

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

**Stanovení metoklopramidu pomocí uhlíkových pastových elektrod**

**Determination of metoclopramide using carbon paste electrodes**

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

**Praha 2009**

**Miroslav Mikeš**

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2008 – 2009 a vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT ČR (projekty MSM 0021620857, LC 06035 a RP 14/63). Z těchto projektů byla tato bakalářská práce také finančně podporována.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne.....

.....

podpis

Rád bych poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., za odborné vedení cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Haně Dejmkové a dalším členům katedry analytické chemie za pomoc, kterou mi při práci poskytli. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

## **Klíčová hesla:**

HPLC – spektrofotometrická detekce

HPLC – elektrochemická detekce

HPLC – reverzní fáze

## **Klíčová slova:**

HPLC

4-amino-5-chloro-*N*-[2-(diethylamin)ethyl]-2-methoxybenzamid monohydrochlorid

uhlíková pastová elektroda

## **Key Words plus:**

HPLC – spectrophotometric detection

HPLC – electrochemical detection

HPLC – RP

## **Key Words:**

HPLC

4-amino-5-chloro-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-methoxybenzamide hydrochloride

carbon paste electrode

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
1. Cíl práce.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1 Metoklopramid hydrochlorid.....	8
2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	8
2.1.2 Možnosti praktického využití MCP.....	8
2.1.3 Kontraindikace a nežádoucí účinky.....	9
2.1.4 Metody pro stanovení MCP v čistém stavu, v léčivech a tělních tekutinách .....	10
2.2 Uhlíkové pastové elektrody.....	11
2.2.1 Základní charakteristika.....	11
2.2.2 Důležité fyzikálně chemické a elektrochemické vlastnosti CPE.....	11
2.2.3 Některé přednosti a nevýhody CPE.....	12
2.2.4 Využití CPE.....	13
3. Experimentální část.....	14
3.1 Použité chemikálie.....	14
3.2 Použitá aparatura.....	14
3.3 Další používaná zařízení.....	15
3.4 Použité vzorce.....	15
3.5 Pracovní postupy.....	16
3.5.1 Příprava uhlíkové pastové elektrody.....	16
3.5.2 Příprava používaných chemikálií.....	16
3.5.3 Vlastní měření.....	17
3.5.4 Spektrofotometrické zjišťování stálosti zásobního roztoku.....	17
4. Výsledky a diskuse.....	19
4.1 Vliv pH vodné složky mobilní fáze.....	19
4.2 Hydrodynamické voltamogramy.....	22
4.3 Kalibrační závislosti.....	24
4.3.1 Spektrofotometrická detekce.....	24
4.3.2 Elektrochemická detekce.....	28
5. Závěr.....	32
6. Literatura.....	33

## Seznam použitých zkratk

<i>A</i>	absorbance
AU, mAU	jednotky absorbance
<i>c</i>	koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CNS	centrální nervový systém
CPE	uhlíková pastová elektroda
EPS	extrapyramidový systém
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>k</i>	retenční faktor
LC-MS	kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií
<i>L<sub>D</sub></i>	mez detekce
MCP	metoklopramid
<i>N</i>	počet teoretických pater kolony
NMR	jaderná magnetická rezonance
p.a.	pro analýzu
pH	vodíkový exponent
<i>R</i>	korelační koeficient
RIA	radioimunoanalýza
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
<i>t<sub>M</sub></i>	mrtvý čas kolony
<i>t<sub>R</sub></i>	retenční čas
<i>t<sub>i</sub></i>	teplota tání
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
<i>w<sub>1/2</sub></i>	šířka píku v polovině výšky
<i>λ</i>	vlnová délka elektromagnetického záření
<i>e</i>	hustota

# 1. Cíl práce

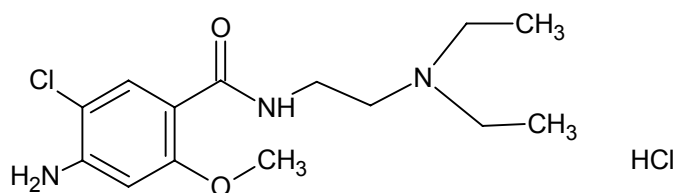
Předložená bakalářská práce se zabývá studiem detekce metoklopramid hydrochloridu s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografii na reverzních fázích.

Cílem práce bylo optimalizovat podmínky pro stanovení metoklopramid hydrochloridu pomocí elektrochemické (ampérometrické) detekce na uhlíkových pastových elektrodách.

MCP patří do skupiny léčiv zejména gastrointestinálního traktu. Má významné antiemetické, ale také prokinetické účinky ovlivňující absorpci jiných léčiv. Klinickými studii byly u této látky potvrzeny časté a závažné lékové interakce. Také biologická dostupnost je u různých jedinců rozdílná<sup>1</sup>. Z toho vyplývá nezbytnost přesného stanovení MCP pro optimalizaci léčby.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Metoklopramid hydrochlorid<sup>2,3</sup>



C.A.S. Name: 4-amino-5-chloro-*N*-[2-(diethylamin)ethyl]-2-methoxybenzamid monohydrochlorid

$C_{14}H_{22}ClN_3O_2 \cdot HCl$

C.A.S. Number: [7232-21-5]

zkratka: MCP

#### 2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti MCP

Metoklopramid hydrochlorid je bílý nebo téměř bílý jemný prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu a lihu. Čerstvě připravený roztok MCP ve vodě je čirý. Teplota tání je 145 °C až 149 °C (Cit.<sup>3</sup>). Relativní molekulová hmotnost je 336,3.

V roztoku je MCP vysoce fotolabilní<sup>4</sup>.

#### 2.1.2 Možnosti praktického využití MCP

Metoklopramid je používán jako léčivo již od roku 1960 (Cit.<sup>5</sup>). Má mnohostranné využití zejména v gastroenterologii, chirurgii, gynekologii, kardiologii. Existují dva základní farmakologické účinky, a to blokování dopaminových receptorů a ovlivnění cholinergních mechanismů<sup>6</sup>. Často se používá jako antiemetikum a prokinetikum. Stimuluje motilitu horní



části trávicího traktu, zvyšuje klidové napětí dolního svěrače jícnu, zvyšuje tonus a amplitudy kontrakce žaludku. Bylo potvrzeno, že MCP je účinnou látkou k léčbě a prevenci diabetické gastroparesie (diabetické žaludeční zástavy krevního oběhu), dyspepsie a řady funkčních gastrointestinálních poruch. Je indikován při zvracení různého původu, nevolnosti, pálení žáhy, přetrvávajícím pocitu plnosti po jídle, ztrátě chuti k jídlu a anorexii. MCP se využívá též k léčbě akutního migrenózního záchvatu, při úrazech hlavy a mozku atd. Je indikován zejména při intoleranci jiných léků<sup>6,7</sup>.

V posledních letech byly provedeny studie, které potvrzují také některé ochranné účinky MCP proti bohužel dosud opakovaně zneužívaným vysoce toxickým chemickým bojovým látkám organofosfátového typu. Byl potvrzen určitý ochranný účinek MCP pro inhibici lidské bolesti<sup>8</sup>.

MCP je účinnou látkou mnoha farmaceutických přípravků. K dostání je pod různými obchodními názvy např. Cerucal, Degan, MCP Hexal, Migranerton, Reglan. Na trhu jsou různé druhy tablet obsahující 10, 15 nebo 30 mg MCP nebo ampule injekčního roztoku. Injekční forma MCP je indikována u stavů kdy je třeba rychlého nástupu účinku nebo kdy není možné perorální podání<sup>7</sup>.

MCP se rychle a dobře vstřebává. Podstupuje minimální jaterní metabolismus s výjimkou jednoduché konjugace. MCP je vylučován hlavně prostřednictvím ledvin<sup>5</sup>.

### 2.1.3 Kontraindikace a nežádoucí účinky

Vedle mnoha pozitivních účinků může MCP vyvolat i řadu negativních vedlejších účinků. Je třeba jej užívat pouze v nezbytných případech a jen na lékařský předpis. Doporučováno je jeho použití pro dospělé a terapie by neměla překročit 12 týdnů. Výskyt nežádoucích účinků koreluje s dávkou a trváním léčby metoklopramidem. Mezi nejčastější nepříznivé vedlejší účinky patří ospalost, únava, malátnost a neklid. Méně často se vyskytují bolesti hlavy, nespavost, zmatenost, závratě, deprese a duševní poruchy se sebevražednými tendencemi. Existují zprávy o křečovitých záchvatech, halucinacích a EPS (extrapyramidový systém). Mezi symptomy patří nedobrovolné pohyby končetin, obličejových svalů a úst, rytmické vyplazování jazyka a slintání, neschopnost udržet moč atd.<sup>5</sup>

Opatrnost při užívání se doporučuje u starších pacientů a u žen zejména během těhotenství, dále u osob s ledvinovými nebo jaterními onemocněními, s vysokým krevním tlakem, Parkinsonovou chorobou, u osob se sklonek k depresím a u dětí<sup>5,7,9</sup>.

## 2.1.4 Metody pro stanovení MCP v čistém stavu, v léčivech a tělních tekutinách

Z výše uvedeného vyplývá velký význam přesného stanovení MCP. Rozdíl v biologické dostupnosti MCP u různých osob má potenciální klinický význam, neboť jeho antiemetické účinky i nežádoucí účinky na CNS korelují s plazmatickou koncentrací. Proto je přesné stanovení MCP v léčivech a měření plazmatické koncentrace MCP nezbytné pro optimalizaci léčby, abychom se vyvarovali toxických koncentrací<sup>10</sup>.

Metody používané pro stanovení účinné látky ve farmaceutických přípravcích jsou obvykle založeny na extrakci volných bází a následném stanovení UV-spektrofotometrií. Stanovení však silně ruší vlivy interferující matrice. K odstranění interferencí při stanovení MCP byla úspěšně použita diazotační reakce. Jde o reakci primární aromatické skupiny MCP s dusitanem a následnou kopulací diazoniové soli s anilinem v alkalickém prostředí za vzniku azobarviva, které má absorpční maximum při 410 nm (Cit.11).

Spektrofotometrická a fluorimetrická detekce se ukázala být nedostatečně citlivou pro stanovení některých léčiv v biologické matrici. Mnoho látek nemá chromofory nebo absorbuje UV záření velmi slabě, aby mohlo být dosaženo dostatečně nízké meze detekce.

Proto je v HPLC technikách výhodné použít elektrochemické detektory, neboť jsou mnohem citlivější a specifitější. Pro stanovení MCP v lidském séru je publikována metoda RP-HPLC s ampérometrickou detekcí. Využívá mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a vody 40:60 (v/v) o pH 3. Průtoková rychlost byla nastavena na 1,2 ml·min<sup>-1</sup>. Na pracovní elektrodu ze skelného uhlíku bylo vloženo napětí + 1,1 V, na UV detektoru byla nastavena vlnová délka 275 nm. Dosaženo bylo retenčního času 7,3 min a mez detekce činila 2 ng·ml<sup>-1</sup> (Cit. 12).

V citované literatuře i v množství dalších odborných článků týkajících se MCP jsou popsány mnohé další analytické metody a jejich varianty, vhodné pro stanovení MCP. Jsou to například LC-MS<sup>4</sup>, fluorimetrie<sup>13</sup>, <sup>1</sup>H NMR spektrometrie<sup>14</sup>, dále potenciometrie<sup>15</sup>, voltametrie<sup>16,17</sup>, RIA<sup>18</sup> a mnohé další.

## 2.2 Uhlíkové pastové elektrody

### 2.2.1 Základní charakteristika

CPE jsou malou, ale významnou skupinou elektrod používaných v elektrochemii. Patří do zvláštní skupiny heterogenních uhlíkových elektrod. CPE tvoří směs uhlíkového prášku a vhodné pastové kapaliny. Mechanické, fyzikálně-chemické a elektrochemické vlastnosti uhlíkových past mohou chování elektrod typu CPE přibližovat příbuzným čidlům z tuhých uhlíkových materiálů (např. skelný uhlík, pyrolytický grafit aj.) a elektrodám z ušlechtilých kovů (Pt, Au nebo Ag). Přítomné pojivo je však činí spíše jedinečnými z hlediska potenciometrických měření, kdy vykazují vlastnosti elektrod s kapalinovými membránami. CPE obsahují jak složku vodivou (uhlík) tak izolační (pastová kapalina).

Optimální výběr uhlíkového prášku i pastové kapaliny patří mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující výsledné vlastnosti CPE.

Na trhu jsou dostupné grafitové prášky s nízkou adsorpční schopností, s vysokou uniformitou distribuce velikosti částic a vysokou chemickou čistotou. Velikost zrna je v řádu nanometrů.

Pastová kapalina hraje roli pojiva, které mechanicky váže jednotlivé částice uhlíku, ale zároveň se výrazně podílí na elektrochemických vlastnostech uhlíkové pasty.

Mezi důležité vlastnosti pastové kapaliny patří chemická netečnost a elektroinaktivita, vysoká viskozita a malá těkavost, minimální rozpustnost ve vodě, snížená mísitelnost s organickými rozpouštědly.

První z nich byl 1-bromnaftalen, dále lehké uhlovodíky ( $C^6$  až  $C^{10}$ ), aromáty (benzen, 1,3,5-trimethylbenzen, difenylether), silikonové a parafinické oleje aj.<sup>19,20</sup>

### 2.2.2 Důležité fyzikálně chemické a elektrochemické vlastnosti CPE

Charakteristiky, jimiž se uhlíkové pastové elektrody nejvíce odlišují od ostatních elektrochemických čidel, ať už jde o tuhé elektrody z uhlíku či drahých kovů, varianty rtuťové kapky, či různé senzory s membránami, lze popsat takto:

Konzistence uhlíkové pasty závisí zejména na poměru uhlíku ku kapalině, ale také na zvolených složkách.

Ohmický odpor uhlíkové pasty se pohybuje kolem 10  $\Omega$ , díky čemuž indikační čidla poskytují rychlou odezvu a stabilní signál<sup>21</sup>.

Co se týče životnosti, je uhlíková pasta stabilní a použitelná po dobu několika týdnů či měsíců.

Elektrochemické vlastnosti čerstvě připravené pasty se obvykle ustálí po cca 24 hodinách. Aby nedocházelo k jejímu vysychání, je nutné přechovávat ji ponořenou koncovou částí do nádoby s destilovanou vodou<sup>21</sup>.

Potenciálový rozsah a hodnota zbytkových proudů patří mezi nejdůležitější charakteristiky CPE i ostatních elektrod. Potenciálový rozsah CPE záleží na elektrolytu, v němž je měření prováděno. V kyselých roztocích je potenciálový rozsah v rozmezí od - 1,0 V do + 1,5 V, v neutrálních roztocích mezi - 1,3 V a + 1,4 V a v alkalických roztocích od - 1,2 V do + 1,2 V (Cit.<sup>20</sup>). Potenciálový limit CPE v anodické oblasti je přisuzován proudům způsobeným oxidací základního elektrolytu. Potenciálový limit v katodické oblasti je dán hodnotou přepětí elektrody vůči vodíku. Mimo to se při provádění katodických redukcí na CPE často nepříznivě uplatňuje kyslík rozpuštěný v pastě<sup>19</sup>.

Velmi nízké hodnoty zbytkových proudů jsou způsobené přítomností pastové kapaliny. Snižujeme-li však obsah pastové kapaliny, vykazují CPE vyšší zbytkové proudy a přibližují se tak vlastnostmi pevným elektrodám. Takovéto elektrody se označují jako CPE na limitu "suchého grafitu"<sup>19</sup>.

### 2.2.3 Některé přednosti a nevýhody CPE

Největší výhodou CPE je snadnost jejich chemické modifikace. Lze tak s minimálními náklady získat elektrodový materiál s požadovanými vlastnostmi. Podle způsobu modifikace jsou rozlišovány chemicky modifikované pastové elektrody, elektrody s alterovaným povrchem nebo elektrody modifikované *in situ*. U chemicky modifikovaných dochází k přimíšení modifikujících komponentů přímo do pasty a mají proto speciální jednoúčelové využití. Slouží jako selektivní činidla pro určitou látku či ion. Úpravou povrchu CPE se mění jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Například jeho elektrochemickou aktivací lze zvýšit stupeň reverzibility určitého systému. Aktivované elektrody mají kromě sníženého přepětí i

zvýšenou citlivost, čímž je možno snížit mez stanovitelnosti. U modifikace *in situ* dochází pouze k modifikaci povrchové vrstvy uhlíkové pasty. Ta může být po analýze látky odstraněna a čistá CPE použita k dalším účelům.

K dalším přednostem CPE patří snadná obnovitelnost povrchu oproti příbuzným pevným elektrodám<sup>19</sup>.

CPE se příliš nehodí pro fyzikálně chemické studie vzhledem k hůře definovanému povrchu uhlíkové pasty<sup>19</sup>. Jako nevýhoda je také uváděna nižší stabilita pasty v roztocích s vysokým obsahem organického rozpouštědla. To lze však vyřešit použitím kuliček skelného uhlíku<sup>22</sup>.

## 2.2.4 Využití CPE

Počátky využití CPE spadají do 60.let minulého století. CPE byly navrženy v roce 1958 R. N. Adamsem. Cílem bylo vytvořit elektrodu s obnovitelným povrchem, která je využitelná pro anodické oxidace<sup>20,21</sup>.

Vzhledem k četným výhodám, uvedeným v předchozí části, nachází CPE široké využití v elektroanalýze. CPE jsou využívány ve voltametii, ampérometrii a potenciometrii při výzkumu reakčních mechanismů organických i anorganických látek, dále také v chronopotenciometrii při anorganické a organické stopové analýze. Ampérometrické enzymové biosenzory založené na uhlíkové pastě slouží v coulometrii k analýze léčiv a omamných látek. Využívají se též pro elektrochemickou detekci při analýze biologicky důležitých sloučenin. CPE speciálních konstrukcí slouží k měření v živých tkáních pokusných zvířat (např. intravenózně u opic či v mozku krysy) v režimu *in vivo*, neboť živé organismy snášejí materiály na bázi uhlíkové pasty příznivě. Stále větší praktický význam má analytická aplikace CPE pro sledování kvality životního prostředí a při kontrole léčiv<sup>23,24</sup>.

## 3. Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

4-amino-5-chlor-*N*-[2-(diethylamin)ethyl]-2-methoxybenzamid monohydrochlorid (Sigma-Aldrich)

deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA)

dihydrogenfosforečnan sodný ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , p.a., Lachema, Neratovice)

kyselina fosforečná (85%,  $\rho = 1,71 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  p.a., Lachema, Brno)

hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)

methanol (Penta, Chrudim)

mikrokuličky skelného uhlíku o průměru 0,4-12  $\mu\text{m}$  (Alpha Aesar, USA)

minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)

### 3.2 Použitá aparatura

**Pumpa:** vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

**Dávkovač:** LCI 30 se smyčkou 20  $\mu\text{l}$  (Laboratorní přístroje, Praha)

**Kolona:** Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 (5  $\mu\text{m}$ ), 125  $\times$  4 mm (LichroCART)

**Detektory:** UV/VIS detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Praha)

Ampérometrický detektor ADLC 1 v tříelektrodovém zapojení (Laboratorní přístroje, Praha)

- Pracovní elektroda- uhlíková elektroda pístového typu, tělo teflonové s nerezovým pístem pro vytlačení pasty, aktivní plocha kruhová o průměru 3 mm
- Referentní elektroda- argentchloridová s  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl
- Pomocná elektroda- platinová

**Programové vybavení:** CSW 1.7 (DataApex Ltd.), pracující v prostředí Windows 95 (Microsoft)

### 3.3 Další používaná zařízení

**Spektrofotometr:** Agilent Technologies 8453

**pH metr:** digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK)

s kombinovanou skleněnou elektrodou

**Magnetická míchačka:** Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)

**Odstranění vzduchu z mobilní fáze:** ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

### 3.4 Použité vzorce<sup>25</sup>

**Retenční faktor  $k$ :**

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

$t_R$  ····· retenční čas

$t_M$  ····· mrtvý čas

**Počet teoretických pater  $N$ :**

$$N = 5,545 \cdot (t_R / w_{1/2})^2$$

$t_R$  ······· retenční čas

$w_{1/2}$  ····· šířka píku v polovině jeho výšky

## 3.5 Pracovní postupy

### 3.5.1 Příprava uhlíkové pastové elektrody

Před přípravou uhlíkové pastové elektrody byl nejprve důkladně vyčištěn zásobník elektrodového pouzdra za použití acetonu.

Poté byla připravena uhlíková pasta smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku a 90  $\mu\text{l}$  minerálního oleje a obě komponenty byly několik minut homogenizovány pomocí tloučku v třecí misce. Po malých dávkách a za důkladného pění byla vpravena uhlíková pasta do zásobníku elektrodového pouzdra. Elektroda naplněná čerstvou pastou byla ponechána samovolně homogenizovat po dobu cca 24 hodin.

### 3.5.2 Příprava používaných chemikálií

#### **Příprava 0,1 mol·l<sup>-1</sup> fosfátového pufru**

Nejprve byl připraven 0,1 mol·l<sup>-1</sup> roztok dihydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě z předem vypočteného a odváženého množství pevného dihydrogenfosforečnanu sodného. Za použití pH metru bylo pak přidáním 0,1 mol·l<sup>-1</sup> kyseliny fosforečné případně 0,2 mol·l<sup>-1</sup> hydroxidu sodného upraveno pH roztoku na požadovanou hodnotu (2, 3, 4 nebo 6).

#### **Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze byla připravena smísením fosfátového pufru (0,1 mol·l<sup>-1</sup>) o zvoleném pH (2, 3, 4 nebo 6) s methanolem v poměru 1:1. Pro odstranění vzduchu z mobilní fáze byla použita ultrazvuková čistička.

#### **Příprava 1·10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup> roztoku MCP v deionizované vodě a příprava 1·10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup> roztoků pro dávkování do kolony**

Zásobní roztok o koncentraci 1·10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deionizované vodě. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním zásobního roztoku mobilní fází. Všechny roztoky byly uchovávány



v temnu v chladničce při konstantní teplotě 5 °C. Stálost zásobního roztoku byla sledována spektrofotometricky.

### 3.5.3 Vlastní měření

Nejprve byl zkoumán vliv pH (2, 3, 4 nebo 6) výše uvedené mobilní fáze na retenční charakteristiky MCP. Nástřikem vodného roztoku NaNO<sub>3</sub> o koncentraci 1·10<sup>-3</sup> mol·l<sup>-1</sup> na RP-HPLC kolonu byl zjištěn mrtvý čas kolony. Dusičnan sodný byl detekován při vlnové délce 230 nm. Pro zjištění retenčních časů MCP byl prováděn nástřik 1 · 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup> roztoku této látky do chromatografické kolony. Dávkovaný objem byl vždy 20 µl a průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml·min<sup>-1</sup>. Spektrometrická detekce se uskutečnila při vlnové délce 273 nm.

Za účelem získání dat pro sestrojení hydrodynamických voltamogramů byly za stejných experimentálních podmínek zkoumány zmíněné čtyři hodnoty pH fosfátového pufru v mobilní fázi při potenciálu + 0,8 V až + 1,4 V (s krokem po 0,1 V) vloženém na uhlíkovou pracovní elektrodu ampérmetrického detektoru, který byl sériově zapojen za UV detektorem. Všechna měření byla prováděna při nastavené citlivosti 200 nA/V. Při změně mobilní fáze, případně i v průběhu měření, byl obnovován povrch elektrody.

Za zjištěných optimálních podmínek (pH, potenciál) byly proměřeny koncentrace MCP v roztoku v rozmezí 0,2 až 100 µmol·l<sup>-1</sup>.

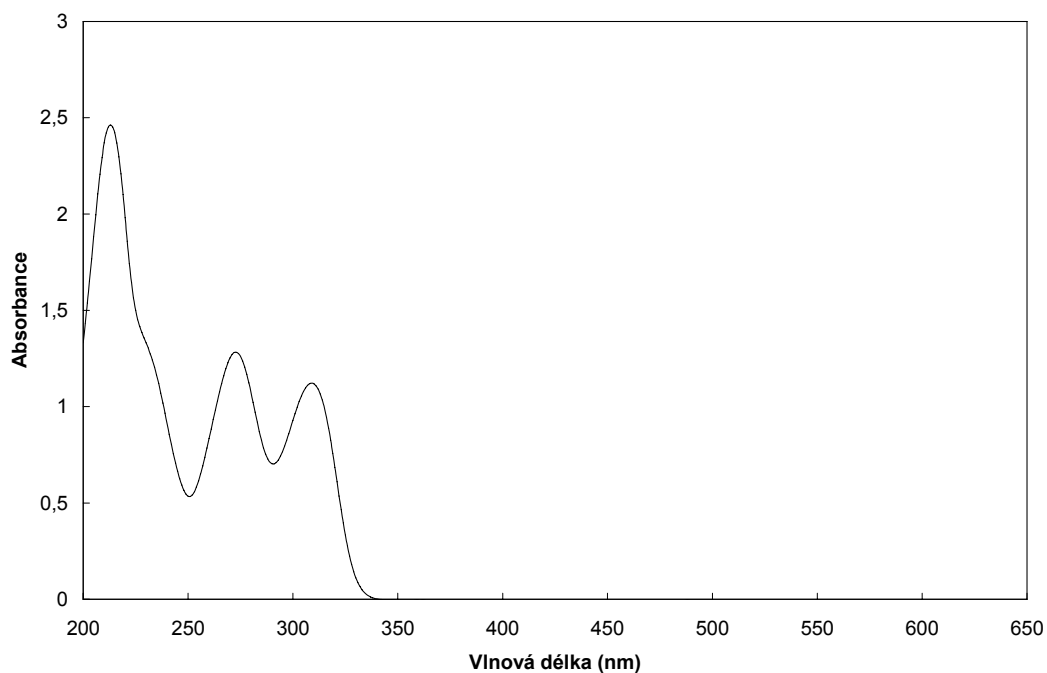
### 3.5.4 Spektrofotometrické zjišťování stálosti zásobního roztoku MCP

Kontrola stálosti MCP byla provedena pomocí spektrofotometru Agilent Technologies 8453. Absorpční spektrum studované látky bylo proměřeno v zásobním roztoku MCP v deionizované vodě proti deionizované vodě. Měření bylo prováděno v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,01 mm v rozmezí vlnových délek 200 až 600 nm. Změřené spektrum je uvedeno na obrázku 3.5.1. Absorbance byly sledovány při třech vlnových délkách absorpčních maxim v průběhu 2 měsíců. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.5.1.

Z naměřených hodnot lze soudit, že studovaný roztok je stálý po dobu nejméně 2 měsíců, pokud je uchováván v temnu při teplotě 5 °C.

**Tab. 3.5.1** Stálost zásobního roztoku MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v deionizované vodě

čas (dny)	Absorbance		
	$\lambda = 213 \text{ nm}$	$\lambda = 273 \text{ nm}$	$\lambda = 309 \text{ nm}$
0	2,469	1,293	1,133
1	2,462	1,282	1,122
7	2,478	1,289	1,130
15	2,474	1,279	1,120
52	2,482	1,299	1,138



**Obr. 3.5.1** UV-VIS spektrum MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve vodě (měřeno proti vodě) v kyvetě o tloušťce 1,01 mm

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Vliv pH vodné složky mobilní fáze

Pro zjištění vlivu pH vodné složky mobilní fáze na retenční charakteristiky MCP byla použita RP-HPLC kolona, která může být použita pouze v kyselé oblasti. Proměřeny byly hodnoty pH 2, 3, 4 a 6, kompatibilní s použitou chromatografickou kolonou.

Jako mobilní fáze byl použit roztok obsahující 50 objemových dílů fosfátového pufru zvoleného pH a 50 objemových dílů methanolu. Průtoková rychlost mobilní fáze byla  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Dávkováno bylo  $20 \text{ } \mu\text{l}$  roztoku MCP v mobilní fázi, koncentrace MCP v roztoku činila  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Detekce roztoku MCP na UV/VIS detektoru byla provedena při vlnové délce 273 nm. Pro zjištění mrtvého času kolony byl proveden nástřik  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaNO}_3$ . Detekce roztoku  $\text{NaNO}_3$  byla provedena při 230 nm a naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4.1.1.

Byly změřeny retenční časy MCP a vypočteny hodnoty dekadického logaritmu retenčního faktoru MCP. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.1.1. Na Obr. 4.1.1 je zobrazena závislost log retenčního faktoru MCP na pH vodné složky mobilní fáze.

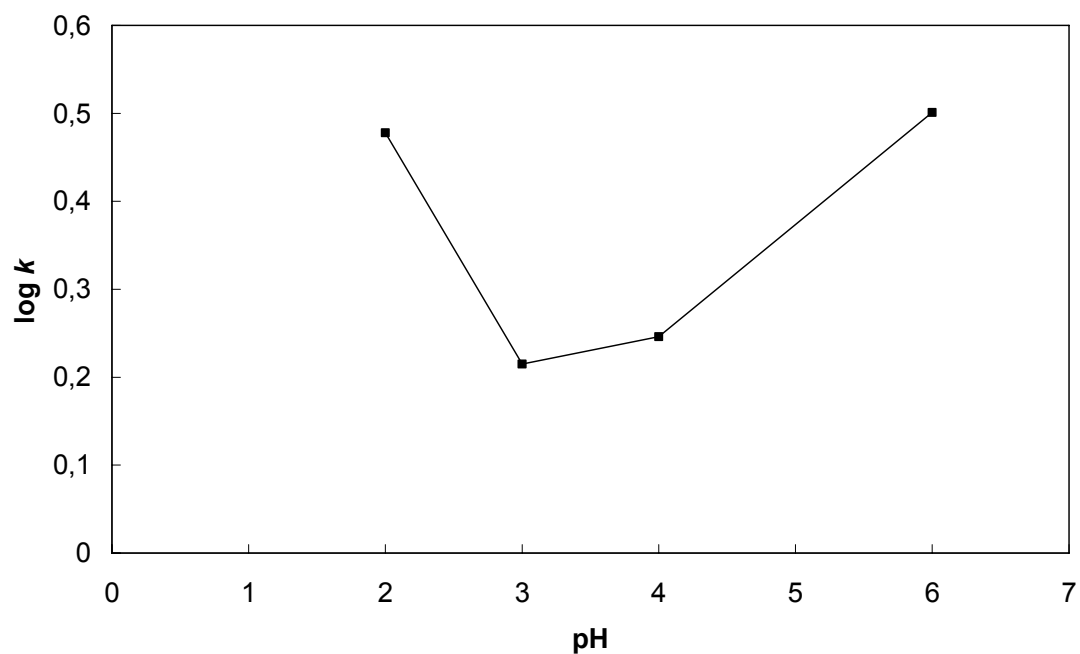
Ze získaných dat je zřejmé, že zadržování analytu (MCP) na stacionární fázi je výrazně ovlivněno pH mobilní fáze (viz Obr. 4.1.1).

Dále byla vypočtena závislost účinnosti RP-HPLC kolony na pH vodné složky mobilní fáze. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.1.2 a na Obr. 4.1.2.

Vypočtený počet teoretických pater je velmi nízký, což by svědčilo o velmi nízké separační účinnosti chromatografické kolony. To je patrné i z chromatogramů uvedených v kapitolách 4.3.1 a 4.3.2. (Obr. 4.3.5 a Obr. 4.3.10), kde jsou vidět velmi široké eluční píky. Příčinou by mohlo být opotřebení kolony.

Tab.4.1.1 Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenční charakteristiky MCP

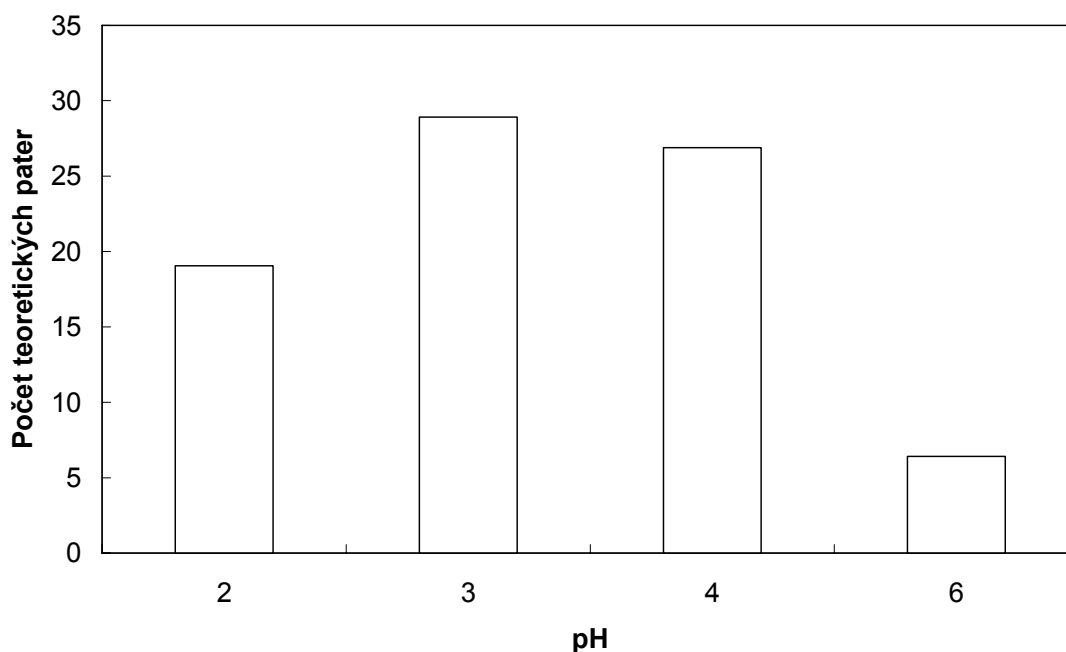
pH	2	3	4	6
$t_R$ (min)	3,540	3,037	3,017	3,871
$\log k$	0,478	0,215	0,246	0,501
$t_M$ (min)	0,883	1,150	1,093	0,929



Obr. 4.1.1 Závislost log retenčního faktoru MCP na pH vodné složky mobilní fáze (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o zvoleném pH (2,3,4,6) : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)

Tab. 4.1.2 Závislost účinnosti RP-HPLC kolony na pH vodné složky mobilní fáze

pH	2	3	4	6
$t_R$ (min)	3,540	3,037	3,017	3,871
$w_{1/2}$ (min)	1,91	1,33	1,37	3,60
$N$	19	29	27	6



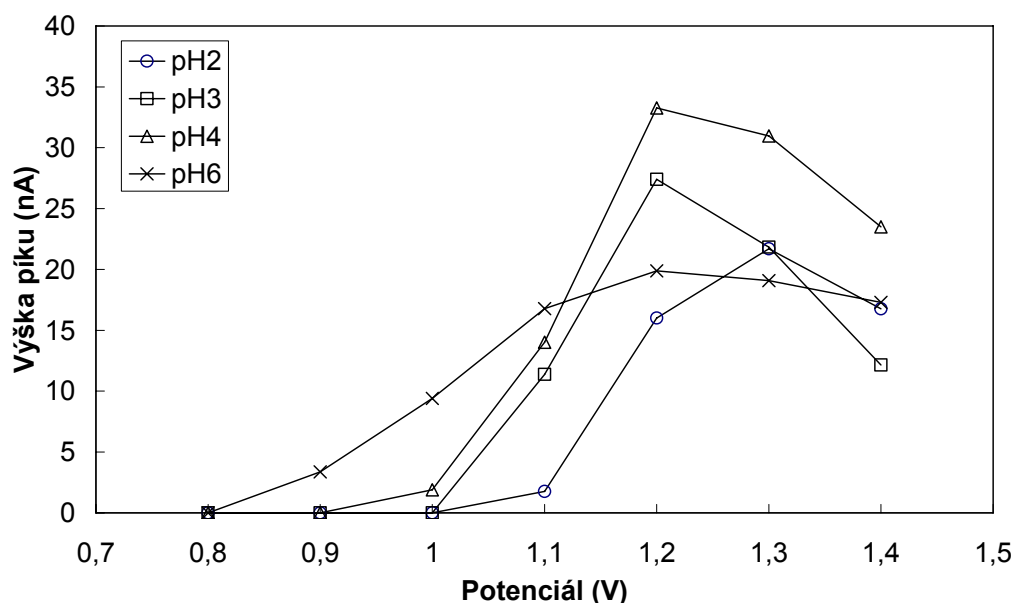
Obr. 4.1.2 Závislost účinnosti RP-HPLC kolony na pH vodné složky mobilní fáze (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o zvoleném pH (2,3,4,6) : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)

## 4.2 Hydrodynamické voltamogramy

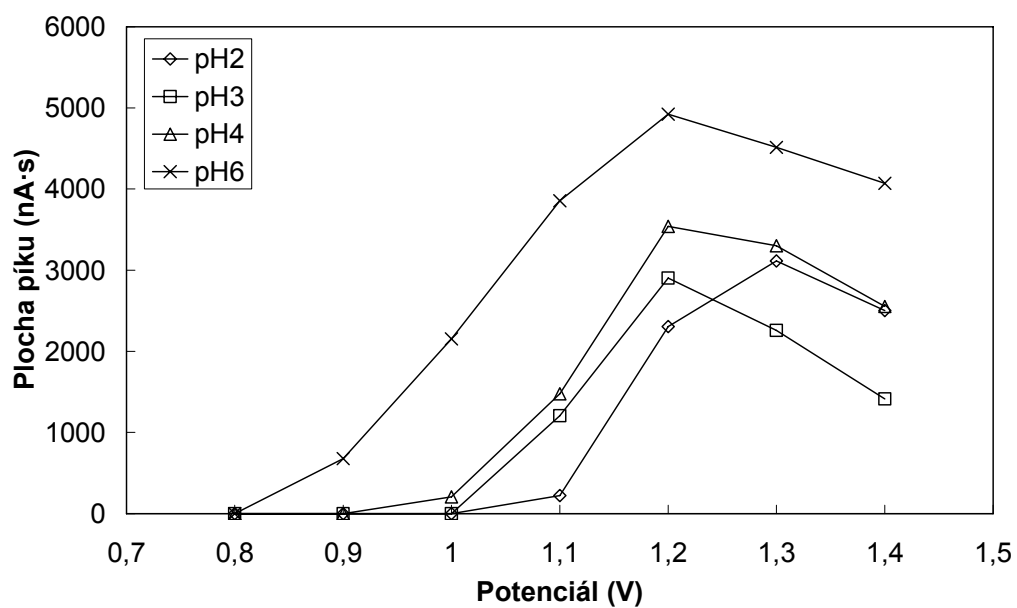
Hydrodynamické voltamogramy byly proměřeny s cílem nalézt optimální podmínky pro elektrochemickou detekci MCP v mobilní fázi pro pH vodné složky mobilní fáze 2, 3, 4 a 6.

Na pracovní uhlíkovou pastovou elektrodu zapojenou v uspořádání wall-jet byl vložen potenciál + 0,8 až + 1,4 V. Při tomto potenciálovém rozmezí byla proměřena závislost výšky respektive plochy píku na vloženém potenciálu.

Hydrodynamický voltamogram vyhodnocený z výšek píku je znázorněn na Obr. 4.2.1 a voltamogram vyhodnocený z ploch píku na Obr. 4.2.2. Z Obr. 4.2.1 je patrné, že největší výšku píku poskytuje měření při pH 4; plocha píku (Obr. 4.2.2) je při tomtéž pH srovnatelná s hodnotami získanými při pH 6. Optimální potenciál + 1,2 V byl vyhodnocen shodně z výšek i ploch píků.



**Obr. 4.2.1** Hydrodynamické voltamogramy MCP vyhodnocené z výšek píků (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o zvoleném pH (2, 3, 4, 6) : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v mobilní fázi)



**Obr. 4.2.2** Hydrodynamické voltamogramy MCP vyhodnocené z ploch píků (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o zvoleném pH (2, 3, 4, 6) : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku MCP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v mobilní fázi)

## 4.3 Kalibrační závislosti

Měření kalibračních závislostí MCP bylo prováděno za optimálních podmínek zjištěných vyhodnocením hydrodynamických voltamogramů. Byla použita mobilní fáze tvořená směsí methanolu a fosfátového pufru o pH 4 v poměru 1:1. Měření byla prováděna na koloně Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm. Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku MCP ve výše zmíněné mobilní fázi. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí 0,2 až 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 4.3.1 Spektrofotometrická detekce

K měření byl použit UV/VIS detektor LCD 2040. Měření bylo prováděno při vlnové délce 273 nm. Kalibrační závislosti z výšek i ploch píků ve vhodném koncentračním rozmezí byly vyneseny do grafů kalibračních závislostí a byly zpracovány metodou lineární regrese.

Kalibrační závislost z výšek píků pro rozmezí koncentrací MCP 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  je uvedena na Obr. 4.3.1. Na Obr. 4.3.2 je znázorněna kalibrační závislost vynesená z ploch píků v témže koncentračním rozmezí. Na Obr. 4.3.3 a Obr. 4.3.4 jsou pak zobrazeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozsahu.

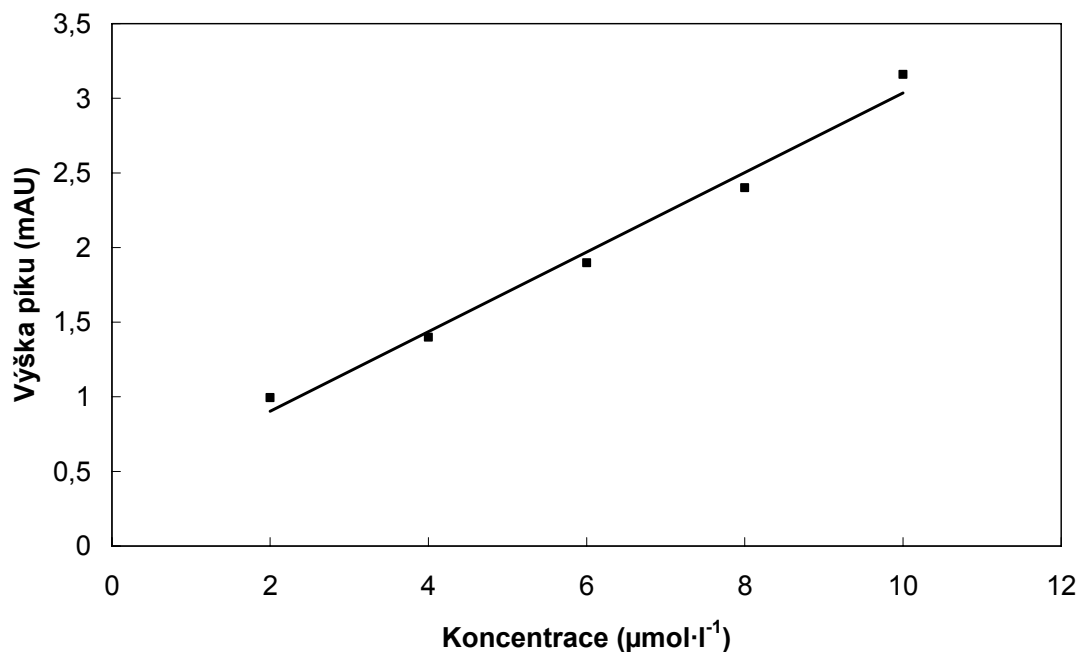
Parametry kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 10 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 2 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  jsou uvedeny v Tab. 4.3.1 a Tab. 4.3.2.

Chromatogramy MCP v rozmezí koncentrací 1 až 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  jsou uvedeny na Obr. 4.3.5.

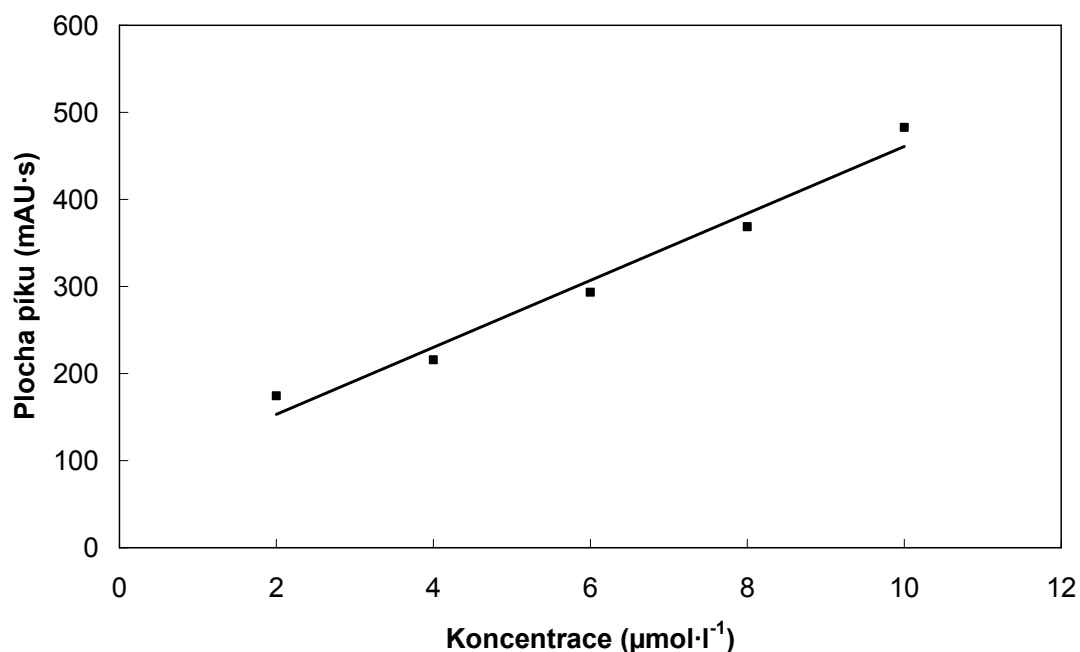
Korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9994 až 0,9745, což vypovídá o nižší linearitě kalibrační závislosti. Vyšší linearitu nepotvrzují ani směrnice logaritmických závislostí, jejichž hodnota je cca 0,84 a je tedy vzdálená od 1.

Dosažený limit detekce  $L_D = 1,99 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl stanoven jako koncentrace odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

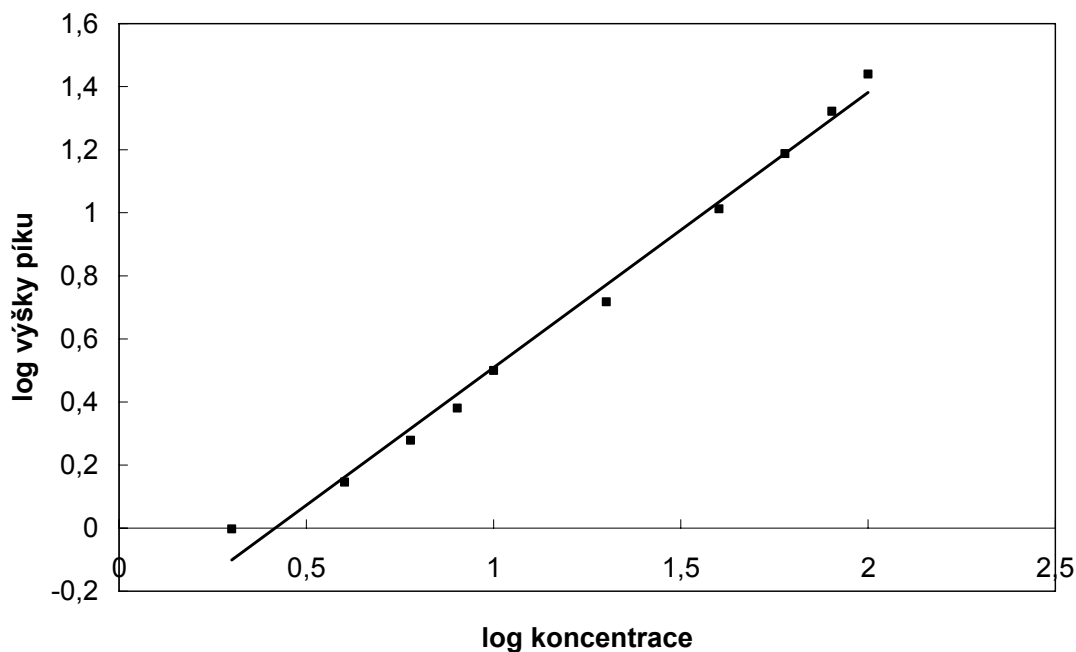




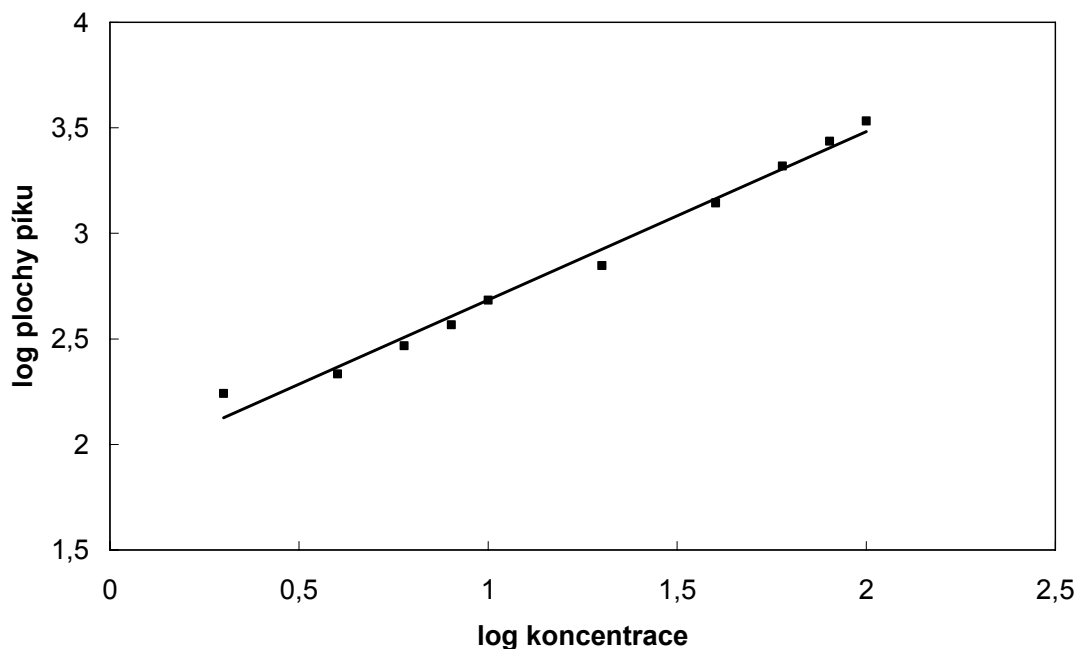
**Obr. 4.3.1** Kalibrační závislost MCP vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125 × 4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)



**Obr. 4.3.2** Kalibrační závislost MCP vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)



**Obr. 4.3.3** Kalibrační závislost MCP v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)



**Obr. 4.3.4** Kalibrační závislost MCP v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 2 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)

**Tab. 4.3.1** Parametry kalibračních závislostí pro stanovení MCP pomocí HPLC s UV spektrometrickou detekcí při 273 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

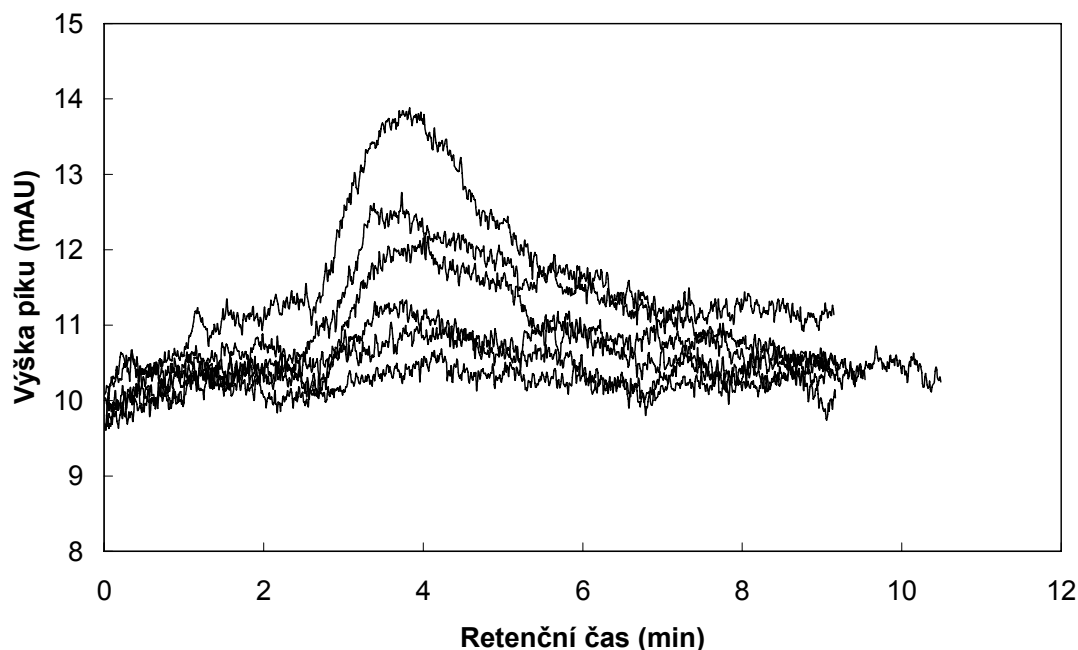
Koncentrační rozmezí ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{AU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ )	Úsek (mAU)	$R^2$
2 - 10	266,6	0,37	0,9860
10 - 100	269,0	-0,14	0,9964
2 - 100	264,4	0,20	0,9977

Závislost  $\log A$  na  $\log c$ : směrnice: 0,87 ; úsek: -0,36 ;  $R^2$  : 0,9913

**Tab. 4.3.2** Parametry kalibračních závislostí pro stanovení MCP: HPLC s UV spektrometrickou detekcí při 273 nm. Vyhodnoceno z ploch píků.

Koncentrační rozmezí ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\text{AU}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ )	Úsek (mAU·s)	$R^2$
2 - 10	$38,5\cdot 10^3$	76,1	0,9745
10 - 100	$33,0\cdot 10^3$	94,2	0,9990
2 - 100	$33,0\cdot 10^3$	96,8	0,9994

Závislost  $\log A$  na  $\log c$ : směrnice: 0,80 ; úsek: 1,89 ;  $R^2$  : 0,9862



**Obr. 4.3.5** Chromatogramy MCP v rozmezí koncentrací 1 až  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, UV detekce při 273 nm)

### 4.3.2 Elektrochemická detekce

K měření byl použit ampérometrický detektor ADLC 1 s pracovní uhlíkovou pastovou elektrodou v tříelektrodovém zapojení. Na základě vyhodnocení hydrodynamických voltamogramů byl jako optimální pracovní potenciál použit potenciál + 1,2 V.

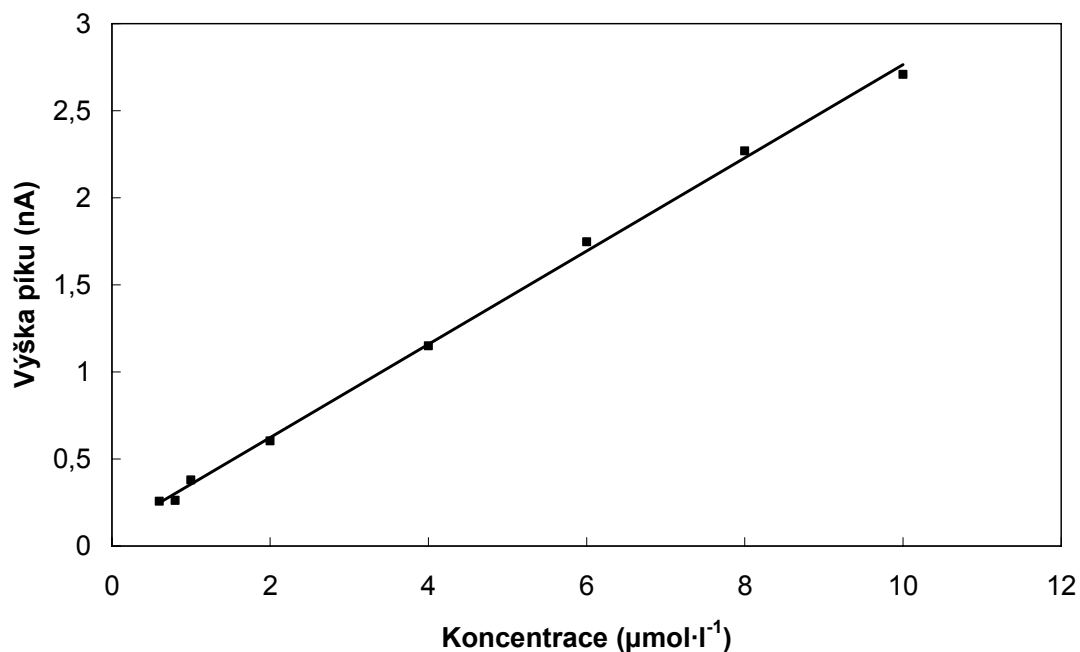
Kalibrační závislost z výšek píků pro rozmezí koncentrací MCP 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  je ukázána na Obr. 4.3.6. Na obrázku Obr. 4.3.7 je znázorněna kalibrační závislost vynesená z ploch píků v témže koncentračním rozmezí. Na Obr. 4.3.8 a Obr. 4.3.9 jsou pak zobrazeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozsahu.

Parametry kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí 0,6 – 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 10 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,6 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byly zpracovány rovněž metodou lineární regrese. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.3.3 a Tab. 4.3.4.

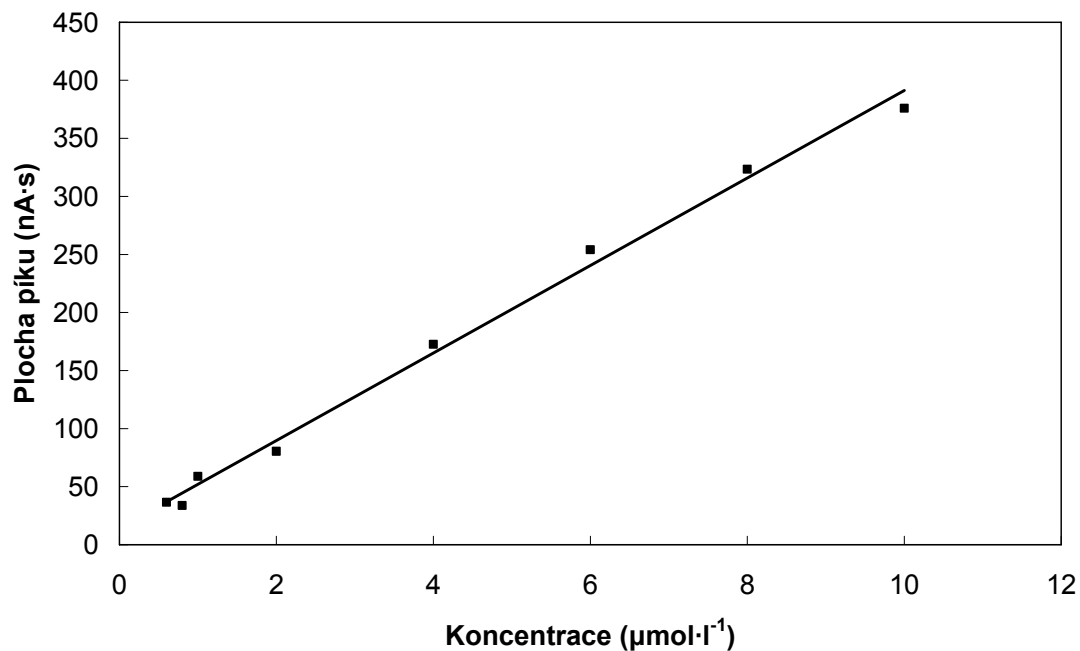
Chromatogramy MCP v rozmezí koncentrací 0,6 až 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  jsou uvedeny na Obr. 4.3.10.

Korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9994 až 0,9940. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozsahu. Linearitu závislostí zde potvrzují i směrnice logaritmických závislostí, jejichž hodnota je blízká 1.

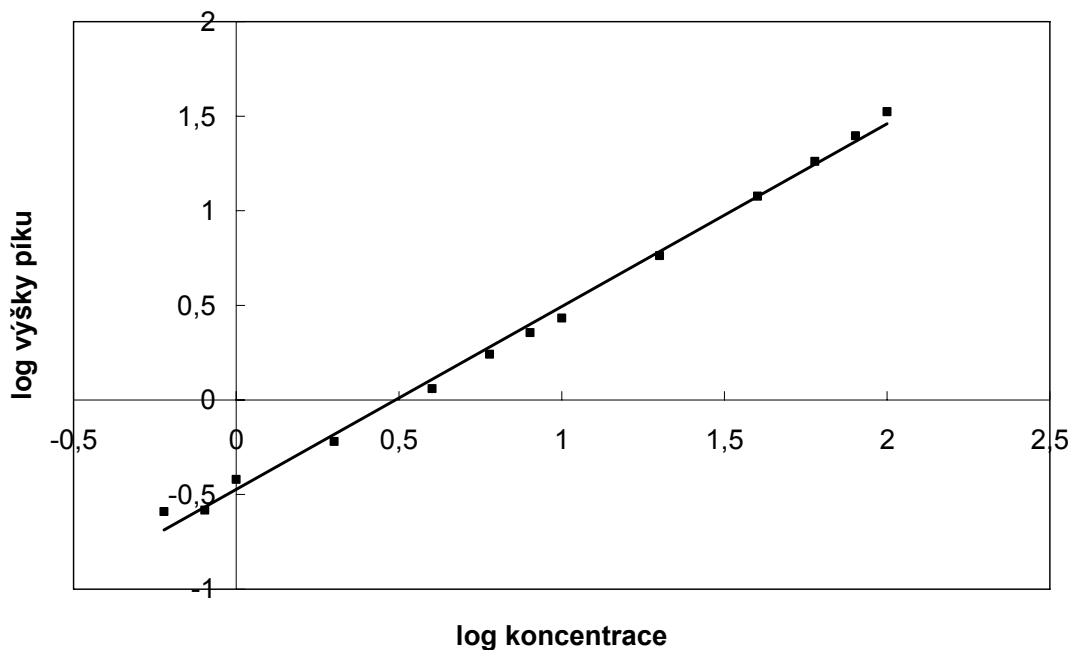
Dosažená mez detekce je 0,27  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což je podstatně nižší mez detekce ve srovnání s mezí detekce určenou ze spektrometrického měření. Ampérometrický detektor s indikační uhlíkovou pastovou elektrodou lze tedy s výhodou použít pro stanovení MCP.



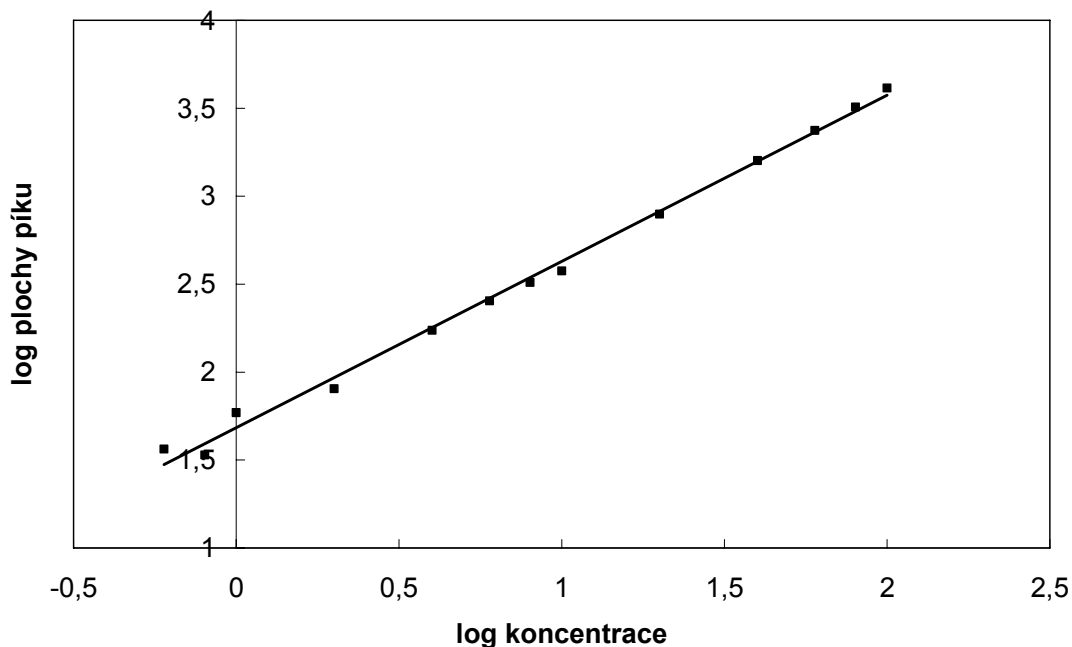
**Obr. 4.3.6** Kalibrační závislost MCP vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí  $0,6 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>,  $100 - 5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu + 1,2 V)



**Obr. 4.3.7** Kalibrační závislost MCP vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí  $0,6 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>,  $100 - 5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu + 1,2 V)



**Obr. 4.3.8** Kalibrační závislost MCP v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí  $0,6 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>,  $100 - 5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu + 1,2 V)



**Obr. 4.3.9** Kalibrační závislost MCP v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí  $0,6 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>,  $100 - 5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu + 1,2 V)

**Tab. 4.3.3** Parametry kalibračních závislostí pro stanovení MCP: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu + 1,2 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

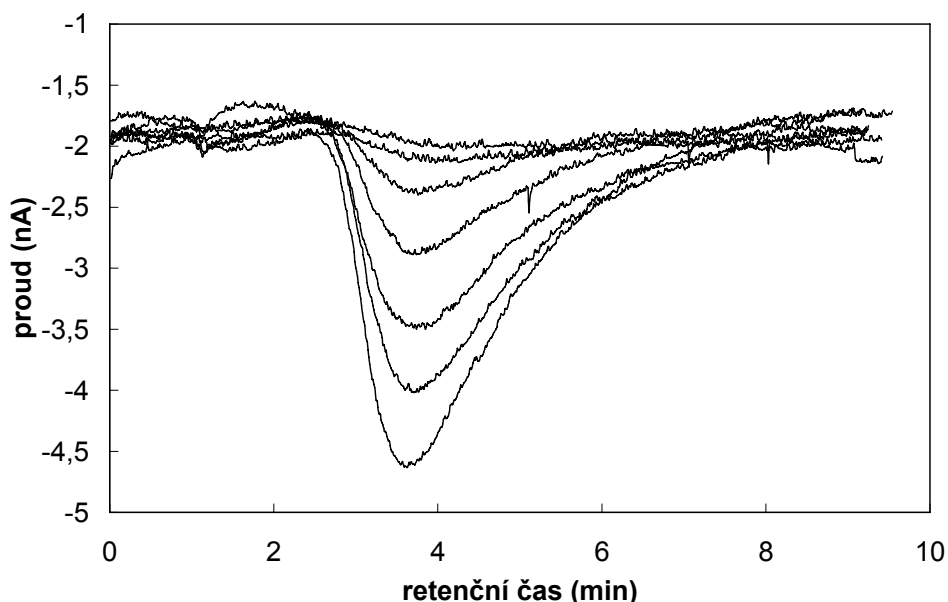
Koncentrační rozmezí ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\mu\text{A}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ )	Úsek (nA)	$R^2$
0,6 - 10	267,6	0,09	0,9984
10 - 100	334,8	1,13	0,9963
0,6 - 100	267,6	-0,29	0,9971

Závislost  $\log A$  na  $\log c$ : směrnice: 0,97 ; úsek: -0,47 ;  $R^2$  : 0,9957

**Tab. 4.3.4** Parametry kalibračních závislostí pro stanovení MCP: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu + 1,2 V. Vyhodnoceno z ploch píků.

Koncentrační rozmezí ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Směrnice ( $\mu\text{A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ )	Úsek (nA·s)	$R^2$
0,6 - 10	$37,7\cdot 10^3$	14,3	0,9940
10 - 100	$41,2\cdot 10^3$	-52,2	0,9993
0,6 - 100	$40,5\cdot 10^3$	-4,3	0,9994

Závislost  $\log A$  na  $\log c$ : směrnice: 0,95 ; úsek: 1,68 ;  $R^2$  : 0,9954



**Obr. 4.3.10** Chromatogramy MCP v rozmezí koncentrací 0,6 až  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup>, 100 – 5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 50:50 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  MCP v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu + 1,2 V)

## 5. Závěr

V předložené práci bylo prostudováno chromatografické chování MCP na RP-HPLC koloně za použití ampérometrické a UV spektrometrické detekce. Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenční charakteristiky MCP byl sledován pomocí spektrometrické detekce při vlnové délce 273 nm.

Byly optimalizovány podmínky pro stanovení MCP pomocí elektrochemické (ampérometrické) detekce na uhlíkových pastových elektrodách. Prostudována byla závislost odezvy ampérometrického detektoru na vloženém potenciálu a pH vodné složky mobilní fáze. Optimální podmínky pro stanovení MCP jsou: mobilní fáze- methanol : fosfátový pufr (50 objemových dílů methanolu a 50 dílů pufru); pH fosfátového pufru 4; ampérometrická detekce při potenciálu + 1,2 V; spektrometrická detekce při vlnové délce 273 nm.

Za optimálních podmínek byly změřeny kalibrační závislosti MCP a byl zjištěn limit detekce. Ten činí za použití UV spektrometrické detekce  $1,99 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , při použití ampérometrické detekce je  $0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



## 5. Literatura

1. Urbánek, K.: Farmakoterapie v gastroenterologii. *Klin Farmakol Farm* 18, 146-148 (2004).
2. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 20.8.2009.
3. *European Pharmacopoeia* 5.0, 2030-2031 (2005).
4. Maduille, A. Jiwan, J.-L. H.: LC-MS characterisation of metoclopramide photolysis products. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Chemistry* 205, 197-2002 (2009).
5. [www.rxlist.com](http://www.rxlist.com), staženo 20.8.2009.
6. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 367-369, Avicenum, Praha (2004).
7. *Pharmindex Breviř, Medical Tribune CZ* 17 (2008).
8. Bartling, A.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Worek, F.: Effect of metoclopramide and ranitidine on the inhibition of human AChE by VX in vitro. *Journal of Applied Toxikology* 25, 568-571 (2005).
9. Mérieau, E.: Métochloramide et méthémoglobinémie néonatale. *Archives de pédiatrie* 12, 438-441 (2005).
10. Katagiri, F.; Inoue, S.; Itoh, H.; Takeyama, M.: Clinical application of an enzyme immunoassay for cholecystokinin-like immunoreactive substance for determination of the human plasma levels: the effect of metoclopramide on gastrointestinal peptides and stress-related hormones. *Journal of Peptide Science* 12, 311-320 (2006).
11. Shah, J.; Rasul Jan, M.; Azam Khan, M.; Amin, S.: Spectrophotometric Determination of Metoclopramide in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry* 60, 633-635 (2005).
12. Lamparczyk, H.; Chmielewska, A.; Konieczna, L.; Plenis, A.; Zarzycki, P.K.: RP-HPLC Metod with electrochemical detection for the determination of metoclopramide in serum and its use in pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography* 15, 513-517 (2001).

13. Buna, M.; Aaron, J.J.; Prognon, P.; Mahuzier, G.: Effects of pH and solvent on the fluorescence properties of biomedically important benzamides. Application to determination in drugs and in human urine. *Analyst* 121, 1551-1556 (1996).
14. George, M.; Lau-cam, H.; Lau-cam, C.: <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopic Assay Method for Metoclopramide Hydrochloride in Tablets and Injections. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 17, 975-984 (1991).
15. Mostafa, G.A.E.: PVC matrix membrane sensor for potentiometric determination of metoclopramide hydrochloride in some pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31, 515-521 (2003).
16. Farghaly, O.A.; Taher, M.A.; Naggar, A.H.; El-Sayed, A.Y.: Square wave anodic stripping voltammetric determination of metoclopramide in tablet and urine at carbon paste electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38, 14-20 (2005).
17. Wang, Z.; Zhang, H.; Zhou, S.; Dong, W.: Determination of trace metoclopramide by anodic stripping voltammetry with nafion modified glassy karbon electrode. *Talanta* 53, 1133-1138 (2001).
18. De Villiers, M.; Parkin, D.; Van Jaarsveld, P.; Van der Walt, B.: Aradioimunoassy for metoclopramide. *Department of Pharmacology* (1987).
19. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, 138-146 (1994).
20. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* 93, 490-499 (1999).
21. Barek, J. a kol.: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2006).
22. German, N.; Armalis, S.; Zima, J.; Barek, J.: Voltammetric determination of fluoren-9-ol and 2-acetamidofluorene using carbon paste electrodes. *Collect. Czech. Chem. Commun* 70, 292-304 (2005).
23. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* 88, 412-422 (1994).
24. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* 18, 301-305 (2002).
25. Štulík, K. a kol.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha (2005).