

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Anna Kroiherová

**SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA PRO SPEKTROMETRICKÉ  
STANOVENÍ SLOŽEK BIASEPTOLU**

Sequential Injection Analysis for Spectrophotometric  
Determination of Biseptol Components

Bakalářská práce

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

Praha 2020

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 9. května 2020

## Abstrakt

Byla vyvinuta a optimalizována metoda využívající techniku sekvenční injekční analýzy pro spektrometrické stanovení dvou analytů, sulfamethoxazolu a trimethoprimu, ve směsi v léčivém přípravku Biseptol® 480 bez nutnosti jejich separace. Oba analyty absorbují záření v UV oblasti spektra, ale pouze sulfamethoxazol, jakožto primární amin, poskytuje po derivatizační reakci s dusitanem sodným a *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem barevný produkt, který lze detegovat ve VIS oblasti spektra. Koncentrace sulfamethoxazolu je přímo úměrná absorbanci barevného produktu diazotační reakce a odečtením této koncentrace od koncentrace obou analytů změřené v UV oblasti spektra, lze určit koncentraci trimethoprimu ve vzorku.

**Klíčová slova:** sekvenční injekční analýza, trimethoprim, sulfamethoxazol, biseptol

## Abstract

A method using the sequential injection analysis technique for the spectrometric determination of two analytes, sulfamethoxazol and trimethoprim, in a mixture in the drug Biseptol® 480 without the need for their separation, was developed and optimized. Both analytes absorb in the UV spectrum, but only sulfamethoxazol, as primary amine, gives a colour product after derivatization reaction with sodium nitrite and *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine, that can be detected in the VIS spectrum. The concentration of sulfamethoxazol is directly proportional to the absorbance of the colour product and by subtracting this concentration from the concentration of both analytes measured in the UV spectrum, the concentration of trimethoprim in the sample can be determined.

**Key words:** sequential injection analysis, trimethoprim, sulfamethoxazole, biseptol

**Poděkování**

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za vedení při mé bakalářské práci, za poskytnuté konzultace a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D. a mé rodině za podporu při studiu.

## Obsah

1	Cíl práce .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Analyzované látky .....	8
2.2	Analytické metody pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu .....	10
2.3	Sekvenční injekční analýza .....	10
3	Experimentální část .....	12
3.1	Analyzovaný léčivý přípravek .....	12
3.2	Použité chemikálie .....	12
3.3	Příprava roztoků .....	12
3.4	Instrumentace .....	14
3.5	Zpracování naměřených dat .....	15
4	Výsledky a diskuze .....	16
4.1	Optimalizace experimentálních podmínek .....	16
4.1.1	Statické spektrometrické měření .....	16
4.1.2	Sekvenční průtoková analýza .....	17
4.2	Stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu SIA metodou .....	19
4.3	Stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu HPLC metodou .....	22
4.4	Diskuze .....	23
5	Závěr .....	24
	Seznam literatury .....	25

## Seznam použitých zkratek

<i>A</i>	absorbance
<i>c</i>	molární koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
<i>c<sub>g</sub></i>	hmotnostní koncentrace [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
<i>F</i>	průtoková rychlost [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]
FIA	průtoková injekční analýza
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
NEDA	<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin
PTFE	polytetrafluorethylen
RSD	relativní směrodatná odchylka
<i>S</i>	plocha SIA píku [s]
SMX	sulfamethoxazol
SIA	sekvenční injekční analýza
TMP	trimethoprim
<i>V</i>	objem [ $\mu\text{l}$ ]

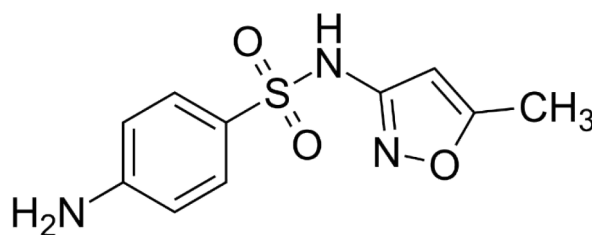
## **1 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je navrhnout a optimalizovat metodu sekvenční injekční analýzy se spektrometrickou detekcí pro simultánní stanovení dvou analytů, sulfamethoxazolu a trimethoprimu, obsažených v antibakteriálním přípravku Biseptol<sup>®</sup> 480 bez nutnosti jejich separace. Záměrem je také navrhnout metodu tak, aby byla časově a finančně nenáročná, s co nejmenší spotřebou činidel, neboť kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu je často užívaná v léčivých přípravcích a doposud užívané metody jsou časově náročné a finančně nevýhodné pro časté a opakované analýzy a většinou je zapotřebí velká spotřeba organických rozpouštědel.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Analyzované látky

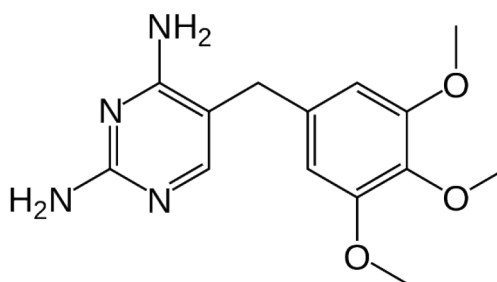
Předkládaná bakalářská práce se zabývá stanovením složek antibakteriálního léčiva označovaného jako kotrimoxazol, což je směs sulfamethoxazolu a trimethoprimu ve fixním poměru 5:1 [1]. Je prodáváno pod komerčním názvem Biseptol, Bactrim nebo Co-trimoxazol Forte. Užívá se při infekcích močových nebo dýchacích cest, při zánětech středního ucha, střevních infekcích a infekcích kůže. Obvykle se vyrábí tablety s obsahem 400 mg sulfamethoxazolu a 80 mg trimethoprimu, případně dávky vyšší (800 mg sulfamethoxazolu a 160 mg trimethoprimu). Kotrimoxazol má synergický antimikrobiální účinek na řadu grampozitivních a gramnegativních mikrobů a snižuje riziko vzniku rezistentních kmenů [2]. Kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu inhibuje po sobě jdoucí stupně metabolismu bakteriální kyseliny listové. Výsledkem synergického účinku kotrimoxazolu je sekvenční blokáda metabolismu bakteriální kyseliny listové [1].



Obr. 2.1. Strukturální vzorec sulfamethoxazolu

Sulfamethoxazol je antibakteriální chemoterapeutikum patřící do skupiny sulfonamidů [3], látek, které byly zavedeny do terapeutické praxe ve druhé polovině 30. let 20. století. Sulfonamidy jsou kompetitivní antagonisté kyseliny paraaminobenzoové, inhibující syntézu kyseliny dihydrolistové kompeticí o enzym dihydropteroát syntasy. Tímto mechanismem sulfonamidy brání syntéze bakteriálního růstového faktoru kyseliny listové, jelikož se vytváří její nefunkční analogy [1]. Dnes se sulfonamidy používají jako alternativní léčba močových infekcí, poněkud šířeji se stále uplatňuje kombinace

sulfamethoxazolu s trimethoprimem. Systematický název sulfamethoxazolu (CAS [723-46-6]) je 4-amino-*N*-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzensulfonamid [3]. Strukturní vzorec je uveden na obr. 2.1, jeho sumární vzorec je  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$  a relativní molekulová hmotnost 253,28. Jedná se o téměř bílý krystalický prášek. Sulfamethoxazol je velmi obtížně rozpustný ve vodě, dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, kyselině chlorovodíkové nebo hydroxidu sodném. Jeho teplota tání je 167 °C. Sulfamethoxazol má dvě disociační konstanty  $pK_{a,1} = 1,6$  a  $pK_{a,2} = 5,7$  při 25 °C.



Obr. 2.2. Strukturní vzorec trimethoprimu.

Trimethoprim je antibakteriální chemoterapeutikum patřící do skupiny pyrimidinů [3]. Byl prvně použit v 60. letech 19. století. Dnes se trimethoprim používá i samostatně, ale častější je použití ve fixní kombinaci se sulfamethoxazolem. Bakteriostatický účinek sulfamethoxazolu může být zvrácen přebytkem 4-aminobenzoové kyseliny, pro takový případ trimethoprim brání následujícímu kroku syntézy kyseliny listové. Mechanismus účinku trimethoprimu je založen na inhibici reductázy kyseliny dihydrolistové [1]. Trimethoprim (CAS [738-70-5]) systematicky 5-[(3,4,5-trimethoxy-fenyl)methyl]pyrimidin-2,4-diamin [2], jeho strukturní vzorec je uveden na obr. 2.2, sumární vzorec trimethoprimu je  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ . Jeho relativní molekulová hmotnost je 290,32. Trimethoprim je bílý či lehce nažloutlý krystalický prášek špatně rozpustný ve vodě a alkoholech, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Jeho  $pK_a$  má při 25 °C hodnotu 7,2.

## 2.2 Analytické metody pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu

Pro stanovení trimethoprimu a sulfamethoxazolu ve směsi bylo navrženo velké množství metod, jelikož kotrimoxazol patří mezi velmi často užívaná léčiva. Mezi oficiální lékopisné metody stanovení patří HPLC na obrácených fázích [4] nebo kombinace UV spektrometrie a diazotační titrace [5]. Mezi další často užívané analytické metody patří například UV spektrometrie s víceúrovňovou kalibrací [6, 7], FTIR spektrometrie [8], amperometrie [9], voltametrie [10], HPTLC [11,12] nebo HPLC [13,14]. Charakteristiky vybraných analytických metod pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu jsou uvedeny v tab. 2.1. Většina z těchto metod je ale časově i finančně náročná. Často jsou také ve velkém množství používána organická rozpouštědla, například jako složky mobilní fáze v HPLC metodách.

Tabulka 2.1

Hodnoty limitů detekce pro sulfamethoxazol a trimethoprim u vybraných analytických metod.

Metoda, reference	Prostředí	LOD / mg dm <sup>-3</sup>	
		sulfamethoxazol	trimethoprim
HPLC na obrácených fázích [13]	methanol	0,20	0,35
FTIR spektrometrie [8]	aceton:chloroform 70:30 (v/v)	9,6	4,0
amperometrie [9]	methanol:voda 70:30 (v/v)	0,22	0,17
voltametrie [10]	methanol	3,6×10 <sup>-3</sup>	3,9×10 <sup>-3</sup>
HPTLC [11]	methanol: voda 9:1(v/v)	0,20	0,35

## 2.3 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (angl. sequential injection analysis, SIA) je průtoková analytická metoda, která byla vyvinuta v roce 1989 na Univerzitě ve Washingtonu z původní metody injekční průtokové analýzy (angl. flow injection analysis, FIA). Metoda SIA je založena na nasátí přesně definovaného objemu vzorku do reakční cívky, ke kterému jsou přidávány potřebné reagenty. Produkt reakce je poté odnášen nosným roztokem přes detekční celu do odpadu. Na rozdíl od techniky FIA využívá SIA změnu přímého a zpětného toku nosného proudu, čímž je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt.

Výhodou metody SIA je snadná automatizace sériových analýz velkého počtu vzorků, rychlost analýzy a malá spotřeba vzorku a reakčních činidel. Metoda se užívá v řadě oborů, například v analýze potravin, monitoringu bioprocusů, imunoanalýze, envirometnální analýze, farmaceutické analýze [15].

Přístroj pro SIA je nejčastěji složen z pístové pumpy, reakční cívky, vícecestného ventilu a vhodného detektoru. K detekci je často užíván spektrometrický [16] nebo spektrofluorometrický detektor [17], ale je možné využít například i elektrochemické detektory [18] nebo turbidimetrie [19]. Analytickou odezvou jsou po sobě jdoucí píky, odpovídající jednotlivým analytům, z jejichž výšky nebo plochy lze zjistit koncentraci analytů.

Instrumentální uspořádání SIA umožňuje užít více reakčních činidel v kombinaci s různými nosnými proudy. Při SIA se po sekvencích nasávají vzorek a reagenty do reakční cívky z vybraných rezervoárů pomocí vícecestného ventilu. Při obráceném chodu pumpy se vzorek a reagenty dokonale promíchají a vzniká tak zóna detekovatelného produktu. [15]. Pro úspěšné stanovení metodou SIA je především důležitá správně zvolená chemická reakce pro převedení analytu na detegovatelný produkt. Analyt je možné detegovat přímo, ale většinou je potřeba ho změnit tak, aby byl kompatibilní s detekčním systémem. Nejjednodušeji jsou adaptovatelné spektrometrické analýzy nebo titrace [20].

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Analyzovaný léčivý přípravek

Analyzovaným léčivým přípravkem byly tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 s deklarovaným obsahem 400 mg sulfamethoxazolu a 80 mg trimethoprimu, vyrobené firmou Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A. (Polsko), číslo šarže 41533850.

#### 3.2 Použité chemikálie

Jako standardy byly použity: sulfamethoxazol, analytical standard (Sigma-Aldrich) a trimethoprim  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich). Veškeré použité chemikálie byly analytické nebo HPLC čistoty: acetonitril (Sigma-Aldrich), dusitan sodný (Lach-Ner), chlorovodíková kyselina 35% (Lach-Ner), octová kyselina 99% (Penta), *N*-(1-naftyl)ethylendiamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich) a triethylamin (Sigma-Aldrich)

#### 3.3 Příprava roztoků

- Roztok dusitanu sodného o koncentraci  $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  v prostředí chlorovodíkové a octové kyseliny.

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0311 g dusitanu sodného, kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a rozpuštěno asi v 50 ml deionizované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 4,5 ml chlorovodíkové kyseliny o koncentraci  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  a 1,5 ml octové kyseliny o koncentraci  $5 \text{ mol dm}^{-3}$ . Směs byla doplněna deionizovanou vodou po rysku. Pro úplné rozpuštění byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně na 15 minut. Roztok je použitelný maximálně 24 hodin.

- Roztok činidla NEDA o koncentraci  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 

Na analytických vahách bylo naváženo 0,1295 g *N*-(1-naftyl)ethylendiamin hydrochloridu, kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku. Pro úplné rozpuštění byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně na 30 minut.
- Směs chlorovodíkové a octové kyseliny.

Do 1000 ml odměrné baňky bylo pipetováno 45 ml chlorovodíkové kyseliny o koncentraci  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  a 15 ml octové kyseliny o koncentraci  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  a doplněno po rysku deionizovanou vodou.
- Standardní roztok sulfamethoxazolu o koncentraci  $0,2 \text{ g dm}^{-3}$ 

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0200 g sulfamethoxazolu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno směsí  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny. Pro úplné rozpuštění byl roztok ponechán v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.
- Standardní roztok trimethoprimu o koncentraci  $0,5 \text{ g dm}^{-3}$ .

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0501 g trimethoprimu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno směsí  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny. Pro úplné rozpuštění byl roztok ponechán v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut.
- Roztok tablety Biseptol<sup>®</sup> 480.

Na analytických vahách byly zváženy tři tablety přípravku Biseptol<sup>®</sup> 480, které byly následně zhomogenizovány, a na analytických vahách byl odvážen podíl odpovídající 15 % hmotnosti tří tablet. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a rozpuštěno ve směsi  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny. Pro úplné rozpuštění byl roztok ponechán v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 2,5 ml do 100 ml baňky a doplněno po rysku směsí  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny.

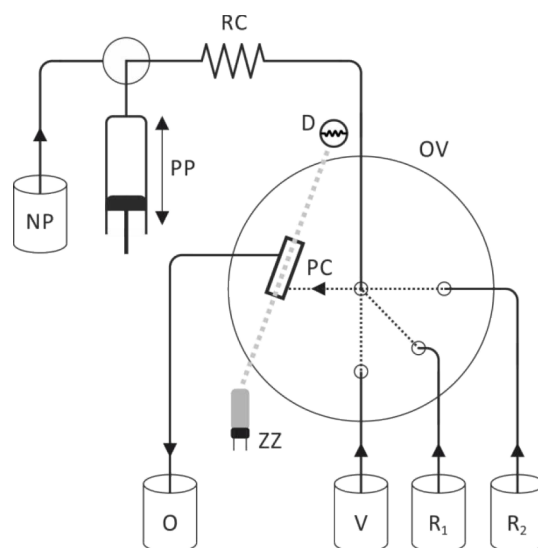
- Mobilní fáze pro HPLC stanovení

Mobilní fáze pro HPLC stanovení byla připravena smícháním 1400 ml destilované vody, 400 ml acetonitrilu a 2,0 ml triethylaminu. S použitím hydroxidu sodného o koncentraci  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  bylo upraveno pH směsi na hodnotu 5,9. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 2000 ml.

### 3.4 Instrumentace

Statická spektrometrická měření byla provedena na jednopaprskovém spektrometru HP-8453 (Agilent, USA) s diodovým polem v křemenných kyvetách o délce optické dráhy 1 cm.

Sekvenční injekční analýza byla provedena na přístroji FIALab-3500, který byl ovládán softwarem FIALab ver. 5.0 (obé FIALab Instruments, USA). Roztoky byly nasávány 1,00 ml injekční pumpou přes osmicestý ventil. Reakční cívka byla vyrobena z PTFE hadičky (Unchurch, USA) vnitřního průměru 0,8 mm a měla celkový objem 1000  $\mu\text{l}$ . Spojovací hadičky z PTFE měly vnitřní průměr 0,5 mm. Spektrometrická detekce u SIA byla realizována na vláknovém spektrometru Ocean Optics QE65000 (Ocean Optics, USA) připojený optickými vlákny o vnitřním průměru 400  $\mu\text{m}$  k průtokové cele o optické dráze 1 cm a vnitřním objemu 80  $\mu\text{l}$ . Celé zapojení je znázorněno na obr. 3.1.



Obr. 3.1. Schéma použité aparatury pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu SIA metodou: *NP* nosný proud (destilovaná voda), *PP* pístová pumpa, *RC* reakční cívka, *OV* osmicestný ventil, *V* vzorek (případně roztok standardu), *R<sub>1</sub>* roztok dusitanu sodného, *R<sub>2</sub>* roztok *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu, *PC* průtoková cela, *ZZ* zdroj záření, *D* detektor, *O* odpad.

Pro HPLC měření byl použit chromatograf UHPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko) s vnitřním detektorem s diodovým polem. Separace byla provedena na koloně XBridge<sup>®</sup> BEH C18 (150×3,0 mm i.d., velikost částic 2,5 μm; Waters). Kolona byla temperovaná na 30 °C. Byla použita isokratická eluce s výše popsanou mobilní fází s průtokovou rychlostí 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Nástřik vzorku byl 2 μl. Detekce probíhala spektrometricky při vlnové délce 254 nm.

### 3.5 Zpracování naměřených dat

Veškerá stanovení byla provedena v pěti opakováních, pokud není uvedeno jinak. Data byla statisticky zpracována. Výsledky jsou uvedeny jako mediány s příslušnými intervaly spolehlivosti. Statistické zpracování bylo provedeno v prostředí programu Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, USA). Grafy byly zpracovány v prostředí programu OriginPro 8.1 (Microcal).

## 4 Výsledky a diskuze

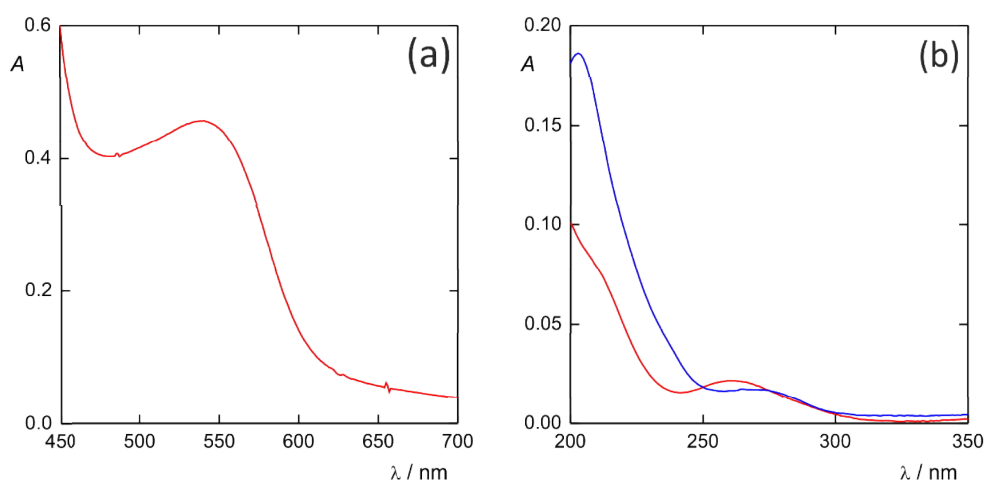
Stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu ve směsi v přípravku Biseptol® 480 bylo založeno na měření absorbance v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. V ultrafialové oblasti spektra byly změřeny absorbance obou analytů. Ve viditelné oblasti spektra byla změřena absorbance produktu sulfamethoxazolu po diazotační reakci s dusitanem sodným a činidlem NEDA, kdy absorbance barevného produktu byla přímo úměrná koncentraci sulfamethoxazolu.

### 4.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Nejprve byla provedena měření a optimalizace experimentálních podmínek ve statickém uspořádání. Poté bylo měření převedeno a optimalizováno pro měření technikou SIA.

#### 4.1.1 *Statické spektrometrické měření*

Na základě literárních údajů a po předběžných měřeních byl jako prostředí pro stanovení studovaných látek zvolen vodný roztok  $4,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a současně  $7,5 \cdot 10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  octové kyseliny. Při statickém spektrofotometrickém měření byla změřena spektra obou analytů samostatně a produktu diazotační reakce pro určení optimální vlnové délky pro měření samostatných analytů a produktu diazotační reakce v prostředí směsi chlorovodíkové kyseliny a octové kyseliny. Naměřená spektra jsou uvedena na obrázku 4.1.



Obr. 4.1. Absorpční spektra ve vodném roztoku  $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny: (a) produktu diazotační reakce sulfamethoxazolu o koncentraci  $2,5 \text{ mg dm}^{-3}$  s  $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  dusitanem sodným a  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  NEDA; (b) samotného sulfamethoxazolu o koncentraci  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  (červená křivka) a samotného trimethoprimu o koncentraci  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  (modrá křivka).

Z naměřených spekter byla pro měření absorbance v ultrafialové oblasti zvolena jako vhodná vlnová délka 264 nm. Pro měření absorbance ve viditelné oblasti byla zvolena jako vhodná vlnová délka 540 nm.

#### 4.1.2 *Sekvenční průtoková analýza*

Pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu SIA metodou byla použita aparatura znázorněná na obr. 3.1. Jako nosný proud byla použita destilovaná voda. Pro veškerá měření pro optimalizaci SIA byl použit standard o koncentraci  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  sulfamethoxazolu a  $1 \text{ mg dm}^{-3}$  trimethoprimu. Jako analytický signál byla použita plocha SIA píku.

Nejprve byla pro stanovení ve viditelné oblasti optimalizována koncentrace reakčních činidel podle tabulky 4.1. Pro další měření byla vybrána koncentrace NEDA  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  a koncentrace dusitanu sodného  $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , při nichž bylo dosaženo největší analytické odezvy.

Tabulka 4.1

Závislost velikosti signálu při vlnové délce 540 nm ( $S_{A540}$ ) na koncentraci použitých reagentů při SIA stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu ( $c(\text{sulfamethoxazol}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $c(\text{trimethoprim}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ , průtoková rychlost nosného proudu  $50 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$ , dávkovaný objem vzorku  $50 \text{ } \mu\text{l}$ ).

$c(\text{NEDA}) / \text{mol dm}^{-3}$	$c(\text{NaNO}_2) / \text{mol dm}^{-3}$	$S_{A264} / \text{s}$
$5,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	— <sup>a</sup>
$3,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	1,459
$5,0 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	1,509

<sup>a</sup> Signál byl nereprodukovatelný.

Pro určení vhodné průtokové rychlosti nosného proudu byly změřeny odezvy pro průtokové rychlosti uvedené v tabulce 4.2. Pro měření byla vybrána průtoková rychlost nosného proudu  $50 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$ , při níž bylo dosaženo největší analytické odezvy.

Tabulka 4.2

Závislost velikosti signálu při vlnové délce 264 nm ( $S_{A264}$ ) na průtokové rychlosti nosného proudu ( $F$ ) při SIA stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu ( $c(\text{sulfamethoxazol}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $c(\text{trimethoprim}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ , dávkovaný objem vzorku  $50 \text{ } \mu\text{l}$ ).

$F / \mu\text{l s}^{-1}$	$S_{A264} / \text{s}$
50	0,199
100	0,100

Pro určení optimálního dávkovaného objemu vzorku byly změřeny odezvy pro dávkované objemy vzorku uvedené v tabulce 4.3. Pro měření byl použit dávkovaný objem vzorku  $50 \text{ } \mu\text{l}$ , při němž bylo dosaženo největší analytické odezvy

Tabulka 4.3

Závislost velikosti signálu při vlnové délce 264 nm ( $S_{A264}$ ) na dávkovaném objemu vzorku při SIA stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu ( $c(\text{sulfamethoxazol}) = 5 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $c(\text{trimethoprim}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ , průtoková rychlost nosného proudu  $50 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$ ).

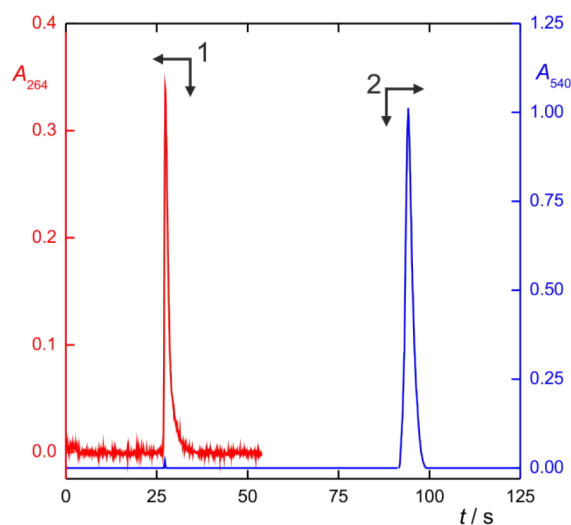
Dávkovaný objem vzorku / $\mu\text{l}$	$S_{A264} / \text{s}$
50	1,427
75	1,251
100	1,402

## 4.2 Stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu SIA metodou

Sekvenční injekční analýza pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu ve směsi byla realizována v aparatuře znázorněné v kapitole 3.4. Na základě optimalizačních experimentů byla pro stanovení použita průtoková rychlost nosného proudu  $50 \mu\text{l s}^{-1}$  a následující sekvence:

1. do reakční cívky aparatury bylo nasáto  $50 \mu\text{l}$  roztoku vzorku (resp. standardu) a po 10 sekundové prodlevě byl obsah reakční cívky promyt detekční průtokovou celou do odpadu, tím byl získán signál při vlnové délce  $264 \text{ nm}$ ;
2. reakční cívka, spojovací hadičky a detekční průtoková cela byly promyty destilovanou vodou;
3. do reakční cívky aparatury bylo nasáto  $50 \mu\text{l}$  roztoku vzorku (resp. standardu), dále  $100 \mu\text{l}$  roztoku dusitanu sodného o koncentraci  $4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  a  $100 \mu\text{l}$  roztoku NEDA o koncentraci  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , po 30 sekundové reakční prodlevě byl obsah reakční cívky promyt detekční průtokovou celou do odpadu, tím byl získán signál při vlnové délce  $540 \text{ nm}$ ;
4. reakční cívka, spojovací hadičky a detekční průtoková cela byly promyty destilovanou vodou.

Na obr. 4.2 je uveden příklad získaného záznamu (SIAGram). Cyklus jednoho měření trval  $150 \text{ s}$ , za hodinu lze tedy analyzovat 24 vzorků.

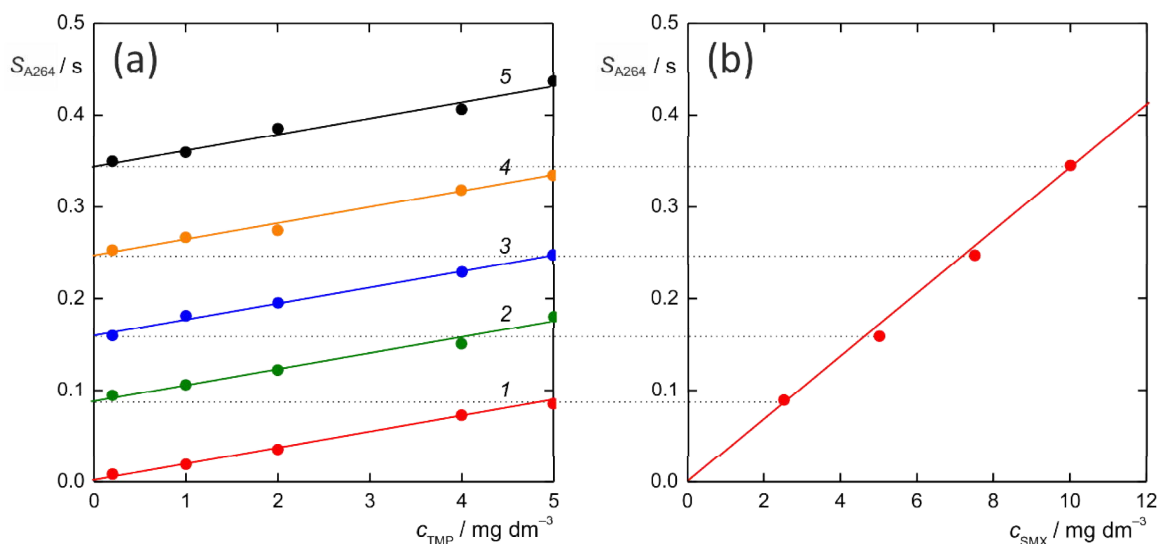


Obr. 4.2 Závislost absorbance na čase (SIA pík) pro standardní roztok o koncentraci  $2 \text{ mg dm}^{-3}$  trimethoprimu (červená křivka 1) a  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  sulfamethoxazolu (modrá křivka 2) ve vodném roztoku  $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  chlorovodíkové kyseliny a  $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  octové kyseliny (dávkový objem vzorku  $50 \mu\text{l}$ ,  $F = 50 \mu\text{l s}^{-1}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{NaNO}_2) = 100 \mu\text{l}$ ,  $c(\text{NEDA}) = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{NEDA}) = 100 \mu\text{l}$ ).

Jako analytický signál pro konstrukci kalibračních závislostí sloužily plochy SIA píků. Plocha SIA píku při vlnové délce 264 nm je úměrná koncentraci obou analytů, tedy trimethoprimu i sulfamethoxazolu, na základě aditivity absorbancí podle Lambertova-Beerova zákona. Při optimálních podmínkách byla proměřena závislost plochy píku při vlnové délce 264 nm na koncentraci standardu trimethoprimu s konstantním přírůvkem sulfamethoxazolu (obr. 4.3), kterou lze popsat rovnicí

$$S_{A264} = 0,0173 c_{\text{TMP}} + 0,0344 c_{\text{SMX}} \quad (4.1)$$

kde  $S_{A264}$  je plocha SIA píku při vlnové délce 264 nm [s],  $c_{\text{TMP}}$  je koncentrace trimethoprimu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ] a  $c_{\text{SMX}}$  je koncentrace sulfamethoxazolu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]. Determinační koeficient závislosti je 0,9928, vypočítaný limit detekce pro trimethoprim je  $0,03 \text{ mg dm}^{-3}$  (koncentrace odpovídající signálu trojnásobku šumu základní linie).



Obr. 4.3. Závislost plochy SIA píku při vlnové délce 264 nm (a) na koncentraci standardu trimethoprimu v rozmezí 0,1–5,0  $\text{mg dm}^{-3}$  při konstantní koncentraci sulfamethoxazolu (1) 0,0  $\text{mg dm}^{-3}$ , (2) 2,5  $\text{mg dm}^{-3}$ , (3) 5,0  $\text{mg dm}^{-3}$ , (4) 7,5  $\text{mg dm}^{-3}$  a (5) 10,0  $\text{mg dm}^{-3}$ ; (b) na koncentraci sulfamethoxazolu bez přítomnosti trimethoprimu.

Plocha SIA píku při vlnové délce 540 nm je úměrná pouze koncentraci sulfamethoxazolu (ani desetinásobný přebytek přítomného trimethoprimu neovlivní hodnotu plochy píku). Pro lineární dynamický rozsah sulfamethoxazolu 0,1–10,0  $\text{mg dm}^{-3}$  byla změřena kalibrační závislost, kterou popisuje rovnice

$$S_{A540} = 0,076 c_{SMX} \quad (4.2)$$

kde  $S_{A540}$  je plocha SIA píku při vlnové délce 540 nm [s] a  $c_{SMX}$  je koncentrace sulfamethoxazolu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ]. Determinační koeficient závislosti je 0,9797, vypočítaný limit detekce pro sulfamethoxazol je 0,01  $\text{mg dm}^{-3}$  (koncentrace odpovídající signálu trojnásobku šumu základní linie).

Při stanovení obou látek se tedy koncentrace sulfamethoxazolu získá z rovn. (4.2) a následně se tato hodnota dosadí do rovn. (4.1) aby bylo možné získat i hodnotu trimethoprimu.

Vyvinutá SIA metoda byla použita pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu v autentickém vzorku léčivého přípravku, tabletách Biseptol® 480. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 4.4, ze které je patrné, že stanovené hodnoty SIA měřením jsou v dobré shodě s deklarovaným obsahem sulfamethoxazolu i trimethoprimu v tabletě.

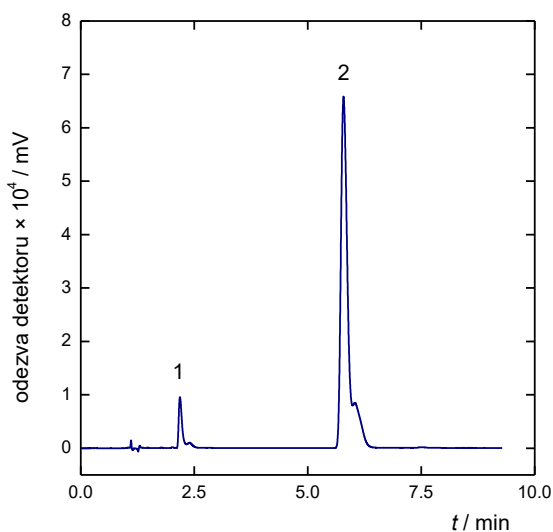
Tabulka 4.4

Výsledky stanovení obsahu složek tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 metodou SIA.

složka	obsah	
	deklarovaný	nalezený / % ± RSD
sulfamethoxazol	400 mg v tabletě	94 ± 3
trimethoprim	80 mg v tabletě	96 ± 1

### 4.3 Stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu HPLC metodou

Jako srovnávací metoda pro stanovení obsahu složek autentického vzorku tablet Biseptol<sup>®</sup> 480 byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie podle metody uvedené v The United States Pharmacopoeia [4]. Na obr. 4.4 je znázorněn ilustrativní chromatogram, výsledky stanovení jsou uvedeny v tab. 4.5.



Obr. 4.4 Chromatogram stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu metodou HPLC: (1) trimethoprim ( $c = 0,32 \text{ mg ml}^{-1}$ ), (2) sulfamethoxazol ( $c = 1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Podmínky měření: kolona XBridge<sup>®</sup> BEH C18 (150×3,0 mm i.d., velikost částic 2,5  $\mu\text{m}$ ), isokratická eluce voda:acetonitril:triethylamin = 1589:400:2 (v/v/v), průtok 0,5 ml min<sup>-1</sup>, detekce při 254 nm, nástřik vzorku 2  $\mu\text{l}$ ).

Tabulka 4.5

Výsledky stanovení obsahu složek tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 metodou HPLC.

složka	obsah	
	deklarovaný	nalezený / % ± RSD
sulfamethoxazol	400 mg v tabletě	95,94 ± 0,07
trimethoprim	80 mg v tabletě	97,94 ± 0,03

#### 4.4 Diskuze

Pro stanovení kotrimoxazolu byla vyvinuta a optimalizována metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Stanovení bylo založeno na měření absorbance obou analytů, sulfamethoxazolu a trimethoprimu, v ultrafialové oblasti spektra a měření absorbance barevného produktu diazotační reakce sulfamethoxazolu s NEDA ve viditelné oblasti spektra. Použitá metoda sekvenční injekční analýzy se osvědčila jako rychlá a jednoduchá metoda, která poskytuje dostatečně přesné výsledky pro stanovení obou analytů.

Při porovnání s lékopisnou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie je metoda SIA rychlejší, méně nákladná a poskytuje dostatečně přesné výsledky stanovení. Výhodou je také menší spotřeba použitých chemikálií.

## 5 Závěr

V bakalářské práci byla vyvinuta a optimalizována metoda sekvenční injekční analýzy pro spektrometrické stanovení analytů trimethoprimu a sulfamethoxazolu ve směsi. Metoda byla úspěšně aplikována na stanovení těchto analytů v lékové formě Biseptol<sup>®</sup> 480. Stanovení obsahu analytů ve vzorku bylo provedeno pomocí naměřených kalibračních závislostí. Jako srovnávací metoda byla využita HPLC na obrácených fázích podle metody uvedené v The United States Pharmacopoeia. Zjištěné koncentrace sulfamethoxazolu a trimethoprimu pomocí metody SIA jsou v dobré shodě s nalezenými koncentracemi pomocí srovnávací metody HPLC.

Vyvinutá SIA metoda pro stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu v lékové formě Biseptol<sup>®</sup> 480 se tedy ukázala jako vhodná metoda pro rychlé a přesné stanovení těchto dvou látek. Výhodou stanovení SIA metodou oproti již zavedeným metodám je rychlost měření, snadná automatizace a snížení finančních nákladů díky malé spotřebě reakčních činidel.

Výsledky dosažené v této bakalářské práci se rovněž staly podkladem pro publikaci v časopise *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, viz příloha.

## Seznam literatury

1. Švihovec, J. a kol.: *Farmakologie*. Praha, Grada 2018.
2. Lincová, D.; Fraghali, H. a kol.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2007.
3. Hampl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2002.
4. *The United States Pharmacopoeia 41, National Formulary 36*. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville 2018.
5. *British Pharmacopoeia 2019*. The Stationery Office, London 2019.
6. Rohman, A.; Silawati, D.; Sudjadi, Riyanto, S.: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim using uv spectroscopy in combination with multivariate calibration. *Journal of Medical Sciences* **15**, 178–184 (2015).
7. Hassouna, M.E.M.: Simultaneous spectrophotometric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in drugs. *Analytical Letters* **30**, 2341–2352 (1997).
8. Kargosha, K.; Ahmadi, S.H.: Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets by first-derivative FTIR spectrometry. *Analytical Letters* **32**, 1613–1626 (1999).
9. Pereira, P.F.; Pereira da Silva, W.; Munoz, R.A.A., Richter, E.M.: A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. *Química Nova* **38**, 663–668 (2015).
10. Andrade, L.S.; Rocha-Filho, R.C.; Cass, Q.B.; Fatibello-Filho, O.: Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **21**, 1475–1480 (2009).
11. Shewiyo, D.H.; Kaale, E.; Risha, P.G.; Dejaegher, B.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander Heyden, Y.: Development and validation of a normal-phase high-performance thin layer chromatographic method for the analysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7102–7107 (2009).
12. Datta, K.; Das, S.K.: Thin layer chromatographic method for rapid quantification and identification of trimethoprim and sulfamethoxazole in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Liquid Chromatography* **11**, 3079–3089 (1988).
13. Amin, A.S.; El Shahat, M.F.; Edeen, R.E.; Meshref, M.A.: Comparison of ion-pairing and reversed phase liquid chromatography in determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Analytical Letters* **41**, 1878–1894 (2008).
14. Kulikov, A.U.; Verushkin, A.G.; Loginova, L.P.: Comparison of micellar and reversed-phase liquid chromatography for determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Chromatographia* **61**, 455–463 (2005).

- 
15. Lenehan, C.E.; Barnett, N. W; Lewis, S.W.: Sequential injection analysis. *Analyst* **127**, 997–1020 (2002).
  16. Shu, H.C.; Hakanson, H.; Mattiasson, B.: On-line monitoring of D-lactic acid during a fermentation process using immobilized D-lactate dehydrogenase in sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* **300**, 277–285 (1995).
  17. Guzman, M.; Pollema, C.; Růžička, J.; Christian, G. D.: Sequential injection technique for atomation of complex analytical procedures: fluorometric assay of factor thirteen. *Talanta* **40**, 81–87 (1993).
  18. Wilmer, M.; Trau, D.; Renneberg, R.; Spener, F.: Amperometric immunosensor for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) in water. *Analytical Letters* **30**, 515–525 (1997).
  19. March, J. G.; Simonet, B. M.; Grases F.: Kinetic-turbidimetric determination of phytic acid by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **409**, 9–16 (2000).
  20. Townshend, A.: *Encyclopedia of Analytical Science*. Londýn, Academic Press 1995.

## Příloha