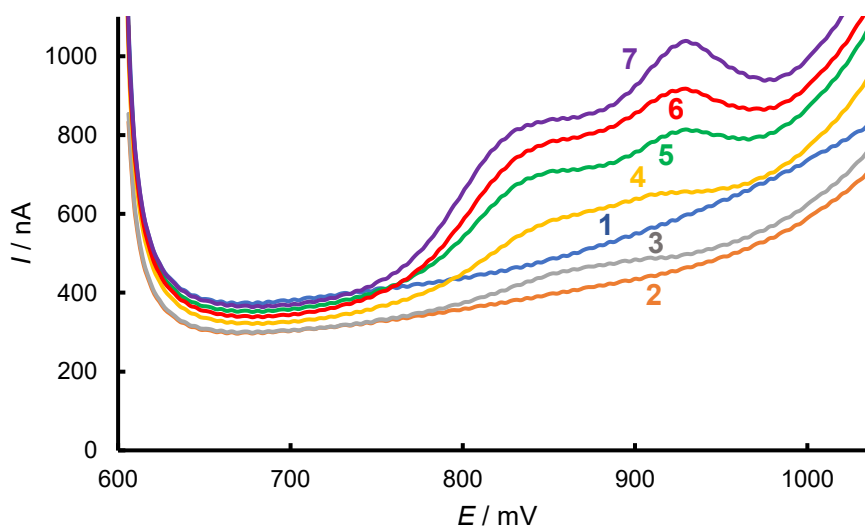
Obr. 27: závislost  $I_p$  TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pořadovém čísle měření; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3). (A) první a (B) druhá série měření pro potenciálové okno 0–1040 mV; (C) první a (D) druhá série měření pro potenciálové okno 600–1040 mV

Z měření byla vypočítána relativní směrodatná odchylka, která pro potenciálové okno 0–1040 mV pro první sérii měření vyšla 17 % a pro druhou sérii měření vyšla 16 %. Pro potenciálové okno 600–1040 mV vyšla relativní směrodatná odchylka pro první sérii měření 6,7 % a pro druhou sérii měření vyšla 16 %. U všech sérií nebylo do výpočtu započteno první

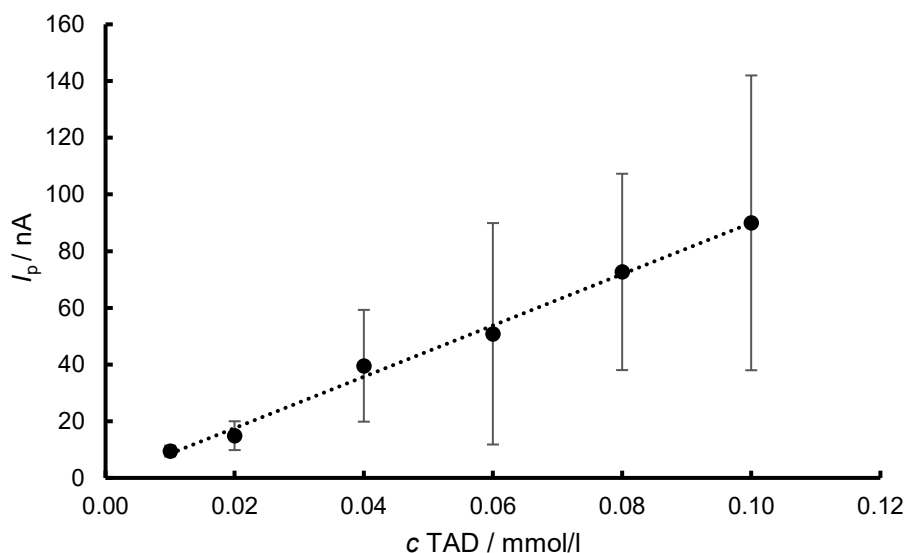
měření, jelikož bylo velmi odlehlé. Pro další měření bylo tedy využito potenciálové okno 600–1040 mV.

### 3.2.5 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST

Pro tvorbu kalibrační závislosti bylo využito prostředí popsané v obr. 28. Měření bylo provedeno po pěti opakováních. Bylo vybráno opakované měření vykazující v důsledku lineární závislosti obr. 29; odpovídající data v tab. 6. Čištění elektrody bylo provedeno leštěním pomocí  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



Obr. 28: DC voltamogramy TAD zaznamenané na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3). (1) bez přídavku, (2)  $c_{\text{st}} = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (3)  $c_{\text{st}} = 2 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (4)  $c_{\text{st}} = 4 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (5)  $c_{\text{st}} = 6 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (6)  $c_{\text{st}} = 8 \cdot 10^{-5}$  mol/l, (7)  $c_{\text{st}} = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l



Obr. 29: kalibrační závislost TAD; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

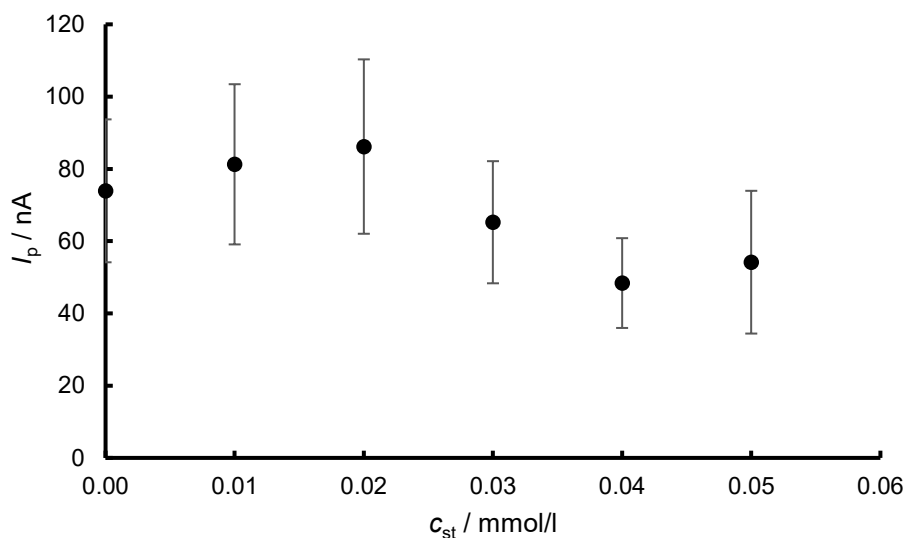
Tab. 6: parametry přímky kalibrační závislosti TAD; měřené technikou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Směrnice [nA·l/mmol]	Úsek [nA]	$r^2$
905	-0,509	0,9935

Byly vypočítány hodnoty  $L_Q = 2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $L_D = 6,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

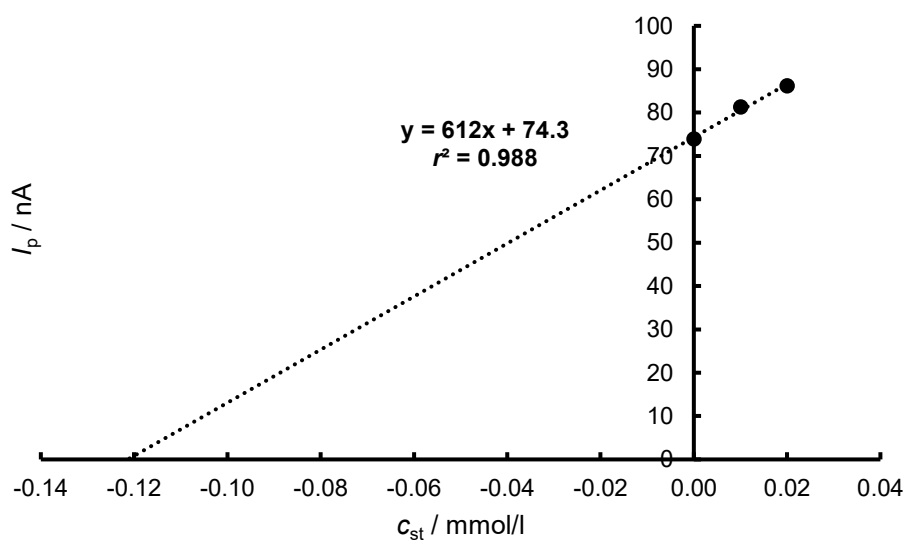
### 3.2.6 STANOVENÍ OBSAHU TADALAFILU V LÉKU

Pro stanovení množství TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg byla využita metoda standartního přídávku. Podmínky měření jsou popsány v popisku k obr. 30 a odpovídající koncentrační závislost je zobrazena na obr. 31. Postup přípravy roztoků je uveden v kap. 2.1. Elektroda byla čištěna pomocí ultrazvuku (1 minuta).



Obr. 30: závislost  $I_p$  na  $c_{st}$  TAD; měřené metodou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Přídavky  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$  a  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l nevykazovaly lineární charakter (obr. 30) a dále s nimi nebylo pracováno.



Obr. 31: závislosti  $I_p$  na  $c_{st}$  TAD; měřené metodou DCV na uhlíkové kompozitní elektrodě v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Výsledek obsahu TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg zjištěný vyvinutou DCV metodou vyšel 243 %.



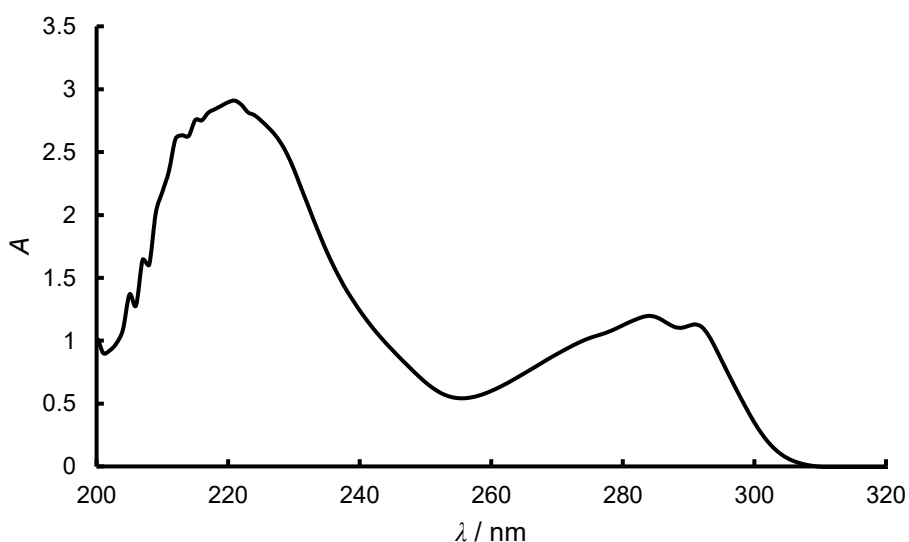
### 3.3 SPEKTROMETRICKÉ STANOVENÍ

#### 3.3.1 MĚŘENÍ STABILITY

Na spektrofotometru byl proměřen vzorek v různých pH s různým obsahem ethanolu, aby bylo stanoveno vhodné prostředí. Nejprve byl vzorek proměřen s kyselým pufrům o pH 2 (data nejsou ukázána). Při poměru ethanolu 9:1 s koncentrací TAD  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (připravený ze zásobního roztoku o  $c = 1 \cdot 10^{-3}$  stejně jako všechny další vzorky) byl rozdíl mezi počáteční absorbancí a konečnou při měření 17 %. Následně byl proměřen vzorek s obsahem ethanolu 9:1 o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, rozdíl mezi počáteční absorbancí a konečnou při měření byl okolo 2 %.

Dále byla proměřena absorbance pro vzorek s BR pufrům o pH 7 (data nejsou ukázána). Pro tato měření byl použit už jen vzorek s poměrem ethanolu 8:2 s koncentrací TAD  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, který měl rozdíl absorbancí pod 5 % a vzorek s poměrem ethanolu 9:1 s koncentrací TAD  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, kterému vyšel rozdíl absorbancí nad 10 %.

Poté byl přeměřen vzorek s BR pufrům o pH 12 (obr. 32). Pro vzorek s poměrem ethanolu 8:2 s koncentrací TAD  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l byl rozdíl absorbancí okolo 5 % a byl proměřen vzorek s poměrem ethanolu 9:1 a koncentrací TAD  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, u kterého vyšel rozdíl absorbancí okolo 17 %.

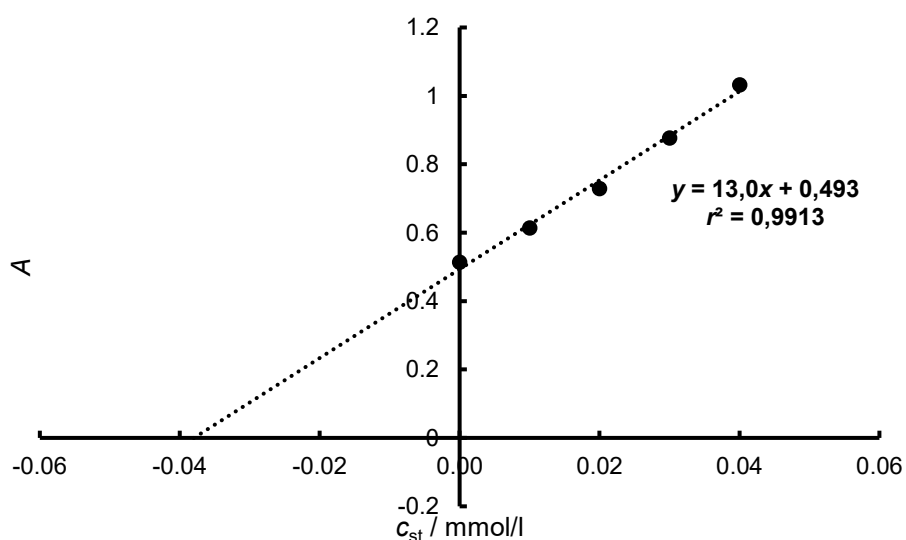


Obr. 32: absorpční spektrum TAD ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí BR pufru o pH 12–ethanol (8:2); měřené proti blanku (BR pufru o pH 12–ethanol (8:2)) v křemenné kyvetě o délce 1,0 cm

Pro další měření byl tedy vybrán jako nejstabilnější vzorek s obsahem ethanolu 8:2 a  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Ovšem v celé práci byl vybrán poměr ethanolu 7:3, kvůli výsledkům naměřeným technikami DPV a DCV.

### 3.3.2 STANOVENÍ OBSAHU TADALAFILU V LÉKU

Pro stanovení obsahu TAD v léčivu byla využita metoda standartního přídávku (obr. 33). Podmínky pro toto stanovení byly zvolené stejné jako pro techniky DPV a DCV, aby bylo možné porovnat vyvinuté voltametrické a spektrofotometrické metody. Koncentrace léčiva v měřeném roztoku bez přídávku byla  $4 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Poté byla koncentrace TAD navýšena přidáním standartního přídávku 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l a 400  $\mu$ l ze zásobního roztoku ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l). Konečná koncentrace TAD v roztoku byla  $8 \cdot 10^{-5}$  mol/l.



Obr. 33: závislost  $A$  na  $c_{st}$  TAD v prostředí BR pufr o pH 4–ethanol (7:3)

Výsledek obsahu TAD v léku Tadalafil Teva 5 mg vyšel 94,9 %.

## 4 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá voltametrickým stanovením TAD na uhlíkové kompozitní elektrodě. Spektrometricky bylo stanoveno, že roztok TAD je stabilní v pufru o hodnotě pH 2, 7 a 12 po dobu 20 minut, pokud se nachází alespoň ve 20 % ethanolu. Dále byly zjišťované optimální podmínky pro stanovení TAD metodou DPV a DCV.

Nejprve bylo měřeno vhodné množství ethanolu pro metodu DPV a DCV. To bylo vyhodnoceno na 7:3 ethanolu v roztoku, jelikož poskytoval největší proudovou odezvu.

Pro měření vhodného pH byly vyhodnocovány proudové odezvy pro rozmezí BR pufru od 2,5 do 12,5 pH. Za nejvhodnější byl stanoven BR pufr o hodnotě pH 4 (pro obě metody DPV a DCV). Při vyhodnocení byl brán ohled na velikost proudu píku a velikost relativní směrodatné odchylky.

Opakovatelnost byla měřena ve dvou potenciálových oknech a ve dvou sériích měření. Jako nejvhodnější bylo vybráno okno s rozmezím od 600 do 1040 mV, jehož směrodatná odchylka dosahovala hodnot 6,1 % a 3,2 % pro DPV a pro DCV dosahovala 6,7 % a 16 %.

Kalibrační závislost byla měřena v rozmezí koncentrací od  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l do  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Pro metodu DPV byl  $L_Q = 1,3 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $L_D = 4,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Pro metodu DCV byl  $L_Q = 2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $L_D = 6,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

Následně byl stanoven TAD v léčivu Tadalafil Teva 5 mg. Jeho obsah metodou DPV byl stanoven na 148 % a obsah metodou DCV byl stanoven na 234 %. Jako metoda pro srovnání byla vybrána UV–VIS spektrometrie ve stejném prostředí, které bylo použito pro měření obsahu TAD v léčivu pro metody DPV a DCV (tedy BR pufr o hodnotě pH 4 a ethanol (7:3)), při tomto stanovení vyšel obsah TAD 94,9 %. Důvodem zvýšených hodnot u metody DPV a DCV může být přítomnost dalších látek v tabletě, které jsou schopny ovlivnit stanovení.

## 5 LITERATURA

1. Forgue T. S., Patterson B. E., Bedding A. W., Payne C. D., Phillips D. L., Wrishko R. E., Mitchell M. I.: Tadalafil Pharmacokinetics in Healthy Subjects. *British Pharmacological Society* **61** (2006), 243–363
2. Padma-Nathan H., McMurray J. G., Pullman W. E., Whitaker J. S., Saoud J. B., Ferguson K. M., Rosen R. C.: On-Demand IC351 (Cialis<sup>TM</sup>) Enhances Erectile Function in Patients with Erectile Dysfunction. *International Journal of Impotence Research* **13** (2001), 2–9
3. Galiè N., Brundage B. H., Ghofrani H. A., Oudiz R. J., Simonneau G., Safdar Z., Shapiro S., White J., Chan M., Beardsworth A., Frumkin L., Barst R. J.: Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **119** (2009), 2894–2903
4. Henrie A. M., Nawarskas J. J., Anderson J. R.: Clinical Utility of Tadalafil in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: An Evidence-Based Review. *Core Evidence* **10** (2015), 99–109
5. Francis S. H., Corbin J. D.: Molecular Mechanisms and Pharmacokinetics of Phosphodiesterase-5 Antagonists. *Current Urology Reports* **4** (2003), 457–465
6. Feldman A. F., Goldstein I., Hatzichristou G. D., Krane J. R., Mckinlay B. J.: Impotence and its Medical and Psychosocial Correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *The Journal of Urology* **151** (1994), 54–61.
7. Coward R. M., Carson C. C.: Tadalafil in the Treatment of Erectile Dysfunction. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **4** (2008), 1315–1329
8. Carson C. C., Rajfer J., Eardley I., Carrier S., Denne J. S., Walker D. J., Shen W., Cordell W. H.: The Efficacy and Safety of Tadalafil: an Update. *BJU International* **93** (2004), 1171–1405
9. McMahon C.: Comparison of Efficacy, Safety, and Tolerability of On-Demand Tadalafil and Daily Dosed Tadalafil for the Treatment of Erectile Dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine* **2** (2005), 415–425
10. Porst H.: IC351 (Tadalafil, Cialis): Update on Clinical Experience. *International Journal of Impotence Research* **14** (2002), 57–64

11. Seftel A.D.: Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Differentiation Based on Selectivity, Pharmacokinetic, and Efficacy Profiles. *Clinical Cardiology* **27** (2004), I-14– I-19
12. Gresser U., Gleiter C. H.: Erectile Dysfunction: Comparison of Efficacy and Side Effects of the PDE-5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil Review of the Literature. *European Journal of Medical Research* **7** (2002), 435–446
13. Hellstrom W. J. G., Overstreet J. W., YU A., Saikali K., Shen W., Beasley C. M., Watkins V. S.: Tadalafil Has No Detrimental Effects on Human Spermatogenesis or Reproductive Hormones. *Journal of Urology* **170** (2003), 887–891
14. *European pharmacopoeia 10.0*. Strasbourg, Council of Europe (2019), p. 3957–3959
15. Abu-Nameh E. S., Al Absi N., Al-Wahish M. A., Hodali H. A., Khanfar M. F.: Electrochemical Detection of Tadalafil at Glassy Carbon Electrodes Modified with Ruthenium(II) Complex. *International Journal of Electrochemical* **15** (2020), 6396–6404
16. Polat M. B., Doğan A., Başcı N. E.: Spectrophotometry, Potentiometry and HPLC in Determination of Acidity for Cabergoline and Tadalafil. *Journal of Research in Pharmacy* **23** (2019), 177–186
17. Sartori E. R., Clausen D. N., Pires I. M. R., Salamanca-Neto C. A. R.: Sensitive Square-Wave Voltammetric Determination of Tadalafil (Cialis®) in Pharmaceutical Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Diamond and Related Materials* **77** (2017), 153–158
18. Demir E., Inam.: Electrochemical Behavior of Tadalafil on TiO<sub>2</sub> Nanoparticles–MWCNT Composite Paste Electrode and its Determination in Pharmaceutical Dosage Forms and Human Serum Samples Using Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry. *Journal of Solid State Electrochemistry* **18** (2014), 2709–2720
19. Převzato z: [https://www.metrohm.com/cs\\_cz/products/6/1204/61204180.html](https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/1204/61204180.html), staženo dne 10.8.2024
20. Sadikoglu M., Saglikoglu G., Yagmur S., Orta E., Yilmaz S.: Voltammetric Determination of Acyclovir in Human Urine Using Ultra Trace Graphite and Glassy Carbon Electrodes. *Current Analytical Chemistry* **7** (2011), 130–135