

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>4</b>
1.1. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....	5
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>6</b>
2.1. BOPINDOLOL .....	7
2.1.1. <i>Charakteristika bopindololu.....</i>	<i>7</i>
2.1.2. <i>Známé metody stanovení bopindololu.....</i>	<i>8</i>
2.1.2.1. Průtokové metody .....	8
2.1.2.2. Chromatografické metody .....	9
2.2. CHEMILUMINISCENCE .....	10
2.2.1. <i>Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí.....</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Faktory ovlivňující chemiluminiscenční emisi .....</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>Charakteristiky chemiluminiscence jako analytické techniky .....</i>	<i>12</i>
2.3. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA (SIA) .....	14
2.3.1. <i>Princip metody .....</i>	<i>14</i>
2.3.2. <i>Konfigurace SIA systému .....</i>	<i>15</i>
2.3.3. <i>Porovnání metod SIA a FIA.....</i>	<i>16</i>
2.3.4. <i>Využití metody SIA .....</i>	<i>17</i>
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>18</b>
3.1. POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ .....	19
3.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	19
3.2.1. <i>Základní a pracovní roztoky .....</i>	<i>20</i>
3.3. POUŽITÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM .....	23
3.4. OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ .....	24

3.4.1. <i>Výběr vhodného léčiva</i> .....	24
3.4.2. <i>Optimalizace jednotlivých parametrů</i> .....	24
3.4.2.1. Struktura měřicího cyklu .....	24
3.4.2.2. Použitá rozpouštědla.....	25
3.4.2.3. Koncentrace činidel .....	25
3.4.2.4. Objemy činidel a průtoková rychlost .....	25
3.5. STANOVENÍ ANTAZOLINU .....	26
3.5.1. <i>Příprava kalibračních roztoků</i> .....	26
3.5.1.1. Prostředí 60% (V/V) methanolu .....	26
3.5.1.2. Prostředí 60% (V/V) ethanolu .....	27
3.5.2. <i>Měření kalibrační závislosti</i> .....	27
3.5.3. <i>Opakovatelnost měření</i> .....	28
3.5.4. <i>Stanovení obsahu v léčivém přípravku</i> .....	28
3.5.4.1. Stanovení obsahu metodou SIA .....	28
3.5.4.2. Stanovení obsahu srovnávací izotachoforetickou metodou .....	29
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>30</b>
4.1. OPTIMALIZACE METODY .....	31
4.1.1. <i>Určení základních parametrů</i> .....	31
4.1.2. <i>Výsledky optimalizace</i> .....	31
4.1.2.1. Struktura měřicího cyklu .....	31
4.1.2.2. Výběr léčiva vhodného pro chemiluminiscenční stanovení .....	32
4.1.2.3. Vliv obsahu methanolu .....	33
4.1.2.4. Vliv obsahu ethanolu .....	34
4.1.2.5. Vliv koncentrace činidel .....	36
4.1.2.6. Objemy činidel .....	39
4.1.2.6.1. <i>Optimalizované koncentrace činidel</i> .....	39
4.1.2.6.2. <i>Koncentrovanější roztoky činidel</i> .....	41
4.1.2.6.3. <i>Nižší koncentrace činidel</i> .....	42
4.1.2.7. Objem vzorku .....	44

4.2.	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI .....	45
4.2.1.	<i>Kalibrační závislost v prostředí 60% methanolu .....</i>	<i>45</i>
4.2.2.	<i>Kalibrační závislost v prostředí 60% ethanolu .....</i>	<i>48</i>
4.3.	OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ .....	49
4.4.	STANOVENÍ BOPINDOLOLU V HROMADNĚ VYRÁBĚNÉM LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU .....	52
4.4.1.	<i>Hmotnostní stejnoměrnost tablet dle ČL 2002 .....</i>	<i>52</i>
4.4.2.	<i>Vlastní stanovení obsahu bopindololu v léčivém přípravku .....</i>	<i>53</i>
4.4.2.1.	Stanovení obsahu metodou SIA .....	53
4.4.2.2.	Stanovení obsahu bopindololu v tabletách Sandonorm metodou kapilární izotachoforézy .....	54
4.4.3.	<i>Statistické srovnání metody SIA s kapilární izotachoforézou .....</i>	<i>55</i>
4.4.4.	<i>Obsahová stejnoměrnost tablet dle ČL 2002 .....</i>	<i>56</i>
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>62</b>

# **1. ÚVOD**

## 1.1. Úvod a cíl práce

Sekvenční injekční analýza (SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik. Vyvinula se z průtokové injekční analýzy na počátku devadesátých let a od té doby dochází k jejímu neustálému rozvoji. Od jejího zavedení byla publikována řada prací týkajících se stanovení běžných anorganických iontů a organických látek, včetně léčiv. Uplatnění nalézá při kontrole kvality životního prostředí, potravin, léčiv, při analýze toxických látek. Ve farmacii se též uplatňuje při hodnocení déletrvajících stabilitních studiích nebo zjišťování rychlosti uvolňování účinné látky z dané lékové formy.

Vzhledem k rychlosti, jednoduchosti, flexibilitě a plné automatizaci je vhodným prostředkem v případech analýzy velké série vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí. Výhodou je též možnost využití jakéhokoli způsobu detekce, s ohledem na použitý reakční systém.

Cílem mé rigorózní práce bylo vybrat vhodné léčivo, optimalizovat metodu jeho stanovení sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí a následně tuto metodu využít ke stanovení léčiva v hromadně vyráběném léčivém přípravku.

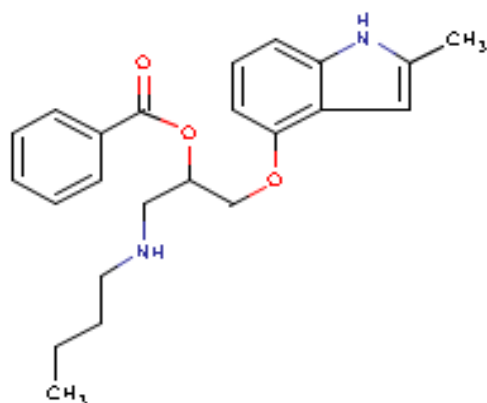
## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. Bopindolol

### 2.1.1. Charakteristika bopindololu

#### Farmakologické vlastnosti:

Bopindolol patří do skupiny tzv. neselektivních beta-blokátorů, tj. léčiv, které blokují účinky sympatické nervové stimulace a sympatomimetik nejen na  $\beta_1$  receptorech myokardu, ale i  $\beta_2$  receptorech v bronších, cévách a tukové tkáni. Tím způsobují nejen snížení srdeční frekvence, snížení kontraktility myokardu a snížení srdeční dráždivosti, ale i bronchokonstrikci, vaokonstrikci či zvýšení lipoproteinémie. Bopindolol se též vyznačuje mírnou vnitřní sympatomimetickou aktivitou, což je schopnost v určitém rozsahu  $\beta$ -adrenergní receptory stimulovat a tím bránit výrazné bradykardii, vazokonstrikci či metabolickým účinkům. Terapeutický význam spočívá především v léčbě různých forem ischemické choroby srdeční, arteriální hypertenze, arytmií<sup>1,2)</sup>



Obrázek č.1: Vzorec bopindololu

V současnosti je v České republice registrován jediný přípravek s obsahem bopindololu: Sandonorm<sup>3)</sup>.

Bopindolol není uveden v Českém lékopise, ani v jiných dostupných lékopisech<sup>4,5,6)</sup>.

## 2.1.2. Známé metody stanovení bopindololu

### 2.1.2.1. Průtokové metody

#### Metoda sekvenční injekční analýzy (SIA)

Dosud nebyla zveřejněna žádná původní práce, která by se zabývala stanovením bopindololu metodou SIA s využitím chemiluminiscenční detekce ani technikou SIA obecně.

#### Metoda průtokové injekční analýzy (FIA)

Publikována byla práce zabývající se stanovením bopindololu pomocí této metody:

*Meireles, Sklenářová, Satinský, Solich a Araujo* popsali stanovení bopindololu s využitím průtokové injekční metody spojené s extrakcí na pevné fázi. Tato metoda popisuje stanovení bopindololu s využitím FIA techniky se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 635 nm. Metoda je založena na produkci zeleného, ve vodě rozpustného komplexu s ionty železa v kyselém prostředí. Automatizovaný FIA systém umožňuje přímé stanovení bopindololu v tabletách. Bopindolol byl adsorbován na pevnou fázi v minikoloně přímo integrované do průtokového systému. S pomocí extrakce na pevné fázi byl bopindolol stanoven s lineárním rozmezím 125 až 1000  $\mu\text{g/ml}$ , relativní směrodatnou odchylkou 1,87 % a detekčním limitem 70  $\mu\text{g/ml}$ . Metoda byla aplikována na stanovení bopindololu v přípravku Sandonorm tablety. Obdržené výsledky byly srovnány s metodou HPLC, přičemž obě metody poskytly srovnatelné výsledky <sup>7)</sup>.

#### Metoda kapilární izotachoforézy (ITP)

*Urbánek, Pospíšilová a Polášek* publikovali stanovení bopindololu v hromadně vyráběných léčivých přípravcích pomocí kapilární izotachoforézy s konduktometrickou detekcí. Elektrolytový systém byl složen z 5 mM pikolinátu draselného a 5 mM kyseliny pikolinové jako vedoucího elektrolytu (pH 5,37) a 10 mM kyseliny mravenčí jako terminálního elektrolytu. Hodnoty separačního a detekčního proudu byly 50  $\mu\text{A}$  (po dobu 350 s) a 10  $\mu\text{A}$ . Analýza trvala přibližně 12 min. Za těchto podmínek byla stanovena efektivní pohyblivost bopindololu s využitím tetraethylamonia jako mobilní fáze. Kalibrační graf vyjadřující závislost délky zóny na koncentraci bopindololu byl lineární v rozmezí 10 – 100  $\text{mg/l}$ . Metoda je vhodná pro stanovení bopindololu v přípravku Sandonorm tablety s relativní směrodatnou odchylkou 1,45 % (n=6). Podle validačního procesu založeného na metodě standardního přídavku byl výtěžek 97,3 % <sup>8)</sup>.



### 2.1.2.2. Chromatografické metody

**Grobuschek, Schmid, Koidl a Guebitz** popsali chirální separaci aminokyselin, léčiv s aminoalkoholovou skupinou i jiných léčiv pomocí kapilární elektrochromatografie (CEC) a mikro-HPLC s využitím teikoplanin aglykonu jako stacionární fáze. Aglykon teikoplaninu ukazuje rozdílné separační chování ve srovnání se samotným teikoplaninem jako stacionární fáze. Selektor je vázán na silikagelu a separace probíhá na reverzních fázích či polárním organickém médiu. Tato chirální stacionární fáze vykazuje vysokou enantiosektivitu zvláště pro aminokyseliny. Touto metodou bylo zkoumáno 22 různých beta-blokátorů<sup>9)</sup>.

**Steuer, Baumann a Erni** publikovali separaci ionizovaných látek superkritickou fluidní chromatografií (SFC). Separace jsou popsány u isradipinu a jeho produktů, bopindololu a jeho prekurzoru a degradačního produktu, spiraprilu a jeho produktů a u kyseliny benzoové, hydroxybenzoové, tropové a salicylové pomocí SFC. Diskutována jsou omezení této separační techniky ve srovnání s HPLC<sup>10)</sup>.

**Perkins, Tattrie, Johnson a Rabin** se zabývali HPLC separací a coulometrickou detekcí metabolitů bopindololu v lidské plazmě. Plazma byla smíchána s 1 M NaOH a vnitřním standardem (N-izopropyl analog metabolitu) za přidání směsi heptan - izoamylalkohol. Po promíchání a centrifugaci byla část organické fáze zpětně extrahována 0,1 M kyselinou octovou. Část vodné fáze byla analyzována HPLC s elektrochemickou detekcí. Mobilní fází byl 30% methanol v 0,03 M fosfátu draselném (pH 2,2). Kalibrační graf byl lineární v rozmezí 0,5 až 20 ng/ml, detekční limit byl 0,25 ng/ml. Výtěžek se pohyboval kolem 77%. Metoda byla aplikována ve farmakokinetických studiích<sup>11)</sup>.

**Humbert, Denouel a Keller** publikovali stanovení hydrolyzovaného bopindololu [4-(2-benzoyloxy-3-t-butylaminopropoxy)-2-methylindol hydrogenmalonátu] v lidské plazmě kolonovou kapalinovou chromatografií s catridge extrakcí a elektrochemickou detekcí. Plazma byla smíchána s roztokem mepindololu (vnitřní standard) a NaOH, směs byla centrifugována a supernatant vpraven na kolonu. Po eluci heptan-izoamylalkoholem a zpětné extrakci kyselinou octovou byl podíl vodné fáze injikován na kolonu. Mobilní fází tvořila směs vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného s methanolem (7:3). Celková analýza vzorku trvala 14 min. Detekční limit byl 25 – 50 pg/ml.<sup>12)</sup>

**Kuesters a Giron** popsali chirální separaci pindololu a bopindololu s využitím chirálních imobilizovaných proteinů jako stacionárních fází. Separace enantiomerů bopindololu probíhala na koloně s mobilní fází tvořenou směsí 0,1 M hydrogenfosforečnanu sodného, 0,1 M dihydrogenfosforečnanu sodného a 0,5 % propan-2-olu. Pindolol byl převeden na derivát, který byl separován na stejné koloně mobilní fází 0,1 M hydrogenfosforečnan sodný a 5%

propan-2-ol. Detekce probíhala při vlnové délce 220 nm. Identita substancí byla potvrzena GC-MS <sup>13)</sup>.

*Oddie, Jackman a Bobik* popsali analýzu bopindololu a jeho aktivního metabolitu v lidské plazmě metodou HPLC. Bližší informace o parametrech a validaci metody nebyly vyhledatelné <sup>14)</sup>.

*Perrin, Vanden-Heyden, Maftough a Massart* se zabývali rychlým screeningem pro chirální separaci pomocí kapilární elektroforézy s využitím vysoce sulfatovaných cyklodextrinů jako chirálních selektorů. Metoda se zabývá screeningem chirálních sloučenin, zejména derivátů aminokyselin a fenylaminů, včetně bopindololu <sup>15)</sup>.

## 2.2. Chemiluminiscence

### 2.2.1. Mechanismus chemiluminiscenčních reakcí

Chemiluminiscence je definována jako emise elektromagnetického záření (ve viditelné, infračervené nebo ultrafialové oblasti) produkovaného chemickou reakcí, nejčastěji oxidací. Molekuly přijetím dostatečného množství energie při chemické reakci přecházejí do excitovaného stavu a při přechodu zpět do základního stavu produkují záření. Proces světelné emise v chemiluminiscenci je stejný jako u fotoluminiscence (fluorescence a fosforescence), liší se však procesem excitace. V případě fotoluminiscence jsou molekuly emitující záření elektronicky excitovány absorpcí záření, zatímco v chemiluminiscenci není využíván žádný světelný zdroj.

Chemiluminiscenční reakce mohou probíhat dvěma základními principy:

*Přímá chemiluminiscence:*

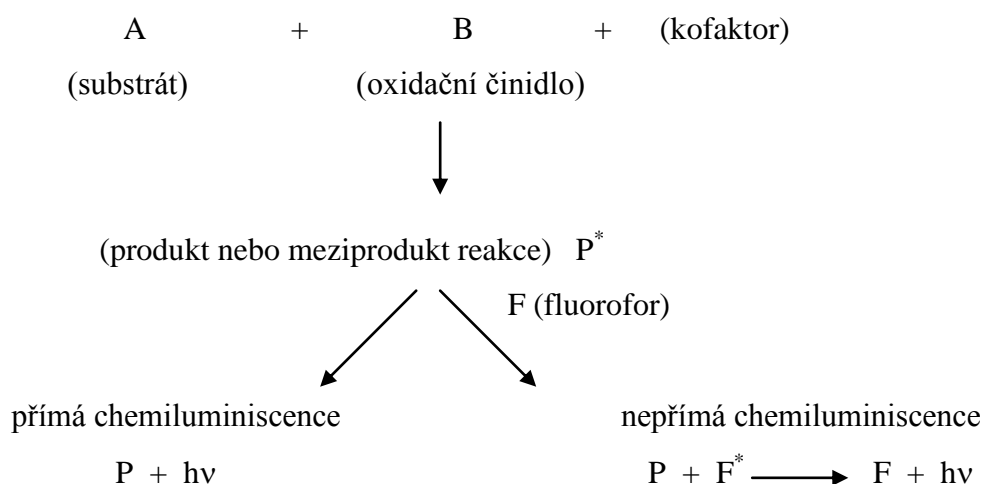
Jedná se o reakci dvou činidel, substrátu a oxidačního činidla, za tvorby produktu nebo meziprojektu. Frakce tohoto produktu nebo meziprojektu je schopna vytvářet elektronicky excitovaný stav, který následně přechází do základního stavu za emise fotonu.

Reakce může probíhat za přítomnosti kofaktoru či katalyzátoru. Substrátem je chemiluminiscenční prekurzor schopný konverze na elektronicky excitovanou molekulu a odpovědný za světelnou emisi, nebo účinkující jako donor energie v nepřímé chemiluminiscenci. Katalyzátor, enzym nebo kovový ion, zajišťuje adekvátní prostředí pro vysokou chemiluminiscenční účinnost. Kofaktory jsou někdy nezbytné ke konverzi jednoho nebo více substrátů na formu schopnou reakce.

### *Nepřímá chemiluminiscence:*

Tento typ chemiluminiscence je založen na přenosu energie excitované složky na fluorofor. Tento proces umožňuje molekulám, neschopným přímé chemiluminiscence, poskytnout přebytek jejich energie fluoforu, který je následně excitován za emise fotonu při návratu do základního stavu.

*Obrázek č.2: Schéma průběhu chemiluminiscenčních reakcí*



### *Požadavky na chemiluminiscenční emisi:*

Aby mohlo dojít v průběhu chemické reakce k emisi záření, je nezbytné, aby tato reakce byla exotermická, tj. aby mohla produkovat dostatečné množství energie potřebné k dosažení excitovaného stavu molekuly. Pro luminiscenci ve viditelné oblasti (400-750 nm) musí být uvolněno 40-70 kcal/mol, čehož lze docílit u určitých typů oxidačních reakcí.

### **2.2.2. Faktory ovlivňující chemiluminiscenční emisi**

Intenzita chemiluminiscence závisí na řadě parametrů:

#### ○ *Chemická struktura chemiluminiscenčního prekurzoru:*

Molekuly obsahující amino a hydroxy skupinu, stejně jako polycyklické aromatické systémy, mohou být snadno oxidovány. Na druhé straně elektrony odnímající skupiny směřují k stabilizaci elektronického náboje a činí oxidaci sloučenin, v nichž jsou obsaženy, obtížnější.

- *Povaha a koncentrace dalších substrátů ovlivňujících chemiluminiscenční reakci*
- *Katalyzátor, přítomnost kovových iontů*
- *Vlastnosti rozpouštědla a složení roztoku:*  
Rozpouštědlo, ve kterém CL experiment probíhá má velký vliv na účinnost CL reakce.
- *pH a iontová síla*
- *Teplota*
- *Zhášení chemiluminiscence:*  
Chemiluminiscence může být snížena nebo úplně eliminována interakcemi s ostatními chemickými složkami v procesu zhášení chemiluminiscence. Existují dva případy zhášení. Statické zhášení, kdy interakce mezi potenciálně lumineskující molekulou a zhášecem se uskutečňuje v základním stavu za tvorby nelumineskujícího komplexu. Druhým případem je dynamické zhášení, kdy zhášecí složka a potenciálně lumineskující molekula reagují během poločasu fluoreskující molekuly nebo později.
- *Energetický přenos:*  
Tento proces zahrnuje předání excitační energie jiné molekule molekulou v excitovaném stavu. Ztráta excitační energie z donorové složky rezultuje v zhášení luminescence donoru a může rezultovat v luminiscenci energetického příjemce (akceptoru).

### **2.2.3. Charakteristiky chemiluminiscence jako analytické techniky:**

Využití chemiluminiscenčních systémů v analytické chemii je založeno na některých charakteristikách:

- Poskytuje vysokou citlivost a nízké detekční limity
- Ve srovnání s fotoluminescencí není vyžadován žádný světelný zdroj, což má některé výhody jako např. absence rozptylu fotoluminiscenčních signálů , absence problémů vztažených k nestabilitě vnějšího zdroje, redukce interferencí způsobených neselektivním excitačním procesem, jednodušší zařízení.
- Citlivost a linearita jsou nejvíce ovlivněny reakcí a vybranými reakčními podmínkami.

- Technika má mnohostranné využití při stanovení rozmanitých látek, které se mohou účastnit chemiluminiscenčního procesu, tj. chemiluminiscenční substrát nebo prekursor; nezbytná činidla pro chemiluminiscenční reakci (obvykle oxidanty); složky ovlivňující rychlost nebo účinnost reakce – aktivátory (katalyzátory - enzymy nebo kovové ionty) nebo inhibitory (složky inhibující CL emisi); fluorofory v případě nepřímé CL; některé složky nepřímo zahrnuté v CL reakci, ale které mohou reagovat s jinými složkami za tvorby produktu, který je reaktantem v chemiluminiscenční reakci; složky, které mohou být derivatizovány některými chemiluminiscenčními prekuzory nebo fluorofory a stanoveny přímou nebo nepřímou chemiluminiscenční metodou.
- Podle povahy analytu a chemiluminiscenční reakce bude vzrůst nebo pokles chemiluminiscence přímo úměrný koncentraci analytu.
- Chemiluminiscenční reakce mohou být využity jako způsob detekce ve spojení s technikami chromatografie, kapilární elektroforézy nebo průtokové injekční analýzy.

Chemiluminiscenční chování určité látky lze očekávat, pokud sloučenina či její reakční produkt má fluorescenční vlastnosti. V tomto případě je pravděpodobné, že oxidace takovýchto složek bude produkovat chemiluminiscenční záření, ale existuje řada výjimek.

Během několika minulých let zájem užití chemiluminiscenčních systémů v analytické chemii značně vzrostl, hlavně v plynných a kapalných fázích, aplikace v pevné fázi jsou značně omezeny.

*Tabulka č.1: Běžné aplikace hlavních chemiluminiscenčních systémů*

<b>Typ fáze</b>	<b>Činidlo</b>	<b>Analyt</b>
Plynná	O <sub>3</sub>	Uhlovodíky, NO
Plynná	O <sub>3</sub> , po konverzi analytu na NO	Nitrosaminy
Plynná	H <sub>2</sub> plamen	Sloučeniny síry
Kapalná	Luminol a jeho deriváty	Kovové ionty a komplexy, oxidanty (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> ), inhibitory (Ag <sup>+</sup> , Ce <sup>4+</sup> , Ti <sup>4+</sup> ), látky produkující H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (např. glukóza), látky snadno oxidovatelné a stanovitelné nepřímo (např. karboxylové kyseliny)
Kapalná	Ru(bipy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	Alifatické aminy

Kapalná	Peroxyoxaláty	Oxidanty (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), fluorofory (polycyklické aromatické uhlovodíky), derivatizované sloučeniny s fluorofory (aminokyseliny, steroidy, alifatické aminy, karboxylové kyseliny)
Kapalná	Přímé stanovení s MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , ClO <sup>-</sup> , IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , atd.	Různé látky (obvykle obsažené ve farmaceutických přípravcích)
Pevná	O <sub>2</sub> , za tepla	Polymery

Vzhledem k tomu, že emise chemiluminiscenčního záření je často produkována oxidací mnoha organických sloučenin, měření této světelné emise může být použito jako indikátor změn složení materiálů způsobených oxidačními procesy, při hodnocení stabilizátorů určených pro prevenci nebo zpomalení těchto oxidačních změn. Příklady materiálů, které mohou být charakterizovány chemiluminiscenční emisí, jsou polymery, snadno podléhající degradaci vnějšími vlivy nebo složky potravin trpící změnami chuti či aroma <sup>16</sup>).

## 2.3. Sekvenční injekční analýza (SIA)

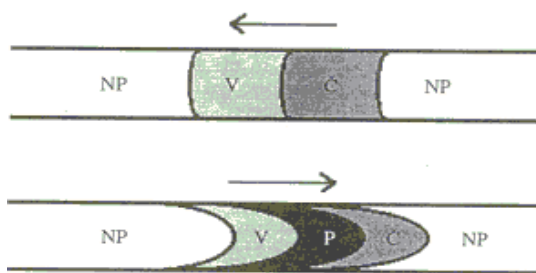
### 2.3.1. Princip metody

Sekvenční injekční analýza patří do skupiny průtokových analytických technik. Byla vyvinuta z průtokové injekční analýzy (FIA). Základem obou metod je převedení analyzované látky na detekovatelný (např. barevný) produkt reakcí s činidlem a změření vhodné analytické vlastnosti tohoto produktu při průtoku detektorem.

U metody FIA je zóna vzorku injikována do kontinuálního nosného proudu a mísí se s činidlem za vzniku produktu při plynulém průtoku jednotlivých zón vícekanálovým systémem směrem k průtokovému detektoru.

Metoda SIA je založena na oddělených měřicích cyklech. Nejprve jsou zóny média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednorázového systému za využití selektivního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Obrácením pohybu pístu dojde k promísení zóny vzorku a činidla a následnému dopravení vzniklého produktu do detektoru, čímž je jeden měřicí cyklus ukončen. Výsledkem odezvy detektoru je signál ve formě píku podobně jako u metody FIA. Jedná se o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu detektorem <sup>17,18</sup>).

Obrázek č.3: Zóny vzorku, činidla a produktu reakce v SIA systému před a po obrácení směru toku nosného proudu

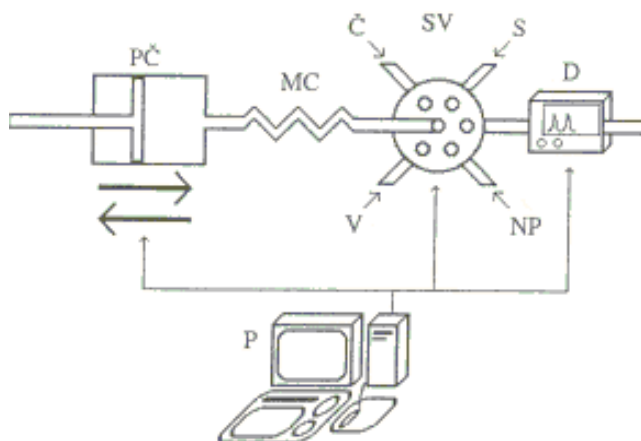


NP – nosný proud, V – vzorek, Č – činidlo, P – produkt reakce

### 2.3.2. Konfigurace SIA systému

Základní konfiguraci SIA systému tvoří jednokanálové dvousměrné čerpadlo, vícecestný selekční ventil, detektor, mísící cívka a spojovací materiál. SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je podmínkou k dosažení reprodukovatelné odpovědi detektoru. Nezbytnou součástí systému je PC s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a vyhodnocuje výstupní data.

Obrázek č.4: Schéma SIA systému



PČ – pístové čerpadlo, SV – selekční ventil, S – standard, Č – činidlo, NP – nosný proud, V – vzorek, MC – mísící cívka, D – detektor, P – počítač

Vstupní částí systému je čerpadlo, které generuje tok nosného proudu. Nejpoužívanější jsou pístová čerpadla řízená krokovým elektromotorem. Délka pohybu pístu je definována počtem jednotlivých kroků, rychlost pohybu pístu lze libovolně měnit.

Vícecestný selekční ventil, obvykle 6, 8 nebo 10-ti cestný, zajišťuje zapojení požadovaných roztoků do systému, jejich aspiraci a seřazení jednotlivých zón v mísící cívce. Synchronizace s pohybem čerpadla je řízena počítačem.

Mísící cívka umožňuje promíchání zón a též slouží jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla. Bývá řazena mezi čerpadlo a selekční ventil.

Detektor je volen podle druhu použité analytické reakce. Nejčastěji jsou využívány detektory spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické s příslušnými průtokovými celami.

Spojovacím materiálem umožňujícím spojení jednotlivých součástí jsou obvykle plastické hadičky o vnitřním průměru 0,7 až 0,8 mm<sup>17)</sup>.

### **2.3.3. Porovnání metod SIA a FIA**

Základní rozdíl mezi oběma metodami spočívá ve způsobu toku nosného proudu. Metoda FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco metoda SIA změny směru toku nosného proudu - přímý a zpětný tok.

Nevýhodou metody SIA oproti FIA je snížená frekvence dávkování vzorku způsobená časovou prodlevou při změně směru toku nosného proudu a nutnost používat počítačovou techniku a poměrně složité řídicí programy.

SIA metoda poskytuje řadu výhod. Analýza probíhá v jednobanálním uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem oproti vícekanálovému systému u FIA metody. SIA pracuje s malými objemy vzorků a činidel zastavením a změnou směru toku. Spotřeba činidel a vzorků je proto mnohem nižší než u FIA, kde jsou roztoky čerpány kontinuálně. Další výhoda spočívá v možnosti změnit parametry měření prostřednictvím počítače, bez zásahu do konfigurace SIA systému, což u FIA systému není možné<sup>17)</sup>.



#### **2.3.4. Využití metody SIA**

Vzhledem k rychlosti, flexibilitě a plné automatizaci je možno metodu SIA využít v případech nutnosti analyzování velké série vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí. Ve farmacii umožňuje nejen kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale také hodnocení déle trvajících stabilitních studií. Uplatnění nachází v technologii při zjišťování obsahové stejnoměrnosti účinné látky v přípravcích a rychlosti jejího uvolňování z lékové formy, ale též při monitorování hladin léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách, při analýze složek životního prostředí např. při stanovení některých anorganických iontů ve vodě za účelem kontroly její kvality. Na základě imunoanalytických reakcí a za přítomnosti speciálních detekčních cel umožňuje tato metoda stanovení protilátek, antigenů, inzulinu, theofylinu a dalších látek <sup>17)</sup>.

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### 3.1. Použitá zařízení

1. Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP
2. 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.
3. Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 s objemem 2,5 ml
4. Deseticestný selekční ventil VICI VALCO
5. Mísící cívka o objemu 1,2 ml z teflonové (PTFE) hadičky
6. Fluorimetrický průtokový detektor Schoeffel Instruments, model FS 970, USA
7. Spojovací materiál – hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,75 mm, Watrex Praha

Zařízení a přístroje č. 2-7 byly součástí sestavy průtokového systému SIA

8. Počítačem řízený ITP analyzátor Villa Labeco EA 100 (Spišská Nová Ves, SR) v jednokolonovém uspořádání; separační kopolymerová (etylenfluorid-propylenová) kapilára o délce 160 mm a průměru 0,3 mm s vodivostním detektorem a s dávkovacím kohoutem o objemu 30  $\mu$ l.

### 3.2. Použité chemikálie

- Atenolol, Sigma-Aldrich
- Clotrimazol
- Diltiazem hydrochlorid
- Tramadol hydrochlorid
- Nimesulid
- Indometacin
- Nefopam hydrochlorid, Sigma-Aldrich
- Cimetidin, Sigma-Aldrich
- Tolazolin hydrochlorid, Sigma-Aldrich
- Orfenadrin hydrochlorid, Sigma-Aldrich
- Acebutolol hydrochlorid, Sigma-Aldrich

- Verapamil hydrochlorid, Sigma-Aldrich
- Metoprolol tartarát, Sigma-Aldrich
- Bopindolol hydrogenmalonát, Léčiva, š. 9400701
- Endralazin mesilát, Slovakofarma, š. 83902-04
- Fenpiverin bromid
- Pitofenon chlorid
- Norepinefrin bitartrát hydrát, Sigma-Aldrich, š. 07005CQ
- Kyselina sírová 96% p.a., Lachema Brno
- Manganistan draselný p.a., Lachema Neratovice
- Hexametrafosfát p.a., Sigma-Aldrich
- Methanol, Sigma-Aldrich
- Ethanol 96% denaturovaný methanolem, Hobe Pardubice

### 3.2.1. Základní a pracovní roztoky

Pro přípravu všech roztoků byla používána vysoce čistá, deionizovaná voda, připravovaná na Katedře analytické chemie systémem Millipore Mill-Q RG. Zásobní roztok manganistanu draselného byl uchováván v chladu a temnu. Pracovní roztoky byly připravovány vždy před měřením.

Do odměrných baněk byly připraveny následující roztoky:

- Zásobní roztoky testovaných léčiv:

***Acebutolol hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0186 g doplněním vodou do 50 ml.

***Atenolol*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0133 g doplněním vodou do 50 ml.

***Bopindolol hydrogenmalonát*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0242 g doplněním vodou do 50 ml.

***Cimetidin*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0126 g doplněním vodou do 50 ml.

***Clotrimazol*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0172 g doplněním vodou do 50 ml.

***Diltiazem hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0225 g doplněním vodou do 50 ml.

***Endralazin mesilát*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0183 g doplněním vodou do 50 ml.

***Fenpiverin hydrogenbromid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0208 g doplněním vodou do 50 ml.

***Indometacin*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0179 g doplněním vodou do 50 ml.

***Metoprolol tatrát*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0342 g doplněním vodou do 50 ml.

***Nefopam hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0145 g doplněním vodou do 50 ml.

***Nimesulid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0154 g doplněním vodou do 50 ml.

***Norepinefrin bitatrát hydrát*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0169 g doplněním vodou do 50 ml.

***Orfenadrin hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0153 g doplněním vodou do 50 ml.

***Pitofenon hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0202 g doplněním vodou do 50 ml.

***Tramadol hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0149 g doplněním vodou do 50 ml.

***Tolazolin hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0098 g doplněním vodou do 50 ml.

***Verapamil hydrochlorid*** o koncentraci 1 mM z navážky 0,0246 g doplněním vodou do 50 ml.

- Zásobní roztok kyseliny sírové o koncentraci 1 M z 13,95 ml 96% kyseliny sírové do 250 ml.
  - Zásobní roztok manganistanu draselného o koncentraci 1 mM z navážky 0,0395 g do 250 ml.
  - Zásobní roztok hexametafosfátu 100 mM z navážky 12,8548 g do 100 ml.
- Pracovní roztoky kyseliny sírové byly připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 1 M vodou do 10 ml odměrné baňky. Výsledné koncentrace a použité objemy zásobního roztoku jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka č.2: Ředění zásobního roztoku kyseliny sírové

Koncentrace pracovního roztoku [mol/l]	Objem zásobního roztoku [ml]
0,1	1
0,2	2
0,3	3
0,4	4
0,5	5
0,6	6
0,7	7
0,8	8
0,9	9

- Pracovní roztoky manganistanu draselného byly připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 1 mM vodou do 10 ml odměrné baňky. Výsledné koncentrace a použité objemy zásobního roztoku jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka č.3: Ředění zásobního roztoku manganistanu draselného

Koncentrace pracovního roztoku [mM]	Objem zásobního roztoku [ml]
0,1	1
0,2	2
0,3	3
0,4	4
0,5	5
0,6	6
0,7	7
0,8	8
0,9	9

- Pracovní roztoky hexametafosfátu byly připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 100 mM vodou do 10 ml odměrné baňky. Výsledné koncentrace a použité objemy zásobního roztoku jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka č.4: Ředění zásobního roztoku hexametafosfátu

Koncentrace pracovního roztoku [mM]	Objem zásobního roztoku [ml]
10	1
20	2
30	3
40	4
50	5
60	6
70	7
80	8
90	9

- Pracovní roztoky jednotlivých léčiv o koncentraci 0,1 mM byly připraveny naředěním 2,5 ml zásobního roztoku o koncentraci 1 mM vodou ve 25 ml odměrné baňce.

### 3.3. Použitý průtokový systém

Pro optimalizaci a následné stanovení léčiva byl použit průtokový SIA systém řízený počítačem s fluorimetrickým detektorem, upraveným pro měření chemiluminiscence.

Schéma viz obr.č.4 str.15:

1 – hexametafosfát jako zesilovač chemiluminiscence, 2 – vzorek léčiva, 3 – kyselina sírová, 4 – manganistan draselný, 5 – demineralizovaná voda jako nosný proud.

Provedení měřicího cyklu: ventil pístové pumpy byl nejprve přepnut do polohy IN umožňující nasátí nosného proudu. Po přepnutí ventilu do polohy OUT následovala aspirace objemů vzorku a jednotlivých činidel prostřednictvím deseticestného selekčního ventilu do nádržové cívky (holding coil) v následujícím pořadí: hexametafosfát, vzorek léčiva, kyselina sírová a manganistan draselný. Změnou pohybu pístu došlo k promísení reakčních zón a k dopravení vzniklého produktu do detektoru. Následovalo promytí systému nosným proudem.

Z fotonásobiče chemiluminiscenčního detektoru byla odezva převedena v počítači na data a zpracována ve formě grafického záznamu s následným vyhodnocením pomocí programu FaF SIA 1.0. Modul tohoto programu s názvem Peak detection vyhodnocoval výšku píku resp. plochu pod píkem. Tyto hodnoty jsou přímo úměrné intenzitě resp. sumě chemiluminiscence a tím i koncentraci stanovené látky ve vzorku.

### **3.4. Optimalizace metody stanovení**

Cílem optimalizace bylo zjistit vhodné podmínky pro stanovení vybraného léčiva metodou sekvenční injekční analýzy a docílit co nejlepší odezvy detektoru a dobré reprodukovatelnosti výsledků. Základem stanovení byla reakce s manganistanem draselným v prostředí kyseliny sírové.

Optimalizovány byly:

- struktura měřicího cyklu
- koncentrace činidel (kyselina sírová, manganistan draselný, hexametafosfát)
- použítá rozpouštědla (voda, metanol, etanol)
- aspirované objemy činidel
- průtoková rychlost

#### **3.4.1. Výběr vhodného léčiva**

Jednotlivá léčiva byla testována za stejných podmínek. Cílem bylo zvolit léčivo, které vykazuje dostatečně intenzivní chemiluminiscenci při oxidaci roztokem manganistanu v kyselém prostředí, a následně vypracovat SIA metodu pro stanovení obsahu účinné látky v hromadně vyráběném léčivém přípravku.

#### **3.4.2. Optimalizace jednotlivých parametrů**

##### **3.4.2.1. Struktura měřicího cyklu**

Při optimalizaci byla používána následující struktura měřicího cyklu:

1. nasátí nosného proudu do pístové pumpy (konstantní objem 500  $\mu$ l demineralizované vody)
2. nasátí zesilovače chemiluminiscence
3. nasátí vzorku
4. nasátí kyseliny sírové
5. nasátí manganistanu draselného
6. vytlačení zón do detektoru
7. promytí systému nosným proudem



Napětí na fotonásobiči: 450 V (konstantní pro všechna následující měření)

K optimalizaci bylo používáno 30  $\mu\text{l}$  standardu léčiva o koncentraci 0,1 mM.

Jednotlivé objemy činidel byly upřesněny po nalezení optimálních koncentrací činidel.

### 3.4.2.2. Použitá rozpouštědla

Cílem bylo najít nejvhodnější prostředí pro rozpuštění vzorku při stanovení léčiva. Byl zkoušen vliv jednotlivých rozpouštědel, tj. methanolu a ethanolu, a jejich koncentrace na zesílení intenzity chemiluminiscence oproti vodnému prostředí.

### 3.4.2.3. Koncentrace činidel

Při optimalizaci koncentrace činidel byly hledány nejvhodnější hodnoty koncentrací kyseliny sírové, manganistanu draselného a hexametafosfátu. Rozsah testovaných koncentrací u jednotlivých činidel je uveden v tabulce.

Tabulka č. 5: Rozsah koncentrací jednotlivých činidel

Činidlo	Rozsah koncentrací [mol/l]
Kyselina sírová	0,1 – 1,0
Manganistan draselný	$0,1 \cdot 10^{-3}$ – $1,0 \cdot 10^{-3}$
Hexametafosfát	$10,0 \cdot 10^{-3}$ – $100,0 \cdot 10^{-3}$

### 3.4.2.4. Objemy činidel a průtoková rychlost

Pomocí metody SIMPLEX s využitím programu FaF SIA Optim 0.89 byly hledány nejvhodnější hodnoty aspirovaných objemů činidel ( kyseliny sírové, manganistanu draselného a hexametafosfátu) a průtokové rychlosti při vytlačování zón s produktem do detektoru, při nichž by byla dosažena co nejvyšší odezva detektoru a co nejlepší reprodukovatelnost.

Tabulka č.6: Rozsah dávkovaných objemů činidel a průtokových rychlostí

Činidlo	Objem činidla [ $\mu\text{l}$ ]	Průtoková rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]
Kyselina sírová	1 – 100	10 – 100
Manganistan draselný	1 – 100	10 – 100
Hexametafosfát	1 - 100	10 - 100

## 3.5. Stanovení bopindololu

### 3.5.1. Příprava kalibračních roztoků

#### 3.5.1.1. Prostředí 60% (V/V) methanolu

Základem pro přípravu kalibračních roztoků byl roztok bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Další roztoky pro měření kalibrační závislosti byly připravovány z tohoto roztoku naředěním 60% (V/V) methanolem do odměrných baněk.

Tabulka č.7: Ředění zásobního roztoku bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l pro přípravu kalibračních roztoků

Koncentrace kalibračního roztoku [mol/l]	Objem zásobního roztoku [ml]	Výsledný objem kalibračního roztoku [ml]
$1 \cdot 10^{-5}$	10,0	100
$1,5 \cdot 10^{-5}$	3,75	25
$2 \cdot 10^{-5}$	5,0	25

Další roztoky byly připraveny naředěním roztoku bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l.

Tabulka č.8: Ředění roztoku bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l pro přípravu kalibračních roztoků

Koncentrace kalibračního roztoku [mol/l]	Objem roztoku o konc. $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l [ml]	Výsledný objem kalibračního roztoku [ml]
$1 \cdot 10^{-6}$	1,0	10
$2 \cdot 10^{-6}$	2,0	10
$4 \cdot 10^{-6}$	4,0	10
$6 \cdot 10^{-6}$	6,0	10
$8 \cdot 10^{-6}$	8,0	10

### 3.5.1.2. Prostředí 60% (V/V) ethanolu

Základem pro přípravu kalibračních roztoků byl roztok bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l připravený ze zásobního roztoku bopindololu naředěním 60% (V/V) ethanolem do odměrné baňky. Další roztoky pro měření kalibrační závislosti byly připravovány z tohoto roztoku naředěním 60% (V/V) ethanolem do odměrných baněk.

Tabulka č.9: Ředění roztoku bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l pro přípravu kalibračních roztoků

Koncentrace kalibračního roztoku [mol/l]	Objem roztoku o konc. $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l [ml]	Výsledný objem kalibračního roztoku [ml]
$1 \cdot 10^{-6}$	1,0	10
$1,5 \cdot 10^{-6}$	1,5	10

Tabulka č.10: Ředění roztoku bopindololu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l pro přípravu kalibračních roztoků

Koncentrace kalibračního roztoku [mol/l]	Objem roztoku o konc. $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l [ml]	Výsledný objem kalibračního roztoku [ml]
$1 \cdot 10^{-7}$	1,0	10
$2 \cdot 10^{-7}$	2,0	10
$4 \cdot 10^{-7}$	4,0	10
$6 \cdot 10^{-7}$	6,0	10
$8 \cdot 10^{-7}$	8,0	10

### 3.5.2. Měření kalibrační závislosti

Při měření kalibrační závislosti (závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci bopindololu) byl použit stejný průtokový systém jako při optimalizaci metody stanovení. Měření u jednotlivých kalibračních roztoků probíhalo při nalezených optimalizovaných podmínkách pro dané koncentrace a objemy činidel a dané rozpouštědlo. Získané hodnoty byly zpracovány graficky pomocí programu Microsoft Excel 2000.

### 3.5.3. Opakovatelnost měření

Pro vyjádření hodnot opakovatelnosti bylo využíváno hodnot relativní směrodatné odchylky, která byla zjištěna provedením třech sérií po 15 měřeních. Měření bylo prováděno s využitím stejného průtokového systému a za stejných podmínek, jaké byly použity pro následné stanovení obsahu. Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byla vypočítána s použitím uvedených vzorců <sup>19)</sup>:

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

### 3.5.4. Stanovení obsahu bopindololu v léčivém přípravku

#### 3.5.4.1. Stanovení obsahu metodou SIA

Obsah bopindololu byl stanoven v přípravku:

*Sandonorm* tablety ( Léčiva a.s. Praha, Česká republika v licenci Novartis AG,  
Basilej, Švýcarsko)

Obsah účinné látky:

Bopindolol hydrogenmalonát 1 mg v 1 tableť

Ke stanovení byla použita metoda vnějšího standardu, kterým byl roztok bopindololu o vhodné koncentraci odpovídající přibližně polovině intervalu, v němž je závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci bopindololu lineární.

Stanovení bylo provedeno při nalezených optimálních podmínkách v průtokovém systému, a to v prostředí 60% (V/V) methanolu. Prostředí 60% ethanolu, jako zesilovače intenzity chemiluminiscence, by bylo výhodnější u přípravků s nižším obsahem účinné látky.

Po změření intenzity chemiluminiscence standardu byla stejným způsobem změřena intenzita chemiluminiscence připraveného vzorku.

Před vlastním stanovením bylo nutné vzorky upravit. Odvážené množství tabletové drti odpovídající průměrné hmotnosti jedné tablety bylo v odměrné baňce rozpuštěno v 60% methanolu a doplněno stejným rozpouštědlem po značku. Každý vzorek bylo nutné zfiltrovat a 10-krát zředit pro získání koncentrace ležící přibližně v polovině rozsahu koncentrací kalibrační křivky.

#### **3.5.4.2. Stanovení obsahu bopindololu srovnávací isotachoforetickou metodou**

Pro ověření správnosti výsledků získaných SIA chemiluminiscenční metodou byla provedena srovnávací analýza tablet Sandonorm dříve publikovanou isotachoforetickou metodou <sup>8)</sup>.

## **4. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 4.1. Optimalizace metody

Cílem bylo najít optimální podmínky pro stanovení vybraného léčiva v léčivém přípravku sekvenční injekční analýzou s využitím chemiluminiscenční detekce.

### 4.1.1. Určení základních parametrů

Jako základní podmínky pro měření byly zvoleny:

Napětí na fotonásobiči:	<b>450 V</b>
Rozsah:	<b>0,5 <math>\mu</math>A</b>
Aspirované objemy:	<b>30 <math>\mu</math>l</b> zesilovače chemiluminiscence (hexametafosfát) <b>30 <math>\mu</math>l</b> roztoku standardu léčivé látky <b>30 <math>\mu</math>l</b> kyseliny sírové <b>20 <math>\mu</math>l</b> manganistanu draselného
Průtoková rychlost:	<b>100 <math>\mu</math>l/s</b>

#### Základní struktura měřicího cyklu pro optimalizaci:

1. nasátí nosného proudu do pístové pumpy
2. nasátí zesilovače chemiluminiscence
3. nasátí vzorku
4. nasátí kyseliny sírové
5. nasátí manganistanu draselného
6. vytlačení zón do detektoru
7. promytí systému nosným proudem

### 4.1.2. Výsledky optimalizace

#### 4.1.2.1. Struktura měřicího cyklu

Na základě testování byla navržena konečná struktura měřicího cyklu.

1	Syringe pump	Valve position	IN	
2	Syringe pump	Set flow rate [ $\mu$ l/s]	100	
3	Syringe pump	Aspirate [ $\mu$ l]	500	
4	Syringe pump	Valve position	OUT	
5	Multi port valve	Set valve position	1	Hexametafosfát
6	Syringe pump	Aspirate [ $\mu$ l]	30	
7	Multi port valve	Set valve position	2	Standard léčiva
8	Syringe pump	Aspirate [ $\mu$ l]	30	

9	Multi port valve	Set valve position	3	Kyselina sírová
10	Syringe pump	Aspirate [ $\mu$ l]	30	
11	Multi port valve	Set valve position	4	Manganistan draselný
12	Syringe pump	Aspirate [ $\mu$ l]	20	
13	Multi port valve	Set valve position	9	Detektor
14	Syringe pump	Set flow rate [ $\mu$ l/s]	100	
15	Syringe pump	Empty syringe		

#### 4.1.2.2. Výběr léčiva vhodného pro chemiluminiscenční stanovení

Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,2  $\mu$ A, 1,0  $\mu$ A
- Koncentrace standardu léčivé látky:  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l
- Koncentrace kyseliny sírové: 0,5 mol/l
- Koncentrace hexametafosfátu: 80 mmol/l
- Koncentrace manganistanu draselného: 1 mmol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.11: Naměřené hodnoty intenzit jednotlivých standardů léčivých látek v prostředí vody, 60% methanolu a 60% ethanolu

Standard léčiva o konc. $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	I [nA] ve vodném prostředí	I [nA] v prostředí 60% methanolu	I [nA] v prostředí 60% ethanolu	
			celková intenzita	intenzita po odečtení slepého pokusu
Acebutolol HCl	0	2,96	68,96	1,51
Atenolol	1,60	2,24	76,08	8,62
<b>Bopindolol hydrogenmalonát</b>	302,50	872,80	1159,77	1092,32
<b>Cimetidin</b>	31,97	19,34	268,44	200,99
Clotrimazol	0	2,40	75,28	7,83
Diltiazem HCl	0	3,20	78,15	10,70
<b>Endralazin mesilát</b>	576,94	181,25	- *)	-
Fenpiverin HBr	0	1,60	60,77	0
<b>Indometacin</b>	28,41	128,65	916,71	849,26
Metoprolol tartrát	0	1,68	65,42	0
Nefopam HCl	0	0	67,45	0
Nimesulid	0	1,60	76,20	8,75



<b>Norepinefrin bitartrát hydrát</b>	935,27	907,06	- *)	-
Orfenadrin HCl	0	1,60	71,03	3,58
Pitofenon HCl	0	3,20	64,14	0
Tramadol HCl	3,36	2,32	70,69	3,24
Tolazolin HCl	0	0	67,10	0
Verapamil HCl	2,48	2,64	79,04	11,59

\*) intenzita chemiluminiscence u testovaných roztoků léčiv převyšovala maximální měřitelnou hodnotu i při nejméně citlivém měřicím rozsahu detektoru

Z testovaných léčiv vykazovaly nejvyšší intenzitu chemiluminiscence následující látky: bopindolol hydrogenmalonát, cimetidin, endralazin mesilát, indometacin a norepinefrin bitartrát hydrát.

Pro následnou optimalizaci a stanovení v léčivém přípravku byl vybrán bopindolol hydrogenmalonát, jehož intenzita chemiluminiscence se z testovaných látek jeví jako nejvhodnější.

#### 4.1.2.3. Vliv obsahu methanolu

Rozsah testovaného obsahu methanolu: 10 – 90 % (V/V)

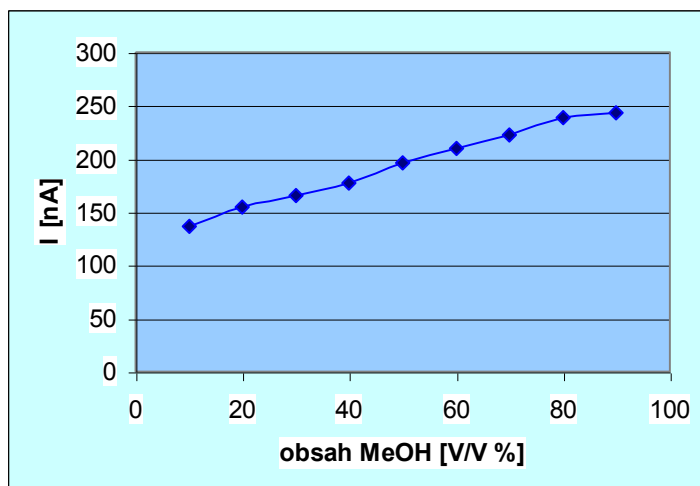
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Koncentrace standardu bopindololu:  $10^{-5}$  mol/l
- Koncentrace kyseliny sírové: 0,5 mol/l
- Koncentrace hexametafosfátu: 80 mmol/l
- Koncentrace manganistanu draselného: 1 mmol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.12: Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu methanolu

% MeOH [V/V]	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1.	0,6767	0,7801	0,8473	0,9066	0,9708	1,0307	1,1106	1,1627	1,2272
2.	0,7001	0,7783	0,8245	0,8753	0,9735	1,0526	1,0995	1,2016	1,2223
3.	0,6738	0,7730	0,8161	0,8783	0,9680	1,0328	1,1261	1,2190	1,2192
4.	0,6839	0,7673	0,8297	0,8846	0,9889	1,0730	1,0876	1,2000	1,2156
5.	0,6792	0,7699	0,8115	0,8889	1,0003	1,0450	1,1269	1,1719	1,1966
Ø	0,68	0,77	0,83	0,89	0,98	1,05	1,11	1,19	1,22
<b>I [nA]</b>	<b>136,6</b>	<b>154,8</b>	<b>165,2</b>	<b>177,4</b>	<b>196,1</b>	<b>209,4</b>	<b>222,0</b>	<b>238,2</b>	<b>243,2</b>
<b>S<sub>r</sub> [%]</b>	1,42	0,79	1,58	1,06	1,26	1,49	1,37	1,74	0,92

Graf č.1 : Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu methanolu



Intenzita chemiluminiscence stoupá se stoupajícím obsahem methanolu ve vzorku. Pro další měření byl vybrán 60% obsah methanolu, jelikož další zvyšování intenzity chemiluminiscence v závislosti na obsahu methanolu je méně výrazné.

Hodnota intenzity chemiluminiscence slepého pokusu byla zanedbatelná.

#### 4.1.2.4. Vliv obsahu ethanolu

Rozsah testovaného obsahu ethanolu: 10 – 90 % (V/V)

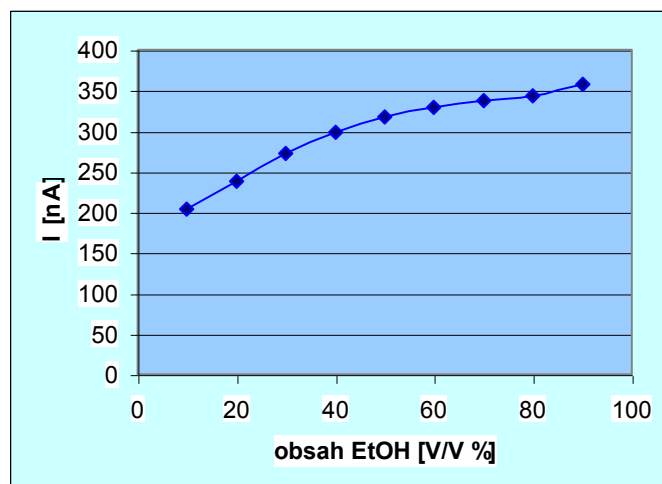
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 1,0  $\mu\text{A}$
- Koncentrace standardu bopindololu:  $10^{-6}$  mol/l
- Koncentrace kyseliny sírové: 0,5 mol/l
- Koncentrace hexametafosfátu: 80 mmol/l
- Koncentrace manganistanu draselného: 1 mmol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu\text{l/s}$

Tabulka č.13: Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu ethanolu

%EtOH [V/V]	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1.	0,5673	0,6910	0,8091	0,8652	0,9280	1,0167	1,0826	1,1627	1,2272
2.	0,5621	0,6786	0,7761	0,8556	0,9676	1,0252	1,1007	1,2016	1,2223
3.	0,5474	0,6693	0,7837	0,8761	0,9330	0,9988	1,0686	1,2190	1,2192
4.	0,5427	0,7055	0,7764	0,8821	0,9559	1,0090	1,0824	1,2000	1,2156
5.	0,5695	0,6888	0,7829	0,8619	0,9286	1,0042	1,0523	1,1719	1,1966
Ø	0,56	0,69	0,79	0,87	0,94	1,01	1,08	1,19	1,22
Ø po odečtení slep.pokusu	0,51	0,59	0,68	0,74	0,79	0,82	0,84	0,86	0,89
I [nA]	203,6	237,9	272,1	298,0	317,5	329,53	337,5	238,2	243,2
S <sub>r</sub> [%]	1,96	1,83	1,63	1,13	1,74	0,92	1,51	1,74	0,92

Graf č.2 : Závislost intenzity chemiluminiscence na obsahu ethanolu



Se stoupajícím obsahem ethanolu ve vzorku intenzita chemiluminiscence rovněž stoupá. Za optimální je možno považovat 60% obsah ethanolu, dalším zvyšováním obsahu se intenzita již výrazně nemění. Naměřené hodnoty signálu je třeba korigovat na signál slepého pokusu.

Tabulka č.14: Porovnání intenzit chemiluminiscence u jednotlivých rozpouštědel

Použitá rozpouštědla	voda	methanol 60% [V/V]	voda	ethanol 60% [V/V]
C vzorku [mol/l]	10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>	
I [nA]	61,8	209,4	8,9	329,5
Zvýšení intenzity CL	3,4x		37x	

V porovnání s vodným roztokem o stejné koncentraci analytu dochází za přítomnosti 60% methanolu přibližně k trojnásobnému zvýšení intenzity chemiluminiscence.

V případě 60% obsahu ethanolu ve vzorku je zvýšení intenzity chemiluminiscence přibližně 37-násobné v porovnání s vodným roztokem stejné koncentrace.

Zesílení intenzity chemiluminiscence vlivem obsahu ethanolu je možné využít při stanovení bopindololu ve vzorcích o velmi nízké koncentraci respektive v přípravcích s menším obsahem účinné látky. V mém případě však bylo výhodnější použít jako rozpouštědlo 60% methanol, protože citlivost detekce byla dostatečná a nebylo nutné korigovat signál detektoru na signál slepého pokusu.

#### 4.1.2.5. Vliv koncentrace činidel

##### Kyselina sírová

Rozsah testovaných koncentrací: 0,1 – 1,0 mol/l

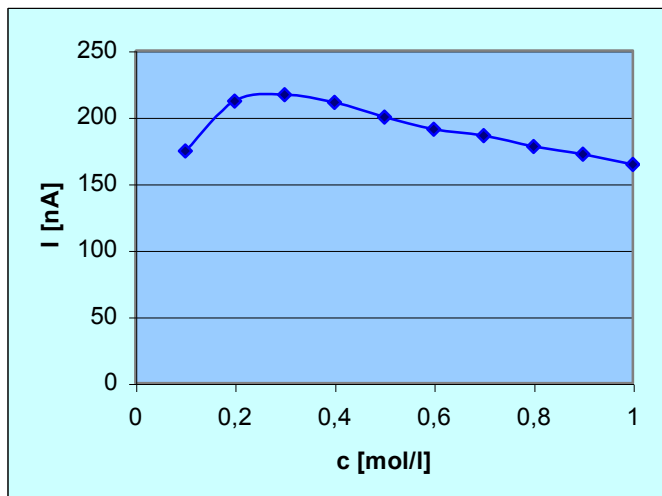
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Koncentrace standardu bopindololu v 60% methanolu:  $10^{-5}$  mol/l
- Koncentrace hexametafosfátu: 80 mmol/l
- Koncentrace manganistanu draselného: 1 mmol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.15 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci kyseliny sírové

C [mol/l]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
1.	0,8646	1,0579	1,0872	1,0289	1,0076	0,9511	0,9275	0,8862	0,8462	0,8317
2.	0,8806	1,0491	1,0809	1,0572	1,0066	0,9510	0,9231	0,9003	0,8700	0,8238
3.	0,8694	1,0705	1,0556	1,0620	1,0028	0,9586	0,9271	0,8779	0,8599	0,8075
4.	0,8805	1,0674	1,0957	1,0843	0,9942	0,9668	0,9416	0,8903	0,8603	0,8146
5.	0,8612	1,0527	1,0998	1,0426	0,9920	0,9443	0,9296	0,8957	0,8691	0,8372
Ø	0,87	1,06	1,08	1,05	1,00	0,95	0,93	0,89	0,86	0,82
I [nA]	<b>174,3</b>	<b>211,9</b>	<b>216,8</b>	<b>211,0</b>	<b>200,13</b>	<b>190,9</b>	<b>186,0</b>	<b>178,0</b>	<b>172,2</b>	<b>164,6</b>
S <sub>r</sub> [%]	0,92	0,78	1,43	1,77	0,64	0,80	0,68	0,87	0,99	1,32

Graf č.3 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci kyseliny sírové



Nejvyšší intenzitu signálu vykazuje bopindolol za přítomnosti kyseliny sírové o koncentraci 0,3 mol/l, dalším zvyšováním koncentrace se intenzita chemiluminiscence snižuje. Pro další měření byl vybrán roztok kyseliny sírové o koncentraci 0,3 mol/l.

Hodnota intenzity signálu u slepého pokusu byla zanedbatelná.

### **Manganistan draselný**

Rozsah testovaných koncentrací: 0,1 – 1,0 mmol/l

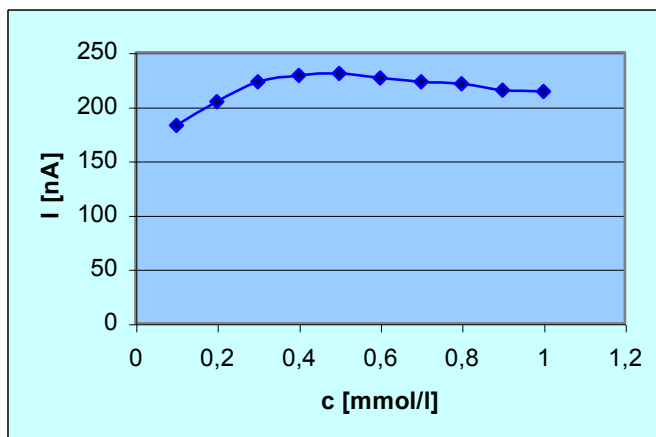
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Koncentrace standardu bopindololu v 60% methanolu:  $10^{-5}$  mol/l
- Koncentrace hexametafosfátu: 80 mmol/l
- Koncentrace kyseliny sírové: 0,3 mol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.16 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci manganistanu draselného

C [mmol/l]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
1.	0,9004	1,0004	1,1214	1,1301	1,1420	1,1371	1,1063	1,1136	1,0876	1,0656
2.	0,9267	1,0209	1,0971	1,1493	1,1540	1,1186	1,1173	1,0970	1,0665	1,0681
3.	0,8967	1,0327	1,1056	1,1346	1,1481	1,1452	1,1291	1,1096	1,0811	1,0548
4.	0,9050	1,0161	1,1268	1,1460	1,1626	1,1167	1,1222	1,1168	1,0656	1,0737
5.	0,9370	1,0457	1,1154	1,1512	1,1569	1,1257	1,0977	1,0910	1,0746	1,0848
Ø	0,91	1,02	1,11	1,14	1,15	1,13	1,11	1,11	1,08	1,07
I [nA]	182,6	204,6	222,7	228,5	230,5	226,1	222,9	221,1	215,0	213,9
S <sub>r</sub> [%]	1,77	1,53	1,01	0,76	0,66	0,97	1,09	0,98	0,91	0,92

Graf č.4: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci manganistanu draselného



Nejvyšší intenzita signálu byla dosažena u roztoku manganistanu draselného o koncentraci 0,5 mmol/l, dalším zvyšováním koncentrace již intenzita klesala. Pro další měření byl použit roztok o koncentraci 0,5 mmol/l.

Hodnota intenzity signálu u slepého pokusu byla zanedbatelná

### Hexametafosfát

Rozsah testovaných koncentrací:

10 – 100 mmol/l

Podmínky měření:

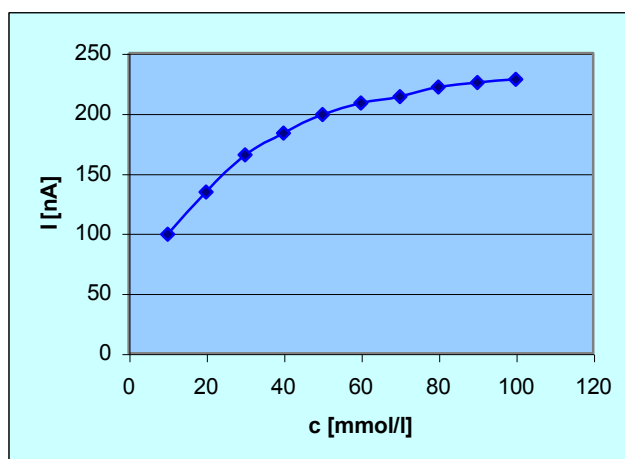
- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Koncentrace standardu bopindololu v 60% methanolu:  $10^{-5}$  mol/l
- Koncentrace kyseliny sírové: 0,3 mol/l

- Koncentrace manganistanu draselného: 0,5 mmol/l
- Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.17 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci hexametafosfátu

C [mmol/l]	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.	0,4911	0,6578	0,8350	0,9140	0,9945	1,0266	1,0688	1,0971	1,1159	1,1491
2.	0,4903	0,6829	0,8255	0,9104	0,9943	1,0346	1,0733	1,1018	1,1392	1,1498
3.	0,4978	0,6659	0,8259	0,9208	0,9980	1,0470	1,0872	1,1153	1,1286	1,1426
4.	0,4957	0,6761	0,8295	0,9246	0,9991	1,0494	1,0587	1,1239	1,1367	1,1356
5.	0,4973	0,6805	0,8116	0,9169	0,9873	1,0563	1,0553	1,1057	1,1267	1,1270
Ø	0,49	0,67	0,83	0,92	0,99	1,04	1,07	1,11	1,13	1,14
I [nA]	<b>98,9</b>	<b>134,5</b>	<b>165,1</b>	<b>183,5</b>	<b>198,9</b>	<b>208,6</b>	<b>213,7</b>	<b>221,8</b>	<b>225,7</b>	<b>228,2</b>
S <sub>r</sub> [%]	1,11	1,46	1,07	0,61	0,63	1,06	1,07	0,88	0,73	0,76

Graf č.5: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci hexametafosfátu



Se stoupající koncentrací hexametafosfátu se intenzita chemiluminiscence zvyšuje. Pro další měření jsem použila roztok hexametafosfátu o koncentraci 80 mmol/l, roztoky o vyšší koncentraci vykazovaly již nevýznamné zvýšení intenzity chemiluminiscence.

Hodnota intenzity signálu u slepého pokusu byla zanedbatelná.

#### 4.1.2.6. Objemy činidel

##### 4.1.2.6.1. Optimalizované koncentrace činidel

Při hledání optimálních hodnot objemů činidel byla využívána metoda simplexů s využitím programu FaF SIA Optim 0.89. Po zadání výchozích hodnot všech parametrů si

program již navrhuje další parametry sám podle dosaženého výsledku měření až do nalezení optimálních hodnot všech parametrů.

Optimální objemy činidel byly hledány při konstantní průtokové rychlosti 100  $\mu\text{l/s}$  za následujících podmínek:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu\text{A}$
- Standard bopindololu o konc.  $10^{-5}$  mol/l v 60% methanolu: 30  $\mu\text{l}$
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l: 1 – 100  $\mu\text{l}$
- Kyselina sírová o koncentraci 0,3 mol/l: 1 – 100  $\mu\text{l}$
- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l: 1 – 100  $\mu\text{l}$

*Tabulka č.18 : Dosažené hodnoty intenzity chemiluminiscence pro jednotlivé objemy činidel*

Číslo měření	Objem HMF [ $\mu\text{l}$ ]	Objem $\text{H}_2\text{SO}_4$ [ $\mu\text{l}$ ]	Objem $\text{KMnO}_4$ [ $\mu\text{l}$ ]	Hodnota signálu	Relat.směr. odchylka [%]	Intenzita CL [nA]
1.	55	53	32	0,7033	0,70	140,7
2.	45	53	32	0,6840	1,07	136,8
3.	50	44	32	0,7174	0,55	143,5
4.	50	50	24	0,8417	0,24	168,3
5.	56	46	20	0,9607	0,49	192,1
6.	61	42	14	1,0926	1,74	218,5
7.	61	35	2	0,7283	2,04	145,7
8.	66	44	1	0,3640	1,90	72,8
9.	54	44	24	0,8928	0,65	178,6
10.	59	39	10	1,0994	1,16	219,9
11.	69	32	2	0,7594	1,66	151,9
12.	55	45	19	0,9870	1,27	197,4
13.	64	39	3	0,9092	1,34	181,8
14.	62	40	8	1,0884	0,45	217,7
15.	66	36	2	0,7641	1,77	152,8
16.	58	43	15	1,0636	0,66	212,7
17.	63	37	6	1,0854	0,82	217,1
18.	62	39	9	1,0892	0,41	217,8



<b>19.</b>	57	40	14	1,0773	0,87	215,5
<b>20.</b>	<b>61</b>	<b>40</b>	<b>9</b>	<b>1,0999</b>	<b>0,41</b>	<b>220,0</b>

Optimální objem 80mM hexametafosfátu: **61 µl**

Optimální objem 0,3 M kyseliny sírové: **40 µl**

Optimální objem 0,5 mM manganistanu draselného: **9 µl**

#### 4.1.2.6.2. Koncentrovanější roztoky činidel

Optimální objemy činidel byly hledány při konstantní průtokové rychlosti 100 µl/s za následujících podmínek:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5 µA
- Standard bopindololu o konc.  $10^{-5}$  mol/l v 60% methanolu 30 µl
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l 1 – 100 µl
- Kyselina sírová o koncentraci 1 mol/l 1 – 100 µl
- Manganistan draselný o koncentraci 1 mmol/l 1 – 100 µl

Tabulka č. 19: Dosažené hodnoty intenzity chemiluminiscence pro jednotlivé objemy činidel

Číslo měření	Objem HMF [µl]	Objem H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [µl]	Objem KMnO <sub>4</sub> [µl]	Hodnota signálu	Rel.směr. odchylka [%]	Intenzita CL [nA]
<b>1.</b>	55	53	22	0,4401	0,40	88,0
<b>2.</b>	45	53	32	0,4067	1,10	81,3
<b>3.</b>	50	44	32	0,4272	1,90	85,4
<b>4.</b>	50	50	24	0,5926	2,68	118,5
<b>5.</b>	56	47	20	0,7566	0,97	151,3
<b>6.</b>	62	44	13	0,9925	1,12	198,5
<b>7.</b>	69	43	1	0,9557	0,78	191,1
<b>8.</b>	58	41	22	0,7010	2,99	140,2
<b>9.</b>	65	45	6	1,3830	0,36	276,6
<b>10.</b>	61	47	12	1,0449	0,85	209,0

<b>11.</b>	63	46	11	1,0757	0,86	215,1
<b>12.</b>	64	46	8	1,2390	1,26	247,8
<b>13.</b>	65	46	6	1,3968	1,81	279,4
<b>14.</b>	66	46	4	1,4904	0,78	298,1
<b>15.</b>	67	46	3	1,5033	2,09	300,7
<b>16.</b>	68	47	1	0,9696	2,49	193,9
<b>17.</b>	66	46	5	1,4726	1,13	294,5
<b>18.</b>	<b>67</b>	<b>46</b>	<b>3</b>	<b>1,5030</b>	<b>0,47</b>	<b>300,6</b>

Optimální objem 80mM hexametafosfátu: **67 µl**

Optimální objem 1 M kyseliny sírové: **46 µl**

Optimální objem 1 mM manganistanu draselného: **3 µl**

#### 4.1.2.6.3. Nižší koncentrace činidel

Optimální objemy činidel byly hledány při konstantní průtokové rychlosti 100 µl/s za následujících podmínek:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5 µA
- Standard bopindololu o konc.  $10^{-5}$  mol/l v 60% methanolu: 30 µl
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l: 1 – 100 µl
- Kyselina sírová o koncentraci 0,2 mol/l: 1 – 100 µl
- Manganistan draselný o koncentraci 0,2 mmol/l: 1 – 100 µl

Tabulka č.20 : Dosažené hodnoty intenzity chemiluminiscence pro jednotlivé objemy činidel

Číslo měření	Objem HMF [µl]	Objem H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [µl]	Objem KMnO <sub>4</sub> [µl]	Hodnota signálu	Rel.směr. odchylka [%]	Intenzita CL [nA]
<b>1.</b>	55	53	32	0,7098	1,05	142,0
<b>2.</b>	45	53	32	0,7074	1,25	141,5
<b>3.</b>	50	44	32	0,7405	2,76	148,1
<b>4.</b>	50	50	24	0,8001	0,77	160,0

5.	55	44	20	0,8767	2,15	175,3
6.	60	40	15	0,9104	0,12	182,1
7.	57	33	6	0,7618	0,29	152,4
8.	54	43	24	0,8383	0,71	167,7
9.	57	38	12	0,8863	0,29	177,3
10.	66	30	7	0,8147	1,69	162,9
11.	62	35	11	0,9273	1,37	185,5
12.	66	32	1	—	0	0
13.	57	40	18	0,9182	1,19	183,6
14.	66	38	19	0,9090	0,24	181,8
15.	63	38	17	0,9283	0,98	185,7
16.	63	34	15	0,9341	1,56	186,8
17.	64	31	14	0,9348	1,67	187,0
18.	<b>60</b>	<b>37</b>	<b>16</b>	<b>0,9487</b>	<b>0,63</b>	<b>189,7</b>
19.	62	35	13	0,9302	0,55	186,0

Optimální objem 80 mM hexametafosfátu: **60  $\mu$ l**

Optimální objem 0,2 M kyseliny sírové: **37  $\mu$ l**

Optimální objem 0,2 mM manganistanu draselného: **16  $\mu$ l**

Z naměřených výsledků vyplývá, že optimální nalezená velikost dávkovaného objemu činidla souvisí s jeho koncentrací, což bylo nejvíce patrné u manganistanu draselného.

Zatímco v případě koncentrovanějšího roztoku je zapotřebí menšího objemu činidla, u méně koncentrovaného roztoku je tomu naopak.

Poměrně malý optimální objem manganistanu draselného lze vysvětlit tím, že při nižší výsledné koncentraci manganistanu v reakční směsi je snížena absorpce chemiluminiscenčního záření jeho barevným roztokem, což vede k následnému zesílení chemiluminiscenčního signálu.

#### 4.1.2.7. Objem vzorku

Při hledání optimální hodnoty objemu vzorku byla používána univariantní metoda s využitím programu FaF SIA Optim 0.89, při které se během měření mění pouze jeden zadaný parametr.

Optimální objem vzorku byl hledán za následujících podmínek:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Standard bopindololu o konc.  $10^{-5}$  mol/l v 60% (V/V) methanolu 5 - 100  $\mu$ l
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l 61  $\mu$ l
- Kyselina sírová o koncentraci 0,3 mol/l 40  $\mu$ l
- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l 9  $\mu$ l
- Průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.21 : Dosažené hodnoty intenzity chemiluminiscence pro jednotlivé objemy vzorku

Číslo měření	Objem HMF [ $\mu$ l]	Objem vzorku [ $\mu$ l]	Objem H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ $\mu$ l]	Objem KMnO <sub>4</sub> [ $\mu$ l]	Hodnota signálu	Relat.směr. odchylka [%]	Intenzita CL [nA]
1.	61	5	40	9	—	—	0
2.	61	10	40	9	0,3462	0,94	62,2
3.	61	15	40	9	0,5791	1,25	115,8
4.	61	20	40	9	0,7942	1,14	158,8
5.	61	25	40	9	0,9973	1,05	199,5
6.	61	30	40	9	1,1611	0,94	232,2
7.	61	35	40	9	1,3024	0,22	260,5
8.	61	40	40	9	1,3968	0,86	279,4
9.	61	45	40	9	1,4763	0,48	295,3
10.	61	50	40	9	1,5216	0,80	304,3
11.	61	55	40	9	1,5447	0,34	308,9
12.	<b>61</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>9</b>	<b>1,5698</b>	<b>0,50</b>	<b>314,0</b>
13.	61	65	40	9	1,5673	1,52	313,5
14.	61	70	40	9	1,5253	0,48	305,1
15.	61	75	40	9	1,5141	0,36	302,8

<b>16.</b>	61	80	40	9	1,5130	0,57	302,6
<b>17.</b>	61	85	40	9	1,4747	1,23	295,0
<b>18.</b>	61	90	40	9	1,4367	1,38	287,4
<b>19.</b>	61	95	40	9	1,4300	0,26	286,0
<b>20.</b>	61	100	40	9	1,3981	1,80	279,6

Optimální objem vzorku: **60 µl**

## 4.2. Kalibrační závislosti

### 4.2.1. Kalibrační závislost v prostředí 60% methanolu

Rozsah testovaných koncentrací:  $1 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$  mol/l

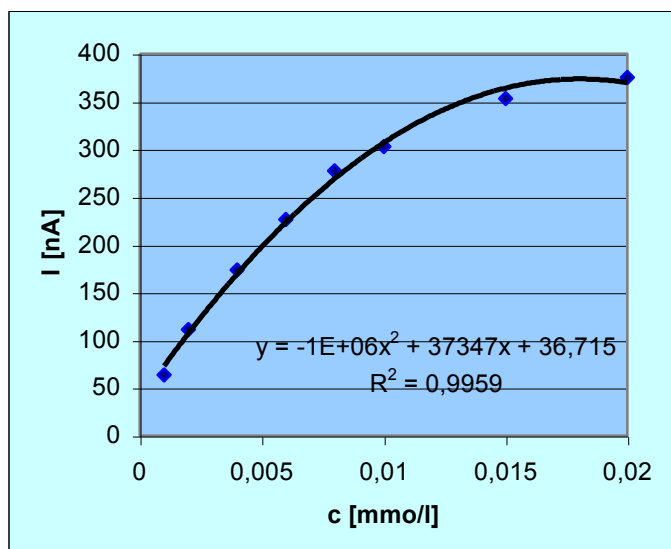
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5 µA
- Standard bopindololu 60 µl
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l 61 µl
- Kyselina sírová o koncentraci 0,3 mol/l 40 µl
- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l 9 µl
- Průtoková rychlost 100 µl/s

Tabulka č.22: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu v prostředí 60% methanolu

C [mol/l]	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
<b>1.</b>	0,3218	0,5543	0,8625	1,1135	1,3810	1,5053	1,7714	1,8596
<b>2.</b>	0,3217	0,5565	0,8591	1,1197	1,3790	1,5237	1,7678	1,8666
<b>3.</b>	0,3165	0,5615	0,8582	1,1462	1,3975	1,4974	1,7540	1,8955
<b>4.</b>	0,3219	0,5516	0,8679	1,1354	1,3902	1,5327	1,7349	1,8497
<b>5.</b>	0,3199	0,5658	0,8535	1,1330	1,3805	1,5277	1,7719	1,8898
<b>6.</b>	0,3226	0,5527	0,8809	1,1258	1,3797	1,5088	1,7866	1,8902
<b>7.</b>	0,3028	0,5745	0,8888	1,1452	1,3998	1,4968	1,7711	1,8845
<b>Ø</b>	0,32	0,56	0,87	1,13	1,39	1,51	1,77	1,88
<b>I [nA]</b>	<b>63,8</b>	<b>111,3</b>	<b>173,2</b>	<b>226,6</b>	<b>277,4</b>	<b>302,6</b>	<b>352,9</b>	<b>375,2</b>
<b>S<sub>r</sub> [%]</b>	2,12	1,37	1,41	1,01	0,64	0,92	0,89	0,76

Graf č.6: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu



Kalibrační křivka vyhodnocená v celém rozsahu koncentrací má charakter polynomu druhého stupně (parabola).

V rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l standardu bopindololu bylo provedeno podrobnější měření pro získání lineární oblasti kalibrační závislosti.

Lineární oblast v průběhu kalibrační křivky byla hledána za následujících podmínek:

Rozsah testovaných koncentrací:  $2 \cdot 10^{-6}$  –  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l

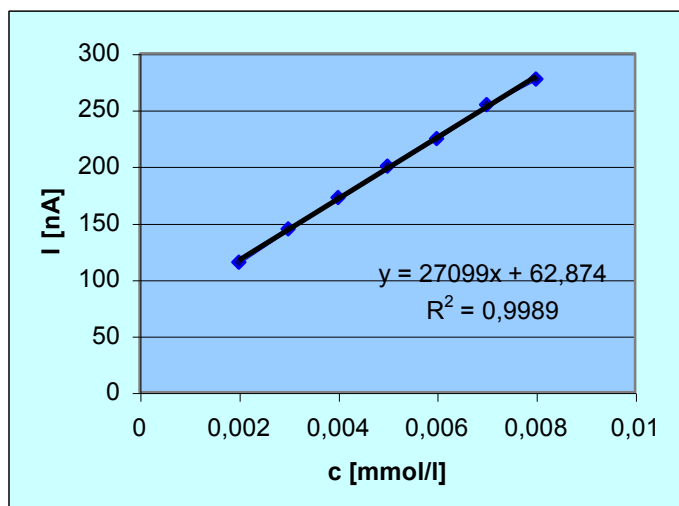
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A
- Standard bopindololu v 60% methanolu 60  $\mu$ l
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l 61  $\mu$ l
- Kyselina sírová o koncentraci 0,3 mol/l 40  $\mu$ l
- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l 9  $\mu$ l
- Průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.23: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu

C [mol/l]	$2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-6}$
1.	0,5603	0,7371	0,8810	1,0091	1,1449	1,2795	1,3892
2.	0,5691	0,7297	0,8629	0,9866	1,1282	1,2896	1,3647
3.	0,5711	0,7017	0,8518	0,9902	1,1169	1,2873	1,3968
4.	0,5897	0,7294	0,8644	1,0266	1,1219	1,2606	1,3777
5.	0,5721	0,7061	0,8642	0,9988	1,1119	1,2675	1,3794
6.	0,5726	0,7115	0,8454	0,9897	1,1037	1,2542	1,4030
7.	0,5888	0,7264	0,8673	1,0009	1,1245	1,2532	1,3895
Ø	0,57	0,72	0,86	1,00	1,12	1,27	1,39
I [nA]	<b>115,0</b>	<b>144,6</b>	<b>172,5</b>	<b>200,1</b>	<b>224,3</b>	<b>254,9</b>	<b>277,1</b>
S <sub>r</sub> [%]	<b>1,93</b>	<b>1,75</b>	<b>1,25</b>	<b>1,29</b>	<b>1,25</b>	<b>1,11</b>	<b>0,91</b>

Graf č.7: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu



Parametry regresní křivky:

Rovnice:  $y = 27\,099x + 62,874$

Korelační koeficient:  $r = 0,9994$

Detekční limit:  $4,43 \cdot 10^{-4} \text{ mmol/l}$

V intervalu koncentrací  $2 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ , v němž je kalibrační závislostí přímka, je možné závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu považovat za lineární a lze ji využít k následnému stanovení bopindololu v léčivém přípravku.

#### 4.2.2 Kalibrační závislost v prostředí 60% ethanolu

Rozsah testovaných koncentrací:  $1 \cdot 10^{-7}$  -  $1,5 \cdot 10^{-6}$  mol/l

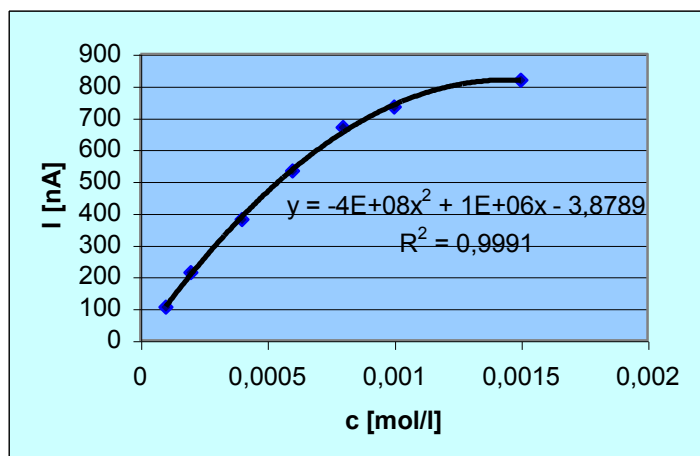
Podmínky měření:

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru: 1,0  $\mu$ A
- Standard bopindololu v 60% ethanolu 60  $\mu$ l
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l 61  $\mu$ l
- Kyselina sírová o koncentraci 0,3 mol/l 40  $\mu$ l
- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l 9  $\mu$ l
- Průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s

Tabulka č.24 : Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu

C [mol/l]	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$
1.	0,4098	0,6835	1,1004	1,4864	1,8381	1,9906	2,1953
2.	0,4118	0,6726	1,1030	1,4702	1,8315	1,9922	2,1761
3.	0,4135	0,6939	1,1023	1,4910	1,8116	1,9646	2,1658
4.	0,4133	0,6912	1,0710	1,4666	1,8095	1,9552	2,2017
5.	0,4068	0,6756	1,0859	1,4553	1,8053	1,9743	2,1776
6.	0,3951	0,6743	1,0991	1,4588	1,8121	1,9874	2,1840
7.	0,4072	0,6713	1,0910	1,4766	1,8000	1,9641	2,1958
Ø	0,41	0,68	1,09	1,47	1,81	1,98	2,19
I [nA]	162,1	271,0	436,7	590,1	725,6	790,8	875,4
I nA po odečtení slep.pokusu	105,0	213,9	379,6	532,3	668,5	733,7	817,5
S <sub>r</sub> [%]	1,75	1,26	1,03	0,85	0,77	0,73	0,59

Graf č.8: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu

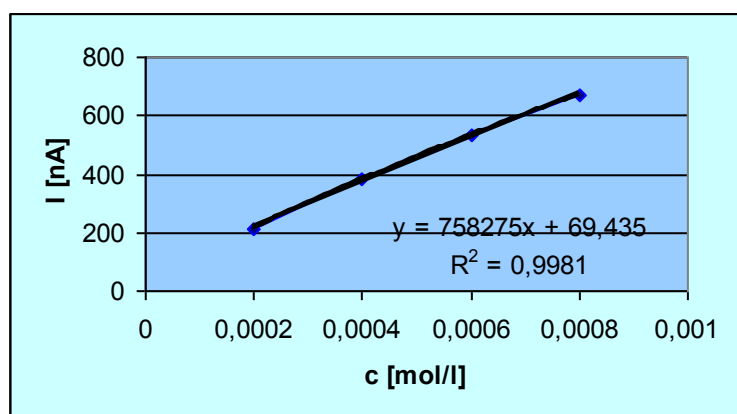




Při vyhodnocení celého rozsahu koncentrací má kalibrační křivka parabolický charakter.

V rozmezí koncentrací standardu bopindololu  $2 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-7}$  mol/l by bylo možné považovat závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu za lineární, viz graf č.9.

Graf č.9: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu



Detekční limit:  $3,17 \cdot 10^{-5}$  mmol/l

Stanovení obsahu v ethanolicím prostředí s využitím jeho zesilujícího vlivu na intenzitu chemiluminiscence by však bylo výhodnější u přípravků obsahujících menší množství účinné látky.

### 4.3. Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla zjišťována pomocí roztoku standardu bopindololu o koncentracích  $2 \cdot 10^{-6}$  a  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l, tj. o koncentracích, které leží na počátku a na konci intervalu, ve kterém je závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci bopindololu považována za lineární.

Pro každou koncentraci byly provedeny tři série patnácti měření při optimalizovaných podmínkách.

- Napětí na fotonásobiči: 450 V
- Rozsah detektoru:  $0,5 \mu\text{A}$
- Standard bopindololu v 60% methanolu:  $60 \mu\text{l}$
- Hexametafosfát o koncentraci 80 mmol/l:  $61 \mu\text{l}$
- Kyselina sírová 0,3 mol/l:  $40 \mu\text{l}$

- Manganistan draselný o koncentraci 0,5 mmol/l 9 µl
- Průtoková rychlost 100 µl/s

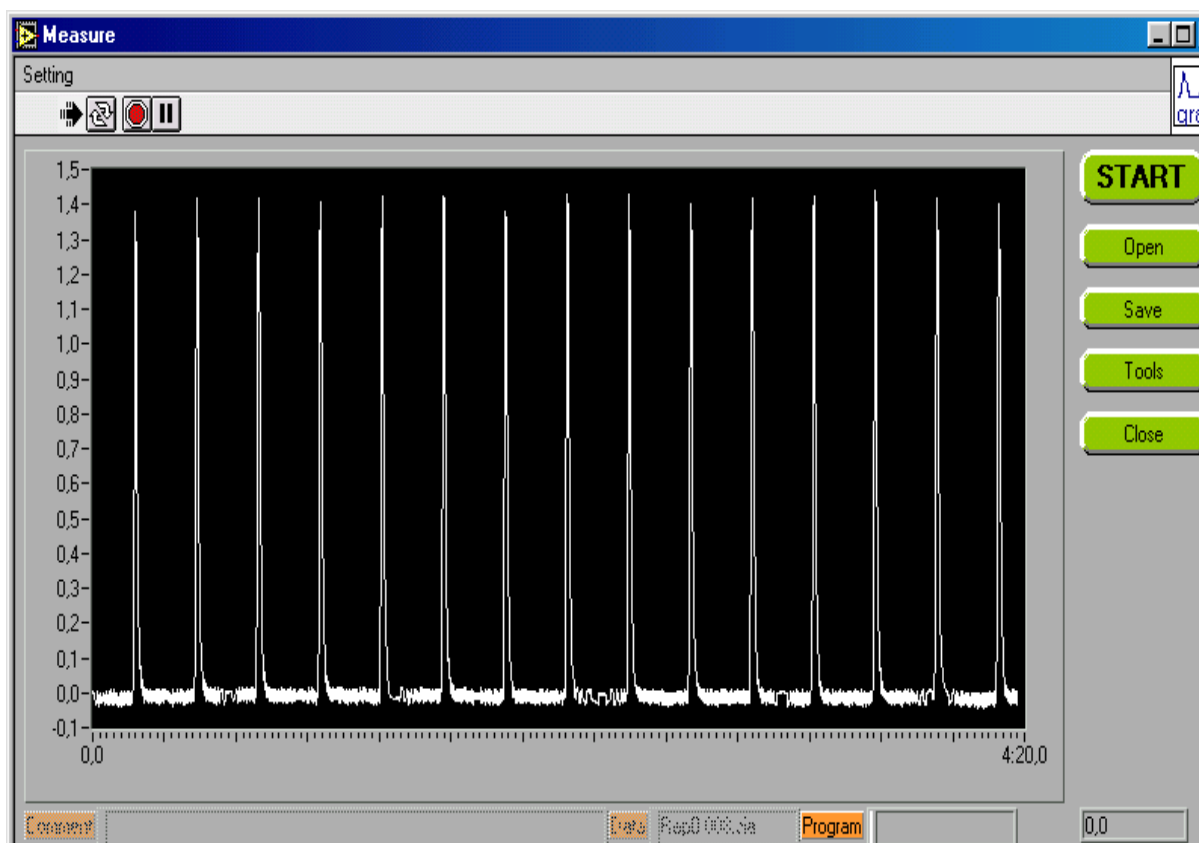
Tabulka č.25: Hodnoty relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé koncentrace standardu bopindololu

<b>8.10<sup>-6</sup> mol/l</b>	<b>1. série</b>	<b>2. série</b>	<b>3. série</b>
1.	1,3655	1,3427	1,3546
2.	1,3629	1,3546	1,3634
3.	1,3577	1,3510	1,3507
4.	1,3557	1,3770	1,3838
5.	1,3688	1,3677	1,3802
6.	1,3430	1,3415	1,3687
7.	1,3527	1,3559	1,3629
8.	1,3788	1,3721	1,3987
9.	1,3988	1,3721	1,3710
10.	1,3667	1,3530	1,3790
11.	1,3483	1,3744	1,3846
12.	1,3668	1,3906	1,3674
13.	1,3493	1,3873	1,3804
14.	1,3865	1,3546	1,3790
15.	1,3649	1,3555	1,3670
Ø	1,36	1,36	1,37
<b>I [nA]</b>	<b>272,9</b>	<b>272,7</b>	<b>274,6</b>
<b>S</b>	0,0113	0,0146	0,0121
<b>S<sub>r</sub> [%]</b>	<b>0,83</b>	<b>1,07</b>	<b>0,88</b>

<b>2.10<sup>-6</sup> mol/l</b>	<b>1. série</b>	<b>2. série</b>	<b>3. série</b>
1.	0,5774	0,5831	0,5867
2.	0,5836	0,5716	0,5928
3.	0,5825	0,5730	0,5771
4.	0,5897	0,5922	0,5809
5.	0,5791	0,5855	0,5966
6.	0,5925	0,5961	0,5768
7.	0,6039	0,5960	0,5644

8.	0,5881	0,5795	0,5801
9.	0,5867	0,5688	0,5720
10.	0,5885	0,5969	0,5911
11.	0,5931	0,5997	0,6070
12.	0,5729	0,5669	0,5838
13.	0,5813	0,5910	0,5810
14.	0,5999	0,5889	0,5890
15.	0,5666	0,5845	0,5699
Ø	0,59	0,58	0,58
I [nA]	117,1	117,0	116,7
S	0,0095	0,0104	0,0107
S <sub>r</sub> [%]	1,61	1,79	1,85

Obrázek č.5: Hodnoty signálu pro koncentraci standardu bopindololu  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l



Hodnoty relativní směrodatné odchyly se pohybovaly v rozmezí 0,83 až 1,85 %.  
Získané hodnoty slouží pro posouzení opakovatelnosti.

## 4.4. Stanovení bopindololu v hromadně vyráběném léčivém přípravku

### 4.4.1. Hmotnostní stejnoměrnost tablet dle ČL 2002

Bylo zváženo 20 náhodně vybraných tablet a stanovena průměrná hmotnost jedné tablety. Dle ČL 2002 se nejvýše 2 tablety smí lišit od povolené odchylky uvedené v lékopise, což pro průměrnou hmotnost tablety více než 80 mg a méně než 250 mg je 7,5%. Žádná jednotlivě stanovená hmotnost se nesmí lišit o více než dvojnásobek této odchylky.

Tabulka č.26 : Hmotnostní stejnoměrnost tablet

Číslo měření	Naměřená hmotnost [g]	Číslo měření	Naměřená hmotnost [g]
1.	0,1286	11.	0,1280
2.	0,1280	12.	0,1288
3.	0,1307	13.	0,1282
4.	0,1292	14.	0,1311
5.	0,1304	15.	0,1302
6.	0,1304	16.	0,1307
7.	0,1285	17.	0,1296
8.	0,1288	18.	0,1295
9.	0,1282	19.	0,1294
10.	0,1314	20.	0,1295

Průměrná hmotnost tablety ..... 0,1295 g

Rozmezí hmotností vyhovující požadavkům ČL 2002 na hmotnostní stejnoměrnost tablet ..... 0,1198 – 0,1392 g

Hmotnost všech dvaceti tablet vyhovuje požadavkům ČL 2002 na hmotnostní stejnoměrnost.

## 4.4.2. Vlastní stanovení obsahu bopindololu v léčivém přípravku

### 4.4.2.1. Stanovení obsahu metodou SIA

Stanovení bopindololu bylo provedeno za optimalizovaných podmínek metodou vnějšího standardu. Jako standard byl použit roztok bopindololu o koncentraci 0,004 mmol/l, která se nachází přibližně uprostřed intervalu koncentrací, v němž je závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu lineární, tj. rozmezí 0,002 – 0,008 mmol/l.

Hodnocený přípravek:

*Sandonorm* tablety ( Léčiva a.s. Praha, Česká republika v licenci Novartis AG, Basilej, Švýcarsko)

Obsah účinné látky:

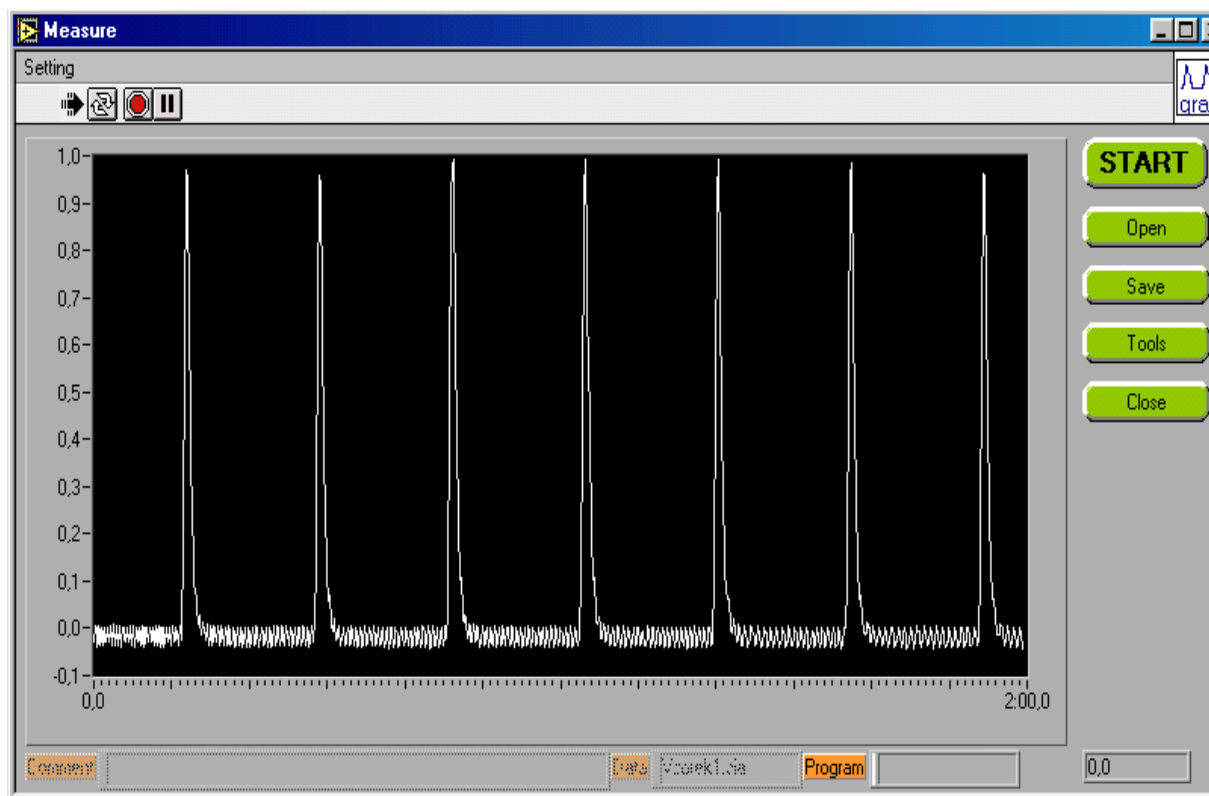
Bopindolol hydrogenmalonát 1 mg v 1 tabletě

Před vlastním stanovením bylo nutné vzorky upravit. Odvážené množství tabletové drti odpovídající průměrné hmotnosti jedné tablety bylo v odměrné baňce o obsahu 50 ml rozpuštěno v 60% methanolu a doplněno stejným rozpouštědlem po značku. Každý vzorek bylo nutné zfiltrvat a 10-krát zředit 60% methanolem pro získání koncentrace ležící přibližně v polovině rozsahu koncentrací kalibrační křivky.

Tabulka č.27: Výsledky chemiluminiscenčního SIA stanovení obsahu bopindololu v přípravku *Sandonorm*

	VZ č.1	ST	VZ č.2	ST	VZ č.3	ST	VZ č.4	ST	VZ č.5	ST
1.	0,9514	0,9252	0,9659	0,9354	0,9667	0,9388	0,9801	0,9601	0,9446	0,9621
2.	0,9604	0,9209	0,9623	0,9490	0,9700	0,9719	0,9981	0,9487	0,9511	0,9506
3.	0,9716	0,9337	0,9807	0,9591	0,9858	0,9237	0,9870	0,9597	0,9635	0,9492
4.	0,9598	0,9134	0,9837	0,9529	0,9686	0,9691	0,9844	0,9410	0,9553	0,9613
5.	0,9541	0,9268	0,9626	0,9750	0,9594	0,9699	0,9829	0,9425	0,9421	0,9527
6.	0,9458	0,9241	0,9863	0,9602	0,9699	0,9538	0,9930	0,9741	0,9382	0,9536
7.	0,9600	0,9398	0,9733	0,9436	0,9570	0,9671	0,9978	0,9749	0,9445	0,9557
Ø	0,96	0,93	0,97	0,95	0,97	0,96	0,99	0,96	0,95	0,96
I [nA]	<b>191,5</b>	<b>185,3</b>	<b>194,1</b>	<b>190,7</b>	<b>193,6</b>	<b>191,3</b>	<b>197,8</b>	<b>191,5</b>	<b>189,7</b>	<b>191,0</b>
S <sub>r</sub> [%]	0,83	0,94	1,03	1,30	0,91	1,83	0,69	1,37	0,87	0,71
Obsah [mg]	<b>1,00</b>		<b>0,99</b>		<b>0,98</b>		<b>1,00</b>		<b>0,96</b>	

Obrázek č.6: Hodnoty signálu zkoušeného vzorku



Průměrný obsah:	<b>0,986 mg/tbl</b>
Směrodatná odchylka s:	0,01497
Relativní směrodatná odchylka RSD:	<b>1,50 %</b>

#### 4.2.2.2. Stanovení obsahu bopindololu v tabletách Sandonorm metodou kapilární isotachoforézy

Pro zhodnocení správnosti výsledků stanovení obsahu bopindololu v tabletách Sandonorm chemiluminiscenční SIA metodou byla provedena analýza stejné šarže tablet již dříve publikovanou a validovanou isotachoforetickou metodou<sup>7)</sup>. Bylo analyzováno pět vzorků drtě, získané rozmělněním 20 tablet. Výsledky jsou uvedeny v tab. č.28 :

Tabulka č.28: Výsledky isotachoforetického stanovení obsahu bopindololu v přípravku

Sandonorm

Vzorek č.	1	2	3	4	5
Obsah mg/tbl	0,97	0,97	0,95	0,99	1,00

Průměrný obsah: 0,976 mg/tbl

Směrodatná odchylka s: 0,01744

Relativní směrodatná odchylka RSD: 1,79%

#### 4.4.3. Statistické srovnání metody SIA s kapilární izotachoforézou

Obě metody byly srovnávány Studentovým t-testem.

Studentův t-test <sup>18)</sup>:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B| \sqrt{n-1}}{\sqrt{(s_A^2 + s_B^2)}}$$

$\bar{x}_A$  ..... průměr hodnot získaných metodou sekvenční injekční analýzy (SIA)

$\bar{x}_B$  ..... průměr hodnot získaných metodou kapilární izotachoforézy (ITP)

$n$  ..... počet měření

$S_A$  ..... průměrná hodnota směrodatné odchylky získaná metodou SIA

$S_B$  ..... průměrná hodnota směrodatné odchylky získaná metodou ITP

Tabulka č.29: Porovnání výsledků stanovení obsahu bopindololu v přípravku

Sandonorm metodou SIA a ITP

	SIA	ITP
Vzorek č.1 [mg/tbl]	1,00	0,97
Vzorek č.2 [mg/tbl]	0,99	0,97
Vzorek č.3 [mg/tbl]	0,98	0,95
Vzorek č.4 [mg/tbl]	1,00	0,99
Vzorek č.5 [mg/tbl]	0,96	1,00

<b>Průměrný obsah [mg/tbl]</b>	<b>0,986</b>	<b>0,976</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>	$S_A = 0,0149$	$S_B = 0,0174$
<b>Relativní směr. odchylka [%]</b>	1,50	1,79

Podle vzorce byla vypočítána hodnota  $t$ :  $t = 0,870$

V tabulce hodnot Studentova rozdělení pro  $(2n-2) = 8$  a  $p = 0,95$  je kritická hodnota  $t_k = 2,306$ .

Vypočítaná hodnota pomocí Studentova  $t$ -testu je menší než kritická hodnota Studentova rozdělení.

Rozdíl obou metod není statisticky významný.

#### 4.4.4. Obsahová stejnoměrnost tablet dle ČL 2002

Pomocí metody SIA byl stanoven obsah účinné látky u 10 vybraných tablet. Dle ČL 2002 má obsah účinné látky ležet v rozmezí 85 – 115% průměrného obsahu. Přípravek nevyhovuje požadavkům lékopisu, pokud více než jeden obsah účinné látky je mimo toto rozmezí nebo jestliže jeden obsah je mimo rozmezí 75 – 125% průměrného obsahu účinné látky.

Tabulka č.30 : Obsahová stejnoměrnost tablet

	<b>Vz č.1</b>	<b>St</b>	<b>Vz č.2</b>	<b>St</b>	<b>Vz č.3</b>	<b>St</b>	<b>Vz č.4</b>	<b>St</b>	<b>Vz č.5</b>	<b>St</b>
<b>1.</b>	1,0266	0,9880	0,9897	0,9708	0,9531	0,9568	0,9424	0,9629	0,9661	0,9629
<b>2.</b>	1,0350	0,9696	0,9841	0,9785	0,9796	0,9710	0,9467	0,9586	0,9509	0,9501
<b>3.</b>	1,0349	0,9603	0,9765	0,9752	0,9706	0,9612	0,9506	0,9634	0,9516	0,9385
<b>4.</b>	1,0197	0,9789	0,9823	0,9790	0,9756	0,9574	0,9421	0,9554	0,9499	0,9593
<b>5.</b>	1,0356	0,9690	0,9654	0,9609	0,9606	0,9834	0,9348	0,9555	0,9486	0,9505
<b>6.</b>	1,0246	0,9592	0,9566	0,9649	0,9842	0,9753	0,9322	0,9577	0,9364	0,9520
<b>7.</b>	0,9993	0,9748	0,9729	0,9782	0,9733	0,9524	0,9473	0,9626	0,9437	0,9542
<b>Ø</b>	1,03	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,94	0,96	0,95	0,95
<b>I [nA]</b>	205,0	194,3	195,1	194,5	194,2	193,1	188,5	191,9	189,9	190,5
<b>S<sub>r</sub> [%]</b>	1,25	0,98	1,18	0,74	1,04	1,19	0,71	0,34	0,88	0,80
<b>Obsah [mg]</b>	<b>1,02</b>		<b>0,97</b>		<b>0,97</b>		<b>0,95</b>		<b>0,97</b>	



	Vz č.6	St	Vz č.7	St	Vz č.8	St	Vz č.9	St	Vz č.10	St
1.	0,9469	0,9522	0,9677	0,9730	0,9627	0,9536	0,9200	0,9472	1,0101	0,9458
2.	0,9381	0,9609	0,9485	0,9531	0,9403	0,9458	0,9319	0,9500	0,9974	0,9629
3.	0,9490	0,9415	0,9502	0,9659	0,9563	0,9518	0,9301	0,9368	0,9974	0,9325
4.	0,9407	0,9469	0,9558	0,9531	0,9609	0,9427	0,9245	0,9445	1,0134	0,9604
5.	0,9681	0,9443	0,9507	0,9428	0,9774	0,9629	0,9168	0,9457	1,0137	0,9452
6.	0,9541	0,9644	0,9439	0,9494	0,9646	0,9436	0,9325	0,9543	0,9932	0,9515
7.	0,9551	0,9574	0,9544	0,9560	0,9763	0,9435	0,9263	0,9326	1,0043	0,9494
Ø	0,95	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,93	0,94	1,00	0,95
I [nA]	190,1	190,5	190,6	191,2	192,5	189,8	185,2	188,9	200,8	189,9
S <sub>r</sub> [%]	0,99	0,89	0,80	1,06	1,24	0,73	0,74	0,88	0,88	0,99
<b>Obsah [mg]</b>	<b>0,97</b>		<b>0,96</b>		<b>0,98</b>		<b>0,95</b>		<b>1,02</b>	

Průměrný obsah: **0,977 mg**

Průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky: **2,53 %**

Rozmezí obsahu vyhovující požadavkům ČL 2002 na obsahovou stejnoměrnost tablet  
..... 0,8304 – 1,1236 mg

Obsah účinné látky ve všech dvaceti tabletách vyhovuje požadavkům ČL 2002 na obsahovou stejnoměrnost.

## **5. ZÁVĚR**

Bylo vybráno léčivo (bopindolol) poskytující při reakci s manganistanem draselným v kyselém prostředí za přítomnosti hexametafosfátu jako zesilovače chemiluminiscence výraznou chemiluminiscenci a byla navržena a optimalizována metoda jeho stanovení sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí.

Z testovaných léčiv vykazovaly nejvyšší intenzitu chemiluminiscence následující látky: bopindolol hydrogenmalonát, cimetidin, endralazin mesilát, indometacin a norepinefrin bitartrát hydrát. Jednoznačný vztah mezi strukturou léčiva a intenzitou chemiluminiscence nebyl pozorován.

Při hledání optimálních dávkovaných objemů činidel byla použita metoda simplexů.

Na základě provedených měření byly nalezeny následující optimální podmínky pro stanovení:

Napětí na fotonásobiči: 450 V

Rozsah detektoru: 0,5  $\mu$ A

Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Objem vzorku: 60  $\mu$ l

Optimální koncentrace a dávkované objemy činidel:

Kyselina sírová: 0,3 mol/l; 40  $\mu$ l

Manganistan draselný: 0,5 mmol/l; 9  $\mu$ l

Hexametafostát: 80 mmol/l; 61  $\mu$ l

Jako optimální prostředí pro rozpuštění vzorku při stanovení byl zvolen 60% methanol.

Tyto podmínky se jeví jako optimální pro stanovení léčiva v hromadně vyráběném léčivém přípravku.

Kalibrační závislost byla měřena v rozmezí koncentrací standardu bopindololu  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Grafem kalibrační závislosti je parabola. V rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  –  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l je možné považovat závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu za lineární a lze ji využít k následnému stanovení bopindololu ve farmaceutických přípravcích.

Pro zjištění opakovatelnosti měření byly provedeny tři série patnácti měření při optimalizovaných podmínkách pro roztoky standardu bopindololu o koncentracích  $2 \cdot 10^{-6}$  a  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l, tj. koncentrace ležící na počátku a na konci intervalu, v němž lze závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci bopindololu považovat za lineární. Průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky byla 0,93% pro koncentraci  $8 \cdot 10^{-6}$  mol/l a 1,75% pro koncentraci  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

Metoda byla aplikována na stanovení obsahu bopindololu v přípravku Sandonorm tablety.

Jako srovnávací metoda pro stanovení bopindololu byla použita kapilární izotachoforéza. Obě metody byly srovnány pomocí Studentova t-testu. Výsledkem hodnocení je, že rozdíl mezi výsledky získanými oběma metodami není statisticky významný. Znamená to také, že pomocné látky přítomné v tabletovině neruší chemiluminiscenční SIA stanovení bopindololu v tabletách Sandonorm.

Na intenzitu chemiluminiscence má podstatný vliv obsah organického rozpouštědla v injektovaném roztoku vzorku. Největší zesílení chemiluminiscence bylo dosaženo při obsahu 60% ethanolu; ve srovnání s vodným roztokem o stejné koncentraci analytu došlo přibližně k 37-násobnému zvýšení intenzity chemiluminiscence. V případě přítomnosti 60% methanolu ve vzorku bylo zvýšení intenzity chemiluminiscence oproti vodnému roztoku přibližně trojnásobné.

V případě použití 60% ethanolu jako rozpouštěcího prostředí byly optimální tyto podmínky:

Napětí na fotonásobiči: 450 V

Rozsah detektoru: 1,0  $\mu$ A

Průtoková rychlost: 100  $\mu$ l/s

Objem vzorku: 60  $\mu$ l

Optimální koncentrace a dávkované objemy činidel:

Kyselina sírová: 0,3 mol/l; 40  $\mu$ l

Manganistan draselný: 0,5 mmol/l; 9  $\mu$ l

Hexametafosfát: 80 mmol/l; 61  $\mu$ l

Kalibrační závislost byla měřena v rozmezí koncentrací standardu bopindololu  $1 \cdot 10^{-7}$  -  $1,5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Grafem kalibrační závislosti je parabola. V rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$  –  $8 \cdot 10^{-7}$  mol/l by bylo možné považovat závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci standardu bopindololu za lineární a tudíž ji využít ke stanovení bopindololu ve farmaceutických přípravcích. Zesilující vliv 60% ethanolu lze uplatnit u vzorků s velmi nízkou koncentrací účinné látky.

## 6. LITERATURA

1. Lincová D., Farghalli H.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Praha, 2002
2. Autorský kolektiv: Remedia kompendium. 3.vydání, Panax, Praha, 1999
3. Autorský kolektiv: Mikro-verze AISLP. Praha, 2001. CD-ROM
4. Autorský kolektiv: Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2002
5. The United States Pharmacopoeial Convention: United States Pharmacopoeia XXVI. Rockville, USA, 2002
6. Council of Europe: European pharmacopoeia 2002. Strasbourg, 2001
7. Meireles J., Sklenářová H., Šatinský D., Solich P., Araucho A, Montenegro M.: Determination of bopindolol using the flow injection technique coupled with solid phase extraction. J. Pharm. Biomed. Anal. 33, (2003), 1149-1153.
8. Urbánek M., Popsíšilová M., Polášek M.: Determination of bopindolol in pharmaceuticals by capillary isotachopheresis. J. Pharm. Biomed. Anal. 28, (2002), 509-515 .
9. Grobuschek N., Schmid MG., Koidl J., Guebitz G.: Enantioseparation of amino-acids and drugs by CEC, pressure supported CEC, and micro-HPLC using a teicoplanin aglycone stationary phase. J. Sep. Sci. 25, (2002), 1297-1302; in Anal. Abstr., abstrakt č. 6536G10245
10. Steuer W., Baumann J., Erni F.: Separation of ionic drug substances by supercritical fluid chromatography. J. Chromatogr. 500, (1990), 469-479
11. Perkins S.L., Tattrie B., Johnson P.M., Rabin E.Z.: Analytical problems encountered during high-performance liquid-chromatographic separation and coulometric detection of bopindolol metabolites in human plasma. Ther. Drug Monit. 10, (1988), 480-185; in Anal.Abstr., abstrakt č. 5102D00087
12. Humbert H., Denouel J., Keller H.P.: Column liquid-chromatographic determination of hydrolysed bopindolol [4-(2-benzoyloxy-3-t-butylaminopropoxy)-2-methylindole hydrogen malonate], in the picogram-per-millilitre range in plasma, using cartridge extraction and dual electrochemical detection. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 66, (1987), 205-215.
13. Kuesters E., Giron D.: Enantiomeric separation of the beta-blocking drugs pindolol and bopindolol using a chiral-immobilized protein stationary phase. J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 9, (1986), 531-533; in Anal. Abstr., abstrakt č. 4906E00050

14. Oddie C.J., Jackman G.P., Bobik A.: Analysis of bopindolol [4-(2-benzoyloxy-3-t-butylaminopropoxy)-2-methylindole hydrogen malonate] and its active metabolite 18-502 [4-(3-t-butylamino-2-hydroxypropoxy)-2-methylindole] in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 24, (1983), 469-474.
15. Perrin C., Vander-Heyden Y., Maftouh M., Massart DL.: Rapid screening for chiral separations by short-end injection capillary electrophoresis using highly sulfated cyclodextrins as chiral selectors. *Electrophoresis*. 22, (2001), 3203-3215.
16. Garcia-Campaña A.M., Baeyens W.R.G.: *Chemiluminiscence in analytical chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001
17. Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza. *Chem. Listy* 93, (1999), 354-359
18. Růžička J., Marshall G.D.: Sequential injection. *Anal. Chim. Acta* 237, (1990), 329-343
19. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. SNTL, Praha, 1980