

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>3</b>
1.1. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....	4
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>5</b>
2.1. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA .....	6
2.1.1. <i>Obecně o SIA metodě</i> .....	6
2.1.2. <i>Princip metody</i> .....	6
2.1.3. <i>Srovnání s FIA technikou</i> .....	7
2.1.4. <i>Složení SIA systému</i> .....	7
2.1.5. <i>Uplatnění SIA v praxi</i> .....	9
2.2. CHEMILUMINISCENCE .....	10
2.2.1. <i>Mechanismus chemiluminiscence</i> .....	10
2.2.2. <i>Faktory ovlivňující chemiluminiscenční reakci</i> .....	12
2.2.3. <i>Využití chemiluminiscence</i> .....	13
2.3. PINDOLOL HYDROCHLORID .....	15
2.3.1. <i>Známé metody stanovení pindololu..</i> .....	17
2.3.1.1. <i>Lékopisná metoda</i> .....	17
2.3.1.2. <i>Průtokové metody</i> .....	17
2.3.1.3. <i>Chromatografické, spektrofotometrické metody</i> .....	17
2.3.1.4. <i>Ostatní metody</i> .....	29
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
3.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ .....	31
3.2. ZKOUMANÝ LÉČIVÝ PŘÍPRAVEK .....	31
3.3. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	32
3.3.1. <i>Zásobní a pracovní roztoky</i> .....	32
3.3.1.1. <i>Zásobní roztoky</i> .....	32
3.3.1.2. <i>Pracovní roztoky</i> .....	32
3.4. OPTIMALIZACE METODY .....	35
3.4.1. <i>Optimalizace jednotlivých parametrů</i> .....	35
3.4.1.1. <i>Struktura měřicího cyklu</i> .....	35
3.4.1.2. <i>Koncentrace činidel</i> .....	36
3.4.1.3. <i>Objemy činidel</i> .....	36
3.4.1.4. <i>Průtoková rychlost</i> .....	36
3.5. STANOVENÍ PINDOLOLU V PROSTŘEDÍ 80% METHANOLU .....	37
3.5.1. <i>Příprava kalibračních roztoků</i> .....	37
3.5.2. <i>Opakovatelnost metody</i> .....	37
3.5.3. <i>Stanovení obsahu pindololu v HVLP</i> .....	38
3.5.4. <i>Ověření správnosti stanovení pindololu v HVLP srovnávací metodou..</i> .....	38
3.5.5. <i>Stanovení obsahové stejnoměrnosti pindololu v tabletách..</i> .....	39
3.5.6. <i>Uvolňování pindololu z tablet v závislosti na čase..</i> .....	39

<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
4.1. OPTIMALIZACE METODY .....	41
4.1.1. <i>Určení základních parametrů</i> .....	41
4.1.2. <i>Výsledky optimalizace</i> .....	41
4.1.2.1. Struktura měřicího cyklu .....	41
4.1.2.2. Optimalizace koncentrace činidel .....	42
4.1.2.2.1. Pindolol v prostředí kyseliny sírové.....	42
4.1.2.2.2. Pindolol v prostředí methanolu.....	46
4.1.2.2.3. Pindolol v prostředí ethanolu.....	50
4.1.2.2.4. Pindolol v různých prostředí .....	55
4.1.2.3. Optimalizace objemů, průtokové rychlosti .....	57
4.2. KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI .....	60
4.2.1. <i>Měření kalibrační závislosti</i> .....	60
4.2.2. <i>Opakovatelnost metody</i> .....	62
4.3. STANOVENÍ OBSAHU PINDOLOLU V TABLETÁCH.....	63
4.3.1. <i>Statistické srovnání metody SIA s HPLC</i> .....	64
4.4. STANOVENÍ OBSAHOVÉ STEJNOMĚRNOSTI V TABLETÁCH.....	65
4.5. UVOLŇOVÁNÍ PINDOLOLU Z TABLET V ZÁVISLOSTI NA ČASE .....	66
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>69</b>

## ***1. ÚVOD***

## ***1.1. Úvod a cíl práce***

Sekvenční injekční analýza (SIA) je moderní, rychle se rozvíjející analytická metoda. Patří do skupiny průtokových metod. Vznikla při zdokonalování průtokové injekční analýzy (FIA) na počátku devadesátých let a od té doby dochází k jejímu rozvoji. Oproti FIA má několik výhod, díky kterým se stala široce používanou analytickou metodou. Vzhledem k vysoké efektivnosti, citlivosti a možnosti automatizace je vhodná k analýze velkých sérií vzorků.

SIA metodou se stanovuje většina běžných anorganických iontů a mnoho organických látek. Ve farmacii se využívá hlavně ke stanovení léčiv (v léčivých přípravcích i tělních tekutinách), kontrole kvality a účinnosti léčiv a při disolučních testech.

Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu stanovení pindololu hydrochloridu sekvenční injekční analýzou za použití chemiluminiscenční detekce a využít tuto metodu ke stanovení pindololu v hromadně vyráběném léčivém přípravku.

## ***2. TEORETICKÁ ČÁST***

## **2.1. Sekvenční injekční analýza**

### **2.1.1. Obecně o SIA metodě**

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických metod. Je moderním příkladem analytické metody, která splňuje požadavky na automatizaci, ekonomizaci a rychlost. Vznikla při vývoji a zdokonalování průtokové injekční analýzy (Flow Injecton Analysis – FIA). SIA však má některé výhody, které z ní činí moderní a široce použitelnou metodu, vhodnou zejména pro stanovení obsahu různých anorganických a organických látek v odlišných oblastech analýzy, včetně farmaceutické analýzy. Základními komponenty jsou pístová pumpa, 6-10cestný selekční ventil, vhodný průtokový detektor, mísící cívka. Vše spojují teflonové trubičky a řídí počítač. SIA je nová metoda s poměrně krátkou historií. První poznatky o ní publikoval prof. J.Růžička na University of Washington v Seattle, USA v roce 1990.<sup>1)</sup>

### **2.1.2. Princip metody**

Základní princip mají metody SIA a FIA stejný. V toku nosného proudu dochází po smíchání vzorku a činidla k chemické reakci za vzniku reakčního produktu, u kterého je měřena vhodná analytická vlastnost po průchodu detektorem. Výsledkem jsou píky, jejichž výška je úměrná koncentraci vzorku. Hlavní rozdíl je v toku nosného proudu.

Při průtokové injekční analýze (FIA) se injikuje přesný objem vzorku do kontinuálního nosného proudu (voda, pufr), který se pak mísí s proudem činidla, resp. činidel za vzniku produktu při plynulém průtoku jednotlivých zón vícekanálovým systémem. (obr. 1).

Technika SIA používá odlišný princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednocanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru; tím je jeden cyklus ukončen. Výsledný analytický signál je získán ve formě píky podobně jako je tomu u FIA; v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem. FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku. Doba trvání jednoho měřicího cyklu v SIA většinou nepřesahuje 30s, což je v mnoha případech srovnatelné s frekvencí dávkování vzorku ve FIA.<sup>2)</sup>

### 2.1.3. Srovnání s FIA technikou

SIA metoda byla vyvinuta zdokonalováním FIA techniky a má tedy oproti ní několik výhod. Základní rozdíl je v toku nosného proudu.

Nevýhody SIA

- nižší frekvenci dávkování vzorku (v důsledku změny směru toku proudu a jeho zastavení)
- složitá počítačová technika

Výhody SIA

- jednodušší uspořádání systému (užití jednoho selekčního ventilu a jednoho čerpadla umožní v jednakanálovém uspořádání pracovat s více roztoky)
- nižší spotřeba roztoků (dávkování velmi malých objemů vzorku a činidel pomocí selekčního ventilu a využití změny směru toku; u FIA je nosný proud a činidla čerpány kontinuálně celý cyklus)
- flexibilita SIA metody – snadná změna nastavení parametrů (průtokové rychlosti, aspirované objemy roztoků) i během měřicího cyklu, u FIA je objem vzorku konstantní během jedné série měření podle použité dávkovací smyčky
- možnost aplikace koncentrovaných organických látek (methanol, ethanol, acetonitril) díky použití chemicky odolných materiálů v SIA systému

### 2.1.4. Složení SIA systému

Vstupní jednotkou SIA systému je dvousměrné pístové **čerpadlo**. Pohyb pístu je řízen přesným krokovým elektromotorem s nastavitelnou rychlostí pohybu. Objemy činidel a vzorku jsou dány délkou pohybu pístu čerpadla.

**Selekční ventily** bývají nejčastěji 6, 8, a 10-cestné. Řídí seřazení činidel a vzorku k systému, jejich aspiraci a po obrácení toku i transport zón do detektoru. Polohu selekčního ventilu a synchronizaci s pohybem pumpy řídí počítač podle zadaného programu.

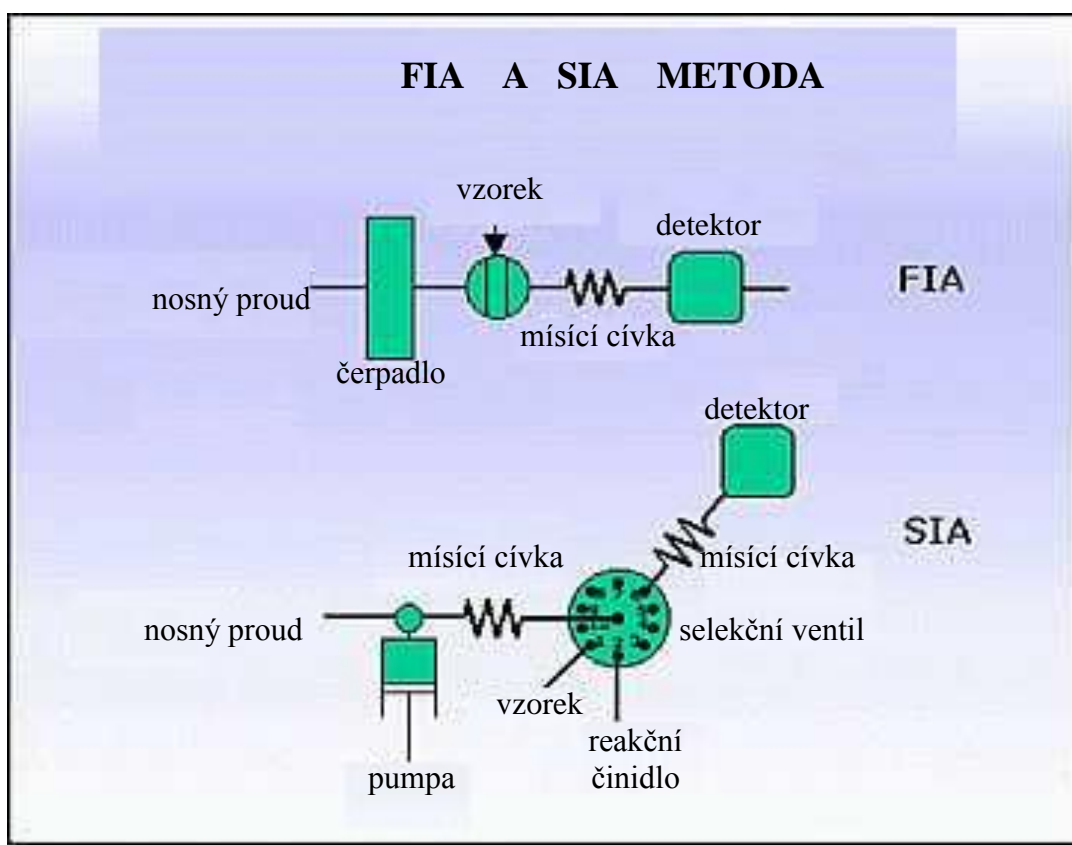
**Reakční ( mísící ) cívky** slouží k promíchání zón ( vzorku, činidel a nosného proudu). Zabráňuje také nasátí vzorku nebo činidel do vnitřního prostoru pumpy. Cívka je většinou umístěna mezi čerpadlem a selekčním ventilem. V systému může být zařazena také druhá cívka (před detektorem), a to hlavně u pomaleji probíhajících reakcí.

Volba **detektoru** záleží na druhu použité analytické reakce. Používají se spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické detektory s příslušnými průtokovými celami.

Mechanické součásti SIA systému (čerpadlo, selekční ventil) a detektor jsou propojeny prostřednictvím příslušných převodníků a digitálních vstupů a výstupů těchto jednotek s *počítačem*, který řídí celý proces automatické analýzy včetně sběru, zpracování a ukládání dat. Klíčový význam zde má kvalitní obslužný program SIA systému, bez něhož nelze automatická SIA měření provádět; příslušný software musí též zpracovávat a vhodným způsobem prezentovat výsledky měření. Běžný je automatický výpočet výšky, plochy a dalších parametrů píku (čas dosažení maxima, šířka píku v určité výšce), kalibračních parametrů a koncentrace vzorku.<sup>2)</sup>

Na následujícím obrázku je znázorněno základní schéma SIA a FIA systému.<sup>3)</sup>

Obr. 1: Základní schéma FIA a SIA systému





### ***2.1.5. Uplatnění SIA v praxi***

Vzhledem k vysoké efektivnosti, automatizaci (analýza velkých sérií vzorků) a dostatečné spolehlivosti dochází u této metody k rychlému rozvoji a stále častějšímu používání v praxi. Pomocí SIA metody se stanovuje většina běžných anorganických iontů, mnohé organické látky včetně farmaceuticky významných látek (stanovení penicilinu, trimeprazinu, perfenazinu, bromazepamu, morfinu, ciprofloxacinu a norfloxacinu). Další uplatnění SIA metody ve farmacii je při kontrole kvality a účinnosti léčiv, při vyhodnocení stabilitních studií, při určování stejnoměrnosti obsahu účinné látky v léčivých přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy. Důležité je také stanovení protilátek, imunoglobulinu G, glukozy či antigenů a monitorování hladin léčiv v tělních tekutinách.<sup>2)</sup>

## 2.2. CHEMILUMINESCENCE

### 2.2.1. Mechanismus chemiluminiscence

**Chemiluminiscence** (CL) je definována jako emise elektromagnetického záření (obvykle ve viditelné nebo infračervené oblasti) vznikajícího při chemické reakci (in vitro).<sup>4)</sup> Vzniká-li toto záření z živých organismů (in vivo) prostřednictvím enzymů, je emise nazývána bioluminiscence (BL).

Chemiluminiscenční reakce může probíhat dvěma základními mechanismy – jako přímá a nepřímá reakce.

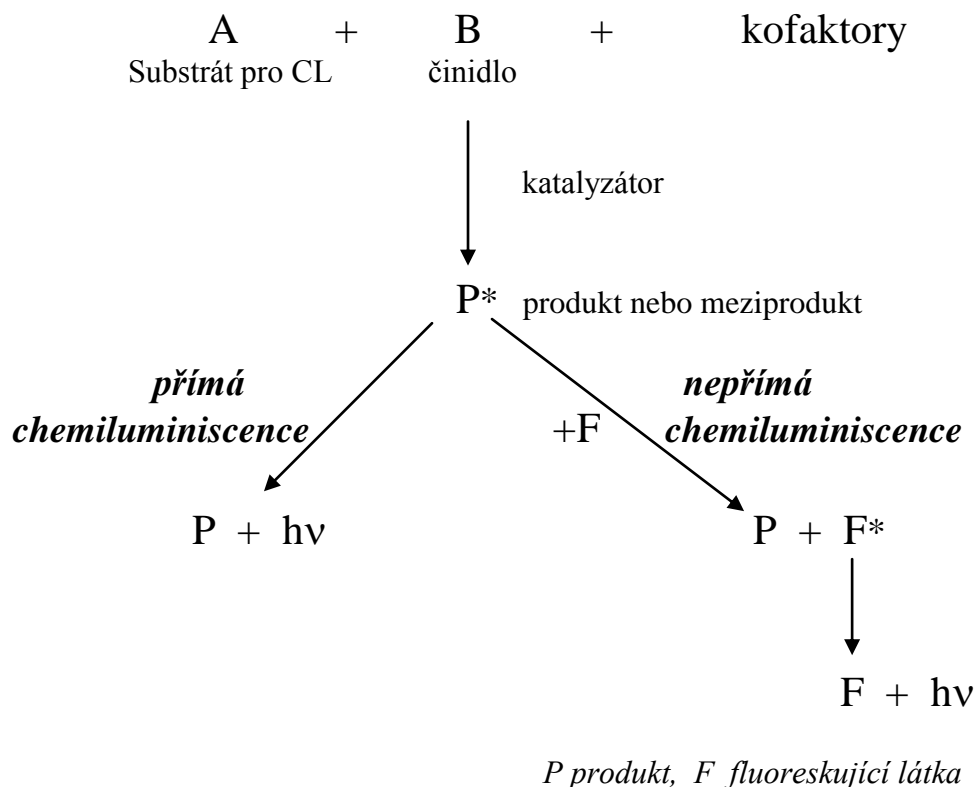
V **přímé reakci** reagují dvě činidla, obvykle substrát a oxidační činidlo v přítomnosti kofaktorů, za vzniku produktu nebo meziproductu, někdy za přítomnosti katalyzátoru. Část produktu nebo meziproductu se nachází v elektronově excitovaném stavu s následnou emisí fotonu (chemiluminiscence) za současného návratu do základní stavu (obr.2.).

Naopak **nepřímá** CL je založena na procesu přenosu energie excitované látky na fluoreskující substanci. Tento proces je možností pro ty molekuly, které nejsou schopny se přímo zapojit do CL reakce. Nadbytek energie předávají fluorescenční substanci, která je excitována a při návratu do základního stavu dochází k emisi fotonu (obr.2.).

Tyto možnosti vedou k velkému počtu obměn, které jsou důležité pro praktické užití CL v kapalných, plynných a pevných skupenstvích.

Substrát je CL prekurzor, který je převeden na elektronově excitovanou molekulu zodpovědnou za světelné záření nebo působící jako přenašeč energie v nepřímé CL. Katalyzátory, enzymy nebo kovy snižují aktivační energii a poskytují náležité prostředí pro vznik vysoké účinnosti CL reakce. Kofaktory jsou někdy nezbytné pro přeměnu jedné nebo více látek na formu umožňující reakci a interakci s katalyzátorem.

Obr. 2: Typy CL reakce <sup>4)</sup>

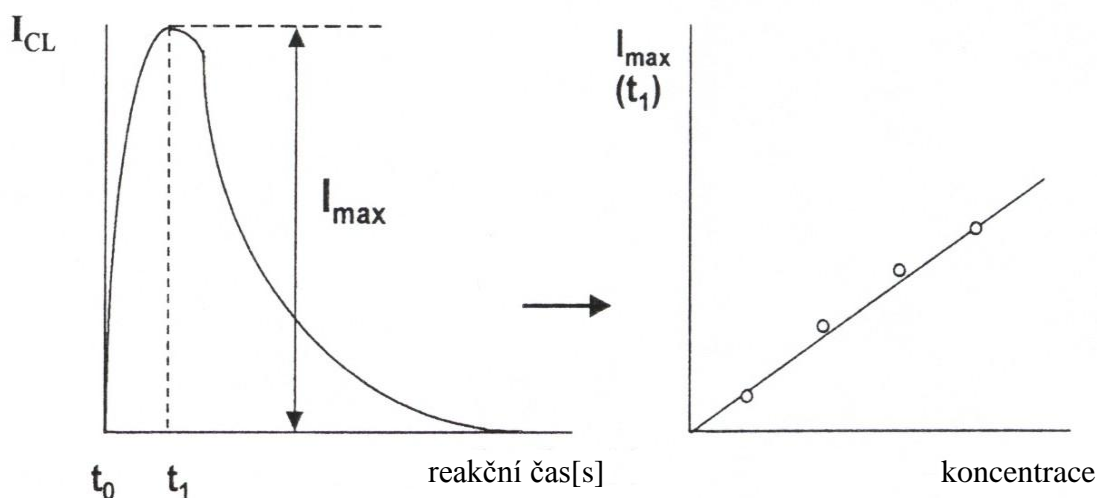


Proces světelného záření při CL je stejný jako při fotoluminiscenci až na excitační proces. Při fluorescenci a fosforescenci je elektronově excitovaný stav vytvořen absorpcí UV nebo viditelného záření.

CL záření není konstantní, ale mění se s časem - světelný záblesk se skládá ze vzrůstajícího signálu po smíchání činidel, poté prochází signál maximem a následně klesá na základní čáru (viz obr. 3). Tato závislost se může lišit v různých CL systémech. Při průtokových metodách musí být proto přesně definovány periody při detekci signálu.

Intenzita záření je funkcí koncentrace chemických sloučenin. <sup>4)</sup> Měření intenzity emise je proto využíváno k analytickým účelům ( pro kvantitativní analýzu). Výhodou CL techniky je použití optického systému, který nevyžaduje vnější světelné zdroje. Přístroje pro CL měření jsou sestaveny od jednoduchých až po velmi složité.

Obr. 3: Závislost intenzity CL na reakčním čase<sup>4)</sup>



### 2.2.2. Faktory ovlivňující chemiluminiscenční reakci

Experimentálními faktory silně ovlivňují CL reakci – hlavně množství produktů a rychlost reakce.

Mezi základní faktory ovlivňující průběh CL reakce patří:

- vybrané katalyzátory
- přítomnost iontů kovů (hlavně přechodné kovy)
- teplota
- pH a iontová síla
- lipofilita rozpouštědla a složek roztoku
- přítomnost příjemce přenášené energie
- chemická struktura CL prekurzoru – nejen centrální část obsahující excitovanou skupinu, ale také postraní řetězce, druh a koncentrace látky

Molekuly, které vstupují do CL reakce jsou obecně redukované sloučeniny, které mohou být snadno oxidovány (při reakci musí být uvolněno velké množství energie - pro luminiscenci ve viditelném spektru 40-70kcal/mol). Molekuly obsahující amino- a hydroxy skupiny náleží do této kategorie, stejně jako polycyklické aromatické řetězce. V silně alkalickém prostředí, hydroxy skupiny a dokonce některé arylamino nebo arylamido skupiny mohou být deprotonovány, a tím se stávají ještě vnímavější k oxidaci. Na druhé straně

elektron odtahující skupiny mají sklon k stabilizaci elektronového náboje a oxidace je tedy složitější u sloučenin, ve kterých jsou tyto skupiny připojeny.<sup>4)</sup>

CL může být snižována nebo zcela eliminována interakcemi s ostatními chemickými sloučeninami v procesu známém jako zhášení chemiluminiscence (vznik nefluoreskujícího komplexu, nebo vznik tohoto komplexu při interakci s již vzniklou fluoreskující molekulou).

### 2.2.3. Využití chemiluminiscence

V posledních několika letech se zájem o chemiluminiscenční detekci v analytické chemii mnohonásobně zvýšil, hlavně v plynných a kapalných fázích. Bohužel aplikace CL je v pevné fázi limitována. Dostatečně nízké detekční limity, výborná citlivost a selektivita CL metod jsou hlavní důvody pro jejich časté použití.

V tabulce jsou uvedeny některé aplikace častěji užívaných CL systémů.

Tabulka 1: Příklady běžného využití chemiluminiscence <sup>4)</sup>

SKUPENSTVÍ	ČINIDLO	ANALYT
Plynné	ethylen	O <sub>3</sub>
Plynné	O <sub>3</sub>	uhlovodíky, NO
Plynné	O <sub>3</sub> po přeměně analytu na NO	nitrosaminy, celkový dusík
Plynné	H <sub>2</sub>	sloučeniny síry
Kapalné	luminol jeho a deriváty	ionty kovů a komplexů Co(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II), Cd(II), Mn(II), Cr(III), Cr(IV), Pt(IV), ClO <sup>-</sup> , Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> peroxidázy oxidační činidla(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , ect.) inhibitiry Ag(I), Ce(IV), Ti(IV) ect. sloučeniny snadno oxidovatelné (askorbová kyselina, karboxylové kyseliny, aminy, ect.) sloučeniny převedené na H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (glukóza, ect.) sloučeniny označené luminolem a deriváty

Kapalné	estery akridinu	sloučeniny označené estery akridinia ionty Ag(I), Bi(III), Pb(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Mn(II), ect. oxidační činidla (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , ect.) sloučeniny převedené na H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> redukcující sloučeniny - Cr(II), Fe(II), Mo(V), askorbová kyselina, tetracykliny, cukry, digoxin
Kapalné	Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	alifatické aminy, organické kyseliny, aminokyseliny, proteiny
Kapalné	peroxyoxalaty	oxidační činidla (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ect.) fluorofory (polycyklické aromatické uhlovodíky) derivatizované sloučeniny s fluoroforem (amino kyseliny, steroidy, alifatické aminy, karboxylové kyseliny, katecholaminy, ect.)
Kapalné	přímá oxidace pomocí MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , ClO <sup>-</sup> , Ce(IV), IO <sup>-</sup> ect.	různé molekuly (obvykle ve farmaceutické aplikaci) anestetika, morfin, paracetamol, aromatické aminy, buprenorfin
Pevné	O <sub>2</sub> plus teplo	polymery

Protože slabá CL emise je často produkována oxidací pevných organických sloučenin, může být měření intenzity tohoto světelného záření použito také jako indikátor změn ve složení materiálu očekávaném při oxidačním procesu, a pro hodnocení stabilizátorů určených k zabránění nebo zpomalení těchto oxidačních změn. Příkladem materiálů, které mohou být charakterizovány CL emisí, jsou polymery, které jsou degradovány vlivem počasí nebo vysoké teploty. <sup>4)</sup>

### 2.3. *Pindolol hydrochlorid*

Pindolol patří mezi antihypertenziva. Je to neselektivní  $\beta$ -blokátor s vnitřní sympatomimetickou aktivitou, VSA (schopnost do určité míry aktivovat  $\beta$ -adrenergní receptory). Výhodou látek s VSA jsou menší bradykardizující účinky, slabší negativně inotropní a metabolické účinky, menší vliv na prokrvení končetin; na druhé straně však látky s výraznou VSA mají menší příznivý vliv na mortalitu pacientů po infarktu myokardu, protože kardioprotektivní účinek souvisí přímo s ovlivněním srdeční frekvence. Spolu s pindololem patří do této skupiny  $\beta$ -blokátorů také bopindolol, oxprenolol, alprenolol, cloranolol, penbutol.<sup>5)</sup>

$\beta$ -blokátory tvoří značně strukturně jednotnou skupinu látek odvozenou modifikací molekuly isoprenalinu. Všechna  $\beta$ -adrenolytika obsahují jako základní strukturní element skupinu  $\text{Ar}-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}-$ , která je pro účinek naprosto nezbytná. Většina používaných  $\beta$ -adrenolytik vznikla prodloužením spojovacího řetězce vsunutím skupiny  $-\text{OCH}_2-$  mezi aromatickou část molekuly a uhlík s alkoholickou skupinou.<sup>6)</sup> Hydroxylová skupina na alifatickém řetězci určuje optickou aktivitu molekuly (levotočivé formy jsou až 100krát účinnější než formy pravotočivé); ostatní části molekuly určují farmakodynamické a farmakokinetické odlišnosti jednotlivých  $\beta$ -blokátorů (vnitřní sympatomimetickou aktivitu, selektivitu k receptorům  $\beta_1$ , resp.  $\beta_2$ ).<sup>5)</sup>

Indikace podávání  $\beta$ -blokátorů jsou rozsáhlé. Jsou využívána především pro své kardiovaskulární účinky v následujících situacích:

Hypertenze – patří mezi nejčastěji používané látky k dlouhodobé terapii hypertenze

Arytmie

Angina pectoris a ostatní formy ischemické choroby srdeční

Další srdeční onemocnění – hypertrofická kardiomyopatie, srdeční insuficience, srdeční selhání

Nežádoucí účinky nejsou příliš časté a většinou souvisí s bloádou adrenergních receptorů. Mezi tyto účinky patří bronchokonstrikce, chladné končetiny, srdeční insuficience, poruchy vedení vzruchu, hypotenze, hyperkalémie, rebound fenomén při náhlém ukončení léčby.<sup>5)</sup>

V léčivých přípravcích existuje ve formě hydrochloridu.

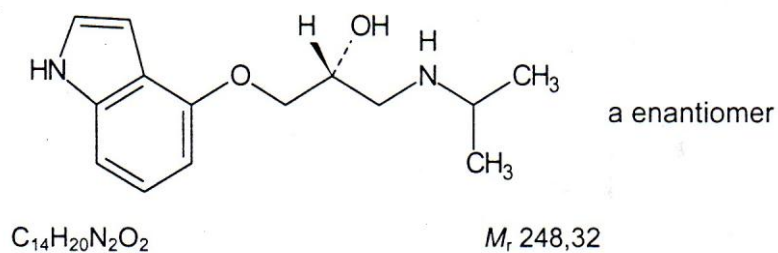
## Pindolol hydrochlorid dle ČL 2002

### Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách. <sup>7)</sup>

Obr. 4: Vzorec pindolu



Je to (2*RS*)-1-(1*H*-indol-4-yloxy)-3-(isopropylamino)propan-2-ol.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny  $C_{14}H_{20}N_2O_2$ .



### 2.3.1. *Známé metody stanovení pindololu*

#### 2.3.1.1. *Lékopisná metoda*

V Českém lékopise 2002 je článek o substanci pindololu. Pro stanovení obsahu této látky je uváděna titrace kyselinou chlorovodíkovou. 0,200 g se rozpustí v 80ml methanolu R a titruje se kyselinou chlorovodíkovou 0,1mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. 1 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1mol/l VS odpovídá 24,83 mg C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>7)</sup>

#### 2.3.1.2. *Průtokové metody*

##### *SIA stanovení*

SIA je poměrně nová metoda, která začala být používána v praxi od roku 1990. Od tohoto roku byly publikovány práce týkající se stanovení farmaceuticky významných látek (např. penicilin, trimeprazin, perfenazin, bromazepam, morfin, ciprofloxacín, norfloxacín a mnoho dalších). Nebyla však uveřejněna žádná práce týkající se stanovení pindololu pomocí SIA.

#### 2.3.1.3. *Chromatografické a spektrofotometrické metody*

*Lochow, Brand a Zeiser* vyvinuli GC-MS metodu stanovení beta blokátorů a bronchospasmolytik ve vodě.<sup>8)</sup> Tyto sloučeniny (metoprolol, propranolol, atenolol, bisoprolol, betaxolol, pindolol, nadolol, salbutamol, klenbuterol) byly stanoveny metodou GC-MS za použití kolony derivatizované trifluoracetanhydridem. Nosným plynem bylo helium. Jako vnitřní standard byl použit methyltestosteron. Kalibrační graf byl lineární od 5-500ng/l. Metoda byla aplikována na pitnou a povrchovou vodu.

*El-Walily, El-Yazbi, Belal a Razak* publikovali stanovení směsi pindololu a klopamidu v tabletách HPLC a derivační UV spektrofotometrickou metodou.<sup>9)</sup> Rozdrcené tablety byly třepány 15minut v 30 ml methanolu a poté bylo doplněno na 50ml methanolem. Směs byla přefiltrována a první část vyřazena.

Pro HPLC byly odebrány části o objemu 1 ml a smíchány s 2ml vnitřního standardu (2,4-dinitrochlorobenzen), a poté zředěny na 10 ml methanolem. Po přefiltrování bylo 10 μl (z každého filtrátu) nastříknuto na kolonu 10μm RP-C18 (25cm x 4,6mm) s mobilní fází voda/methanol/acetonitril (10:9:1) - upraveno na pH 3 octovou kyselinou. Detekce probíhala při 254nm.

Pro spektrofotometrii byly vzorky extraktu tablet (o objemu 1ml) přeneseny do tří separačních baněk. Pro stanovení pindololu byl extrakt doplněn na 10ml methanolem. Do

druhé baňky byl přidán 1ml 1M NaOH a do třetí baňky 1ml 1M HCl, a poté doplněno na 10ml methanolem. Měření probíhalo pro pindolol při druhé derivaci v methanolu při 264 nm a pro klopamid při první derivaci absorbního spektra (methanolvý roztok HCl-methanolvý roztok NaOH) při 254nm. Kalibrační grafy byly lineární od 10-20 µg/ml pro pindolol, 5-10 µg/ml pro klopamid pomocí HPLC a 10-26 µg/ml pro pindolol, 10-20 µg/ml pro klopamid pomocí spektrofotometrii.

**Lukkari, Nyman a Riekkola** popsali stanovení devíti beta-blokátorů v séru pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie.<sup>10)</sup> Devět beta-blokátorů bylo současně separováno a stanoveno pomocí MEKC při -27kV a 35°C se základním elektrolytem 15mM-hexadecyltrimethylammonium bromid v 0,08M-fosfátovém pufru o pH 6,7. Jako vnitřní standard byl použit efedrin (165 µg/ml) a detekce probíhala při 214 nm. Kalibrační grafy byly lineární pro acebutolol, alprenool, atenolol, metoprolol, nadolol, pindolol a propranolol (I) 75-300microg/ml a timolol 150-600microg/ml. Oxprenolol migroval současně s pindololem. Detekční limity se pohybovaly v rozsahu od 1 µg/ml pro I do 50 µg/ml pro timolol.

**Chmielowiec, Schuster a Gengo** popsali stanovení pindololu v lidském séru pomocí HPLC metody.<sup>11)</sup> 1ml séra byl smíchán s 25 µl metoprololu (vnitřní standard 5µg/ml), 100µl 2M NaOH a 4ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a směs byla protřepána 10s a centrifugována 10 minut. Organická fáze byla odpařena do sucha a zbytek byl rozpuštěn ve 100µl mobilní fáze. 80 µl tohoto roztoku bylo analyzováno pomocí HPLC na koloně (25cmx4,6mm) Rainin Dynamax Microsorb, C18(5 µm) vybavenou předkolonou Brownlee NewGuard C18 s fluorimetrickou detekcí. Jako mobilní fáze byl použit 20% vodný roztok acetonitrilu obsahující 0,1% triethylaminu (pH upraveno na 3,5 kyselinou fosforečnou). Kalibrační graf byl lineární od 2 (detekční limit) do 1000ng/ml.

**Telting-Diaz, Kelly, Hua, a Smyth** publikovali stanovení nifedipinu, nicardipinu a pindololu HPLC metodou za použití uhlíkové elektrody a průtokového amperometrického detektoru.<sup>12)</sup> Plasma bylo aplikováno na kolonu Supelco (1cmx1,5mm) a kolona promyta vodou. Nifedipin, nikardipin a pindolol byly vymyty mobilní fází [methanol-50mMfosfátový pufr o pH 6,7 (4:5)]. Eluát byl analyzován HPLC metodou na koloně Spherisorb (25cm x 4,6mm) s mobilní fází o průtokové rychlosti 1ml/min a detektován elektrochemicky užitím uhlíkové elektrody při 1,4V vs. Ag-AgCl. Kalibrační grafy byly lineární od 20 do 500ng/ml pro nifedipin a pindolol, a 20-260ng/ml pro nikardipin.

**Wanwimolruk** navrhl metodu stanovení koncentrace pindololu v plazmě pomocí kapalinové chromatografie na mikrokolonách.<sup>13)</sup> Pindolol s metoprololem (jako vnitřní standard) byly extrahovány z plazmy nebo krve (zalkalizováno 1M NaOH) do etheru a poté reextrahovány do 0,025M kyseliny sírové. 50 $\mu$ l bylo nastříknuto na kolonu (10 cm x 2 mm) Hypersil ODS (5  $\mu$ m) s mobilní fází (0,5 ml/min) tvořenou 20mM dodecyl sulfátu sodného v 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,0)-acetonitril (63:37). Detekce byla fluorimetrická při 310nm (excitace při 260nm). Lineární kalibrační graf byl získán od 5 do 200ng/ml pindololu s detekčním limitem 2,5ng/ml.

**Alpertunga, Sungur, Ersoy a Manav** popsali stanovení beta-blokátorů ve formě dabsylderivátů HPLC metodou.<sup>14)</sup> Rozdrcené tablety (ekvivalentní 0,1mmol léčiva) byly zředěny na 50ml vodou. K 0,1ml roztoků  $\beta$ -blokátorů byly přidány 0,1ml roztoků vnitřních standardů (2mM propranolol hydrochlorid a pro propranolol 2mM-acebutolol hydrochlorid); 0,2 ml 0,5M NaHCO<sub>3</sub> a 1,2 ml 3,4mM roztoku dabsyl chloridu v acetonu. Směs byla třepána a zahřívána na 65°C 10minut, aceton byl odpařen pod dusíkem a zbytek směsi byl extrahován benzenem (5ml). Extrakt byl vymyt vodou. 1ml extraktu byl odpařen a zbytek byl rozpuštěn v methanolu (1ml). Poměrná část (5 $\mu$ l) byla analyzována HPLC metodou na koloně (30 cm x 3.9 mm) s náplní 10 $\mu$ m Bondapack C18 s 75% methanolem jako mobilní fází (0.6 ml min<sup>-1</sup>) a detekcí při 430 nm. Kalibrační grafy (plochy pod křivkou) byly lineární od 15 do 120  $\mu$ M. Metoda byla použita pro stanovení acebutololu, propranolu, metoprolu, pindololu a oxprenolu.

**Lacroix, Moir a Lovering** navrhli metodu kapalinové chromatografie pro stanovení pindololu a příbuzných sloučenin v surovinách.<sup>15)</sup> Léčivo bylo rozpuštěno v methanolu a roztok byl analysován na koloně (15 cm x 4.6 mm) Spherisorb CN (3  $\mu$ m) s mobilní fází: acetonitril - 50mM octanový pufr o pH 5,0 (7:13). Detekce probíhala při 219 nm. Pro kvantitativní analýzu byla srovnána plocha pod píkem s hodnotami pro standard.

**Sungur, Ersoy, Alpertunga a Yalcin** vypracovali metodu stanovení beta blokátorů pomocí tenkovrstvé chromatografie po derivatizaci dabsyl chloridem.<sup>16)</sup> K 10  $\mu$ M roztoku léčiva byl přidán 1ml 0,5M NaHCO<sub>3</sub> a 6ml 16,7mM dabsyl chloridu v acetonu. Směs byla třepána, zahřáta na 65°C 10minut a odpařena pod dusíkem. Po ochlazení byl zbytek extrahován 5ml benzenu. Oddělená organická vrstva byla vymyta vodou a 10 $\mu$ l bylo naneseno na TLC desky (MN Polygram SilG) s mobilní fází CHCl<sub>3</sub> – aceton –95% ethanol (20:1:1). RF hodnoty pro atenolol, acebutolol, pindolol, metoprolol, oxprenolol a propranolol

byly 0,26; 0,35; 0,61; 0,70; 0,77 a 0,82 a odpovídající limity detekce při vizuálním hodnocení byly 0,5; 0,2; 0,02; 0,1; 0,04 a 0,01 nmol.

**Szumilo a Przyborowska** navrhli HPLC metodu stanovení některých beta-blokátorů.<sup>17)</sup> Rozdrcené tablety ekvivalentní 10mg propranololu, pindololu a acebutololu byly extrahovány methanolem. Část (5 $\mu$ l) byla analyzována pomocí HPLC na koloně (25cm x 4mm) LiChrosorb RP-18 s mobilní fází methanol - tlumivý roztok pH 8,6 (17:3) pro propranolol, a methanol - tlumivý roztok pH 8,4 (19:1) pro pindolol a acebutolol. Detekce probíhala při 265 nm pro propranolol a pindolol a při 235nm pro acebutolol. Kalibrační grafy byly lineární od 125 ng stanovované sloučeniny. Propranolol a pindolol byly také stanoveny v heparinizované krvi (5ml) po extrakci etherem z alkalického roztoku.

**Tse a Caubet** popsali stanovení pindololu v plazmě HPLC metodou s UV detekcí.<sup>18)</sup> 2ml heparinizované plazmy byly smíchány s 0,5ml 2M NaOH a látky byly extrahováno 6ml t-butyl methyletheru. Získaný pindolol byl zpětně extrahován do 0,01M HCl a stanoven HPLC metodou na koloně (25cm x 4,6mm) Supelcosil C8 (5 $\mu$ m) s 2cm předkolonou stejného složení a s mobilní fází acetonitril - 0,3% kyselina fosforečná – propan-2-ol (10:9:1). Detekce probíhala při 220 nm. Lineární kalibrační závislost byla získána v rozsahu od 2 do 100 ng/ml pindololu; relativní směrodatná odchylka 5,6% (n = 22).

**Li a Zhang** publikovali stanovení beta blokátorů pindololu, oxprenololu a propranololu v lidské moči pomocí HPLC metody s diode-array spektrofotometrickou detekcí.<sup>19)</sup> 1ml vzorku byl nanesen na kolonu obsahující 1g ionexu GDX-502, která byla vymyta 5 ml H<sub>2</sub>O a 1ml methanolu. Léčiva byla eluována 1ml methanolu. 5 $\mu$ l eluátu bylo dávkováno na kolonu (15cm x 2,1mm) GYQG - C18 (5  $\mu$ m) s mobilní fází methanol - 2% vodný roztok kyseliny octové (9:1) a detekcí při 260nm. Detekční limity byly 2ng pro pindolol, 12ng pro oxprenolol a 2 ng pro propranolol. Metoda je vhodná pro farmakokinetické studie, monitorování léčiv a dopingové zkoušky.

**Smith** popsal HPLC metodu pro stanovení pindololu v lidské plazmě.<sup>20)</sup> Pindolol byl extrahován z alkalizované plazmy do t-butyl methyletheru a poté reextrahován do 0,1M HCl. Část této zředěné kyselí fáze byla nastříknuta na kolonu (25cm x 4,6mm) Supelcosil LC-8 a analyzována s použitím mobilní fáze propan-2-ol - acetonitril - 0,3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:10:9). Fluorescence byla měřena při 315 nm (excitace při 255nm). Detekční limit byl 2ng/l. Metoda může být použita v rutinní analýze lidské plazmy.

**Hsyu a Giacomini** publikovali HPLC stanovení enantiomerů beta-blokátorů v biologických tekutinách.<sup>21)</sup> Pindolol byl extrahován z alkalizované plazmy nebo močoviný do etheru a poté reextrahován do 1M HCl. Roztok byl zalkalizován a pindolol extrahován do etheru. Extrakt byl odpařen do sucha a ke zbytku byl přidán (S)-(-)-alpha-methylbenzyl isokyanatan. Deriváty byly analyzovány HPLC metodou na koloně (15 cm x 4.6 mm) Ultrasphere ODS s 62% methanolem jako mobilní fází a fluorescenční detekcí při 320 nm (excitace při 209nm). Kalibrační graf byl lineární od 100 do 2500 ng pro jeden ze dvou enantiomerů pindololu. Detekční limit byl 2ng/ml. Prostorové izomery atenololu a acebutololu byly také odděleny.

**Shields, Lima, Binkley, Leier a MacKichan** publikovali stanovení pindololu v lidské plazmě a moči HPLC metodou s UV detekcí.<sup>22)</sup> Vzorke moči a plazmy (0,5ml) byly smíchány s 0,5ml uhličitanového pufru (pH 9,5) a extrahovány 3ml etheru. Jako vnitřní standard byl použit alprenolol. Extrakt byl centrifugován a etherová vrstva byla zpět extrahována do zředěné kyseliny sírové (100μl). Část tohoto extraktu byla analyzována HPLC metodou na RP koloně (30 cm x 4 mm) Micropak CN-10 s mobilní fází - 10mM fosfátový pufr (pH 2,6) a detekcí při 220nm. Detekční limit byl 3,1 ng/ml pindololu.

**Spahn, Prinoth a Mutschler** popsali stanovení pindololu v plazmě a moči pomocí tenkovrstvé chromatografie.<sup>23)</sup> Plasma byla smíchána s 0,5g NaCl, 5M NaOH, vnitřním standardem (nadolol 200ng), se směsí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - ether (1:4) a centrifugována. Organická fáze byla odpařena do sucha a zbytek byl rozpuštěn v methanolu a nanesen na TLC desku (silikagel). Moč byla smíchána s 1M NaOH; 0,5g NaCl a butylacetátu a centrifugována. Organická fáze byla odpařena do sucha a zbytek byl rozpuštěn v butylacetátu a nanesen na TLC.

Mobilní fáze byla složena z CHCl<sub>3</sub>- methanol - kyselina octová (15:4:1). Fluorescenční detekce probíhala po ponoření chromatogramu do 4% roztoku kerosinu v cyklohexanu s užitím emisního filtru M313 (excitace při 265nm). Detekční limit byl od 0,5 do 1 ng pindololu. Kalibrační grafy byly lineární od 350 ng/ml pro plazmu a 4000 ng/ml pro moč.

**Diquet, Nguyen-Huu a Boutron** publikovali stanovení pindololu v lidské plazmě HPLC metodou s amperometrickou detekcí.<sup>24)</sup> 1ml plazmy byl zalkalizován a extrahován do etheru. Pindolol byl zpět extrahován do 0,01M HClO<sub>4</sub>. Poté byl stanoven HPLC metodou na koloně (15cmx3,9mm) LiChrospher ODS (5 micro m) s mobilní fází: methanol - 0,01M HClO<sub>4</sub> (1:4) a amprometrickou detekcí (elektroda ze skelného uhlíku při 1,0V proti

Ag/AgCl). Detekční limit byl 0,5 ng/ml, s lineární závislostí od 200ng/ml. Nebylo nutné použít vnitřní standard.

**Park** a spolupracovníci popsali stanovení betablokátorů ve farmaceutických preparátech a lidské moči HPLC metodou s tris(2,2'-bipyridyl)rutheniem (II) a elektrochemiluminiscenční detekcí.<sup>25)</sup> Tato vysoce selektivní a citlivá detekční metoda je založena na elektrogenerované chemiluminiscenci (ECL) tris(2,2'-bipyridyl) ruthenia (II)  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ . Metoda byla vyvinuta pro stanovení betablokátorů jak ve farmaceutických přípravcích tak i ve vzorcích lidské moči. ECL emise je založena na reakci mezi oxidovanou formou  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$  a sekundární aminoskupinou betablokátorů. Měřená intenzita ECL betablokátorů byla vysoce závislá na pH prostředí, ve kterém byla detekce prováděna, přičemž maximum intenzity bylo zjištěno při pH 9. Za optimálních podmínek byl detekční limit pro atenolol 5 pmol a pro metoprolol 8 pmol, s S/N(poměr signálu k šumu) rovno 3 a lineárním pracovním rozsahem ve čtyřech řádech s RSD (relativní standardní odchylkou) pod 5 % pro deset injikovaných vzorků. Koncentrace atenololu a metoprololu ve farmaceutických přípravcích byly určeny za použití metody FIA s ECL detekcí  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  založené na metodě standardního přídavku. Hodnoty stanovené touto metodou byly v souladu s hodnotami, jež jsou deklarované výrobcí. Stanovení pěti betablokátorů ve vzorcích lidské moči bylo provedeno za použití HPLC s  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  detekcí. Výsledný chromatogram byl mnohem přehlednější než chromatogram získaný taktéž metodou HPLC, ale s využitím UV detekce.

**Ranta, Toropainen, Talvitie, Auriola a Urtti** popsali současné stanovení osmi betablokátorů gradientovou HPLC metodou s kombinovanou UV a fluorescenční detekcí v in vitro studii korneální permeability.<sup>26)</sup> Gradientová HPLC metoda s kombinovanou ultrafialovou a fluorescenční detekcí byla vyvinuta pro současné stanovení osmi betablokátorů (alprenolol, atenolol, metoprolol, nadolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol) při in vitro studii korneální permeability. Fluorescenční detekce s excitací při vlnové délce 230 nm a emisí při 302 nm byla selektivní pro šest sloučenin, zatímco UV detekcí při 205 nm bylo možné detekovat všechny sloučeniny. Kalibrace šesti sloučenin v koncentracích 50 či 200 nM až do hodnoty 3  $\mu\text{M}$  byla provedena fluorescenční detekcí a pro všech osm sloučenin pro koncentrace 100 či 200 nM až do hodnoty 30  $\mu\text{M}$  UV detekcí. Detekční limity pro atenolol, metoprolol, nadolol a sotalol se pohybovaly (pro fluorescenční detekci) v rozmezí hodnot 0,7 až 1,3 nM (0,035-0,065 pmol/50  $\mu\text{l}$  vzorku). Směs osmi betablokátorů byla použita v permeační studii na kultivovaném rohovkovém epitelu. Metoda HPLC ukázala

značné rozdíly hydrofilních a lipofilních betablokátorů při jejich permeaci na kultivovaném modelu korneálního epitelu.

**Gumieniczek, Hopkala, Berecka** publikovali denzitometrické a videodenzitometrické stanovení nadololu a pindololu v tabletách s využitím kvantitativní HPTLC.<sup>27)</sup>

Nadolol a pindolol byly stanoveny v tabletách metodou HPLTC s použitím desek se silikagelem 60F254 (20x10cm) objem vzorků činil 10  $\mu$ l. Jako mobilní fáze byl použit roztok etylacetát – metanol - a ledová kyselina octová v poměru 49:49:2. Hodnocení bylo provedeno denzitometricky při vlnové délce 270 nm skanerem typu Camag TLC 3 a videodenzitometricky při 254 nm systémem Desaga VD 40 Video. Kalibrační grafy byly lineární pro koncentrace 0,2-1,2  $\mu$ g/10 $\mu$ l N a P pro denzitometrii a 2-12  $\mu$ g/10 $\mu$ l N a 0,2-1,2  $\mu$ g/10 $\mu$ l P pro videodenzitometrii. RSD (n=5) byly <1,06 % pro denzitometrii a <1,52 % pro videodenzitometrii.

**Motoyama, Suzuki, Shiota a Namba** vypracovali metodu přímého stanovení enantiomerů pindololu v lidském séru sloupcovou LC-MS/MS s použitím fenyلكarbamát-beta-cyklodextrinové chirální kolony.<sup>28)</sup> R(+) a S(-) enantiomery pindololu v séru a moči byly stanovovány odděleně během 16 minut s resolučním faktorem 1,9. Detekční limit (nejnižší detekovatelná koncentrace) při poměru signálu k šumu (S/N) rovno 5 byl 0,13ng/ml pro oba enantiomery.

**Papadopoulos, Parissi-Poulou a Panderi** navrhli validaci HPLC metody s reverzní fází pro stanovení pindololu a klopamidu v tabletách.<sup>29)</sup> Tato metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie byla vyvinuta pro současné stanovení pindololu a klopamidu ve farmaceutických lékových formách. Dostatečná separace obou sloučenin je výsledkem použití beta-cyklodextrinu jako fáze, která je pevně navázána na koloně. Mobilní fáze je složena ze směsi 1,0 % (w/v) triethylaminacetátového pufru (pH=5,5) a metanolu (90:10). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml/min. UV detektor měřil při vlnové délce 245 nm. Pro rozmezí koncentrací od 1,0 do 3,0  $\mu$ g/ml pro pindolol a od 0,5 do 1,5 mg/ml pro klopamid byly získány lineární kalibrační grafy ( $r > 0,99997$ ,  $n = 5$ ). Získané hodnoty RSD ( $n = 5$ ) byly menší než 2,97 % . Detekční limit pro pindolol činil 0,12 mg/ml a pro klopamid 0,16 mg/ml. Metoda byla aplikována při kvalitativní kontrole komerčně vyráběných tablet. Ukazuje se jako vhodná pro rychlou a spolehlivou kvalitativní kontrolu.

**Thevis, Opfermann a Schaenzer** vypracovali metodu rychlého stanovení betablokátorů v lidské moči založené na kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.<sup>30)</sup> V mezinárodním obchodě jsou betablokátoři zastoupené v širokém výběru.

Mezinárodní Olympijský Výbor (International Olympic Committee ) zakazuje používání těchto látek v některých sportovních odvětvích. Laboratoře zaměřené na kontrolu dopingů analyzují vzorky moči vrcholových sportovců několika různými technikami. Rychlé a spolehlivé metody umožňují citlivou detekci mnoha látek. Jejich vysoká výkonnost umožňuje také analýzu velkého množství vzorků. V představené studii je detekční procedura popsána s využitím vysokorychlostní kapalinové chromatografie (LC) a rozmanitými reakcemi, které umožňují identifikaci 32 betablokátorů extrahovaných z lidské moči. Vzorky moči byly hydrolyzovány, extrahovány a analyzovány během 7 minut.

**Katayama** a spolupracovníci popsali stanovení betablokátorů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spolu s mikroextrakcí na pevné fázi (SPME).<sup>31)</sup> Metoda SPME byla použita k monitorování betablokátorů v lidské moči a plazmě. Šest betablokátorů (alprenolol, atenolol, oxprenolol, pindolol, propranolol a timolol) bylo extrahováno ze vzorků moči a plasmy metodou SPME. Jako pevná fáze byla využita vlákna potažená 85 µm vrstvou polyakrylátu. Mikroextrakce probíhala po dobu 2 hodin při 30°C. Poté byly betablokatory rozděleny na koloně o délce 15 cm a vnitřním průměru 4,6 mm s náplní Capcell Pack SG 120 A o velikosti částic 5 µm. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,05M kyseliny fosforečné a metanolu v poměru 55 : 45. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,8 ml/min. Při UV detekci probíhalo měření při 280nm a při fluorimetrické detekci při 360 nm (excitace při 220 nm). Detekční limity byly 2 – 25 µg/ml pro fotometrickou detekci; detekce 0,4 µg/ml propranololu byla možná jen s použitím fluorimetrické detekce. RSD (n = 6) byla 10,1 – 15,3 % pro 500 µg/ml betablokátorů v moči a 9,9 – 13,2 % pro 5 µg/ml betablokátorů v plazmě.

**Khalil a Borham** popsali nepřímé spektrometrické stanovení hydrochloridů pindololu, propranololu a levamisolu založené na atomové absorpci iontových asociátů, které vznikají reakcí s reineckátem amonným a dusitanem kobaltito-sodným.<sup>32)</sup> Pro stanovení pindololu(I), propranololu (II) a levamisolu (III) byla vyvinuta nová, jednoduchá, přesná, nepřímá metoda využívající atomovou absorpční spektrometrii. Metoda je založena na srážení iontových asociátů, které se tvoří reakcí (I), (II) nebo (III) s reineckátem amonným a/nebo s dusitanem kobaltito-sodným. Metoda byla použita pro stanovení 1,14 – 17,07, 1,18 – 17,75 a 1,08 – 16,24 µg/ml pro I, II a III s použitím reineckátu amonného a 1,71 – 25,60, 1,77 – 26,62 a 1,62 – 24,36 µg/ml pro I, II a III s použitím dusitanu kobaltito-sodného. Tato metoda byla použita pro analýzu léčivých látek a některých jejich farmaceutických preparátů.



**Wu, Lord, Pawliszyn a Kataoka** publikovali metodu využívající spojení kapilární mikroextrakce (kapilára je potažena polypyrolem) s kapalinovou chromatografií a elektroprayovou ionizační hmotnostní spektrometrií ke stanovení betablokátorů ve vzorcích moči a séra.<sup>33)</sup> Kalibrační křivky betablokátorů byly lineární pro 1-100 ng/ml s korelačním koeficientem nad 0,9954 (n = 24) a detekční limity (S/N = 3) byly pro většinu sloučenin menší než 0,1 ng/ml. Tato metoda byla úspěšně používána při stanovení betablokátorů v biologických vzorcích.

**Khalil a El-Rabiehi** popsali metodu nepřímého spektrometrického stanovení hydrochloridů pindololu, propranololu a levamisolu založené na atomové absorpci iontových asociátů, které vznikají reakcí s thiokyanatanem manganatým a hexakynoželezitanem draselným.<sup>34)</sup> Pro stanovení pindololu HCL (I), propranololu HCL (II), a levamisolu HCL (III) byla vyvinuta nová, jednoduchá, přesná, nepřímá metoda využívající atomovou absorpční spektrometrii. Metoda je založena na srážení iontových asociátů, které se tvoří reakcí (I), (II) nebo (III) s thiokyanatanem manganatým nebo s hexakynoželezitanem draselným. Metoda byla použita pro analýzu substancí léčivých látek a některých jejich farmaceutických preparátů.

**Lapa, Lima, Reis, Santos a Zagatto** stanovili pindolol multikomutační spektrofotometrickou FIA metodou s využitím FeCl<sub>3</sub> jako činidla. Absorbance byla měřena při 635 nm. Kalibrační graf byl lineární pro 5-120 µg/ml pindololu, s RSD 1,1 % (n = 10) a frekvencí 30 vzorků za hodinu. Při testování dvou obchodních značek testovaných tablet byly výsledky v dobré shodě s výsledky obdrženyými při bezvodé titraci s odchylkou 2,32-1,59 %.

**Ruiz, Martinez-Lozano, Tomas a Carpena** publikovali metodu současného stanovení propranololu (I) a pindololu (II) synchronní spektrofluorimetrií.<sup>36)</sup> Kalibrační grafy byly lineární pro 0,02-1 µg/ml I a 0,04-1,2 µg/ml II. Detekční limity byly 3 ng/ml pro I a 7 ng/ml pro II.

**Panderi a Parissi-Poulou** popsali současné stanovení směsi klopamidu a pindololu v tabletách metodou derivační spektrofotometrie.<sup>37)</sup> Zero-crossing technika měření využívá derivační spektrofotometrii (využívá první derivaci spektra), která eliminuje interference, jež jsou důsledkem překrývání spektrálních oblastí. Tato metoda byla použita pro současné stanovení klopamidu (I) a pindololu (II) v tabletách. Kalibrační grafy byly lineární v rozmezí 6-50 µg/ml klopamidu (I) a 8-100 µg/ml pindololu (II); odpovídající detekční limity byly 0,44 µg/ml (pro I) a 0,05 µg/ml (pro II).

**Erram a Tipnis** popsali jednoduchou spektrofotometrickou metodu pro stanovení pindololu a hydrochlorothiazidu v kombinovaných farmaceutických lékových formách.<sup>38)</sup> Práškové tablety v množství ekvivalentním 12,5 mg hydrochlorothiazidu (I) byly rozpuštěny na ultrazvukové lázni v 50 ml metanolu a vzniklý roztok byl doplněn metanolem na 100 ml pro metodu A, pro metodu B byl použit namísto metanolu 0,1M NaOH a pro metodu C to byla 0,1M HCl. Absorbance vzniklých roztoků byly měřeny v isosbestických bodech při metodě A při 285 nm, při metodě B při 288 nm a při metodě C při 284 nm pro roztoky obsahující jak hydrochlorothiazid tak i pindolol. Absorbance roztoků obsahujících samotný hydrochlorothiazid byly měřeny v isosbestických bodech při 315 nm při metodě A, při 320 nm při metodě B a při 320 nm při metodě C. Při všech měřených vlnových délkách byly kalibrační grafy lineární.

**Bedair, Galal a El-Yazbi** vyvinuli kolorimetrické stanovení betablokátorů v tabletách s využitím 2,3-dichlor-1,4-naftochinonu.<sup>39)</sup> Rozdrcené tablety v množství ekvivalentním 100 mg účinné látky byly rozpuštěny ve 20 ml vody. Následně byl tento roztok extrahován do chloroformu. Extrakt byl doplněn chloroformem na 100 ml a část vzniklého roztoku byla smíšena s 1 ml 10% acetaldehydu v propan-2-olu; 0,3 ml 1% acetaldehydu v dioxanu a 1 ml propan-2-olu. Po zahřátí na dobu 45 minut při 70°C byla měřena absorbance směsi při 655 nm pro stanovení alprenololu a oxprenololu, při 670 nm pro karazolol a pindolol a při 660 nm pro propranolol.

**Sastry, Sailaja a Rao** vypracovali citlivé spektrofotometrické metody pro stanovení pindololu po diazotaci a převedení na azobarviva s N-1-(naftyl)etylendiaminem nebo s kyselinou naftochinon-4-sulfonovou.<sup>40)</sup> Metody byly použity pro stanovení pindololu v léčivých látkách a farmaceutických preparátech.

**Mahrous, Issa a Ahmed** využili oxidaci peroxidem vodíku pro kolorimetrické stanovení 10 až 50 µg/ml pindololu po extrakci z tablet.<sup>41)</sup>

**Pecanac** a spolupracovníci publikovali spektrofotometrickou metodu stanovení pindololu v tabletách na základě tvorby jeho barevného komplexu s trojmocným železem<sup>42)</sup>. Absorbance se měřila při 635 nm a kalibrační graf byl lineární pro 20 až 220 µM pindolol s detekčním limitem 5 µg/ml.

**Sastry, Sailaja, Rao a Krishna** vypracovali extrakčně-spektrofotometrické stanovení některých antihypertenziv s využitím Supracenové violeti 3B.<sup>43)</sup> Vodné vzorky roztoků obsahující 100µg/ml minoxidilu (I), klonidinu (II), pindololu (III) nebo propranololu (IV) byly smíchány s 0,1M pufrům tvořeným glycinem a HCl o pH=1,3 a s vodným roztokem

Supracenové violeti 3B (C. I. Acid Violet 42). Směs byla třepáním (2minuty) extrahována do chloroformu. Absorbance získaného extraktu byla měřena při 575 nm proti slepému vzorku. Pro všechny analyty byly kalibrační křivky lineární v rozsahu 1,2 až 12,5 µg/ml analytu.

**Zakhari, Hassan a El-Shabrawy** popisuje extrakčně-spektrofotometrické stanovení adrenergických betablokátorů včetně pindololu se sirouhlíkem a měďnatými ionty.<sup>44)</sup> Absorbance chloroformového extraktu byla měřena při 435 nm proti slepému vzorku. Pro koncentrace v rozmezí od 8 do 56 µg/ml byly kalibrační grafy lineární. Stanovovány byly tyto látky: propranolol, pindolol, oxyfedrin, alprenolol, acebutolol a atenolol .

**Susanto a Reinauer** popsali stanovení beta blokátorů v lidské plazmě pomocí GLC s detektorem elektronového záchytu.<sup>45)</sup> Léčiva byla extrahována z 1ml plasmy (zalkalizována 0,5ml 1M NaOH a smíchána s 100ng propranololu jako vnitřního standardu) do 5ml hexanu. Po centrifugaci byla organická fáze odpařena dusíkem a zbytek byl derivatizován s anhydridem heptafluoromáselné kyseliny při 65°C 50 minut. Rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku. Zbytek byl rozpuštěn v 50µl hexanu a 1µl roztoku byl analyzován pomocí GLC (jako nosný plyn byl použit dusík). Metoprolol a pindolol byly takto odděleny a stanoveny v rozsahu od 5 do 800ng/ml v plazmě.

**Sastry, Sailaja a Suryanarayana** publikovali spektrofotometrické stanovení pindololu a kaptoprilu na základě reakce s metolem a dichromanem.<sup>46)</sup> Rozdrcené tablety ekvivalentní 50mg pindololu a kaptoprilu byly rozpuštěny ve 100ml 0,1M HCl (pindolol) nebo vody (kaptopril). 0,5-4ml pindololu a 0,4-1,5ml kaptoprilu bylo přidáno k 15ml 0,2M pufru (KH ftalát-0,1MHCl –voda). Dále byl přidán 1ml 0,15% metolu a 0,3% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> , roztok byl zředěn na 25ml vodou a zfiltrován. Absorbce byla změřena po 10minutách při 640nm pro pindolol a po 5 minutách při 440nm pro kaptopril.

**Zakhari, Hassan a El-Shabrawy** publikovali poměrně složitou metodu extrakčně-spektrofotometrického stanovení indolových derivátů včetně pindololu v důležitých farmaceutických preparátech pomocí diazotovaného 4-nitroanilinu.<sup>47)</sup> Kalibrační křivka byla lineární pro 1 - 10 µg/ml pindololu. Metoda byla aplikována pro stanovení pindololu v tabletách.

**Banerjee a Mashru** publikovali metodu rychlého kolorimetrického stanovení pindololu.<sup>48)</sup> Tablety o obsahu 5mg pindolu byly přepány s 25ml 0,1M HCl 10minut. Po filtraci byl roztok zředěn na 50ml. Část roztoku byla smíchána s 6ml 0,007% 4-dimethylaminobenzaldehydu v roztoku anhydridu kyseliny octové a HCl (17:3). Poté byl roztok zahříván na vodní lázni 1,5 minuty. Po ochlazení byl roztok zředěn na 10 ml 0,1M

HCl. Absorbance byla měřena při 570nm. Kalibrační graf byl lineární rozsahu 0,5-5 $\mu$  g/ml pindololu.

**Guerret, Lavene a Kiechel** popsali stanovení pindololu v biologických tekutinách pomocí GLC za použití detektoru elektronového záchytu.<sup>49)</sup>

**Abdel-Hamid a Phillips** popsali rychlou, citlivou a specifickou LC-MS/MS metodu stanovení karbamazepinu, pindololu a theofylinu v lidském séru.<sup>50)</sup> Metoda je vysoce selektivní a nebyly pozorovány žádné interference biologických složek ani současně podávaných léčiv.

**Lazova a Iovcev** publikovali metodu UV spektrofotometrického stanovení klopanidu a pindololu v tabletách Viscaldix.<sup>51)</sup> Dvacet tablet o různé hmotnosti bylo rozdrceno a část ekvivalentní 20mg klopanidu a 40mg pindololu byla rozpuštěna v 60ml methanolu. Po 15 minutách byla směs zředěna na 100ml methanolem a zfiltrována G-4 filtrem. 2ml tohoto filtrátu byly zředěny na 50ml methanolem. Dále byla změřena absorbance tohoto roztoku a standardního roztoku obsahující 8 $\mu$ g/ml klopanidu a 16  $\mu$ g/ml pindololu, obojí při 236 a 270nm. Výsledky byly shodné s výsledky získanými pomocí HPLC.

**Banerjee a Mashru** publikovali kolorimetrické stanovení pindololu v lékových formách.<sup>52)</sup> Rozdrcené tablety ekvivalentní 10 mg pindololu byly třepány s 25ml 0,1M HCl 10 minut. Roztok byl zfiltrován a zředěn na 50ml. K části tohoto roztoku byly přidány 2 ml vanillinu v koncentrované HCl (1% w/v) a doplněno vodou na 10ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 520nm proti slepému vzorku. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,2-16  $\mu$ g/ml.

**Issa, Mahrous, Abdel-Salam a Soliman** vypracovali spektrofotometrickou metodu stanovení některých kardiovaskulárních léčiv včetně pindololu s využitím 2,3-dichloro-5,6-dikyano-p-benzochinonu.<sup>53)</sup> Kalibrační graf byl lineární v rozsahu od 8 do 40 micro g/ml pro pindolol.

**Tawakkol, Mohamed a Aboul-Enein** publikovali metodu stanovení pindololu ve farmaceutických sloučeninách pomocí plynové chromatografie.<sup>54)</sup>

**Takagishi, Ogura, Tomita, Ohkubo a Sakamoto** popsali metodu stanovení pindololu v plazmě a moči pomocí HPLC metody.<sup>55)</sup>

**Guerret** publikoval metodu stanovení pindololu v biologických tekutinách pomocí GLC s detekcí elektronového záchytu.<sup>56)</sup>

**Bangah, Jackman a Bobik** popsali stanovení pindololu v lidské plazmě HPLC metodou.<sup>57)</sup>

**Mahrous, Issa, Abdel-Salam a Soliman** publikovali metodu spektrofotometrického stanovení několika kardiovaskulárních léčiv použitím p-chloranilové kyseliny.<sup>58)</sup> Tablety nebo vodné roztoky obsahující soli chinidinu, prenylaminu, dipyridamolu, tolazolinu, hydralazinu a pindololu byly zalkalizovány roztokem amoniaku a extrahovány do chloroformu (4x20ml). Extrakt byl zředěn na 100ml chloroformem, část (od 0,4 do 2ml) byla odpařena do sucha a zbytek byl rozpuštěn v acetonitrilu (2ml). Dále byla přidána 0,2% chloranilová kyselina v acetonitrilu (1ml) a směs byla zředěna na 5ml acetonitrilem. Absorbance byla měřena při 522 nm proti slepému vzorku. Kalibrační graf byl lineární pro 0,04 do 0,2 mg/ml pindololu.

#### **2.3.1.4. OSTATNÍ METODY**

**Issa a Amin** navrhli metodu konduktometrické titrace pindololu a propranololu využívající jako činidla reineckát amonný a tetrakyanonikelnatan draselný<sup>59)</sup>. Optimální výsledky byly získány pro pindolol v rozmezí 40-380 µg/ml. Výsledky se shodovaly s výsledky, které byly získány titracemi v bezvodém prostředí.

### ***3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST***

### ***3.1. Použité přístroje a zařízení***

1. Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP
2. Analytické váhy SARTORIUS 4503 MPG
3. Počítač platformy PC AT ( IBM kompatibilní) s konfigurací Pentium 75 MHz, 24 MB RAM se standardním vybavením, Windows 98 CZ. Nainstalovány speciální karty AT-MIO-16E10 a AT-23214 National Instruments Corporation, USA
4. Pístové čerpadlo CAVRO XL 3000 s objemem 2,5ml
5. Osmicestný selekční ventil VICI VALCO
6. Mísící cívka o objemu 1,2 ml z teflonové (PTFE) hadičky
7. Fluorimetrický průtokový detektor Schoeffel Instruments, model FS 970, USA s chemiluminiscenčním modulem, vyrobený v dílnách FaF UK  
Spojovací materiál – hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,75 mm, Watrex, Praha
8. Filtrační nástavec Millex-LCR, Millipore Corporation, USA

Zařízení a přístroje č.3.-8. byly součástí sestavy průtokového systému SIA, který byl sestaven na KACH FaF UK

### ***3.2. Zkoumaný léčivý přípravek***

Účinná látka : Pindolol

APO-PINDOLOL 5mg/tbl

### 3.3. Použité chemikálie

Polyfosfát sodný p.a., Sigma-Aldrich Praha

Kyselina sírová 96% p.a., Lachema Neratovice

Manganistan draselný p.a., Balex Pardubice- Rosice nad Labem

Methanol, Sigma- Aldrich

Pindolol Aldrich

Ethanol denaturovaný methanolem, HOBE Pardubice

Ultračistá voda připravená na zařízení Millipore Milli-Q RG

#### 3.3.1. Zásobní a pracovní roztoky

Pro přípravu roztoků byla použita ultračistá voda připravovaná na Katedře analytické chemie systémem Millipore Milli-Q RG. Zásobní roztoky byly uchovávány v chladu a temnu.

##### 3.3.1.1. Zásobní roztoky

Zásobní roztok *pindololu* o koncentraci 1mM z navážky 0,0125g do 50ml 0,01M kyseliny sírové.

*U dále uvedených vodně-organických roztoků se jedná o objemová procenta.*

Zásobní roztok *pindololu* o koncentraci 1mM z navážky 0,0250g do 100ml 80% ethanolu.

Zásobní roztok *pindololu* o koncentraci 1mM z navážky 0,0126g do 50ml 80% methanolu.

Zásobní roztok *hexametafosfátu* o koncentraci 50mM z navážky 6,4277g do 100ml vody.

Zásobní roztok *hexametafosfátu* o koncentraci 200mM z navážky 24,7085g do 100ml vody.

Zásobní roztok *kyseliny sírové* o koncentraci 2M z kyseliny sírové 96% zředěním 10,7ml na 100ml vody.

Zásobní roztok *manganistanu draselného* o koncentraci 10mM z navážky 0,3953g do 250ml vody.

##### 3.3.1.2. Pracovní roztoky

Pracovní roztoky *hexametafosfátu* o koncentracích 1 – 50 mmol/l byly připraveny zředěním zásobního roztoku o koncentraci 50mM vodou. V následující tabulce jsou uvedeny výsledné koncentrace hexametafosfátu a objemy zásobního roztoku použitého k přípravě.

Tabulka 2: Ředění hexametafosfátu

c[mM]	1	5	10	15	20	25	30	35	40	50
Objem zásobního roztoku[ml]	0,2	1	2	3	4	5	6	7	8	10
Objem odměrné baňky[ml]	10									



Pracovní roztoky **hexametafosfátu** o koncentracích 50 – 100 mmol/l byly připraveny zředěním zásobního roztoku o koncentraci 200mM vodou. V následující tabulce jsou uvedeny výsledné koncentrace hexametafosfátu a objemy zásobního roztoku použitého k přípravě.

Tabulka 3: Ředění hexametafosfátu

c[mM]	50	60	70	80	90	100
Objem zásobního roztoku[ml]	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Objem odměrné baňky[ml]	10					

Pracovní roztoky **kyseliny sírové** o koncentracích 0,1 – 2 mol/l byly připraveny zředěním zásobního roztoku o koncentraci 2M vodou. V následující tabulce jsou uvedeny výsledné koncentrace kyseliny sírové a objemy zásobního roztoku použitého k přípravě.

Tabulka 4: Ředění kyseliny sírové

c[M]	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2
Objem zásobního roztoku[ml]	0,5	1	2	3	4	5	10
Objem odměrné baňky[ml]	10						

Pracovní roztok **kyseliny sírové** o koncentraci 0,01mol/l byl připraven zředěním roztoku o koncentraci 1M vodou. 1ml 1M kyseliny sírové byl zředěn na 100ml vodou.

Pracovní roztoky **manganistanu draselného** byly připraveny zředěním zásobního roztoku o koncentraci 10mM vodou. V následující tabulce jsou uvedeny výsledné koncentrace manganistanu draselného a objemy zásobního roztoku použitého k přípravě.

Tabulka 5: Ředění manganistanu draselného

c[mM]	0,2	0,4	0,5	0,6	1	2	3	4	5	6	8	10
Objem zásobního roztoku[ml]	0,2	0,4	0,5	0,6	1	2	3	4	5	6	8	10
Objem odměrné baňky[ml]	10											

Pracovní roztok **0,1 mM pindololu v prostředí 0,01M kyseliny sírové** byl připraven zředěním 1 ml zásobního roztoku o koncentraci 1mM 0,01M kyselinou sírovou. 1ml 1mM zásobního roztoku pindololu byl převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn 0,01M kyselinou sírovou.

Pracovní roztok **0,01mM pindololu v 80%methanolu** byl připraven zředěním zásobního roztoku pindololu o koncentraci 1mM. 1ml tohoto zásobního roztoku byl převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn 80% methanolem.

Pracovní roztok **0,001 mM pindololu v 80% methanolu** byl připraven zředěním 1 ml 0,01mM roztoku pindololu 80% methanolem. 1ml 0,01mM roztoku byl převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn 80% methanolem

Pracovní roztok **0,1 mM pindololu v 40%ethanolu** byl připraven zředěním 1 ml zásobního roztoku o koncentraci 1mM 40% ethanolem. 1ml 1mM zásobního roztoku byl převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn 40% ethanolem.

Pracovní roztok **0,001 mM pindololu v 40%ethanolu** byl připraven zředěním 1 ml 0,1mM roztoku pindololu 40% ethanolem. 1ml 0,1mM roztoku byl převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn 40% ethanolem

### 3.4. Optimalizace metody

Cílem optimalizace bylo získat co největší odezvu detektoru při co nejnižší hodnotě slepého pokusu, tedy co nejlepší podmínky pro stanovení pindololu sekvenční injekční analýzou pomocí chemiluminiscenční detekce.

Odezva detektoru byla zaznamenána ve formě píků, které byly zobrazovány na monitoru počítače. Jejich výška byla automaticky vyhodnocena použitým programem FaFSIA. Intenzita chemiluminiscence v nA byla vypočítána z výšky píků jako:

$I_{CL} [nA] = (\text{průměrná výška píků} / 1,25) \times \text{použitý rozsah detektoru [nA]}$ .

Optimalizovány byly koncentrace a objemy činidel, průtoková rychlost a druh rozpouštědla pro pindolol. Jako rozpouštědlo pro injektované roztoky pindololu byl použit vodný roztok 0,01M kyseliny sírové a vodné roztoky methanolu a ethanolu o různém obsahu organické složky.

#### 3.4.1. Optimalizace jednotlivých parametrů

##### 3.4.1.1. Struktura měřicího cyklu

1. nasátí nosného proudu ( 500 $\mu$ l demineralizované vody)
2. nasátí 30  $\mu$ l zesilovače chemiluminiscence
3. nasátí 30  $\mu$ l vzorku
4. nasátí 30  $\mu$ l kyseliny sírové
5. nasátí 20  $\mu$ l manganistanu draselného
6. obrácení směru toku a dopravení zón do detektoru
7. promytí systému nosným proudem

Napětí na fotonásobiči: 450V pro stanovení optimálních objemů a koncentrací činidel a vzorku

pro stanovení léčivých přípravků

400V při proměrování kalibrační křivky s vyššími koncentracemi pindololu

### 3.4.1.2. Koncentrace činidel

Byly hledány optimální koncentrace hexametafosfátu, kyseliny sírové a manganistanu draselného pro stanovení pindololu rozpuštěného v 0,01M kyselině sírové, v 80% methanolu nebo v 40% ethanolu. Rozsah koncentrací jednotlivých činidel je uveden v tabulkách.

*Tabulka 6: Stanovení pindololu v prostředí 0,01M kyselině sírové*

čínidlo	Rozsah testovaných koncentrací
Hexametafosfát	1-100mM
Kyselina sírová	0,1-2M
Manganistan draselný	1-10mM

*Tabulka 7: Stanovení pindololu v prostředí 80% methanolu*

čínidlo	Rozsah testovaných koncentrací
Hexametafosfát	1-100mM
Kyselina sírová	0,1-2M
Manganistan draselný	0-6mM

*Tabulka 8: Stanovení pindololu v prostředí 40% ethanolu*

čínidlo	Rozsah testovaných koncentrací
Hexametafosfát	0-90mM
Kyselina sírová	0,01-2M
Manganistan draselný	0-6mM

### 3.4.1.3. Objemy činidel

#### Metoda simplex

Optimální objemy činidel pro stanovení pindololu v 80% methanolu byly určovány pomocí automatické metody simplex.<sup>60)</sup>

Rozsah testovaných objemů [μl] byl v následujících intervalech:

Hexametafosfát <1.....50>  
Kyselina sírová <1.....100>  
Manganistan draselný <1.....100>

### 3.4.1.4. Průtoková rychlost

Optimální hodnota průtokové rychlosti byla stanovována v intervalu 10-150μl/s metodou simplex.

### 3.5. Stanovení pindololu v prostředí 80% methanolu

#### 3.5.1. Příprava kalibračních roztoků

Roztoky pindololu ke stanovení kalibrační závislosti byly proměřovány v koncentracích 0-0,1mM. Roztoky 0-0,1mM byly připraveny z 0,1mM roztoku pindololu v 80% methanolu naředěním 80% methanolem. Roztoky 0-0,01mM byly připraveny ředěním roztoku pindololu 0,01 mM v 80% methanolu.

Tabulka 9: Příprava kalibračních roztoků pindololu 0,01-0,1mM

c[mM]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Objem zásobního roztoku [ml]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Objem odměrné baňky [ml]	10									

Tabulka 10: Příprava kalibračních roztoků pindololu 0,001 - 0,01mM

c[mM]	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01
Objem zásobního roztoku[ml]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Objem odměrné baňky [ml]	10									

#### 3.5.2. Opakovatelnost metody

Jako míra opakovatelnosti metody byla použita směrodatnou odchylku, která byla vypočítána z deseti po sobě následujících naměřených hodnot intenzity chemiluminiscence (ve třech sériích) při dávkování roztoku pindololu o koncentraci, ležící v lineární oblasti kalibrační křivky. Stanovení bylo prováděno s optimalizovanými koncentracemi a objemy činidel.

Vzorce pro výpočet směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad s_r [\%] = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

$x_i - \bar{x}$  ....absolutní odchylka jednotlivých výsledků od aritmetického průměru

$s$ .....směrodatná odchylka

$n$ .....počet měření

$s_r$  .....relativní směrodatná odchylka

### 3.5.3. Stanovení obsahu pindololu v léčivých přípravcích (HVLP)

Pindolol byl stanovován v tabletách.

Měření byly prováděno metodou vnějšího standardu. Nejdříve byla změřena intenzita chemiluminiscence u standardu a poté intenzita chemiluminiscence patřičně zředěného extraktu z tablet.

Vzorek byl upravován tak, aby koncentrace účinné látky v měřeném roztoku byla přibližně stejná jako koncentrace standardu (0,004mM), která leží přibližně uprostřed lineární části kalibrační křivky. U přípravku bylo provedeno pět paralelních stanovení.

#### ***Pindolol 5mg/tbl.***

Účinná látka : Pindolol

Úprava vzorku : Byla určena průměrná hmotnost tablety z deseti tablet. Tablety byly rozdrobeny ve třence a bylo naváženo množství odpovídající průměrné hmotnosti tablety. To bylo převedeno do 100ml odměrné baňky, doplněno 80% methanolem a vzorek byl ponechán 45minut na ultrazvukové lázni. Získaný roztok byl přefiltrován a 1ml filtrátu byl zředěn v 10ml odměrné baňce 80% methanolem. Z tohoto roztoku byly odebrány 2ml do 10ml odměrné baňky a objem doplněn 80% methanolem. Stanovení bylo provedeno s pěti různými navážkami vzorku.

### 3.5.4. Ověření správnosti stanovení pindololu v léčivých přípravcích srovnávací metodou

Jako srovnávací metoda k ověření správnosti výsledků SIA-CL stanovení pindololu byla použita HPLC. Míra shody výsledků získaných SIA metodou a srovnávací HPLC metodou byla vyhodnocena statisticky Studentovým t-testem. <sup>61)</sup>

Hodnota kritéria Studentova testu t byla počítána podle vzorce, platného pro stejný počet stanovení metodou A i B ( $n_A = n_B$ ) :

$$t = \frac{|x_A - x_B|}{\{(s_A^2 + s_B^2)/(n_A - 1)\}^{1/2}}$$

kde  $x_A$  je aritmetický průměr výsledků získaných metodou A,  $x_B$  je aritmetický průměr výsledků získaných metodou B,  $s_A$  je směrodatná odchylka průměru  $x_A$  a  $s_B$  je směrodatná odchylka průměru  $x_B$

### **3.5.5. Stanovení obsahové stejnoměrnosti pindololu v tabletách**

U tablet byla dále určována obsahová stejnoměrnost.

Zkouška na obsahovou stejnoměrnost je založena na stanovení jednotlivých obsahů léčivé látky v předepsaném počtu jednotek zkoušeného léčivého přípravku a určení, zda jednotlivé obsahy jsou v povolených mezích vzhledem k průměrné hodnotě obsahu.<sup>7)</sup>

Zkouška byla prováděna u deseti namátkově vybraných tablet léčivého přípravku.

Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 85% až 115% průměrného obsahu a žádný není mimo rozmezí 75% až 125% průměrného obsahu účinné látky.<sup>7)</sup>

### **3.5.6. Uvolňování pindololu z tablet v závislosti na čase**

U zkoumaného léčivého přípravku byla sledována rychlost uvolňování léčivé látky z tablet při rozpouštění na ultrazvukové lázni. Tableta pindololu byla vložena do 50ml odměrné baňky s 80% methanolem a baňka byla umístěna do ultrazvukové lázně. Z této baňky byly odebírány 0,5ml vzorky v různých časových intervalech do 25ml odměrné baňky a po doplnění na 25 ml 80% methanolem byla změřena hodnota intenzity chemiluminiscence.

## **4. VÝSLEDKY A DISKUSE**



## 4.1. Optimalizace metody

Cílem bylo najít optimální podmínky metody pro stanovení pindololu sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí.

### 4.1.1. Určení základních parametrů

Základní parametry (aspirované objemy a průtoková rychlost) byly zpočátku nastaveny pouze orientačně. Optimální hodnoty těchto parametrů byly později zjišťovány pomocí metody simplex.

Napětí na fotonásobiči: 450V

Průtoková rychlost: 100  $\mu\text{l/s}$

Aspirované objemy: 30  $\mu\text{l}$  hexametafosfátu

30  $\mu\text{l}$  roztoku pindololu

30  $\mu\text{l}$  kyseliny sírové

20  $\mu\text{l}$  manganistanu draselného

### 4.1.2. Výsledky optimalizace

#### 4.1.2.1. Struktura měřicího cyklu

V následující tabulce je uvedena navržená struktura měřicího cyklu.

Tabulka 11: Navržená struktura měřicího cyklu

Syringe pump	valve position IN		
Syringe pump	set flow rate [ $\mu\text{l/s}$ ]	100	
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	500	
Syringe pump	valve position OUT		
multi-port valve	set valve position	1	<b>hexametafosfát</b>
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	30	
multi-port valve	set valve position	2	<b>pindolol</b>
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	30	
multi-port valve	set valve position	3	<b>kyselina sírová</b>
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	30	
multi-port valve	set valve position	4	<b>manganistan draselný</b>
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	20	
multi-port valve	set valve position	9	<b>detektor</b>
Syringe pump	set flow rate [ $\mu\text{l/s}$ ]	100	
Syringe pump	empty syringe		

#### 4.1.2.2. Optimalizace koncentrace činidel

##### 4.1.2.2.1. Pindolol v prostředí kyseliny sírové

Pindolol v prostředí 0,01M kyseliny sírové

#### 1. Manganistan draselný

Rozsah testovaných koncentrací 1 – 10 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 1  $\mu$ A

průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 50mM

pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,1mM

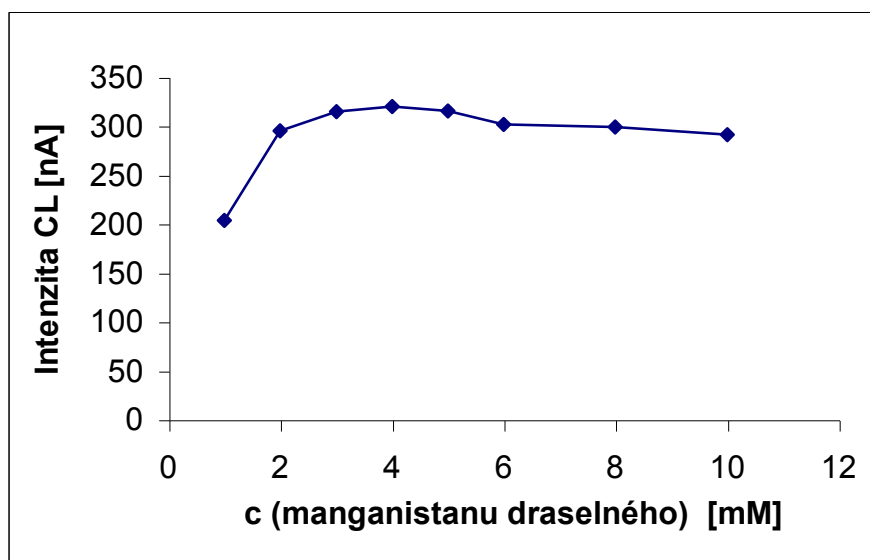
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,6M

manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 1–10mM

Tabulka 12: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci manganistanu draselného

c[mM]	1	2	3	4	5	6	8	10
1.	0,261	0,363	0,395	<b>0,393</b>	0,391	0,383	0,368	0,341
2.	0,243	0,380	0,386	<b>0,400</b>	0,397	0,38	0,384	0,378
3.	0,257	0,364	0,399	<b>0,406</b>	0,394	0,369	0,379	0,373
$\phi$	0,254	0,369	0,393	<b>0,400</b>	0,394	0,377	0,377	0,364
I[nA]	203,2	295,2	314,7	<b>320</b>	315,2	301,6	301,6	291,2

Obr. 5: Vliv koncentrace manganistanu draselného na intenzitu chemiluminiscence



Optimální koncentrace manganistanu draselného je 4mM. Při této koncentraci je intenzita CL nejvyšší (obr.5).

## 2. Kyselina sírová

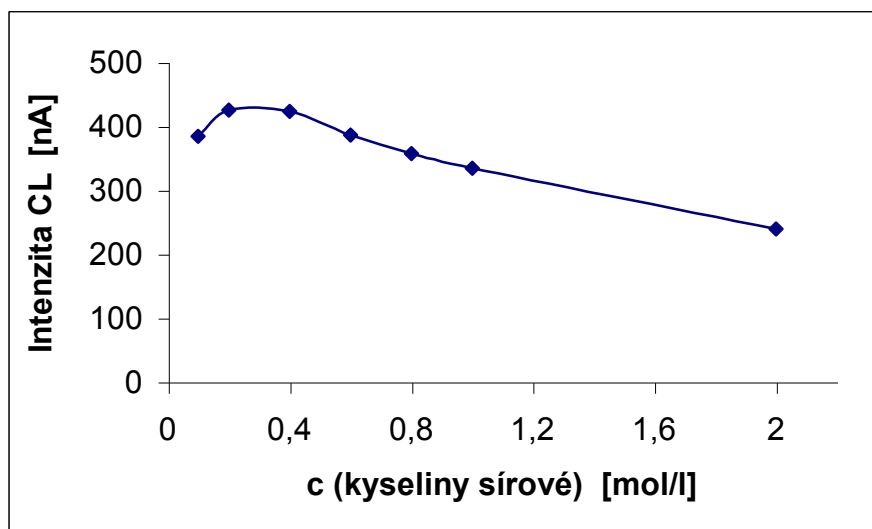
Rozsah testovaných koncentrací 0,1-2,0M

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 1  $\mu$ A  
průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 100mM  
pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,1mM  
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,1 –2M  
manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 13: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci kyseliny sírové

c[M]	0,1	<b>0,2</b>	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0
1.	0,473	<b>0,531</b>	0,531	0,488	0,437	0,415	0,309
2.	0,477	<b>0,529</b>	0,534	0,476	0,454	0,413	0,299
3.	0,491	<b>0,533</b>	0,523	0,485	0,448	0,423	0,289
$\phi$	0,48	<b>0,531</b>	0,529	0,483	0,446	0,417	0,299
I [nA]	384	<b>424,8</b>	423,2	386,4	356,8	333,6	239,2

Obr. 6: Vliv koncentrace kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscence



Nejvyšší intenzita chemiluminiscence je při koncentraci kyseliny sírové 0,2M. Při vyšších koncentracích kyseliny hodnoty intenzity CL pomalu klesají (obr.6). Za optimální byla proto zvolena 0,2M kyselina sírová.

### 3. Hexametafosfát

Rozsah testovaných koncentrací 1 – 100 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

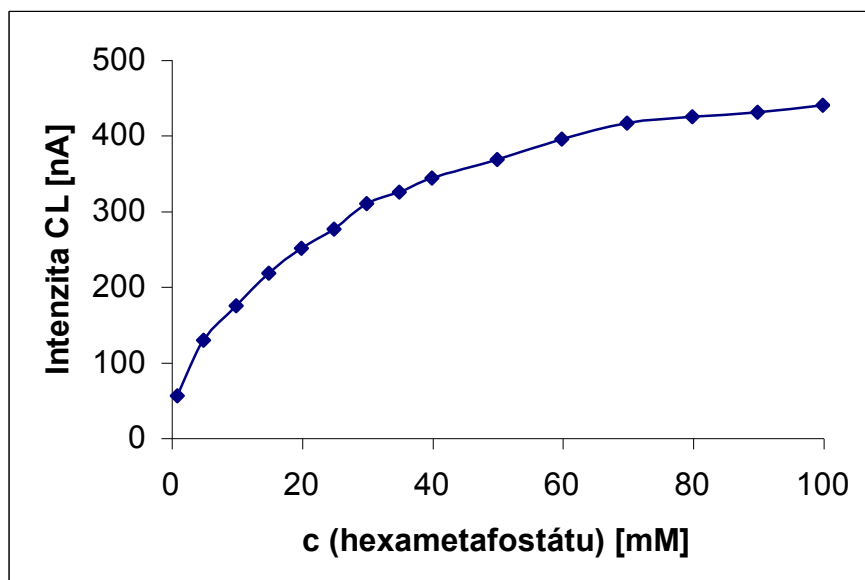
rozsah detektoru 0,5  $\mu$ A  
 průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
 hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 1-100mM  
 pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,1mM  
 kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,2M  
 manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 14: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci hexametafosfátu

c[mM]	1	5	10	15	20	25	30	35	40	50
1.	0,145	0,312	0,443	0,543	0,605	0,683	0,76	0,809	0,865	0,914
2.	0,136	0,324	0,425	0,545	0,637	0,696	0,783	0,804	0,854	0,922
3.	0,134	0,325	0,434	0,539	0,633	0,688	0,777	0,816	0,855	0,919
$\phi$	0,138	0,32	0,434	0,542	0,625	0,689	0,773	0,81	0,858	0,918
I[nA]	55,2	128	173,6	216,8	250	275,6	309,2	324	343,2	367,2

c[mM]	60	70	80	90	100
1.	0,989	1,026	<b>1,055</b>	1,08	1,097
2.	0,986	1,022	<b>1,053</b>	1,067	1,092
3.	0,983	1,069	<b>1,068</b>	1,074	1,103
$\phi$	0,986	1,039	<b>1,059</b>	1,074	1,097
I[nA]	394,4	415,6	<b>423,6</b>	429,5	438,8

Obr. 7: Vliv koncentrace hexametafosfátu na intenzitu chemiluminiscence



Hexametafosfát byl použit jako zesilovač chemiluminiscence. Intenzita CL s rostoucí koncentrací hexametafosfátu stoupá. Jako optimální byla vybrána koncentrace 80mM. Při

vyšších koncentracích hexametafosfátu stoupá intenzita CL jen málo a zbytečně narůstá spotřeba činidla.

**Optimální koncentrace činidel pro stanovení pindololu v prostředí 0,01M kyseliny sírové**

<i>Hexametafosfát :</i>	80mM
<i>Kyselina sírová :</i>	0,2M
<i>Manganistan draselný :</i>	4mM

#### 4.1.2.2. Pindolol v prostředí methanolu

##### Pindolol v prostředí methanolu

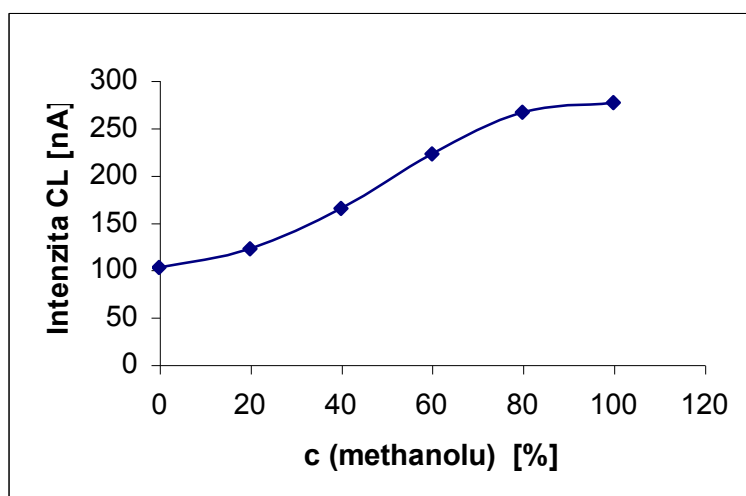
Vzorek pindololu byl při měření v methanolu desetkrát zředěn oproti měření ve vodném prostředí.

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 0,5 $\mu$ A  
průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 50mM  
pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,01mM  
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,6M  
manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 15: Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu methanolu jako rozpouštědla

	0,01M kys.sírová	20% methanol	40% methanol	60% methanol	<b>80% methanol</b>	100% methanol
1.	0,26	0,306	0,407	0,558	<b>0,665</b>	0,677
2.	0,253	0,306	0,409	0,564	<b>0,666</b>	0,701
3.	0,253	0,3	0,417	0,546	<b>0,668</b>	0,694
$\phi$	0,255	0,304	0,411	0,556	<b>0,666</b>	0,691
I[nA]	102	121,6	164,4	222,4	<b>266,4</b>	276,4

Obr. 8: Vliv obsahu rozpouštědla(methanolu) na intenzitu chemiluminiscence



Intenzita chemiluminiscence je podstatně vyšší, použijeme-li jako rozpouštědlo methanol. Intenzita CL stoupá se vzrůstajícím obsahem methanolu. Jako optimální byl zvolen 80% methanol. Intenzita CL slepého pokusu byla nulová.

## Pindolol v prostředí 80% methanolu

### 1. Kyselina sírová

Rozsah testovaných koncentrací 0,1- 2 M

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 1 $\mu$ A

průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

hexametrafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 50mM

pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,01mM

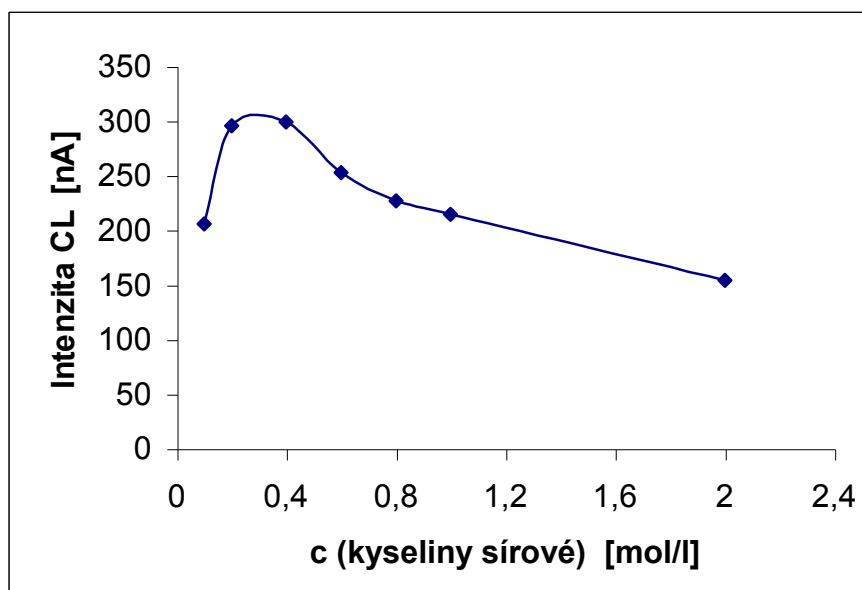
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,1 – 2 M

manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 16: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci kyseliny sírové

c[M]	0,1	0,2	<b>0,4</b>	0,6	0,8	1	2
1.	0,26	0,366	<b>0,392</b>	0,312	0,287	0,269	0,191
2.	0,259	0,372	<b>0,362</b>	0,33	0,299	0,262	0,203
3.	0,253	0,369	<b>0,368</b>	0,305	0,263	0,274	0,181
$\phi$	0,257	0,369	<b>0,374</b>	0,316	0,283	0,268	0,192
I [nA]	205,6	295,2	<b>299,2</b>	252,8	226,4	214,4	153,6

Obr. 9: Vliv koncentrace kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscence



Optimální koncentrace kyseliny sírové je 0,4M. Při vyšších koncentracích kyseliny sírové intenzita CL klesá.

## 2. Hexametafostát

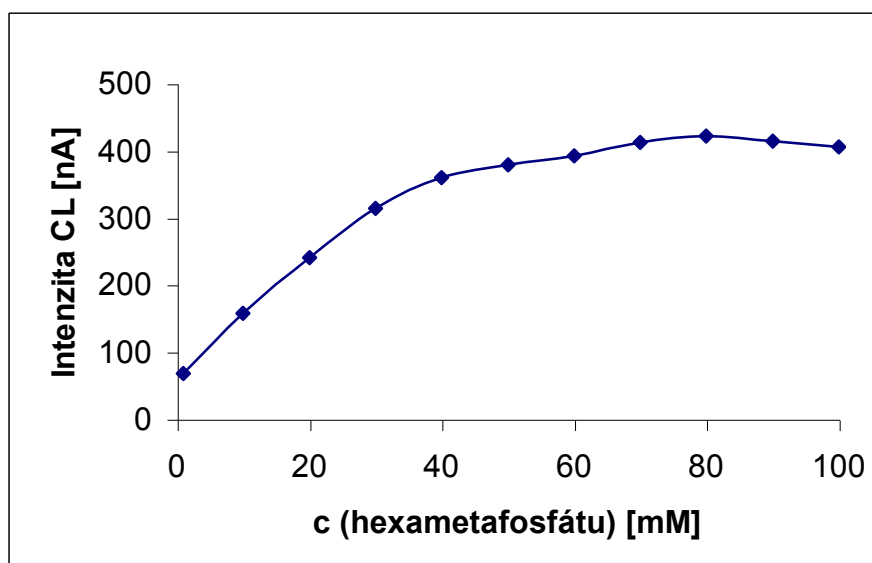
Rozsah testovaných koncentrací 1 – 100 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 1  $\mu$ A  
průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 1-100mM  
pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,01mM  
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,4 M  
manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 1mM

Tabulka 17: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci hexametafosfátu

c[mM]	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	0,09	0,196	0,297	0,399	0,464	0,462	0,491	0,517	<b>0,51</b>	0,524	0,516
2.	0,085	0,198	0,301	0,391	0,426	0,475	0,489	0,509	<b>0,521</b>	0,516	0,503
3.	0,081	0,197	0,304	0,39	0,459	0,482	0,489	0,518	<b>0,549</b>	0,513	0,502
$\phi$	0,085	0,197	0,301	0,393	0,45	0,473	0,49	0,515	<b>0,527</b>	0,518	0,507
I[nA]	68	157,6	240,8	314,4	360	378,4	392	412	<b>421,6</b>	414,4	405,6

Obr.10: Vliv koncentrace hexametafosfátu na intenzitu chemiluminiscence



Intenzita CL stoupá se vzrůstající koncentrací hexametafosfátu ke koncentraci 80mM. Poté intenzita CL mírně klesá. Jako optimální byl proto zvolen 80mM hexametafosfát.



### 3. Manganistan draselný

Rozsah testovaných koncentrací 0 – 6 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 1  $\mu\text{A}$

průtoková rychlost 100  $\mu\text{l/s}$

hexametfosfát 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 80mM

pindolol 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,01mM

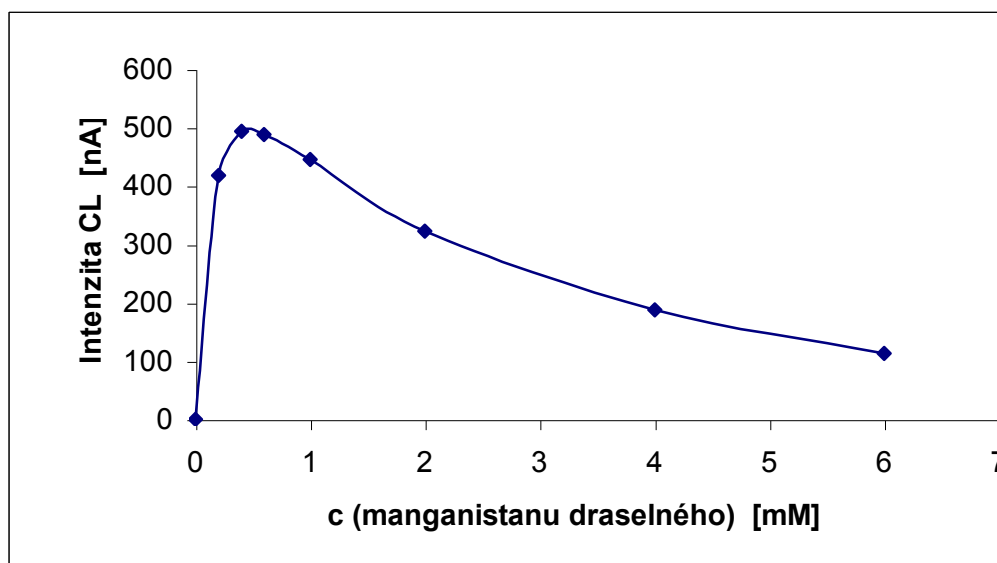
kyselina sírová 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,4 M

manganistan draselný 20  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0 – 8mM

Tabulka 18: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci manganistanu draselného

c[mM]	0	0,2	<b>0,4</b>	0,6	1	2	4	6
1.	0	0,524	<b>0,622</b>	0,617	0,568	0,398	0,241	0,139
2.		0,523	<b>0,623</b>	0,593	0,551	0,403	0,23	0,139
3.		0,522	<b>0,605</b>	0,619	0,552	0,408	0,235	0,144
$\phi$	0	0,523	<b>0,617</b>	0,61	0,557	0,403	0,235	0,141
I[nA]	0	418,4	<b>493,6</b>	488	445,6	322,4	188	112,8

Obr. 11: Vliv koncentrace manganistanu draselného na intenzitu chemiluminiscence



Nejvyšší hodnoty intenzity chemiluminiscence jsou dosaženy při koncentraci manganistanu draselného 0,4 mM.

#### Optimální koncentrace činidel pro stanovení pindololu v prostředí 80% methanolu

Hexametfosfát : 80mM

Kyselina sírová : 0,4M

Manganistan draselný : 0,4mM

#### 4.1.2.2.3. Pindolol v prostředí ethanolu

##### Pindolol v prostředí ethanolu

Roztok pindololu byl pro měření v prostředí ethanolu desítkrát zředěn oproti měření v prostředí methanolu.

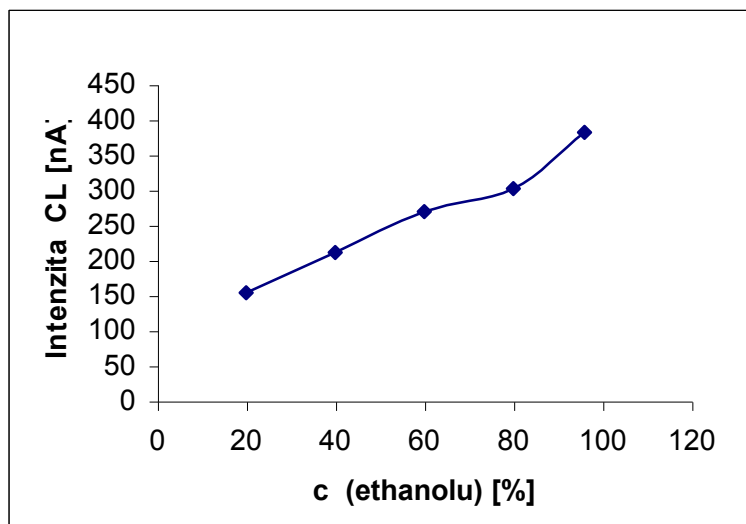
Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru	0,5 $\mu$ A
průtoková rychlost	100 $\mu$ l/s
hexametafosfát	30 $\mu$ l o koncentraci 100mM
pindolol	30 $\mu$ l o koncentraci 0,001mM
kyselina sírová	30 $\mu$ l o koncentraci 0,2M
manganistan draselný	20 $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 19: Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu ethanolu jako rozpouštědla

	20%ethanol	<b>40%ethanol</b>	60%ethanol	80%ethanol	96%ethanol
1.	0,461	<b>0,671</b>	0,8338	0,961	1,174
2.	0,451	<b>0,654</b>	0,834	0,966	1,214
3.	0,472	<b>0,677</b>	0,834	0,962	1,203
$\phi$	0,461	<b>0,667</b>	0,835	0,963	1,197
slepý pokus	0,076	<b>0,14</b>	0,162	0,209	0,242
Rozdíl	0,385	<b>0,527</b>	0,673	0,754	0,955
I[nA]	154	<b>210,8</b>	269,2	301,6	382

Obr.12: Vliv obsahu rozpouštědla(ethanolu) na intenzitu chemiluminiscence



Ethanol jako rozpouštědlo zvyšoval intenzitu CL pindololu ještě více než methanol. Vzorek standardu byl proto 10x zředěn oproti měření v prostředí methanolu. Jak vyplývá z obr. 12, se zvyšováním obsahu ethanolu intenzita CL stoupá. Stoupá však i intenzita CL slepého pokusu. Za optimální byl proto vybrán 40% ethanol.

## Pindolol v prostředí 40% ethanolu

### 1. Kyselina sírová

Rozsah testovaných koncentrací 0,01- 2 M

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 0,5 $\mu$ A

průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

hexametrafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 60mM

pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,001mM

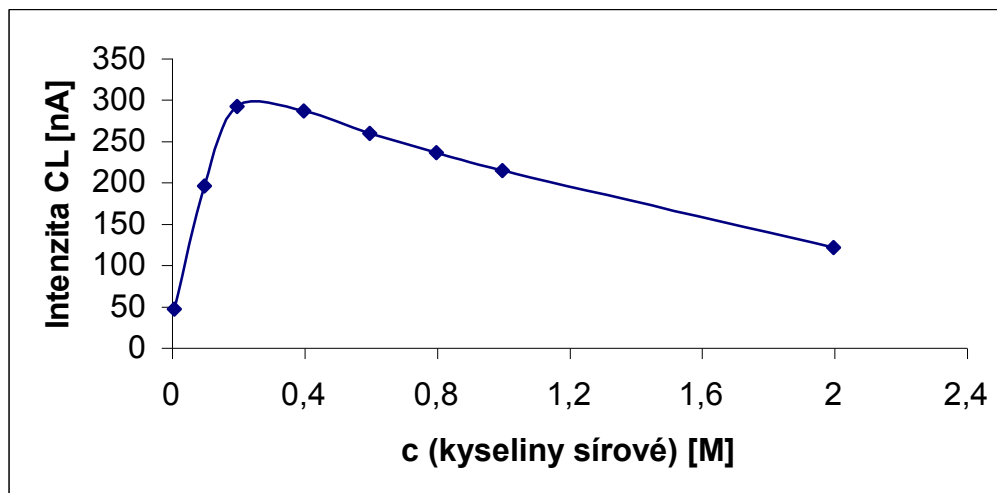
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,01 – 2 M

manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 20: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci kyseliny sírové

C[M]	0,01	0,1	<b>0,2</b>	0,4	0,6	0,8	1	2
1.	0,177	0,643	<b>0,922</b>	0,883	0,816	0,75	0,676	0,439
2.	0,197	0,654	<b>0,932</b>	0,902	0,835	0,779	0,682	0,418
3.	0,189	0,623	<b>0,927</b>	0,905	0,799	0,755	0,668	0,414
$\phi$	0,188	0,64	<b>0,927</b>	0,897	0,817	0,761	0,675	0,424
slepý pokus	0,074	0,153	<b>0,199</b>	0,184	0,17	0,173	0,141	0,124
Rozdíl	0,114	0,487	<b>0,728</b>	0,713	0,647	0,588	0,534	0,3
I [nA]	45,6	194,8	<b>291,2</b>	285,2	258,8	235,2	213,6	120

Obr. 13: Vliv koncentrace kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscence



Intenzita chemiluminiscence při zvýšení koncentrace kys. sírové klesá. Za optimální koncentraci lze považovat 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 2. Hexametafostát

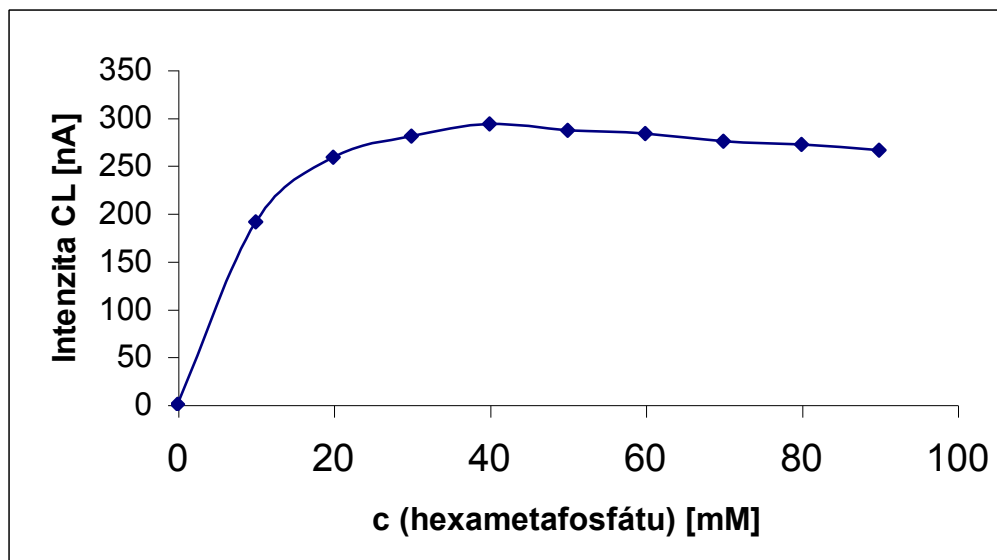
Rozsah testovaných koncentrací 0 – 90 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
 rozsah detektoru 0,5  $\mu$ A  
 průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
 hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 0-100mM  
 pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,001mM  
 kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,2 M  
 manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4 mM

Tabulka 21: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci hexametafosfátu

C[mM]	0	10	20	30	<b>40</b>	50	60	70	80	90
1.	0	0,607	0,821	0,877	<b>0,919</b>	0,885	0,875	0,864	0,875	0,856
2.		0,611	0,817	0,866	<b>0,925</b>	0,901	0,905	0,89	0,877	0,874
3.		0,633	0,798	0,87	<b>0,921</b>	0,914	0,909	0,889	0,888	0,863
$\phi$		0,617	0,812	0,871	<b>0,922</b>	0,9	0,896	0,881	0,88	0,864
slepý pokus		0,144	0,167	0,17	<b>0,189</b>	0,184	0,189	0,193	0,201	0,2
Rozdíl		0,477	0,645	0,701	<b>0,733</b>	0,716	0,707	0,688	0,679	0,664
I[nA]	0	190,8	258	280,4	<b>293,2</b>	286,4	282,8	275,2	271,6	265,6

Obr. 14: Vliv koncentrace hexametafosfátu na intenzitu chemiluminiscence



Intenzita chemiluminiscence stoupá se zvyšující se koncentrací hexametafosfátu až ke koncentraci 40mM, poté pozvolna klesá. Jako optimální byl zvolen 40mM hexametafosfát.

### 3. Manganistan draselný

Rozsah testovaných koncentrací 0 – 6 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 1  $\mu\text{A}$

průtoková rychlost 100  $\mu\text{l/s}$

hexametafosfát 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 40mM

pindolol 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,001mM

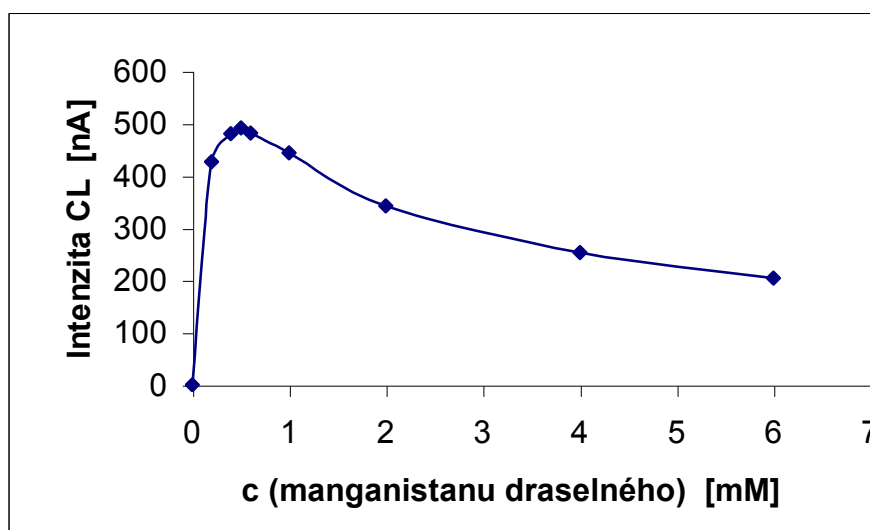
kyselina sírová 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,2 M

manganistan draselný 20  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0 – 6mM

Tabulka 22: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci manganistanu draselného

c	0	0,2	0,4	<b>0,5</b>	0,6	1	2	4	6
1.	0	0,542	0,641	<b>0,664</b>	0,642	0,601	0,472	0,385	0,323
2.		0,568	0,65	<b>0,67</b>	0,661	0,62	0,501	0,381	0,328
3.		0,579	0,631	<b>0,656</b>	0,651	0,606	0,54	0,392	0,329
$\phi$		0,563	0,641	<b>0,663</b>	0,651	0,609	0,492	0,386	0,327
Slepý pokus I[nA]	0	23,7	33	<b>38,9</b>	39,7	43,4	51,2	55,8	57,8
I[nA]	0	426,7	479,8	<b>491,5</b>	481,1	443,8	342,4	253	203,8

Obr.15: Vliv koncentrace manganistanu draselného na intenzitu chemiluminiscence



Nejvyšší hodnoty intenzity chemiluminiscence byly při koncentraci manganistanu draselného 0,5mM (obr.15). Dále byla používána tato koncentrace.

**Optimální koncentrace činidel pro stanovení pindololu v 40% ethanolu**

<i>Hexametafosfát :</i>	40mM
<i>Kyselina sírová:</i>	0,2 M
<i>Manganistan draselný :</i>	0,5mM

#### 4.1.2.2.4. Pindolol v různých prostředích

Byla změřena intenzita chemiluminiscence v prostředí kyseliny sírové, methanolu a ethanolu a byly zjištěny optimální koncentrace jednotlivých činidel (kyseliny sírové, manganistanu draselného a hexametafosfátu). Za těchto optimálních podmínek pro jednotlivá prostředí byla změřena a porovnána intenzita chemiluminiscence při nástřiku roztoku pindololu o koncentraci 0,001 M.

##### **Pindolol v 80% methanolu**

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 0,1  $\mu\text{A}$   
průtoková rychlost 100  $\mu\text{l/s}$   
hexametafosfát 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 80mM  
pindolol 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,001mM  
kyselina sírová 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,4 M  
manganistan draselný 20  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,4mM

Tabulka 23: Intenzita chemiluminiscence v prostředí methanolu za optimálních podmínek

	80% methanol
1.	0,553
2.	0,563
3.	0,55
$\phi$	0,555
Slepý pokus I[nA]	0
I[nA]	44,4

##### **Pindolol v 40% ethanolu**

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 1  $\mu\text{A}$   
průtoková rychlost 100  $\mu\text{l/s}$   
hexametafosfát 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 40mM  
pindolol 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,001mM  
kyselina sírová 30  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,2 M  
manganistan draselný 20  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,5mM

Tabulka 24: Intenzita chemiluminiscence v prostředí ethanolu za optimálních podmínek

	40% ethanol
1.	0,574
2.	0,582
3.	0,61
$\phi$	0,589
Slepý pokus I[nA]	48,4
I[nA]	422,8

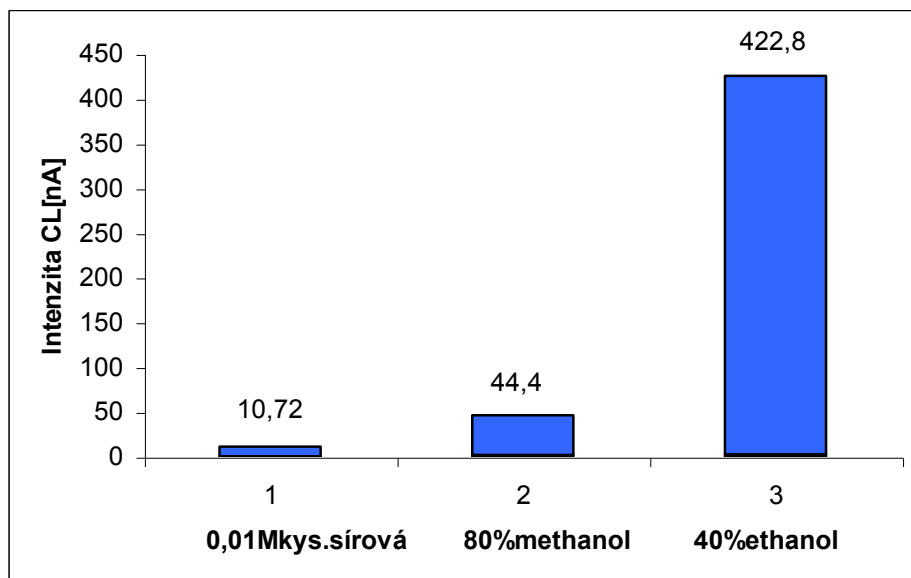
### Pindolol v 0,01M kyselině sírové

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 0,05  $\mu$ A  
průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s  
hexametafosfát 30  $\mu$ l o koncentraci 80mM  
pindolol 30  $\mu$ l o koncentraci 0,001mM  
kyselina sírová 30  $\mu$ l o koncentraci 0,2 M  
manganistan draselný 20  $\mu$ l o koncentraci 4mM

Tabulka 25: Intenzita chemiluminiscence v prostředí kyseliny sírové za optimálních podmínek

	0,01M kys.sírová
1.	0,262
2.	0,268
3.	0,273
$\phi$	0,268
Slepý pokus I[nA]	0
I[nA]	10,72

Obr.16: Závislost intenzity chemiluminiscence na druhu použitého rozpouštědla



Jak vyplývá z údajů na obr. 16, nejvyšší intenzity chemiluminiscence pindololu je dosaženo při použití 40% ethanolu jako rozpouštědla (zhruba čtyřicetkrát vyšší než ve vodném prostředí a desetkrát vyšší než v 80% methanolu). V tomto prostředí již zřejmě vykazují CL i látky zastoupené ve velmi malém množství (např. stopové nečistoty v činidlech) a slepý vzorek není zanedbatelný, což komplikuje vlastní SIA měření. Proto byl jako optimální prostředí vybrán 80% methanol, kde je hodnota intenzity CL slepého pokusu nulová.



### 4.1.2.3. Optimalizace objemů a průtokové rychlosti pro stanovení pindololu v 80%methanolu

#### Metoda SIMPLEX

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči	450V
rozsah detektoru	<b>0,5μA</b>
hexametafosfát	80mM
pindolol v 80% methanolu	0,01mM 45μl
kyselina sírová	<b>0,4 M</b>
manganistan draselný	<b>0,4mM</b>

Optimalizované parametry : P 1: < 1.....50> hexametafosfát  
P 2: < 1.....100> kyselina sírová  
P 3: < 1.....100> manganistan draselný  
P 4: < 10...150> průtoková rychlost

Výchozí objemy 30,30,20,100

Tabulka 26: Optimalizace objemů metodou SIMPLEX

	Hexametafosfát[μl]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [μl]	KMnO <sub>4</sub> [μl]	Průtoková rychlost [μl/s]	I[nA]
1.	30	33	22	102	312
2.	20	33	22	102	298,8
3.	25	24	22	102	288
4.	25	30	14	102	318,4
5.	25	30	20	94	315,6
6.	26	38	16	97	338
7.	27	45	12	95	330
8.	33	40	10	93	317,2
9.	25	46	4	90	227,6
10.	<b>29</b>	<b>36</b>	<b>17</b>	<b>99</b>	<b>341,6</b>
11.	31	47	10	101	326,4
12.	24	41	18	104	334
13.	30	51	17	98	326,4
14.	29	46	16	99	330
15.	24	32	23	99	308

Nejvyšší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při těchto objemech : 29 $\mu$ l hexametafosfátu, 36  $\mu$ l kyseliny sírové, 17  $\mu$ l manganistanu draselného a průtokové rychlosti 99  $\mu$ l/s.

Dále byly metodou SIMPLEX optimalizovány objemy pro koncentrované roztoky činidel ( 2M kyselina sírová, 5mM manganistan draselný). Rozsah detektoru byl snížen, protože zpočátku byla odezva detektoru nízká.

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
 rozsah detektoru **0,2 $\mu$ A**  
 hexametafosfát 80mM  
 pindolol v 80% methanolu 0,01mM 45 $\mu$ l  
 kyselina sírová **2 M**  
 manganistan draselný **5mM**

Výchozí objemy 30,30,20,100

Tabulka 27: Optimalizace objemů metodou SIMPLEX

	Hexametafosfát[ $\mu$ l]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ $\mu$ l]	KMnO <sub>4</sub> [ $\mu$ l]	Průtoková rychlost [ $\mu$ l/s]	I[nA]
1.	35	33	22	92	72,2
2.	25	33	22	92	53,8
3.	30	24	22	92	54,6
4.	30	30	14	92	105,4
5.	30	30	20	84	63,5
6.	37	28	11	90	154,2
7.	<b>43</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>89</b>	<b>223,4</b>

Intenzita chemiluminiscence při sedmém simplexu se zvýšila natolik , že musel být zvýšen měřicí rozsah detektoru na 1  $\mu$ A . Jako výchozí objemy pro další sérii optimalizačních pokusů byly použity objemy ze 7. simplexu s nejvyšší intenzitou chemiluminiscence.

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
 rozsah detektoru **1 $\mu$ A**  
 hexametafosfát 80mM  
 pindolol v 80% methanolu 0,01mM 45 $\mu$ l  
 kyselina sírová **2 M**  
 manganistan draselný **5mM**

Výchozí objemy 43,26,6,89

Tabulka 28: Optimalizace objemů metodou SIMPLEX

	Hexametafosfát[ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ $\mu\text{l}$ ]	KMnO <sub>4</sub> [ $\mu\text{l}$ ]	Průtoková rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]	I[nA]
1.	46	28	7	90	240
2.	40	28	7	90	229,6
3.	43	22	7	90	210,4
4.	43	26	2	90	459,2
5.	43	26	6	85	246,4
6.	43	24	1	91	532
7.	43	29	1	89	584,8
8.	<b><u>43</u></b>	<b><u>28</u></b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>89</u></b>	<b><u>590,4</u></b>

Při použití metody simplex byly nejvyšší hodnoty intenzity chemiluminiscence naměřeny při těchto objemech:

Hexametafosfát                    **43  $\mu\text{l}$**  80 mM

Kyselina sírová                    **28  $\mu\text{l}$**  2 M

Manganistan draselný            **1  $\mu\text{l}$**  5 mM

Průtoková rychlost                **89  $\mu\text{l/s}$**

## 4.2. Kalibrační závislosti

### 4.2.1. Měření kalibrační závislosti

Rozsah testovaných koncentrací pindololu : 0 – 0,1 mM

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 400V nebo 450V

rozsah detektoru	1 $\mu$ A
průtoková rychlost	89 $\mu$ l/s
hexametafosfát	43 $\mu$ l o koncentraci 80mM
pindolol v 80%methanolu	30 $\mu$ l o koncentraci 0,01-0,1mM
kyselina sírová	28 $\mu$ l o koncentraci 2 M
manganistan draselný	1 $\mu$ l o koncentraci 5mM

#### pindolol 0 –0, 1mM

Při měření kalibrační závislosti s vyšší koncentrací pindololu (0-0,1 mM) bylo nutné snížit napětí na fotonásobiči na 400V.

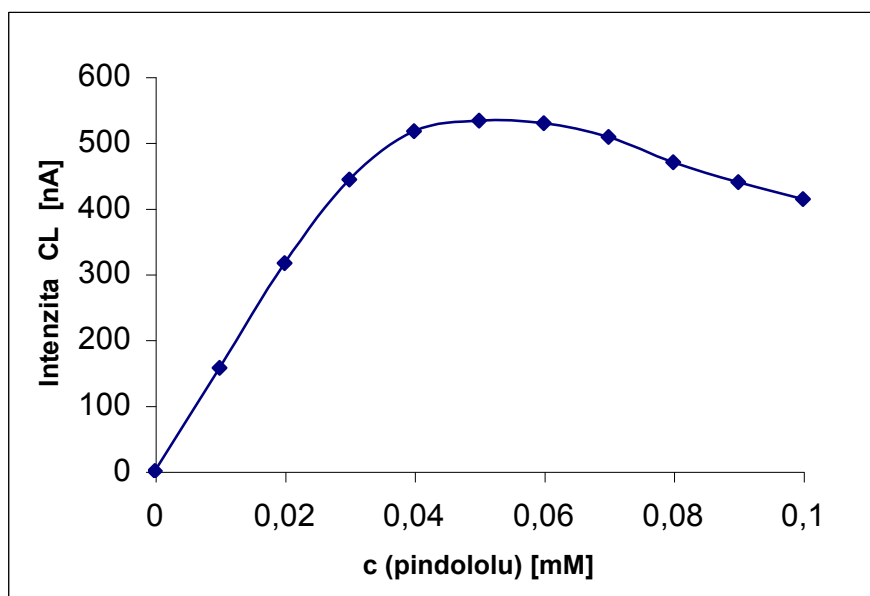
napětí na fotonásobiči: 400V

rozsah detektoru: 1  $\mu$ A

Tabulka 29 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci pindololu

c[mM]	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
1.		0,204	0,394	0,555	0,626	0,65	0,65	0,625	0,577	0,55	0,52
2.		0,198	0,394	0,555	0,649	0,66	0,655	0,636	0,598	0,55	0,519
3.		0,205	0,396	0,549	0,66	0,669	0,668	0,642	0,589	0,549	0,52
4.		0,178	0,394	0,556	0,648	0,682	0,67	0,637	0,585	0,548	0,519
$\phi$	0	0,196	0,395	0,554	0,646	0,666	0,661	0,635	0,587	0,549	0,517
I [Na]	0	156,8	316	443,2	516,8	532,8	528,8	508	469,6	439,2	413,6

Obr. 17: Kalibrační závislost pindololu v rozsahu koncentrací 0-0,1mM



Grafem kalibrační křivky v rozsahu 0-0,1mM (obr.17) je parabola.

### Pindolol 0–0,01mM

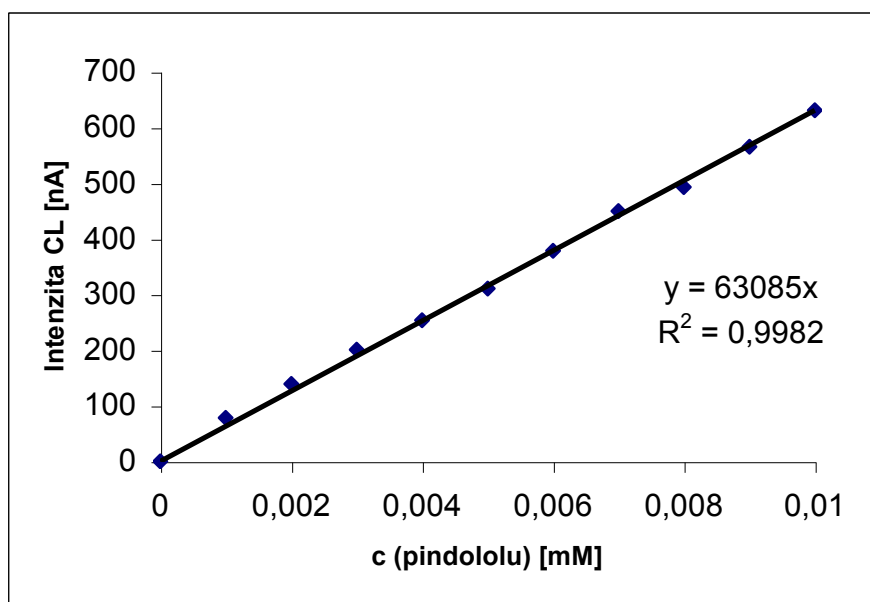
napětí na fotonásobiči: 450V

rozsah detektoru: 1 $\mu$ A

Tabulka 30 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci pindololu

c[mM]	0	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01
1.		0,099	0,18	0,258	0,315	0,400	0,469	0,575	0,606	0,738	0,802
2.		0,097	0,17	0,239	0,312	0,401	0,48	0,548	0,618	0,678	0,81
3.		0,096	0,167	0,248	0,33	0,377	0,467	0,566	0,623	0,709	0,756
4.		0,098	0,177	0,258	0,311	0,375	0,474	0,557	0,615	0,704	0,788
$\phi$	0	0,098	0,174	0,251	0,317	0,388	0,473	0,562	0,616	0,707	0,789
I [nA]	0	78	139,2	200,8	253,6	310,4	378,4	449,6	492,8	565,6	631,2

Obr. 18: Kalibrační závislost pindololu v rozsahu koncentrací 0-0,01mM



Byla proměřena kalibrační závislost  $y = kx + q$  (kde  $y$  je intenzita CL v nA a  $x$  je koncentrace pindololu v mmol/l) v rozmezí koncentrací pindololu 0-0,1mM (obr.17). Grafem kalibrační křivky v celém tomto rozmezí je parabola. Poté byl proměřen užší rozsah koncentrací 0-0,01mM (obr.18). V tomto rozsahu koncentrací je závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci pindololu lineární . Parametry regresní křivky v tomto intervalu jsou následující:

$$\text{Rovnice : } y = 63085x$$

$$\text{Korelační koeficient: } r = 0,9991$$

Interval 0,001-0,01mM pindolol byl použit pro stanovení této účinné látky v léčivých přípravcích.

#### 4.2.2. Opakovatelnost metody

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru	1 $\mu$ A
průtoková rychlost	89 $\mu$ l/s
hexametafosfát	43 $\mu$ l o koncentraci 80mM
standard	30 $\mu$ l 0,008mM pindololu v 80% methanolu
kyselina sírová	28 $\mu$ l o koncentraci 2 M
manganistan draselný	1 $\mu$ l o koncentraci 5mM

Tabulka31: Hodnoty intenzity CL pro tři série o deseti měření

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	$\phi$	I [nA]	s	$s_r$ [%]
0,673	0,677	0,670	0,684	0,675	0,647	0,658	0,680	0,671	0,683	0,672	537,6	0,01091	1,62
0,688	0,681	0,651	0,659	0,645	0,672	0,678	0,680	0,667	0,645	0,667	533,6	0,01496	2,24
0,673	0,669	0,651	0,653	0,659	0,636	0,661	0,659	0,666	0,672	0,660	528,0	0,01067	1,62

Průměrná směrodatná odchylka je 1,83%, výsledky jsou tedy dostatečně přesné a metoda je dobře opakovatelná.

### 4.3. Stanovení obsahu pindololu v tabletách

#### Pindolol v prostředí 80% methanolu

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
rozsah detektoru 0,5 $\mu$ A  
průtoková rychlost 89  $\mu$ l/s  
hexametafosfát 43  $\mu$ l o koncentraci 80mM  
pindolol 30  $\mu$ l v 80%methanolu  
kyselina sírová 28  $\mu$ l o koncentraci 2 M  
manganistan draselný 1  $\mu$ l o koncentraci 5mM

#### APO - PINDOLOL tablety 5mg/tableta

Přípravek ředěn 5000 krát

Průměrná hmotnost tablety : 0,08 g

Standard 0,004mM pindolol tj. 0,00097mg/ml pindololu

Tabulka32: Stanovení obsahu PINDOLOLU v tabletách v pěti vzorcích (A-E)

	standard	A	B	C	D	E
1.	0,61	0,61	0,6	0,608	0,611	0,589
2.	0,617	0,59	0,571	0,604	0,611	0,58
3.	0,615	0,588	0,569	0,602	0,612	0,594
4.	0,613	0,588	0,562	0,59	0,592	0,581
$\phi$	0,614	0,594	0,576	0,601	0,609	0,586
I[nA]	245,6	237,6	230,4	240,4	243,6	234,4
navážka [g]		0,0798	0,0797	0,0797	0,0799	0,0801
c[mg/tbl]		<b>4,71</b>	<b>4,57</b>	<b>4,77</b>	<b>4,66</b>	<b>4,62</b>

$\phi$  (A–E) = **4,67 mg/tbl**

s = **0,069455 (n = 5)**

s<sub>r</sub> = **1,49%**

Průměrný obsah pindololu z pěti navážek je 4,67 mg/tableta. Podle amerického lékopisu tablety obsahující pindolol mají ne méně než 90% a ne více než 110% uváděného množství pindololu. <sup>62)</sup>

Zkoušené tablety tedy vyhovují požadavkům lékopisu ( rozmezí obsahu pindololu 4,5-5,5mg/tableta ).

### 4.3.1. Statistické srovnání metody SIA s HPLC – ověření správnosti SIA-CL metody

Výsledky stanovení pindololu v tabletách sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí byly srovnány s výsledky získanými HPLC metodou pomocí Studentova t-testu.

Tabulka 33: Srovnání výsledků stanovení pindololu v tabletách SIA-CL metodou a metodou HPLC Studentovým t-testem

HVLP / deklarovaný obsah pindololu	Nalezeno ( $\bar{x}$ % $\pm s_R$ )		t-test ( $t_{krit} = 2,228$ )
	SIA-CL	HPLC	
APO-PINDOLOL tablety / 5mg/tbl.	93,4 $\pm$ 1,49	92,2 $\pm$ 1,97	1,172

Pozn.:  $\bar{x}$  % = aritmetický průměr paralelních stanovení (% vzhledem k deklarovanému obsahu);  $s_R$  = relativní směrodatná odchylka průměru; počet stanovení  $n_A = n_B = 6$ ;  $t_{krit}$  = kritická hodnota pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  a počet stupňů volnosti  $\nu = (2n_A - 2) = 10$  <sup>61)</sup>

Vypočítané hodnoty pomocí t-testu jsou nižší než kritická hodnota Studentova rozdělení ( $t_{krit}$ ) na hladině významnosti 0,05. Mezi výsledky získanými oběma metodami tedy nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.



## 4.4. Stanovení obsahové stejnoměrnosti pindololu v tabletách

### Pindolol v prostředí 80% methanolu

Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V  
 rozsah detektoru 1μA  
 průtoková rychlost 89 μl/s  
 hexametrafosfát 43 μl o koncentraci 80mM  
 pindolol 30 μl v 80%methanolu  
 kyselina sírová 28 μl o koncentraci 2 M  
 manganistan draselný 1 μl o koncentraci 5mM

### APO - PINDOLOL tablety 5mg/tableta

Přípravek ředěn 2500 krát

Standard 0,008mM 0,00194mg/ml

Tabulka 34: Stanovení obsahové stejnoměrnosti PINDOLOLU v tabletách

	standard	1.	2.	3.	standard	4.	5.	6.	7.
1.	0,699	0,689	0,670	0,688	0,703	0,672	0,655	0,660	0,652
2.	0,705	0,669	0,659	0,682	0,684	0,646	0,634	0,656	0,651
3.	0,714	0,656	0,644	0,686	0,703	0,654	0,652	0,642	0,638
4.	0,721	0,653	0,646	0,669	0,684	0,657	0,644	0,656	0,676
φ	0,71	0,667	0,665	0,681	0,694	0,657	0,646	0,654	0,659
I[nA]	568	533,6	534	544,8	555,2	525,6	517	523,2	527,2
Hmotnost tablety[g]		0,0796	0,0775	0,0818		0,0796	0,0797	0,0799	0,0811
c[mg/tbl]		<b>4,56</b>	<b>4,54</b>	<b>4,65</b>		<b>4,59</b>	<b>4,52</b>	<b>4,57</b>	<b>4,61</b>

	standard	8.	9.	10.
1.	0,639	0,615	0,605	0,577
2.	0,646	0,572	0,596	0,634
3.	0,627	0,601	0,595	0,608
4.	0,61	0,554	0,599	0,61
φ	0,631	0,586	0,599	0,607
I[nA]	504,8	468,8	479,2	485,6
Hmotnost tablety[g]		0,0795	0,0813	0,0797
c[mg/tbl]		<b>4,51</b>	<b>4,61</b>	<b>4,67</b>

φ (1–10) = **4,59 mg/tbl**

Přípravek vyhovuje zkoušce na obsahovou stejnoměrnost . Obsah účinné látky u jednotlivých tablet není nižší než 85% a vyšší než 115%.

## 4.5. Uvolňování pindololu z tablet v závislosti na čase

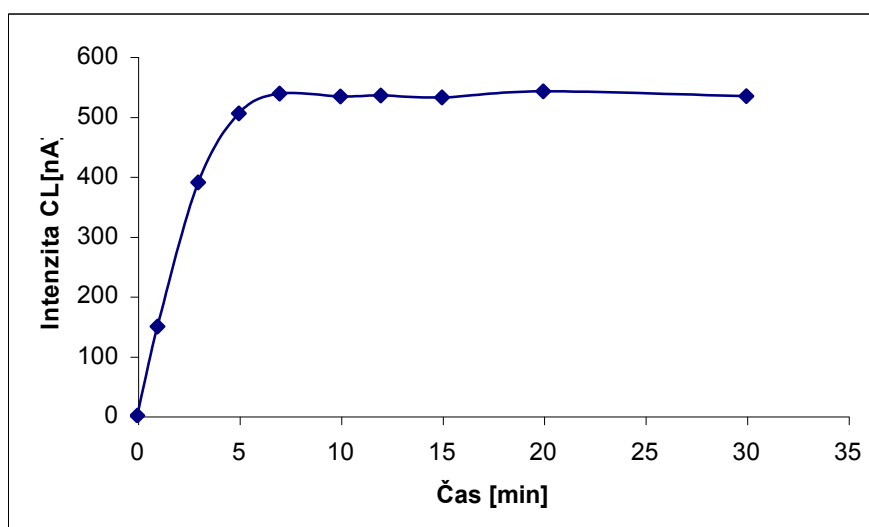
Podmínky pro měření: napětí na fotonásobiči 450V

rozsah detektoru 1  $\mu$ A  
 průtoková rychlost 89  $\mu$ l/s  
 hexametafosfát 43  $\mu$ l o koncentraci 80mM  
 kyselina sírová 28  $\mu$ l o koncentraci 2 M  
 manganistan draselný 1  $\mu$ l o koncentraci 5mM

Tabulka 35: Stanovení koncentrace pindololu v tabletách v závislosti na čase

čas [min]	0	1	3	5	7	10	12	15	20	30
1.		0,190	0,481	0,642	0,670	0,669	0,675	0,660	0,672	0,680
2.		0,189	0,479	0,637	0,683	0,668	0,662	0,658	0,683	0,666
3.		0,180	0,500	0,615	0,663	0,660	0,667	0,676	0,676	0,655
$\phi$	0	0,186	0,487	0,631	0,672	0,666	0,668	0,664	0,677	0,667
I [nA]	0	148,8	389,6	504,8	537,6	532,8	534,4	531,2	541	533,6

Obr.19. Závislost intenzity chemiluminiscence na čase rozpouštění



Tablety se rozpouštějí postupně přibližně 7 minut. Poté zůstává intenzita chemiluminiscence konstantní. Z toho vyplývá, že optimální doba extrakce účinné látky z tablet na ultrazvukové lázni činí asi 10 minut.

## **5. ZÁVĚR**

Byla navržena a optimalizována metoda stanovení pindololu sekvenční injekční analýzou s využitím chemiluminiscenční detekce. Metoda je založena na oxidaci pindololu manganistanem draselným v kyselém prostředí (v prostředí kyseliny sírové) za přítomnosti hexametafosfátu a methanolu jako zesilovačů chemiluminiscence. Pro optimalizaci aspirovaných objemů činidel byla využita metoda SIMPLEX.

Na základě provedených měření byly zvoleny následující optimální parametry pro stanovení pindololu:

Médium pro rozpouštění vzorku: 80% methanol

Napětí na fotonásobiči: 450V

Průtoková rychlost: 89  $\mu$ l/s

Objem vzorku: 30  $\mu$ l

Koncentrace / objemy činidel činidel:

Kyselina sírová: 2M / 28  $\mu$ l

Manganistan draselný: 5mM / 1 $\mu$ l

Hexametafosfát: 80mM / 43 $\mu$ l

Tyto optimální podmínky byly použity k proměření kalibrační závislosti a ke stanovení pindololu v léčivém přípravku.

Kalibrační závislost byla změřena v rozsahu koncentrací 0 - 0,1mM. Grafem kalibrační křivky v celém tomto rozmezí je parabola. V intervalu koncentrací 0 - 0,01mM je závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci pindololu lineární.

Při hodnocení opakovatelnosti metody byly provedeny tři série měření standardního roztoku pindololu o koncentraci, ležící v lineární oblasti kalibrační křivky; v každé sérii bylo provedeno deset nástřiků vzorku. Průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky byla 1,83%; výsledky jsou tedy dostatečně přesné a metoda je dobře opakovatelná.

Metoda byla aplikována na stanovení obsahu pindololu v tabletách .

Výsledky stanovení pindololu v HVLP metodou sekvenční injekční analýzy s chemiluminiscenční detekcí byly srovnány s výsledky získanými HPLC. Mezi výsledky získanými oběma metodami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

Dále byla stanovena obsahová stejnoměrnost v deseti náhodně vybraných tabletách (zkouška podle ČL 2002) a bylo zjištěno jsem, že přípravek vyhovuje zkoušce na obsahovou stejnoměrnost.

## **6. *LITERATURA***

1. [www.cuni.cz/forum/fukVI08/fv4-fVI08.html.cs.windows-1250](http://www.cuni.cz/forum/fukVI08/fv4-fVI08.html.cs.windows-1250) (doc. RNDr. Solich, P., CSc. : K novým analytickým metodám)
2. Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. Chem. Listy 93 (1999), 354-359.
3. [www.globalfia.com](http://www.globalfia.com)
4. Garcia-Campaña, A.M.; Baeyens, W.R.G.: Chemiluminescence in analytical chemistry; Marcel Dekker, Inc.; New York, 2001.
5. Lincová, D.; Farghali, H.: Základní a aplikovaná farmakologie; Galén, Karolinum, Praha, 2002
6. Hartl, J.; Palát, K.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V. : Farmaceutická chemie II/I ; Karolinum, Praha, 1997
7. Autorský kolektiv: Český lékopis 2002. Praha, Grada 2002.
8. Lochow, E.; Brand, H.; Zeiser, C.: GC-MS determination of betablockers and bronchospasmolytics in water. GIT Labor. Fachzeitschrift Sept. 2000 (2 Special Issue): 96-98 in Anal.Abstr., abstrakt č. 6315H10245
9. El-Walily, A.F.M.; El-Yazbi, F.A.; Belal, S.F.; Razak, O.A.: High-performance liquid chromatographic and derivative ultraviolet spectrophotometric determination of pindolol and clopamide mixture in tablets. Anal. Lett. 28 (1995): 893-907; in Anal.Abstr., abstrakt č. 5708G00063
10. Lukkari, P.; Nyman, T.; Riekkola, M.L.: Determination of nine beta-blockers in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr. 674 (1994): 241-246.
11. Chmielowiec, D.; Schuster, D.; Gengo, F.: Determination of pindolol in human serum by HPLC. J. Chromatogr. 29 (1991): 37-39
12. Telting-Diaz, M.; Kelly, M.T.; Hua, C.; Smyth, M.R.: High-performance liquid chromatographic determination of nifedipine, nifedipine and pindolol using a carbon fibre flow-through amperometric detector. J. Pharm. Biomed. Anal. 9(1991): 889-893
13. Wanwimolruk, S.: Micro-bore liquid chromatography for analysis of plasma pindolol concentrations. J. Liq. Chromatogr. 14(9) (1991): 1699-1706; in Anal.Abstr., abstrakt č.5406G00087

14. Alpertunga, B.; Sungur, S.; Ersoy, L.; Manav, S.Y.: Determination of some beta-blockers as dabsyl derivatives by HPLC. *Arch. Pharm.* 323(1990): 587-589; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č.5309G00075
15. Lacroix, P.M.; Moir, D.; Lovering, E.G.: Liquid-chromatographic determination of pindolol and related compounds in raw materials. *J.Assoc.Off. Anal.Chem.* 73 (1990): 521-525; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č. 5308G00083
16. Sungur,S.; Ersoy,L.; Alpertunga,B.; Yalcin,M.S.: Thin-layer chromatographic detection of some beta-blockers after derivatization with dabsyl chloride. *Pharmazie* 44 (1989):864-865.
17. Szumilo, H.; Przyborowska, M.: High-performance liquid-chromatographic determination of some beta-adrenolytic drugs. *Farm. Pol.* 45(1989): 304-307; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č. 5207E00038
18. Tse, F.L.S.; Caubet,W.L.: Improved method for determination of plasma pindolol by high-pressure liquid chromatography with ultra-violet detection. *Biopharm. Drug. Dispos.* 8(1987): 577-581; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č. 5003D00117
19. Li,Y.; Zhang, X.: Determination of beta-adrenoreceptor antagonists in urine by high-performance liquid chromatography with diode-array spectrophotometric detection. *Anal.Chim.Acta.* 196 (1987): 255-258
20. Smith, H.T.:High-performance liquid-chromatographic method for the determination of pindolol in human plasma. *J. Chromatogr. Biomed.Appl.:* 59(1987): 95-103; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č. 4911D00114
21. Hsyu,P.H.; Giacomini,K.M.: High-performance liquid-chromatographic determination of the enantiomers of beta-adrenoceptor blocking agents in biological fluids. I. Studies with pindolol. *J. Pharm.Sci.* 75(1986): 601-605.
22. Shields, B.J.; Lima, J.J.; Binkley, P.F.; Leier, C.V.; MacKichan, J.J.: Determination of pindolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 51(1986): 163-171; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č.4902D00085
23. Spahn, H.; Prinoth, M.; Mutschler, E.:Determination of pindolol in plasma and urine by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 43(1985): 458-464; in *Anal.Abstr.*, abstrakt č. 4804D00093
24. Diquet, B.; Nguyen-Huu, J.J.; Boutron, H.: Determination of pindolol in human plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J.*

- Chromatogr. Biomed. Appl. 36(1984): 430-433; in Anal.Abstr., abstrakt č. 4707D00091
25. Park, Y.J.; Lee, D.W.; Lee, W.Y.: Determination of beta-blockers in pharmaceutical preparations and human urine by high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence detection. Anal.Chim.Acta 471(2002): 51-59.
  26. Ranta, V.P.; Toropainen, E.; Talvitie, A.; Auriola, S.; Urtili, A.: Simultaneous determination of eight beta-blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies in vitro. J. Chromatogr. B; Anal. Technol. Biomed. Life.Sci. 772(2002): 81-87; in Anal.Abstr., abstrakt č. 6515G10341
  27. Gumieniczek, A.; Hopkala, H.; Berecka, A.: Densitometric and videodensitometric determination of nadolol and pindolol in tablets by quantitative HPTLC. J. Liq.Chromatogr. Relat. Technol. 25(2002): 1401-1408; in Anal.Abstr., abstrakt č. 6514G10387
  28. Motoyama, A.; Suzuki, A.; Shiota, O.; Namba, R.: Direct determination of pindolol enantiomers in human serum by column-switching LC-MS/MS using a phenylcarbamate-beta-cyclodextrin chiral column. J. Pharm. Biomed. Anal. 28(2002): 97-106
  29. Papadopoulos, P.; Parissi-Poulou, M.; Panderi, I.: Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of pindolol and clopamide in tablets. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 25(2002): 125-136; in Anal.Abstr., abstrakt č. 6448G10238
  30. Thevis, M.; Opfermann, G.; Schaezner, W.: High-speed determination of beta-receptor blocking agents in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Biomed.Chromatogr. 15(2001): 393-402.
  31. Katayama, M.; Matsuda, Y.; Shimokawa, K.; Tanabe, S.; Hara, I.; Sato, T.; Kaneko, S.; Daimon, H.: Determination of beta-blockers by high-performance liquid chromatography coupled with solid-phase microextraction from urine and plasma samples. Anal.Lett. 34(2001): 91-101.
  32. Khalil, S.; Borham, N.: Indirect atomic-absorption spectrometric determination of pindolol, propranolol and levamisole hydrochlorides based on formation of ion-



- associates with ammonium reineckate and sodium cobaltinitrite. : J. Pharm. Biomed. Anal. 22(2000): 235-240.
33. Wu, J.C.; Lord, H.L.; Pawliszyn, J.; Kataoka, H.: Polypyrrole-coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of beta-blockers in urine and serum samples. J. Microcolumn Separations 12(2000): 255-266; in Anal.Abstr., abstrakt č. 6221G10259
  34. Khalil, S.; El-Rabiehi ,M.M.: Indirect atomic-absorption spectrometric determination of pindolol, propranolol and levamisole hydrochlorides based on formation of ion associates with manganese thiocyanate and potassium ferricyanide. J. Pharm. Biomed. Anal. 22(2000):7-12.
  35. Lapa, R.A.S.; Lima, J.L.F.C.; Reis, B.F.; Santos, J.L.M.; Zagatto, E.A.G.: Multicommutated flow system with online compensation of the Schlieren effect applied to the spectrophotometric determination of pindolol. Anal. Chim. Acta. 366(1998): 209-215.
  36. Ruiz, T.P.; Martinez-Lozano, C.; Tomas, V.; Carpena, J.: Simultaneous determination of propranolol and pindolol by synchronous spectrofluorimetry. Talanta. 45(1998): 969-976.
  37. Panderi, I.; Parissi-Poulou, M.: Simultaneous determination of clopamide-pindolol combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 12(1994): 151-156.
  38. Erram, S.V.; Tipnis, H.P.: Simple spectrophotometric analysis of pindolol and hydrochlorothiazide from combined pharmaceutical dosages. Indian Drugs 30(1993): 319-323; in Anal.Abstr., abstrakt č. 5601G00012
  39. Bedair, M.M.; Galal, S.M.; El-Yazbi, F.A.: Colorimetric determination of beta-adrenergic blocking drugs in tablets using 2,3-dichloro-1,4-naphthaquinone. Sci.Pharm. 60(1992): 235-238; in Anal.Abstr., abstrakt č. 5511G00079
  40. Sastry, C.S.P.; Sailaja, A.; Rao, T.T.: Sensitive spectrophotometric methods for the determination of pindolol. Mikrochim Acta. 107(1992): 1-9; in Anal.Abstr., abstrakt č. 5505G00070
  41. Mahrous, M.S.; Issa, A.S.; Ahmed, N.S.: Oxidants for the colorimetric determination of pindolol. Talanta. 39(1992): 69-72.

42. Pecanac, D.; Radulovic, D.; Zivanovic, L.; Agatonovic-Kustrin, S.: Investigation of the pindolol - iron(III) complex and its use in the spectrophotometric determination of pindolol in bulk drug and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9(1991): 861-864.
43. Sastry, C.S.P.; Sailaja, A.; Rao, T.T.; Krishna, D.M.: Extractive spectrophotometric determination of some antihypertensive agents with Supracen violet 3B. *Indian Drugs* 29(1992): 473-477; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 5506G00055
44. Zakhari, N.A.; Hassan, S.M.; El-Shabrawy, Y.: Colorimetric determination of beta-adrenergic blocking drugs with carbon disulphide and copper(I) ions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9(1991): 421-426
45. Susanto, F.; Reinauer, H.: Determination of beta-blockers in human plasma by electron-capture g.l.c. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 318(1984): 425-427
46. Sastry, C.S.P.; Sailaja, A.; Suryanarayana, M.V.: Spectrophotometric determination of pindolol and captopril with metol - chromium(VI). *Indian Drug.* 28(1990): 45-47; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 5305G00063
47. Zakhari, N.A.; Hassan, S.M.; El-Shabrawy, Y.: Diazotized 4-nitroaniline as a chromogenic reagent for the determination of indole derivatives in certain pharmaceutical preparations. *Anal. Lett.* 22 (1989): 3011-3024.
48. Banerjee, S.K.; Mashru, R.: Rapid colorimetric determination of pindolol. *Indian J. Pharm. Sci.* 51(1989):74-75; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č.5203E00047
49. Guerret, M.; Lavene, D.; Kiechel, J.R.: Determination of pindolol in biological fluids by electron-capture g.l.c. *J. Pharm. Sci.* 69 (1980): 1191-1193; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 4005D00100
50. Abdel-Hamid, M.E.; Phillips, O.A.: LC-MS-MS determination of carbamazepine, pindolol, and theophylline in human serum. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26(2003): 1937-1957.
51. Lazova, O.; Iovcev, I.: Spectrophotometric determination of clopamide and pindolol in Viscaldix tablets by standard-mixture calibration. *Anal. Lab.* 7 (1998): 223-226; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 6111G00098
52. Banerjee, S.K.; Mashru, R.: Rapid colorimetric determination of pindolol in dosage forms. *Indian J. Pharm. Sci.* 53 (1991): 70-71; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 6111G00098
53. Issa, A.S.; Mahrous, M.S.; Abdel-Salam, M.; Soliman, N.: Use of 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone for the spectrophotometric determination of some cardiovascular drugs. *Talanta* 34(1987): 670-672.

54. Tawakkol, M.S.; Mohamed, M.E.; Aboul-Enein, H.Y.: Determination of pindolol in pharmaceutical formulations by gas chromatography. *Chromatographia* 14 (1981): 587-588
55. Takagishi, Y.; Ogura, T.; Tomita, K.; Ohkubo, Y.; Sakamoto, T.: Determination of pindolol in plasma and urine by high-pressure liquid chromatography. *Yakugaku-Zasshi*. 101 (1981): 190-193; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 4104D00116
56. Guerret, M.: Determination of pindolol in biological fluids by an electron-capture gas - liquid chromatographic method on a wall-coated open-tubular column. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 10(1980): 387-392; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 4101D00069
57. Bangah, M.; Jackman, G.; Bobik, A.: Determination of pindolol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 9(1980): 255-259; in *Anal. Abstr.*, abstrakt č. 4004D00111
58. Mahrous, M.S.; Issa, A.S.; Abdel-Salam, M.A.; Soliman, N.: Spectrophotometric determination of some cardiovascular drugs using p-chloranilic acid. *Anal. Lett.* 19(1986): 901-914.
59. Issa, Y.M.; Amin, A.S.: Conductometric titration of pindolol and propranolol using ammonium reineckate and potassium tetracyanonickelate. *Mikrochim. Acta* 118(1995): 85-91.
60. Martin Ořapka: Vývoj software pro automatickou optimalizaci operačních parametrů v sekvenční injekční analýze [Diplomová práce]. Hradec Králové 2003. Univerzita Karlova. Fakulta farmaceutická.
61. Eckschlager, K.: Chyby chemických rozborů. SNTL Praha 1971, s. 134 a 139.
62. The United States Pharmacopoeial Convention: *United States Pharmacopoeia XXVI*. Rockville, USA, 2002.