

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

STANOVENÍ AMILORIDU V MOČI TECHNIKOU SIA

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Rolf Karlíček, DrSc.

Hradec Králové 2006

Lucie Vedralová

Děkuji za pomoc při mé diplomové práci:

panu prof. RNDr. Rolfu Karlíčkoví, DrSc., Mgr. Jitce Huclové, PhD,
Mgr. Daliboru Šatínskému, PhD a všem pracovníkům katedry analytické
chemie.

OBSAH

	OBSAH	3
1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	7
1.1	ÚVOD	8
1.2	CÍL PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	AMILORID	11
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti	11
	<i>struktura</i>	11
	<i>Vlastnosti</i>	11
2.1.2	Farmakologické údaje	11
	<i>Kalium šetřící diuretika</i>	11
	<i>Mechanismus účinku</i>	12
	<i>Farmakokinetika amiloridu</i>	12
2.1.3	HVLP obsahující amilorid	12
	<i>Amilorid jako hlavní účinná látka (5mg)</i>	12
	<i>Amilorid (5mg) v kombinaci s hydrochlorothiazidem</i>	12
	<i>Amilorid (5mg) v kombinaci s chlorthalidonem</i>	13
2.1.4	Dosavadní metody stanovení amiloridu	13
	<i>Lékopisná stanovení ČL 2002</i>	13
	<i>Ostatní metody stanovení</i>	13
2.2	SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA (SIA)	19
2.2.1	Princip metody	19
2.2.2	Prvky SIA systému	20
2.2.3	Využití SIA v praxi	22
2.2.4	Výhody a trendy v SIA	22
2.3	EXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ	23
2.3.1	Princip	23
2.3.2	Typy reaktorů	23
2.3.3	Sorbenty využívané v SPE	25
2.3.4	Postup provedení SPE	26
2.3.5	Výhody využití SIA-SPE	27
2.4	FLUORIMETRIE	28
2.4.1	Charakteristika a princip metody	28
2.4.2	Využití fluorimetrie	29
2.5	CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÝCH LÁTEK	30
2.5.1	Acebutolol	30
2.5.2	Atenolol	30

2.5.3	Betaxolol	31
2.5.4	Furosemid	31
2.5.5	Hydrochlorothiazid	32
2.5.6	Chlorthalidon	33
2.5.7	Losartan	33
2.5.8	Metoprolol	34
2.5.9	Verapamil	34
3	PRAKTICKÁ ČÁST	36
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A SORBENTY	37
3.1.1	Použité přístroje	37
3.1.2	Použité chemikálie a chemikálie	37
3.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ A MOBILNÍCH FÁZÍ, POSTUP PŘÍPRAVY KOLONY	38
3.2.1	Roztoky amiloridu	38
3.2.2	Roztok elučního činidla	38
3.2.3	Roztoky zkoumaných látek s amiloridem	38
	Příprava roztoku acebutololu 400 mg/l + amilorid 5 mg/l	38
	Příprava roztoku atenololu 100 mg/l + amilorid 5 mg/l	38
	Příprava roztoku betaxololu 20 mg/l + amilorid 5 mg/l	38
	Příprava roztoku furosemidu 60 mg/l + amilorid 5 mg/l	39
	Příprava roztoku hydrochlorothiazidu 90 mg/l + amilorid 5 mg/l	39
	Příprava roztoku chlorthalidonu 90 mg/l + amilorid 5 mg/l	39
	Příprava roztoku losartanu 100 mg/l + amilorid 5 mg/l	39
	Příprava roztoku metoprololu 200 mg/l + amilorid 5 mg/l	39
	Příprava roztoku verapamilu 360 mg/l + amilorid 5 mg/l	40
3.2.4	Postup přípravy kolony	40
3.3	ZPŮSOB STANOVENÍ SIA	41
3.3.1	Parametry stanovení amiloridu	41
3.3.2	Schéma programu měření	42
	<i>Schéma</i>	42
	<i>Popis programu</i>	43
3.3.3.	Validace metody	44
	<i>Linearita</i>	44
	<i>Další parametry systému</i>	45
3.4	VLIV DALŠÍCH LÉČIV NA STANOVENÍ AMILORIDU	46

3.4.1	Volba testovaných látek	46
3.4.2	Volba koncentrací	47
3.5	VÝSLEDKY MĚŘENÍ	49
3.5.1	Ovlivnění stanovení amiloridu acebutololem	49
3.5.2	Ovlivnění stanovení amiloridu atenololem	50
3.5.3	Ovlivnění stanovení amiloridu betaxololem	51
3.5.4	Ovlivnění stanovení amiloridu furosemidem	53
3.5.5	Ovlivnění stanovení amiloridu hydrochlorothiazidem	55
3.5.6	Ovlivnění stanovení amiloridu chlorthalidonem	56
3.5.7	Ovlivnění stanovení amiloridu losartanem	57
3.5.8	Ovlivnění stanovení amiloridu metoprololem	59
3.5.9	Ovlivnění stanovení amiloridu verapamilem	60
3.5.10	Souhrn výsledků	62
4	ZÁVĚR	63
5	LITERATURA	65

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

1.1 Úvod

V současné době stále více vzrůstá potřeba nalézt co nejrychlejší a nejjednodušší instrumentální metody k detekci a stanovení látek. Moderním trendem v analytických procesech je maximální zvýšení citlivosti, selektivity a automatizace metody, snížení nároků na množství vzorků a reagensů a zároveň neustálé odstraňování nedostatků. Jde především o nízkou produktivitu, vysoké náklady, velkou spotřebu chemikálií, práce s toxickými látkami atd. Neméně důležité je zvýšení reprodukovatelnosti výsledků, zrychlení a zlevnění detekce.

V těchto ohledech je SIA jednou z perspektivních metod. Je vysoce automatizovaná, dostatečně citlivá, s nízkou spotřebou vzorků a činidel. Výhodou je též omezení manipulace s nebezpečnými látkami a možnost použití různých způsobů detekce. Spektrum látek možných stanovit touto metodou je široké – jde v podstatě o jakýkoli produkt chemické reakce detekovatelný instrumentálními analytickými metodami.

Dalším trendem analytické chemie je stanovení látek přímo z biologického materiálu bez předchozí izolace. Toto umožňuje propojení SIA s extrakcí na pevnou fázi (SPE). Kromě toho, že odpadá izolace, zajistí toto spojení zakoncentrování vzorku či odstranění nežádoucích balastních látek.

Léčivem použitým v mé diplomové práci byl amilorid. Jedná se o kalium šetřící diuretikum. Dlouhodobě je podáván při léčbě primární arteriální hypertenze – buď samostatně nebo v kombinaci s thiazidy, kde snižuje riziko hypokalémie a potencuje jejich účinek. Je velmi důležité sledovat hladinu amiloridu v moči vzhledem k velkým interindividuálním rozdílům v absorpci ze střeva.

Pacienti s arteriální hypertenzí jsou většinou léčeni kombinací antihypertenziv s diuretiky a často trpí dalšími problémy, především onemocněním srdce. Díky tomu se amilorid v těle dostává do styku s dalšími účinnými látkami, které mohou ovlivnit jeho vstřebání a následně mohou zkreslit i výsledek měření. Je tedy důležité zjistit, zda některé látky s amiloridem při tomto stanovení interferují.

1.2 Cíl práce

Cílem mé práce bylo stanovit amilorid v moči a zjistit, ovlivňují-li některé látky toto stanovení. Vybrala jsem ty účinné substance, které byly u pacientů s amiloridem nejčastěji kombinovány.

V dostupné literatuře jsem nenašla zmínku o interferencích těchto látek s amiloridem.

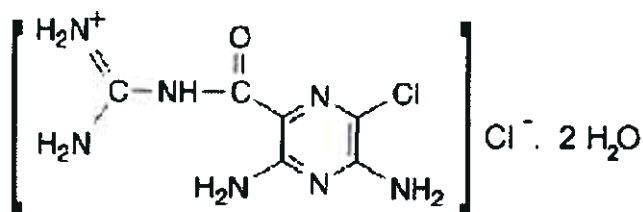
Při své diplomové práci jsem vycházela z poznatků kolegy Pavlíčka, který vypracoval metodu stanovení výše uvedené látky v biologickém materiálu s využitím SIA ve spojení s SPE. Jeho údaje jsem upravila pro své potřeby.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Amilorid

2.1.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti

Struktura



1- (6 – chlor - 3, 5 – diamino – 2 - pyrazinkarbonyl) guanidium chlorid

Vlastnosti

Sumární vzorec amiloridu je $\text{C}_6\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, molekulová hmotnost 302,12.

Jedná se o světležlutý až zelenožlutý prášek, prakticky nerozpustný v éteru, těžce rozpustný v ethanolu a ve vodě, proto se prakticky používá ve formě hydrochloridu. [1]

2.1.2 Farmakologické údaje

Kalium šetřící diuretika

Amilorid patří mezi kalium šetřící diuretika, tzn. močopudné látky odstraňující nadměrné množství vody a solí z těla. V porovnání s ostatními diuretiky jsou méně účinná, nezpůsobují ovšem ztráty K^+ a s tím spojené nežádoucí účinky (hyperurikémie atd.). Tyto látky se proto používají v kombinaci se silnějšími diuretiky, jednak pro zvýšení jejich aktivity, jednak k prevenci hypokalémie. [3,4]

Mechanismus účinku

Amilorid inhibuje reabsorpci Na^+ v Henleově kličce. Ve sběrných kanálcích snižuje činnost Na^+/K^+ ATPázy blokadou Na^+ kanálů v luminální membráně. Těmi je Na^+ transportován do epiteliální buňky na základě koncentračního gradientu, vytvářeného aktivním transportem těchto iontů. Důsledkem toho je zvýšené vylučování vody, Na^+ a retence K^+ .

Amilorid antagonizuje účinek aldosteronu (zvyšuje sekreci K^+ , snižuje vylučování Na^+) v dolní části distálního tubulu a ve sběrném kanálku. [4,5]

Farmakokinetika amiloridu

Amilorid se podává perorálně. Ze střeva se absorbuje pouze z 20% (existuje ovšem značná interindividuální variabilita). Maximální účinek nastupuje po 6 hodinách, přetrvává přibližně 24 hodin. Podává se obvykle v denní dávce 5-10 mg v intervalech 12 hod. Nemetabolizuje se v játrech, vylučován je hlavně močí v nezměněné podobě. Biologický poločas je $T_{1/2} = 5-6$ hod. [2,3]

Vzhledem k tomu, že je ve sběrných kanálcích absorbováno jen malé množství Na^+ , zvyšuje amilorid diurézu jen mírně. Používá se proto nejčastěji v kombinaci s ostatními diuretiky, především s thiazidy. Indikován je v terapii i prevenci arteriální hypertenze, u edémů různé etiologie (při srdečních poruchách, cirhóze jater...) [2,3]. Z nežádoucích účinků jsou nejčastější nevolnost, bolesti hlavy, rychlé snížení krevního tlaku, únava, zvýšení glykémie, glykosurie, urikémie a cholesterolémie [2,5]

2.1.3. HVLP obsahující amilorid

Amilorid jako hlavní účinná látka (5 mg) [2]

Amiclaran – 50 tbl

Amilorid (5 mg) v kombinaci s hydrochlorothiazidem [2]

Apo-amilzide – 100 tbl, 50 mg

Amilorid/HTC AL – 30, 50, 100 tbl, 50 mg

Loradur – 20, 50 tbl, 50 mg

Loradur mite – 20, 50 tbl, 25 mg

Moduretic – 20, 30, 100 tbl, 50 mg

Rhefluin – 30 tbl, 50 mg

Amilorid (5 mg) v kombinaci s chlorthalidonem [2]

Amicloton – 30 tbl, 25 mg

2.1.4 Dosavadní metody stanovení amiloridu

Lékopisná stanovení ČL 2002: [1]

Zkoušky totožnosti:

- A) Infračervené absorpční spektrum odpovídá spektru amilorid-hydrochloridu dihydrátu CRL.
- B) Tenkovrstvá chromatografie na vhodné vrstvě silikagelu:
Zkoušený roztok se připraví rozpuštěním 40 mg vzorku v metanolu R a zředí se jím na 10ml, porovnávací roztok rozpuštěním 40 mg amiloridium hydrochloridu dihydrátu CRL v metanolu R a naředěním na 10 ml.
Mobilní fáze: amoniak zředěný RS1, voda R, dioxan R (6 + 6 + 88)
- C) 10 mg se rozpustí v 10 ml vody R, přidá se 10 ml roztoku cetrimidu R (200 g/l) a 0,25 ml NaOH zředěného RS a 1 ml bromové vody R. Vznikne zelenožluté zbarvení.
Po přidání 2 ml HCl zředěné RS se zbarvení změní na tmavě žluté a v UV při 365 nm modře fluoreskuje.
- D) Vyhovuje zkoušce na chloridy (b).

Stanovení obsahu:

0,200 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml HCl 0,01 mol/l VS a 50 ml lihu 96% R a titruje se NaOH 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

Odečte se koncentrace mezi dvěma inflexními body.

1 ml NaOH 0,1 mol/l VS odpovídá 26,61 mg C₆H₉Cl₂N₇O.

Ostatní metody

Z instrumentálních metod stanovení amiloridu v biologickém materiálu dominuje HPLC s fluorimetrickou detekcí.

V dostupných materiálech jsem nenalezla žádnou metodu stanovení amiloridu pomocí SIA v kombinaci s SPE. [7-33]

HPLC metody			
Metoda	Citlivost	V jakém materiálu	Literatura
HPLC detekce diuretik v lidské moči, kolona Agilent-Zorbax SB-18, detekce hmotnostní spektrometrií	0,25-25 ng/ml	moč	7
Detekce 11 diuretik micelární HPLC		moč	8
HPLC stanovení směsi amiloridu, methyldopy a hydrochlorothiazidu, kolona C-18, detekce při 286 nm, nosný proud voda-metanol (3:1), pH = 3,6, vnitřní standard kofein.		tablety	9
HPLC 5µm Zorbax Rx kolona s fluorescenční detekcí (detekce při 420 nm, excitace při 360 nm)	rozsah detekce 2-2033,4 ng		10
HPLC stanovení plazmatických hladin amiloridu a jeho analog. Kolona C18.	1 ng amiloridu	plazma	11
HPLC stanovení amiloridu v plazmě a moči. Kolona Nucleosil C18, fluor. detekce (exc. 286, detekce 416 nm).	0,2 ng/ml	moč, plazma	12

Současné stanovení furosemidu a amiloridu v plazmě pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Kolona Nucleosil 100 C18. Detekce 413 nm, excitace 360 nm.	1 µg/ml furosemidu, 7.5 pg/ml amiloridu	plasma	13
Stanovení atenololu, hydrochlorthiazidu a amiloridu z komerčních přípravků RP HPLC. Kolona Bondapak C18, Detekce 273 nm.	0,08 – 0,4 mg/ml atenololu, 0,004 – 0,02 mg/ml hydrochlorthiazidu, 0,04 – 0,2 mg/ml amiloridu	tablety	14
HPLC stanovení amiloridu a jeho analog v krysí plazmě. Kolona Alltech Adsorbosphere ODS.		krysí plazma	15
HPLC stanovení diuretik a probenecidu, acetonitril-kys.octová 1% (3:17)		moč	16
HPLC stanovení amiloridu v tělesných tekutinách. Kolona Waters C18 silica. Detekce 365 nm.	1 - 50 ng/ml	plazma	17
HPLC stanovení amiloridu iontoměničovou extrakční metodou, Kolona Spherisorb ODS-2, fluorescenční detekce 418 nm (excitace 366 nm).	0,25 - 25 ng ml	plazma, biologické tekutiny	18
HPLC stanovení amiloridu a dusíkatých bází. Kolona Ultrasphere Si, Fluorimetrická detekce při 410 nm (355 nm excitace).	0,5 - 15 ng/ml v plasmě, 0,1 - 2 µg/ml v moči	plazma, moč	19
RP HPLC amiloridu, kolona Bondapak C18, fluorescenční detekce při 417 nm (excitace 368 nm).	1 ng/ml	plazma, moč	20

HPLC stanovení amiloridu ve směsi s hydrochlorothiazidem, kolona LiChrosorb RP-8. Detekce při 286 nm.	1 - 50 µg/ml amiloridu, 0,01 – 0,5 mg/ml hydrochlorothiazidu	tablety	21
---	--	---------	----

Spektrofotometrické metody			
Metoda	Citlivost	V jakém materiálu	Literatura
Současné stanovení amiloridu a triamterenu fluorimetrií v kombinaci s PLS (isopotenční fluorimetrie)	60-320 ng/ml amiloridu 20-100 ng/ml triamterenu	moč	22
Současné stanovení amilorid hydrochloridu, hydrochlorothiazidu a atenololu v kombinovaných přípravcích při 243,6, 308,6 a 375 nm.	0,033 µg/ml amilorid, 0,038 µg/ml hydrochlorothiazid 0,111 µg/ml atenolol	moč	23
Současné stanovení amilorid hydrochloridu a hydrochlorothiazidu multivariantní analýzou spektrofotometrických dat	1,8-3,0 mg/l ami 21,7-30,4 mg/l hct	farm. preparáty	24
Spektrofotometrie PLS pro současné stanovení amilorid hydrochloridu a furosemidu , absorbance při 250-350 nm	1-1,6 mg/l ami 8-13 mg/l furo	farm. preparáty	25
Fluorimetrické stanovení amiloridu v moči, emisní vlnová délka 392 nm, excitační 357 nm.	14,82 ng/ml ami	moč	26

Fluorimetrické stanovení triamterenu a amilorid-hydrochloridu (detekce triamterenu 439,5 nm, excitace 378,5 nm, detekce amiloridu při 424,5, excitace při 379,5 nm).	0,05 – 1,6 µg/ml	tablety,	27
Spektrofotometrické stanovení amiloridu s MBTH (3-methyl-2-benzothiazolino-hydrazon hydrochlorid) Detekce při 550 nm.	1 – 8 µg/ml	tablety	28
Spektrometrie amiloridu Ramanových spekter s použitím koloidního stříbra.	0,1 a 6,9 µg/ml ami		29
Spektrometrické stanovení amiloridu pomocí Folin - Ciocalteu činidla Absorbance při 740 až 750 nm.	1 – 12 µg/l	tablety	30
Spektrofotometrické stanovení amiloridu reakcí se směsí (1:1:1:3) 10% nitroprussidu Na ⁺ , 10% K ₃ Fe(CN) ₆ , 10% NaOH a H ₂ O při 555 nm.	100 µg/l		31

Ostatní metody

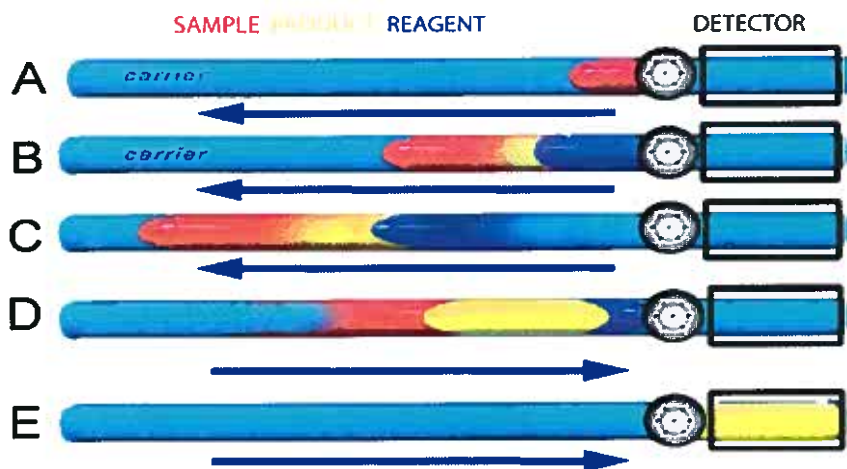
Metoda	Citlivost	V jakém materiálu	Literatura
FIA Dual-stop-flow spektrofotometrické stanovení amiloridu Pomocí Ce^{+4} při 545 nm.		farmaceutické přípravky	32
FIA chemiluminometrické stanovení amiloridu a streptomycinu oxidací N-bromosuccinimidem. proud voda-metanol (3:1), pH = 3,6, vnitřní standard kofein.	0,16 μ g amiloridu, 1,61 μ g streptomycinu	farmaceutické přípravky	33

2.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

SIA je neseparační průtoková metoda umožňující automatizovat složité postupy při analýzách velkých sérií vzorků a tím zvýšit jejich produktivitu a přesnost. Je určena pro jednoduchou manipulaci s kapalinami a hlavně pro provádění derivatizačních reakcí. Byla vyvinuta při odstraňování nedokonalostí průtokové injekční analýzy (FIA).

2.2.1. Princip metody

Princip metody spočívá v převedení vzorku v roztoku na detekovatelný (např. barevný) produkt reakcí s činidlem přímo v systému. Ve FIA je vzorek dávkován do kontinuálního toku činidla a produkt vzniklý reakcí s tímto činidlem je nesen plynulým tokem jednotlivých zón do detektoru. Množství vzorku je dáno délkou dávkovací smyčky a během jednoho měření je fixní. FIA využívá pouze přímý konstantní tok. V SIA je vzorek dávkován odděleně a množství jeho i činidel lze měnit během jedné série měření. Základem SIA je možnost přímého i zpětného toku. Zóny nosného média, vzorku a činidla jsou postupně aspirovány do jednonábového systému s využitím vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Pomocí obráceného pohybu pístu dojde k promísení jednotlivých zón a reakcí vzniklý produkt je dopraven do detektoru. Průtokové rychlosti jsou u SIA a FIA prakticky stejné, a to 1ml/min a doba trvání jednoho měřicího cyklu zpravidla nepřesahuje 30 s. [35,36]



Obrázek č.1: Princip metody

2.2.2. Prvky SIA systému [36]

ČERPADLO

Je vstupní jednotkou systému. Umožňuje přesné dávkování objemů a ovlivňuje průtokovou rychlost. Jednokanálové dvousměrné pístové čerpadlo je řízeno krokovým elektromotorem. Jeho alternativou je peristaltické čerpadlo, které je méně nákladné, ale má několik nevýhod, z nichž hlavní je pulzace toku. Proto se používá spíše jako pomocné zařízení.

VÍCECESTNÝ SELEKČNÍ VENTIL

Nejčastěji 6, 8 a 10-cestný. Řídí seřazení jednotlivých zón v mísící cívce, zajišťuje připojení všech roztoků k systému, jejich aspiraci a po obrácení toku promísení všech zón a transport do detektoru.

REAKČNÍ (mísící) CÍVKA

Slouží k promíchání jednotlivých zón a zároveň jako ochrana před vniknutím vzorku do čerpadla. Je jednodušší a kratší než u FIA systému a zařazena je mezi čerpadlo a selekční ventil. Pokud je použita druhá cívka, umísťuje se před detektor. Některé navíc mohou obsahovat reaktivní náplň, např. pevné nosiče s imobilizovanými enzymy nebo magnetické částice s polymerním povrchem.

DETEKTORY

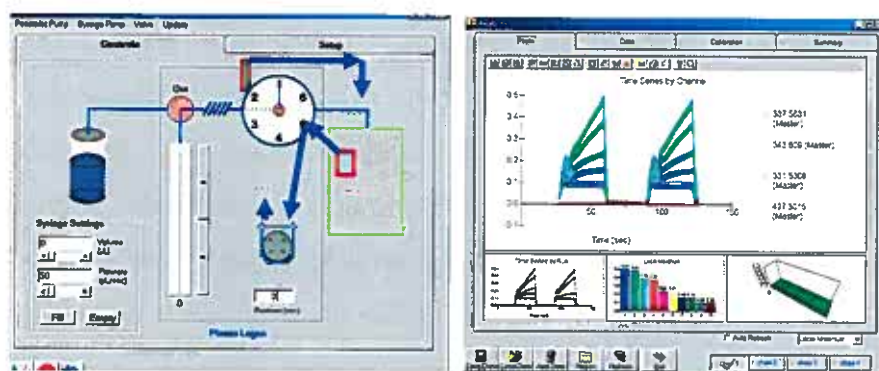
Volba detektoru závisí na typu použité analytické reakce. Využívá se především spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické detekce s příslušnými průtokovými celami (Z-cela, membránová sandwichová cela, jet-ring cela, fontánová cela...). U elektrochemické detekce se vedle běžných amperometrických průtokových cel uplatňují iontově selektivní a enzymové elektrody.

SPOJOVACÍ MATERIÁL

Mechanické součásti SIA systému (čerpadlo, selekční ventil) a detektor jsou propojeny prostřednictvím teflonových hadiček o malém vnitřním průměru (0,5-0,8 mm).

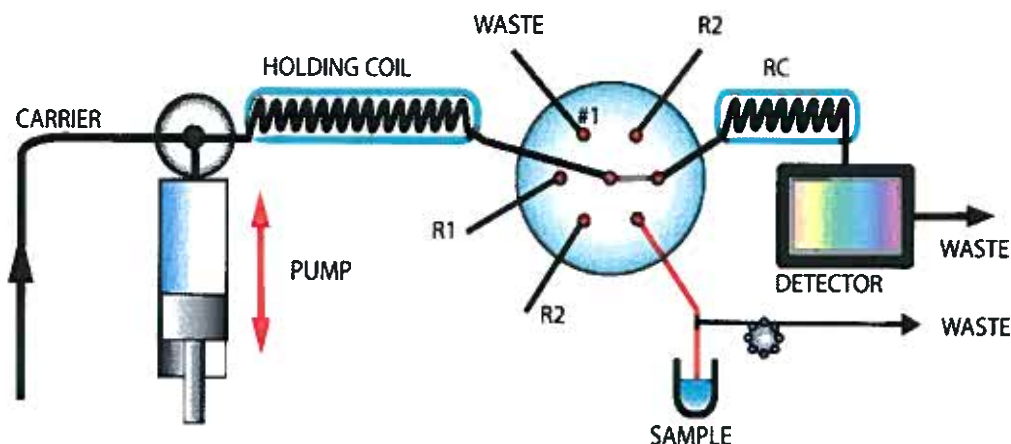
ŘÍDÍCÍ JEDNOTKA

Všechny prvky SIA systému jsou propojeny s osobním počítačem. Pro reprodukovatelnost měření je nutná synchronizace jednotlivých postupů. Velkou výhodou je snadná změna parametrů díky odpovídajícímu obslužnému programu (Fialab, Flutek, Labpro, Mat-lab atd.). Tento software musí zpracovat a vhodně prezentovat výsledky měření (automatický výpočet výšky, plochy píku, šířky píku, kalibrační parametry, koncentraci vzorku).



Obrázek č.2: Program Fialab

Do SIA systému je možné zapojit různé doplňkové moduly (jednotky pro kapalinovou extrakci, dialýzu a difuzi plynů přes membránu).



Obrázek č.3: Základní schéma SIA systému

2.2.3 Využití SIA v praxi

Díky možnosti provádět analýzy velkých sérií vzorků s vysokou produktivitou a spolehlivostí, má tato metoda široké uplatnění v řadě oblastí.

V analýze složek životního prostředí se používá pro zjištění jejich kvality. Stanovují se některé anorganické ionty současně: Ca^{2+} a Mg^{2+} ve vodě fluorimetrickou detekcí, Cl^- a F^- s využitím iontově selektivních elektrod, dusitany a dusičnany pomocí spektrofotometrické detekce, dále sírany, těžké kovy, amonné soli, herbicidy atd.

SIA našla uplatnění i v analýze biologických materiálů. Využívá se imunoanalytických reakcí a speciálních detekčních cel umožňujících vazbu protilátek nebo antigenů přímo v SIA systému. Takto byly stanoveny např. inzulín, lidský sérový albumin. Pomocí enzymů zakotvených v reakční cívce byly stanoveny např. glukóza a ethanol ve víně a pivu. Jet-ring cely jsou vhodné při stanovení iontů Na^+ a Li^+ nebo při analýze buněk ledvinné tkáně.

Také ve farmacii našla SIA své uplatnění: stanovení penicilinu tvořícího barevné komplexy s paladiem, bromazepamu (s ionty Fe^{2+}), morfinu (s manganistanem oxiduje na fluoreskující produkt), ciprofloxacín a norfloxacín (s ionty Fe^{3+}) atd.. V potravinových doplňcích se často stanovuje vitamín C. [36]

2.2.4 Výhody a trendy v SIA

Všude tam, kde je třeba analyzovat velké série vzorků a změny koncentrace analytů (voda, krev, moč), má SIA uplatnění díky své rychlosti, flexibilitě a plné automatizaci. Užití ve farmacii zahrnuje nejen kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale i dlouho trvající stabilitní studie. Výhodou jsou menší spotřeby vzorků a činidel, snadná změna reakčních podmínek nastavením programu bez narušení kontinuity systému a jeho flexibilita. Potenciál využití SIA v analytické praxi je značný a má předpoklady se nadále rozšiřovat, především díky možnosti využití on-line úpravy vzorků.

2.3 Extrakce pevnou fází

Příprava a úprava vzorku je často nejnáročnější a nejkritičtější, zároveň nezbytnou fází celé analýzy. Vzorky ve složitých maticích (biologický materiál) musí být nejprve přečištěny, tím odstraněny interferující složky a vzhledem k nízkým koncentracím látek také zakonzentrovány. K těmto účelům se využívá celé řady separačních a koncentračních technik: extrakce kapalina/kapalina, dialýza, destilace, centrifugace a v současné době hlavně extrakce pevnou fází. Její nepochybně velkou výhodou je možnost zapojení on-line do systému, čímž se proces značně zjednoduší a zrychlí, zároveň se minimalizuje riziko vnesení chyb, odpadá totiž manuální úprava vzorku před samotným měřením.

2.3.1 Princip

Princip SPE je založen na specifické interakci mezi sorbentem, analytem a solventem. Základem sorpce je existence vazebných míst (aktivních center) v molekulách sorbentu, která interagují s molekulami látek v kapalném stavu během kontaktu s jejich povrchem. Při extrakci musí být analyt přitahován silněji než rozpouštědlo. Naproti tomu při eluci musí eluční činidlo překonat vazby analytu a sorbující látky. Pro oddělení analytu od matrice a dalších interferujících složek je nutné znát strukturu, uspořádání funkčních skupin, molekulovou hmotnost, polaritu a pK_A analytu. [40]

2.3.2 Typy reaktorů

Reaktory s tuhou fází jsou užívány díky své schopnosti reagovat s analyzovanou látkou na svém povrchu, chovat se jako extrakční sorbent nebo uvolňovat reakční činidla. [40]

Dle účasti na chemické reakci:

1. Na povrchu sorbentu probíhají chemické reakce :

- *Enzymatické* – k převedení analytu na vhodný produkt se využívá substrátové specifity enzymu. Umožňují stanovení i jednotlivých enantiomerů. Někdy může analyt působit jako specifický inhibitor enzymatické reakce.
- *Oxidačně-redukční* – analyt je převeden do vhodného oxidačního stavu, následuje oxidace, redukce nebo derivatizace na požadovaný produkt.
- *Iontově výměnné* – využívají se k prekoncentraci analytu, též k odstranění některých interferentů z matrice vzorku. Na povrchu reaktoru sice dochází k chemické reakci, řadí se ale spíše k reaktorům extrakčním.

Analyt prochází reaktorem, podstupuje danou chemickou reakci a jako produkt opouští kolonu a pokračuje do detektoru.

2. SPE jako extrakční sorbenty: zde nedochází k chemické reakci, kolona se chová jako nosič, adsorbuje buď analyt nebo matrici.

- *Adsorpční* - slouží k prekoncentraci analytů a odstranění balastních látek, což je vhodné u složitých matric. Tím se odstraní nežádoucí signály detektoru. Vzorek je zachycen fyzikálně-chemickými silami, dokud není matrice zcela odstraněna, až poté je eluován z kolony do detektoru. K sorbentům této skupiny patří silikagel, $\text{Al}(\text{OH})_3$, polyamid atd.
- *Imunoafinitivní* – tyto jsou vhodné v imunologii pro stanovení makromolekulárních protilátek. Jsou zafixovány na stěnu reaktoru nebo na inertní nosič, tvoří tak selektivní stacionární fázi. Vzorek se poté naváže na imobilizovanou protilátku, všechny ostatní komponenty jsou eluovány z kolony ven.

3 SPE uvolňující reakční činidla : jde o zvláštní typ reaktorů, u nichž nedochází k chemické reakci. Jsou uzavřeny v minikolonách (cartridge) nebo vázány na nosiči. V SIA zatím nenalezly velké uplatnění.

Dle vnitřního uspořádání

- *Otevřené tubulární* – reakční materiál mají na stěně kolony. Jejich příprava je náročnější, díky tomu mají i menší uplatnění v praxi.
- *Plněné kolonové* – daleko více používány pro svou snadnou přípravu a vyšší reaktivitu díky velkému povrchu sorbentu.

2.3.3 Sorbenty využívané v SPE

Volba sorbentu závisí na : afinitě k různým sloučeninám (určena polaritou)
velikosti a tvaru částic
velikosti povrchu a počtu aktivních míst
velikosti pórů ovlivňující prostup molekul do sorbentu
chemické inertnosti [39]

Nejčastěji používanými materiály jsou:

- makroporézní polymerní pryskyřice
- silikagely s chemicky vázanou stacionární fází
- sorbenty na bázi aktivního uhlí

Nejdůležitějšími sorbenty v oblasti farmaceutické analýzy jsou chemicky modifikované silikagely. Na radikálový zbytek silikagelu jsou navázány různé funkční skupiny. Podle charakteru těchto skupin se rozlišují tři typy fází:

- normální fáze (polární) – např. silikagel, oxid hlinitý, křemelina
- reverzní fáze (nepolární) – např. C-18, C-8, C-2
- iontoměniče – např. kvarterní amin, propylsulfonové kyseliny

Nejlepší retence analytu je dosažena tehdy, blíží-li se polarita analytu polaritě pevné fáze.

V mé práci jsem použila *BAKERBOND karboxykyselina*, sorbent na bázi silikagelu. Na radikálový zbytek je navázána -COOH skupina. Jde o slabý iontoměnič, katex, vhodný pro adsorpci kationtů z vodných roztoků. Doporučená rozpouštědla: kyseliny, báze, pufrý.

Sorbenty jsou plněny do kolonek z umělých hmot. Extrakce se provádí volným průtokem nebo pod tlakem. Sledovaná látka je adsorpcí zachycena na koloně, zbytek prochází nezachycen nebo lze použít opačný způsob, kdy na koloně jsou adsorbovány balastní látky a tak odděleny od analytu, který

prochází bez zachycení. K eluci se používají rozpouštědla podle charakteru sorbentu – organická rozpouštědla v celém rozsahu polarit, směsi polárních organických rozpouštědel s kyselinami, zásadami popř. pufrů nebo roztoky specifických elučních činidel.

2.3.4 Postup provedení SPE [44]

Úspěšná sorpce na pevnou fázi je podmíněna dodržením několika zásad při ošetření vzorku i vhodně vybraného sorbentu v průběhu extrakce.

- *Aktivace sorbentu* (smočení rozpouštědlem) – cílem tohoto kroku je odstranění nečistot z náplně kolony a vytvoření vhodného fázového rozhraní tak, aby sorpce proběhla co nejlépe. Promývá se asi 1-2 ml rozpouštědla na 100 g náplně kolony. Po aktivaci sorbentu nesmí dojít k jeho vysušení. Došlo by tím ke zhoršení průtoku přes kolonu a ke zkreslení výsledků.
- *Kondičiace stacionární fáze* – jde o odstranění přebytku aktivačního rozpouštědla. Aktivovaný sorbent se promyje několika ml vody nebo pufru. Vytvoří se vhodné prostředí pro sorpci analytu.
- *Kontakt se vzorkem* - vzorek prochází kolonou (optimální průtok 1-3 ml/min) a sorbuje se na náplň kolony.
- *Eluce interferentů* – po retenci analytu se sorbent propláchne 0,5 – 0,8 ml rozpouštědla na 100 g náplně kolony tak, aby byly nežádoucí složky odstraněny, zatímco vzorek zůstává.
- *Eluce analytu* – provádí se takovým elučním činidlem, které rozruší interakce mezi sorbentem a analytem. Eluční objem se pohybuje kolem 0,25 – 1,2 ml na 100 g sorbentu.
- *Regenerace kolony* – hydrofóbní sorbenty se obnovují nejčastěji promytím organickým rozpouštědlem, ionexy mohou být regenerovány kyselými nebo zásaditými roztoky.

2.3.5 Výhody spojení SIA-SPE

Umožňuje upravit vzorek přímo v systému bez předchozí manuální přípravy a stanovení analytu pomocí automatizovaného postupu. Celý proces se zrychlí, omezí se kontakt s potenciálně nebezpečnými vzorky, redukuje se riziko vnesení chyb. SPE se nejčastěji používají pro zakoncentrování analytů ze složitějších matrix (moč, plazma, krev), kde je analyt o velmi nízké koncentraci, příp. k odstranění balastních látek.

2.4 Fluorimetrie

2.4.1 Charakteristika a princip metody

Fluorimetrie se řadí mezi metody luminiscenční analýzy, které využívají k důkazu nebo stanovení látek jejich schopnost vysílat za určitých podmínek luminiscenční záření. Ke vzniku luminiscence je potřeba, aby vzorek nejprve absorboval excitační záření, tím atomy nebo molekuly této látky přejdou na vyšší kvantové hladiny, tzv. excitovaný stav. Částice přecházejí do stabilnějšího stavu tak, že získanou energii vyzáří v podobě luminiscence.

Podle zdroje excitující energie rozlišujeme fotoluminiscenci, chemiluminiscenci, termoluminiscenci a elektroluminiscenci. Fotoluminiscence je sekundární záření, které látka vydává po absorpci primárního světelného záření. Existují dva typy: fosforescence a fluorescence. Liší se délkou luminiscence. U fluorescence dochází k emisi sekundárního záření pouze během působení primárního záření, zatímco u fosforescence trvá emise světla i po jeho ukončení.

Nejlepší předpoklady pro fluorescenci mají látky cyklické, aromatické nebo heterocykly s konjugovaným systémem dvojných vazeb, které jsou schopné existence v izomerních nebo tautomerních formách. Vliv na fluorescenci mají také substituenty, elektrondonorové skupiny (-OH, -OR, -NH₂, -CN) mají tendenci výtěžek fluorescence zvyšovat. Alifatické sloučeniny fluoreskují jen ojediněle.

Fluorescence je charakterizována dvěma spektry, emisním a excitačním. Tato spektra vyjadřují závislost intenzity fluorescence na vlnové délce primárního (excitačního) a sekundárního (emisního) záření. Obě spektra jsou si podobná, emisní je však posunuto k vyšším vlnovým délkám, tedy k nižší energii.

Nejčastěji sledovanou veličinou ve fluorescenční detekci je intenzita fluorescence. Za určitých podmínek je změna fluorescence přímo úměrná koncentraci svítivé látky. V praxi se koncentrace zjišťuje z kalibračních křivek vzorků o známé koncentraci. [37,45]

$$I_F = I_0 \cdot K \cdot \epsilon \cdot l \cdot c$$

kde I_0 ...intenzita primárního záření
 K ...konstanta
 ϵ ...molární absorpční koeficient
 l ...délka vrstvy, kyvety
 c ...koncentrace roztoku (mol/l)

Na výtěžek luminiscence má vliv teplota, koncentrace svítivé látky, míra solvatace látky v rozpouštědle, přítomnost dalších iontů a sloučenin atd. [41]

2.4.2 Využití fluorimetrie

Fluorescenci lze využít jak ke kvalitativní, tak ke kvantitativní analýze. Fluorescenční metody jsou přímé – stanovovaná látka emituje záření, a nepřímé – stanovovaná látka nefluoreskuje, ale chemickou reakcí je převedena na produkt fluoreskující.

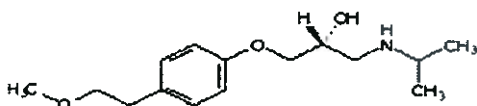
V anorganické analýze se využívá schopnosti některých prvků vytvářet s vhodným organickým činidlem intenzivně fluoreskující komplexy. Používají se např. morin, rhodamin B (ke stanovení např. Al, Be, In a dalších prvků v koncentraci $10^{-8} - 10^{-10}$ g/ml).

K důkazům a stanovením organických látek se často využívá jejich charakteristická fluorescence působením UV záření. Takto lze stanovit např. alkaloidy, uhlovodíkové kancerogeny, vitamíny a hormony s citlivostí až 10^{-9} g. Fluorimetrická stanovení jsou vysoce selektivní, neboť spektra charakterizují každou látku.

Při kvantitativním stanovení se využívá toho, že intenzita signálu je přímo úměrná koncentraci. Je však třeba zohlednit podmínky měření. Výhodné je porovnávat vzorek se standardem měřeným za stejných podmínek. [41]

2.5 Charakteristika zkoumaných látek

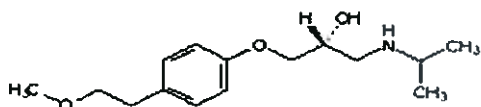
2.5.1 Acebutolol



Je to N-{3-acetyl-4-[(2RS)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]fenyl}butanamid, bílý krystalický prášek snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu a v dichlormethanu. Taje při asi 143 °C. [1]

Acebutolol patří mezi kardioselektivní betablokátory s ISA aktivitou, která zmiňuje bronchokonstrikční a antiarytmické účinky těchto látek, zesiluje vazodilatační účinek a projeví se účinek na β_2 receptorech. Látka se používá k léčbě hypertenze, některých poruch srdečního rytmu, k profylaxi záchvatů anginy pectoris a k dlouhodobé léčbě po prodělání infarktu myokardu. [2,4]

2.5.2 Atenolol

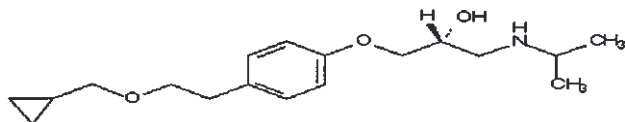


Je to 2-{4-(2RS)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxyfenyl}acetamid, bílý nebo téměř bílý prášek, mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru. [1]

Atenolol patří do skupiny kardioselektivních betablokátorů bez ISA aktivity, stejně jako metoprolol (viz. metoprolol).

Na rozdíl od výše uvedené látky je atenolol látkou hydrofilní. Neúplně se absorbuje ze střeva do vena portae (asi z 50 %), špatně proniká přes hematoencefalickou bariéru, proto má menší centrální nežádoucí účinky. Eliminován je především ledvinami. [2,3]

2.5.3. Betaxolol

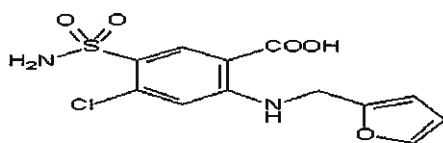


Jeto(2RS)-1-{4-[2-(cyklopropylmethoxy)ethyl]fenoxy}-3-(isopropylamino)propan-2-ol, bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v dichlormethanu a prakticky nerozpustný v etheru. [1]

Betaxolol patří do skupiny kardioselektivních betablokátorů bez ISA aktivity, stejně jako metoprolol a atenolol (viz. výše). Indikován je hlavně u hypertenze mírné až středně těžké formy a k dlouhodobé léčbě a prevenci záchvatů u chronické anginy pectoris, též u glaukomu. [2]

Jde o látku středně lipofilní, eliminována je významně játry i ledvinami. Po p.o. podání se velmi rychle a téměř kompletně vstřebává. Biologická dostupnost se pohybuje kolem 85%, z 50% se váže na plazmatické bílkoviny, maximum účinku nastupuje za 2-4 hod. Firts pass efekt je velmi nízký. [43]

2.5.4 Furosemid

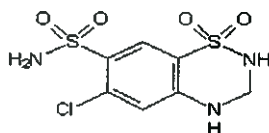


Je to kyselina 4-chlor-2-[(furan-2-ylmethyl)amino]-5-sulfamoylbenzoová, bílý nebo krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Taje při teplotě asi 210 °C, za rozkladu. [1]

Furosemid patří mezi kličková diuretika. Působí na silnou část vzestupného raménka Henleovy kličky, brání zpětnému vstřebávání Na, K a Cl, také Mg a Ca. Výsledkem je zvýšené vylučování těchto minerálů společně s vodou. Tato diuretika patří mezi nejsilnější. Z nežádoucích účinků jsou nejvýznamnější hypokalémie, hyperurikémie, hypotenze, v kombinaci s aminoglykosidovými ATB postižení sluchu. Furosemid je indikován u chronického srdečního selhání, plicního edému, poruch jater i ledvin, hypertenze.

Tato látka má kolísavou absorpci z GITu, vysoce se váže na plazmatické bílkoviny (až 99%). Metabolizován je v játrech glukuronidací. Maximální účinek nastupuje za 1 hod. p.o. a trvá 3-6 hod. [2,4]

2.5.5 Hydrochlorothiazid

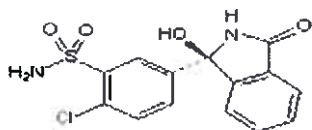


Je to 6-chlor-7-sulfamoyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid, bílý nebo krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. [1]

Hydrochlorothiazid se řadí mezi thiazidová diuretika a patří mezi ta středně silně účinná. Omezuje aktivní reabsorpci Na a Cl, vylučování Ca je sníženo, Mg naopak zvýšeno. Značné jsou rovněž ztráty K. Z extrarenálního působení je nejvýznamnější vasodilatace a hyperglykémie vlivem otevření K kanálů. Indikován je u arteriální hypertenze, srdečního selhání. Z hlavních nežádoucích účinků stojí za zmínku hypokalémie, hyperurikémie, metabolická alkalóza, hyperglykémie, cholesterolémie.

Hydrochlorothiazid se dobře absorbuje z GITu po p.o. podání, vazba na plazmatické bílkoviny je vysoká. Biologická dostupnost se pohybuje od 65 do 75%. Vylučován je močí. Působí krátkodobě, účinek nastupuje do 2 hod. a přetrvává 6-12hod. Prochází placentou. [2,3,5]

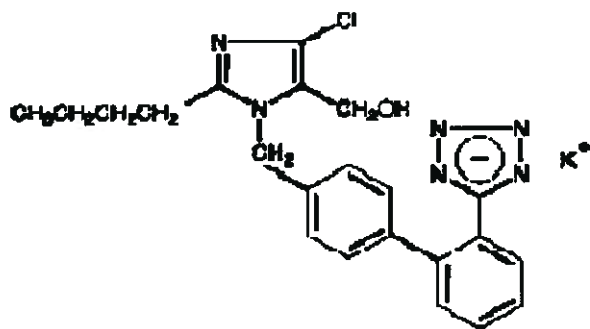
2.5.6 Chlorthalidon



Je to 2-chlor-5-[(1RS)-1-hydroxy-3-oxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-yl]benzensulfonamid, bílý nebo nažloutle bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Taje při asi 220 °C, za rozkladu. [1]

Chlorthalidon patří mezi látky velmi podobné thiazidům s podobnými vlastnostmi. Biologická dostupnost je kolem 60%. Jde o látku s dlouhodobým účinkem, který přetrvává 24-72 hod. [2]

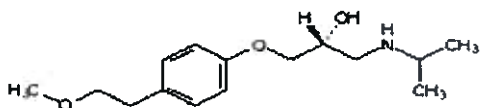
2.5.7 Losartan



Losartan patří do skupiny antagonistů receptoru pro angiotenzin II, vzniklého působením enzymu ACE i nezávisle na něm. Indikují se především při arteriální hypertenzi a srdečním selhání. Mají minimálně nežádoucích účinků – max. je to hyperkalémie, alergie, bolesti hlavy.

Losartan se z velké části konvertuje na aktivní metabolit, který má dlouhý eliminační resp. farmakologický poločas. Maximum účinku nastupuje do 6 hod. a přetrvává 24 hod. Účinek se stabilizuje do 3-6 týdnů. [2,4]

2.5.8 Metoprolol

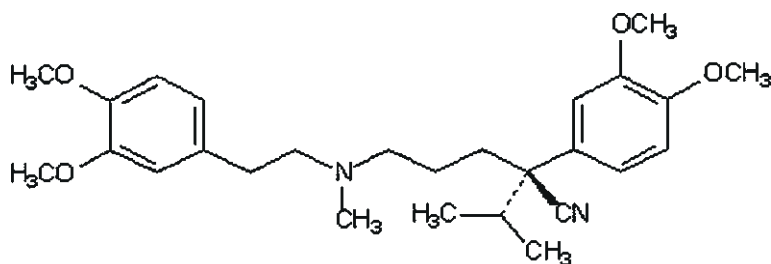


Je to bis{(2RS)-3-(isopropylamino)-1-[4-(2-methoxyethyl)fenoxi]propan-2-ol}, bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v ethylacetátu. [1]

Metoprolol patří do skupiny kardioselektivních betablokátorů bez ISA aktivity (mají menší vazokonstrikční a bronchokonstrikční účinky). Snižuje účinek stresových hormonů na β_1 receptorech umístěných v srdci, cévách, ledvinách a mozku. Důsledkem toho je snížení práce srdečního svalu, snížení krevního tlaku, úprava srdečního rytmu a snížení závažnosti a četnosti záchvatů anginy pectoris. Indikovány jsou též u chronického srdečního selhávání. Z nežádoucích účinků stojí za zmínku astmatický záchvat, bradykardie, rebound fenomén, prohloubení hypoglykémie u diabetiků a mírné zvýšení hladiny lipidů v krvi.

Po p.o. podání se uplatňuje first pass efekt, biologická dostupnost je proto zhruba 50%. Eliminaci zajišťují především játra. Biologický poločas je 3 hod. Metoprolol je látka lipofilní, proto klinický efekt je delší než $T_{1/2}$. [2,3,5]

2.5.9 Verapamil



(2RS)-2-(3,4-dimethoxyfenyl)-5-{{2-(3,4-dimethoxyfenyl)ethyl}(methyl)amino}-2-isopropylpentannitril, bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v methanolu. Taje při asi 144 °C. [1]

Verapamil řadíme do skupiny blokátorů kalciových kanálů. Patří mezi první zástupce této skupiny. Omezuje vstup Ca do buněk hladkého svalstva cév a myocytů srdeční svaloviny a vyvolává tam vasodilataci. Indikován je u arteriální hypertenze, ischemické choroby srdeční se stabilní anginou pectoris. Využívá se též antiarytmického účinku při supraventrikulární tachykardii a fibrilaci síní. Verapamil významně zvyšuje plazmatickou koncentraci digoxinu. [2,4]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Použité přístroje, chemikálie a sorbenty

3.1.1 Použité přístroje

FIA lab[®] 3500 systém, FIA Instruments, USA
Osmicestný selekční ventil, Valco Instruments Co., USA
Fluorescenční detektor PMT – FL, Ocean Optics Inc., USA
UV zdroj D-1000-CE,
Filtry Edmund Industry Optic, GmbH, Německo
Teflonové hadičky, vnitřní průměr 0,75mm
Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
Ultrazvuková lázeň Teson 1, ČR

3.1.2 Použité chemikálie a sorbenty

Amilorid, Furosemid, Metoprolol, Sigma - Aldrich
Atenolol, Betoxolol, Acebutolol Sigma - Aldrich
tbl.- Hydrochlorothiazid Léčiva 20x25 mg hydrochlorothiazidu
Urandil 30x 50 mg chlorthalidonu
Lorista 28x50 mg losartanu
Lekoptin 30x40 mg verapamilu
Methanol Lachema ČR
HNO₃ 0,5 M Lachema ČR
KCl Lachema ČR
NaOH Lachema ČR
Voda ultračistá
Použitý sorbent:
BAKERBOND karboxy JT Baker, Holandsko

3.2 Příprava roztoků standardů a mobilních fází, postup přípravy kolony

3.2.1 Roztoky amiloridu

Zásobní roztok standardu amiloridu o koncentraci 100 mg/l (dále AMI 100) byl připraven rozpuštěním základní látky ve vodě.

Zásobní roztok amiloridu o koncentraci 50 mg/l (dále jen AMI 50) jsem připravila rozpuštěním základní látky ve vodě.

Pracovní roztok standardu amiloridu o koncentraci 5 mg/l (dále jen AMI 5) jsem získala naředěním AMI 50 destilovanou vodou.

Oba roztoky byly uchovávány za snížené teploty v chladničce a chráněny před světlem obalem z aluminiové fólie, stálost jeden týden.

3.2.2 Roztok elučňícího činidla 0,01 M HNO₃ + 0,1 M KCl

Při přípravě elučňícího činidla jsem měla k dispozici zásobní roztok 0,5 M HNO₃, z něho jsem odebrala 1 ml a v 50 ml odměrné baňce doplnila destilovanou vodou na daný objem.

KCl jsem odvážíla do odměrné baňky 50 ml a doplnila na požadovaný objem připraveným roztokem 0,01 M HNO₃.

3.2.3. Roztoky zkoumaných látek s Amiloridem

Příprava roztoku Acebutololu 400 mg/l + AMI 5

Acebutolol je látka snadno rozpustná ve vodě. Do odměrné baňky 25 ml jsem navázila 10 mg této látky, přidala 2,5 ml AMI 50 a doplnila vodou na požadovaný objem. (Dále jen ACE 400).

Příprava roztoku Atenololu 100 mg/l + AMI 5

Atenolol je látka mírně rozpustná ve vodě. Do odměrné baňky 25 ml jsem navázila 2,5 mg této látky, přidala 2,5 ml AMI 50 a doplnila vodou na požadovaný objem. (Dále jen ATE 100).

Příprava roztoku Betaxololu 20 mg/l + AMI 5

Betaxolol je látka velmi snadno rozpustná ve vodě. Do odměrné baňky 25 ml jsem odvážíla 0,5 mg této látky, přidala 2,5 ml AMI 50 a doplnila vodou na požadovaný objem. (Dále jen BET 20).

Příprava roztoku Furosemidu 60 mg/l + AMI 5

Furosemid je látka prakticky nerozpustná ve vodě, rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů – 0,01 M NaOH. 1,5 mg furosemidu jsem nejprve rozpustila v roztoku NaOH. Do odměrné baňky 25 ml jsem naměřila 2,5 ml AMI 50 a doplnila roztokem furosemidu v alkalickém hydroxidu na požadovaný objem. (Dále jen FUR 60).

Příprava roztoku Hydrochlorothiazidu 90 mg/l + AMI 5

Hydrochlorothiazid je velmi těžce rozpustný ve vodě, rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů – 0,01 M NaOH. K dispozici jsem měla pouze tablety Hydrochlorothiazid Léčiva 25 mg. Rozpuštěním 2 tablet tohoto přípravku v 500 ml roztoku NaOH (mícháním po dobu 1 hodiny) a následnou filtrací jsem připravila zásobní roztok hydrochlorothiazidu o koncentraci 100 mg/l (dále jen H 100). Do odměrné baňky 25 ml jsem odměřila 2,5 ml AMI 50 a zbytek doplnila H 100 na požadovaný objem. (Dále jen H 90).

Příprava roztoku Chlorthalidonu 90 mg/l + AMI 5

Chlorthalidon je látka prakticky nerozpustná ve vodě, rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů – 0,01 M NaOH. K dispozici jsem měla pouze tablety Urandil 50 mg. Rozpuštěním 1 tablety tohoto přípravku v 500 ml roztoku NaOH (mícháním po dobu 1 hodiny) a následnou filtrací jsem připravila zásobní roztok chlorthalidonu o koncentraci 100 mg/l (dále jen Ch 100). Do odměrné baňky 25 ml jsem odměřila 2,5 ml AMI 50 a zbytek doplnila Ch 100 na požadovaný objem. (Dále jen Ch 90).

Příprava roztoku Losartanu 100 mg/l + AMI 5

Losartan je látka rozpustná ve vodě. K dispozici jsem měla pouze tablety Lorista 50 mg. Rozpuštěním 2 tablet tohoto přípravku v 500 ml vody (mícháním po dobu 1 hodiny) a následnou filtrací jsem připravila zásobní roztok losartanu o koncentraci 200 mg/l (dále jen LOS 200). Do odměrné baňky 10 ml jsem odměřila 1 ml AMI 50, 5 ml LOS 200 a doplnila vodou na požadované množství. (Dále jen LOS 100).

Příprava roztoku Metoprololu 200 mg/l + AMI 5

Metoprolol je látka snadno rozpustná ve vodě. Do odměrné baňky 25 ml jsem navázila 5 mg této látky, přidala 2,5 ml AMI 50 a doplnila vodou na požadovaný objem. (Dále jen MET 200).

Příprava roztoku Verapamilu 360 mg/l + AMI 5

Verapamil je látka dobře rozpustná ve vodě. K dispozici jsem měla pouze tablety Lekoptin 40 mg. Rozpuštěním 5 tablet v 500 ml vody (mícháním po dobu 1 hodiny) a následnou filtrací jsem připravila zásobní roztok verapamilu o koncentraci 400 mg/l (dále jen VER 400). Do odměrné baňky 10 ml jsem odměřila 1 ml AMI 50 a zbytek doplnila VER 400 na požadované množství. (Dále jen VER 360).

3.2.4 Postup přípravy kolony

Při přípravě kolony jsem použila teflonovou hadičku o vnitřním průměru 2 mm. Z jedné strany jsem ji utěsnila vatou Accuvert a připevnila na vodní vývěvu. Vzniklým podtlakem došlo k nasátí suspenze sorbentu v methanolu do hadičky a posléze k vysušení methanolu. Přebytečný sorbent jsem odstranila a kolonu uzavřela i z druhé strany vatou.

3.3 Způsob stanovení SIA

Metodu stanovení Amiloridu jsem převzala od kolegy Pavlíčka. [38]

3.3.1 Parametry stanovení amiloridu

- Použité vlnové délky: primární filtr λ excitační - žádný
sekundární filtr λ emisní 385 nm
- Závislost fluorescence amiloridu na pH prostředí nebyla prokázána.
- Použitý sorbent: jako nejvhodnější sorbent se ukázal být BAKERBOND karboxy: v dostatečné míře totiž naadsorboval amilorid, ale zároveň bylo možné analyt z něho kompletně eluovat přijatelným objemem činidla, které sorbent nedestruovalo. Adsorpce i eluce byly na rozdíl od jiných sorbentů (Lichrolut EN, Lichrolut TSC, CIM disk SCX) dokonalé.
- Použité eluční činidlo: jako nejúčinnější způsob eluce amiloridu z karboxy sorbentu se ukázala kyselá eluce, spočívající v potlačení ionizace sorbentu nízkým pH elučního činidla – 0,01 M HNO₃. Pro zvýšení účinnosti elučního procesu podpořením výměny iontů bylo použito přídavku 0,1 M KCl.
- Použité průtokové rychlosti
Rychlost aplikace vzorku: 10 μ l/s
Rychlost eluce: 20 μ l/s
- Moč neobsahuje žádné složky, které by při stanovení s amiloridem interferovaly

3.3.2 Schéma programu měření

Schéma

Tabulka č.1 : Schéma programu měření

Pořadí	Krok	Množství, typ činidel, průtoková rychlost	
		IN	OUT
1.	Promytí pumpy	2,5 ml H ₂ O, 100 μl/s	2,5 ml H ₂ O 100 μl/s
2.	Promytí kolony	2,5 ml H ₂ O, 100 μl/s	2,5 ml H ₂ O 40 μl/s
3.	Nástřik vzorku AMI 5	40 μl AMI 5, 25 μl/s, 2 ml H ₂ O, 100 μl/s	40 μl AMI 5, 20 μl/s, 2 ml H ₂ O, 20 μl/s
4.	Promytí vzorku AMI 5	2 ml H ₂ O, 100 μl/s	2 ml H ₂ O, 20 μl/s
5.	Eluce AMI 5	2,3 ml 0,01 M HNO ₃ , 0,1 M KCl, 100 μl/s	2,3 ml 0,01 M HNO ₃ , 0,1 M KCl, 20 μl/s
6.	Promytí pumpy 2x	2,5 ml H ₂ O, 100 μl/s	2,5 ml H ₂ O 100 μl/s
7.	Promytí kolony	2,5 ml H ₂ O, 100 μl/s	2,5 ml H ₂ O 40 μl/s
8.	Nástřik vzorku AMI 5 + zkoušená látka (ZL)	40 μl AMI 5 + ZL, 25 μl/s, 2 ml H ₂ O, 100 μl/s	40 μl AMI 5 + ZL, 20 μl/s, 2 ml H ₂ O, 20 μl/s
9.	Promytí vzorku AMI 5 + ZL	2 ml H ₂ O, 100 μl/s	2 ml H ₂ O, 20 μl/s
10.	Eluce AMI 5 + ZL	2,3 ml 0,01 M HNO ₃ , 0,1 M KCl, 100 μl/s	2,3 ml 0,01 M HNO ₃ , 0,1 M KCl, 20 μl/s
11.	Promytí pumpy	2,5 ml H ₂ O, 100 μl/s	2,5 ml H ₂ O 100 μl/s

Popis programu

V prvním cyklu byl stanovován samotný amilorid (5 mg/l), v druhém cyklu potom směs amiloridu (5 mg) se zkoušenou látkou příslušné koncentrace.

Program byl sestaven následovně:

1. cyklus: nejprve byla propláchnuta pumpa 2,5 ml nosného proudu H₂O (dále jen NP) rychlostí 100 μ l/s, poté kolona 2,5 ml NP rychlostí 40 μ l/s. Dalším krokem byl nástřik 40 μ l vzorku AMI 5 rychlostí 25 μ l/s, k tomu byly čerpadlem aspirovány 2 ml NP (100 μ l/s). Výsledný roztok byl dopraven na kolonu, tam byl amilorid adsorbován, zatímco zbytek prošel bez zachycení do odpadu (20 μ l/s). Zachycená látka byla poté promyta 2 ml NP rychlostí 20 μ l/s a následovala eluce činidlem 2,3 ml 0,01 M HNO₃ a 0,1 M KCl (dále jen EČ) rychlostí 20 μ l/s. Vzorek byl detekován fluorescenčním detektorem při vlnové délce 385 nm. Po dokončení měření byla pumpa propláchnuta 2,5 ml NP (100 μ l/s).

2. cyklus: nejprve byla propláchnuta pumpa 2,5 ml nosného proudu H₂O (dále jen NP) rychlostí 100 μ l/s, poté kolona 2,5 ml NP rychlostí 40 μ l/s. Dalším krokem byl nástřik 40 μ l vzorku roztoku AMI 5 se zkoušenou látkou (ZL) rychlostí 25 μ l/s, k tomu byly čerpadlem aspirovány 2 ml NP (100 μ l/s). Výsledný roztok byl dopraven na kolonu. Tam byl amilorid adsorbován, zkoušená látka se buď též naadsorbovala nebo prošla bez zachycení společně se zbytkem původního roztoku. Zachycený amilorid byl poté promyt 2 ml NP rychlostí 20 μ l/s a následovala eluce činidlem 2,3 ml 0,01 M HNO₃ a 0,1 M KCl (dále jen EČ) rychlostí 20 μ l/s. Vzorek byl detekován fluorescenčním detektorem při vlnové délce 385 nm. Po dokončení měření byla pumpa propláchnuta 2,5 ml NP (100 μ l/s).

Každý vzorek jsem měřila 3x. Vždy před novým měřením jsem systém ještě jednou promývala, aby se co nejvíce eliminovaly možné chyby. 500 μ l nosného proudu (H₂O) byla promyta pumpa a třikrát 100 μ l H₂O i všechny teflonové hadičky.

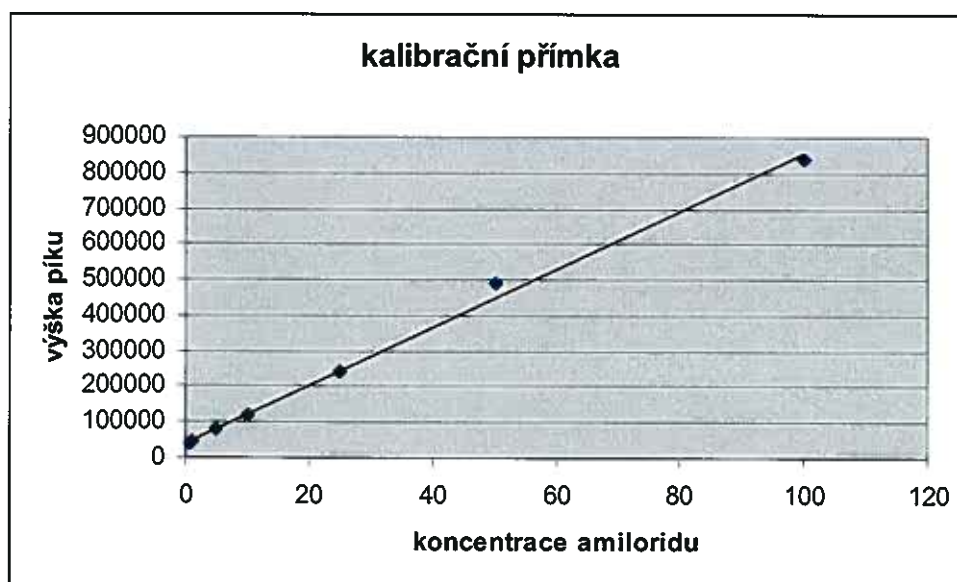
3.3.3 Validace metody

Linearita

Lineární regresní analýzu jsem provedla se 7 hodnotami koncentrací amiloridu ve vodě. Roztoky byly připraveny ředěním základního roztoku amiloridu AMI 100 ($c = 100 \text{ mg/ml}$) vodou na koncentrace 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a 100 mg/l. Použila jsem daný program s optimálními podmínkami nástřiku i eluce. Pro každou koncentraci proběhly vždy 3 cykly, výsledné hodnoty jsou průměrem těchto 3 měření.

Tabulka č. 2: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci

c (mg/l)	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
0,5	40764,12	41327,95	41308,99	41133,69
1,0	45835,95	44224,34	45195,22	45085,17
5,0	75391,28	73427,83	83359,41	77392,84
10,0	120739,00	120218,26	120072,55	120343,27
25	246003,47	244825,05	246706,60	244121,92
50	486288,96	486997,93	488192,09	487159,66
100	837037,28	837928,25	836267,39	837077,64



Obrázek č. 4: Kalibrační přímka závislosti fluorescence na koncentraci

Tabulka 3.: Statistické parametry lineární regrese kalibrační přímky

Statistické parametry lineární regrese : $y = k \cdot x + q$		
Počet bodů	$n = 7$	Odhad chyby
Směrnice	$k = 8131 \pm 218$	
Abs. člen	$q = 42167 \pm 9482$	
Korelační koeficient	$r = 0,9982$	
Reziduální odchylka	$s = 19508$	

Další parametry systému

Citlivost: detekční limit – 0,05 mg/l

kvantitativní limit – 0,15 mg/l

Selektivita: při nástřiku čisté moči nedochází k fluorescenci, což je důkaz toho, že z kolony neeluují žádné další látky v moči obsažené, které by s amiloridem během stanovení interferovaly. [38]

3.4 Vliv dalších léčiv na stanovení

3.4.1 Volba zkoušených látek

Pro mou práci bylo nutné vybrat léčiva, u kterých by bylo vhodné zjistit, zda nějakým způsobem ovlivňují stanovení amiloridu. V dostupné literatuře jsem nenalezla žádné informace o interferenci některých látek s touto.

Při volbě jsem vycházela z požadavku vybrat takové substance, které se dostanou v organismu s amiloridem nejčastěji do kontaktu, tzn. zvolit ty látky, které se s ním používají v kombinované terapii. Mým cílem bylo přiblížit se co nejvíce situaci, která v praxi může nastat.

Vzhledem k tomu, že je amilorid indikován při arteriální hypertenzi, hypokalémii, otocích v důsledku srdečního selhání nebo jaterního selhání, při jiných srdečních onemocněních, se v kombinaci s jinými léky objevuje velmi často. Zvláště pak při hypertenzi a srdečních onemocněních je podáván s řadou dalších léčiv včetně ostatních diuretik.

Využila jsem databáze dvou lékáren základního typu k výběru léků, které byly s amiloridem nejčastěji vydávány během jednoho měsíce (říjen 2004). Výsledky z obou lékáren jsem porovnávala. Pro svou práci jsem poté vybrala látky z nejfrekventovanějších indikačních skupin, to je 9 zástupců. S nimi jsem potom dále pracovala.

Tabulka č. 4: Vybrané látky

Indikační skupina	Vybrané účinné látky
Kardioselektivní β -blokátory s ISA	Acebutolol
Kardioselektivní β -blokátory bez ISA	Atenolol
	Betaxolol
	Metoprolol
Kličková diuretika	Furosemid
	Hydrochlorothiazid

Thiazidová diuretika	Hydrochlorothiazid
	Chlorthalidon
AAII.	Losartan
BKK	Verapamil

Tabulka č. 5: Nejčastěji kombinované léky s amiloridem (seřazené dle četnosti)

Pořadí	Název přípravku	Název účinné látky
1.	Lokren (β -blokátor)	Betaxolol 20 mg
2.	Prestarium (ACEI)	Perindopril 2,4;8 mg
3.	Gopten (ACEI)	Trandolapril 0,5; 2 mg
4.	Lorista (AA II.)	Losartan 50,100 mg
5.	Enap (ACEI)	Enalapril 2,5; 5; 10; 20 mg
6.	Betaloc (β -blokátor)	Metoprolol 25; 50; 100; 200 mg
7.	Agen (BKK)	Amlodipin 5; 10 mg
8.	Lozap (AAII.)	Losartan 12,5; 50 mg
9.	Plenil (BKK)	Felodipin 2,5; 5; 10 mg
10.	Vasocardin (β -blokátor)	Metoprolol 25; 50; 100; 200 mg
11.	Acecor (β -blokátor)	Acebutolol 200; 400 mg
12.	Lomir (BKK)	Isradipin 2,5; 5 mg
13.	Sandonorm (β -blokátor)	Bopindolol 1 mg
14.	Blocalcin (BKK)	Diltiazem 60 mg
15.	Unipress (BKK)	Nitrendipin 10; 20 mg
16.	Presid (BKK)	Felodipin 2,5; 5; 10 mg
17.	Tenormin (β -blokátor)	Atenolol 50; 100 mg
18.	Olicard (vasodilatans)	Isosorbid mononitát 40; 60 mg
19.	Ramil (ACEI)	Ramipril 1,25; 2,5; 5; 10 mg
20.	Dapril (ACEI)	Lisinopril 5; 10; 20 mg

3.4.2 Volba koncentrací

Stejně důležité jako výběr zkoumaných látek bylo i zvolení vhodných koncentrací tak, abych se při stanovení co nejvíce přiblížila situaci in vivo. Řídila jsem se obvyklým dávkováním nebo silou tablet, které jsem měla k dispozici. Měřila jsem látky v poměru, v jakém se v léčivých přípravcích nacházejí nebo v jakém poměru jsou spolu dákovány. Je nutné si ovšem uvědomit, že se jedná pouze o hrubý předpoklad, podle kterého se obě látky vstřebají kompletně a koncentrace v plasmě i v moči budou odpovídat mnou zvoleným poměrům.

Při volbě koncentrací jsem vycházela z dávkovacích schémat:

Tabulka č. 6: Dávkovací schéma zkoušených látek

Název látky	Obvyklé dávkování	Zvolená koncentrace (mg)
Amilorid	ve většině přípravků obsaženo 5 mg	5
Acebutolol	2x200 mg/den, 1x400 mg/den	400
Atenolol	1x50-100 mg/den	100
Betaxolol	2x10 mg/den, 1x20 mg/den	20
Furosemid	40-80 mg/den	60
Hydrochlorothiazid	max. dávka 4x25 mg/den (při otocích), pro zjednodušení přípravy roztoku zvolena koncentrace 90 mg/l (místo 100 mg/l)	90
Chlorthalidon	max. dávka 50-100 mg/den, pro zjednodušení přípravy roztoku zvolena koncentrace 90 mg/l (místo 100 mg/l)	90
Losartan	2x50 mg/den	100
Metoprolol	200 mg/den	200
Verapamil	3x120 mg/den	360

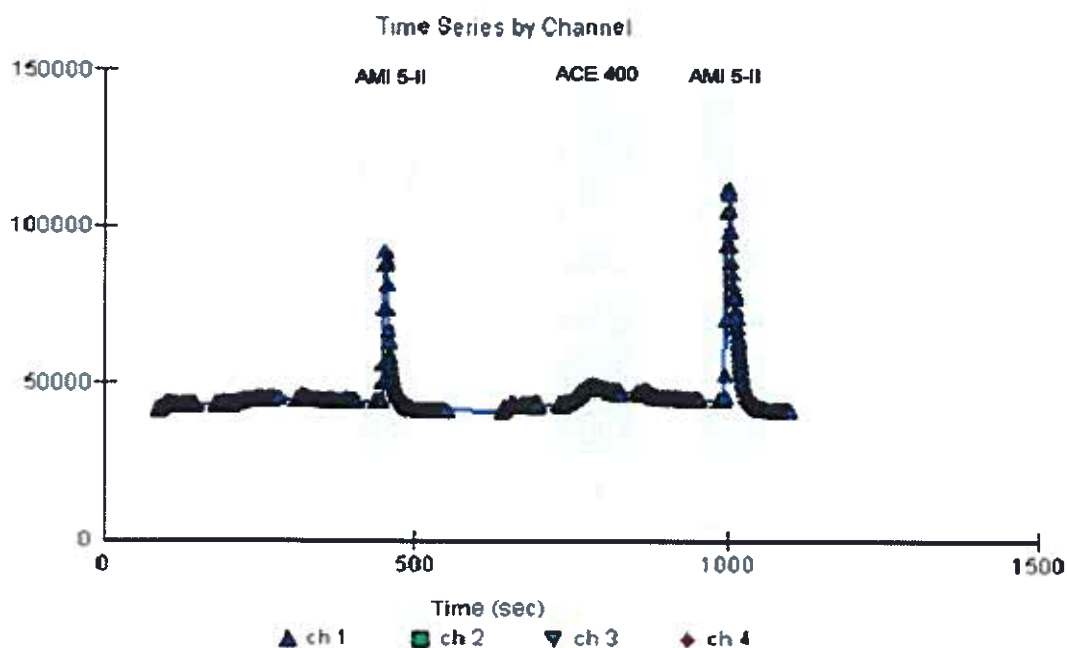
3.5 Výsledky měření

3.5.1 Ovlivnění stanovení amiloridu acebutololem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg (AMI 5-II.) a acebutololu o koncentraci 400 mg/l (dále jen ACE 400). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnávala a vyhodnotila interferenci ACE 400.

Tabulka č. 7: Naměřené hodnoty AMI 5 + ACE 400

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	90107,12	92569,52	91696,87	91457,84
AMI 5-II.	118084,50	112916,20	117509,54	116170,08
ACE 400	49370,07	49846,34	49532,22	49582,88
R_t (AMI 5-I.)	43,53	43,92	43,70	43,72
R_t (AMI 5-II.)	43,64	44,23	44,00	43,96
R_t (ACE400)	72,27	63,78	69,87	68,64



Obrázek č. 5: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + ACE 400

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se lišily, hodnoty AMI 5-II byly vyšší. ACE 400 se navíc částečně naadsorboval na kolonu, na grafu je tedy patrná odezva detektoru. **Acebutolol ovlivňuje stanovení amiloridu směrem k pozitivnějším výsledkům.**

Tabulka č. 8: Výsledné interference ACE 400 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

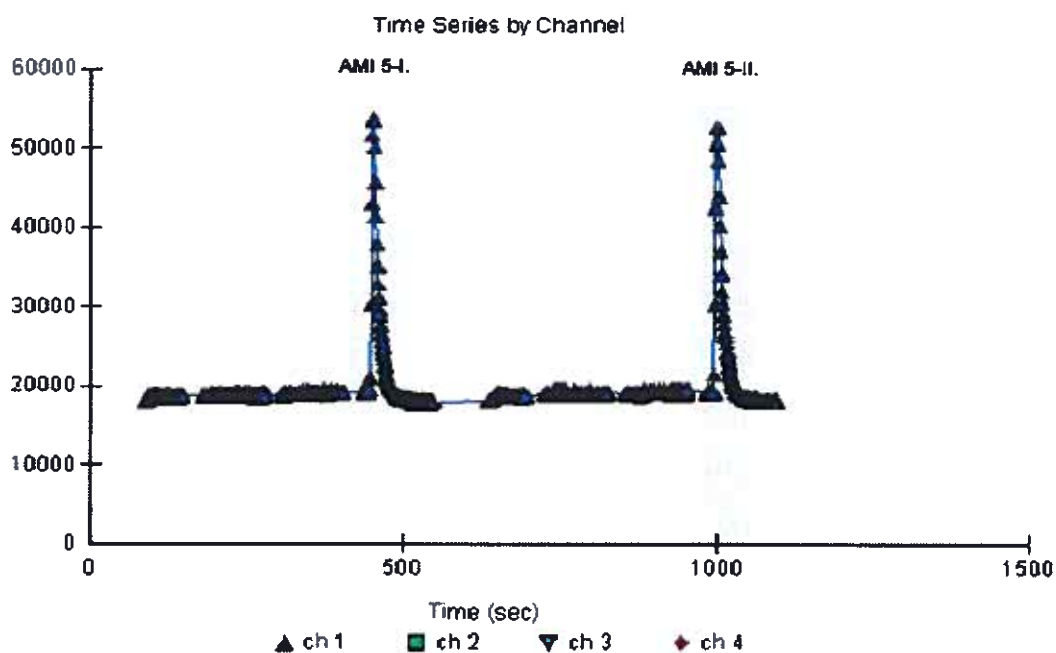
	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + ACE 400	131,05%	121,98%	128,15%	127,06%

3.5.2 Ovlivnění stanovení amiloridu atenololem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) a atenololu o koncentraci 100 mg/l (dále jen ATE 100). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovнала a vyhodnotila interferenci ATE 100.

Tabulka č. 9: Naměřené hodnoty AMI 5 + ATE 100

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	52707,11	54611,25	54328,05	53882,14
AMI 5-II.	51057,04	52820,11	52823,16	52233,44
ATE 100	19416,71	19418,67	19423,13	19419,50
R_t (AMI 5-I.)	45,44	45,42	45,43	45,43
R_t (AMI 5-II.)	45,36	45,58	45,62	45,52
R_t (ATE 100)	186,97	218,72	212,65	206,12



Obrázek č. 6: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + ATE 100

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. ATE 100 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Atenolol neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 10: Výsledné interference ATE 100 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + ATE 100	96,87%	96,72%	97,23%	96,94%

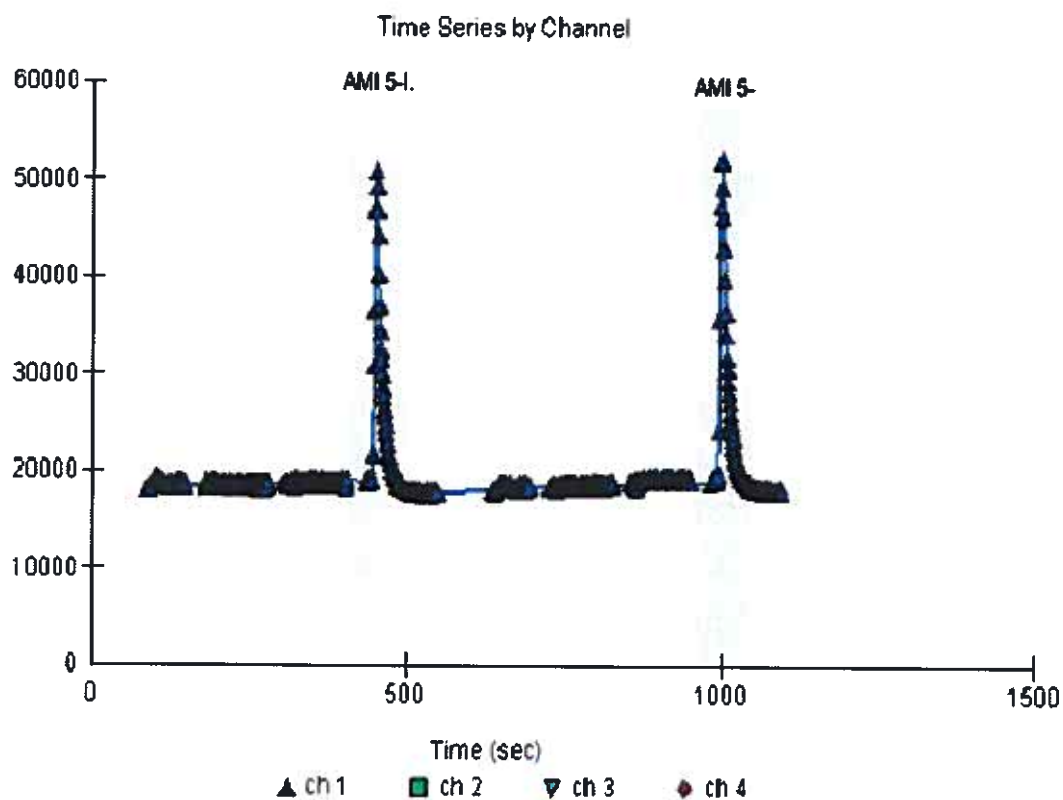
3.5.3 Ovlivnění stanovení amiloridu betaxololem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) a betaxololu o koncentraci 20 mg/l (dále jen BET 20). Výšky

výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnála a vyhodnotila interferenci BET 20.

Tabulka č 11.: Naměřené hodnoty AMI 5 + BET 20

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	52772,59	51041,50	52891,91	52235,33
AMI 5-II.	51865,64	52367,19	52693,76	52308,86
BET 20	19431,62	19639,58	19456,92	19509,37
R_t (AMI 5-I.)	45,71	45,03	45,25	45,33
R_t (AMI 5-II.)	45,38	45,02	45,49	45,30
R_t (BET 20)	194,40	176,64	167,74	179,59



Obrázek č. 7: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + BET 20

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. BET 20 se na kolonu nadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Betaxolol neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 12: Výsledné interference BET 20 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

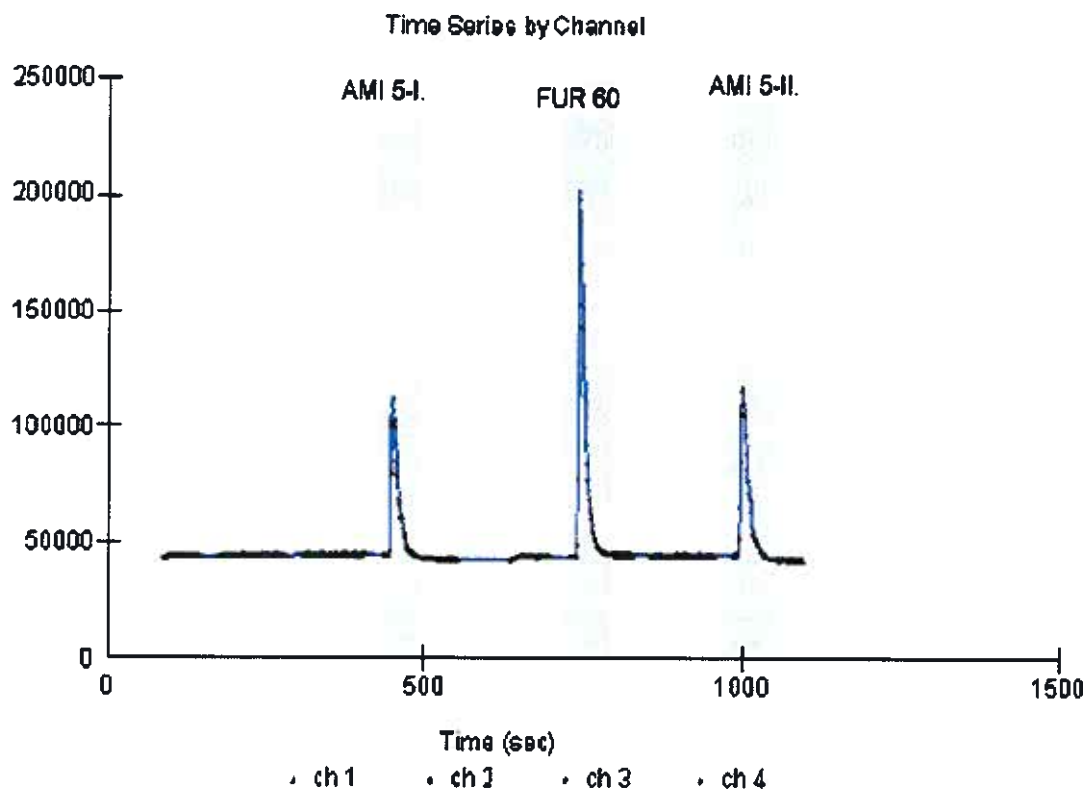
	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + BET 20	98,28%	102,60%	99,63%	100,17%

3.5.4 Ovlivnění stanovení amiloridu furosemidem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) a furosemidu o koncentraci 60 mg/l (dále jen FUR 60). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnála a vyhodnotila interferenci FUR 60.

Tabulka č. 13: Naměřené hodnoty AMI 5 + FUR 60

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	111357,80	112782,10	116370,30	113504,30
AMI 5-II.	113818,10	116532,80	118026,20	116125,70
FUR 60	207449,90	202621,60	203674,20	204581,90
R_t (AMI 5-I.)	43,50	43,54	43,71	43,58
R_t (AMI 5-II.)	45,47	45,32	44,83	45,21
R_t (FUR 60)	23,02	22,82	22,50	22,78



Obrázek č. 8: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + FUR 60

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. FUR 60 se naadsorboval na kolonu, na grafu je tedy patrná odezva detektoru. **Furosemid neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 14: Výsledné interference FUR 60 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

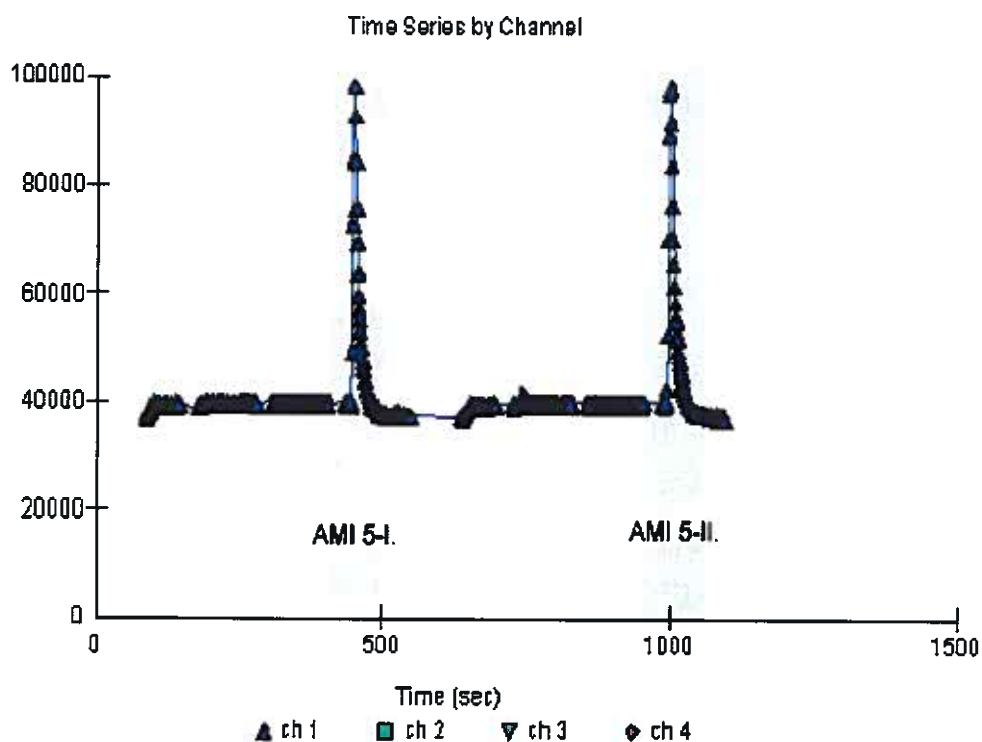
	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + FUR 60	102,21%	103,33%	101,42%	102,23%

3.5.5 Ovlivnění stanovení amiloridu hydrochlorothiazidem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) a hydrochlorothiazidu o koncentraci 90 mg/l (dále jen H 90). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnávala a vyhodnotila interferenci H 90.

Tabulka č. 15: Naměřené hodnoty AMI 5 + H 90

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	100097,15	104874,90	102234,23	102402,09
AMI 5-II.	101618,63	108220,41	99933,96	103257,67
H 90	42683,52	41285,20	42555,84	42174,85
R_t (AMI 5-I.)	45,76	44,34	45,01	45,04
R_t (AMI 5-II.)	45,98	46,82	44,12	45,64
R_t (H 90)	20,61	22,76	21,55	21,64



Obrázek č. 9: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + H 90

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. H 90 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Hydrochlorothiazid neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 16: Výsledné interference H 90 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

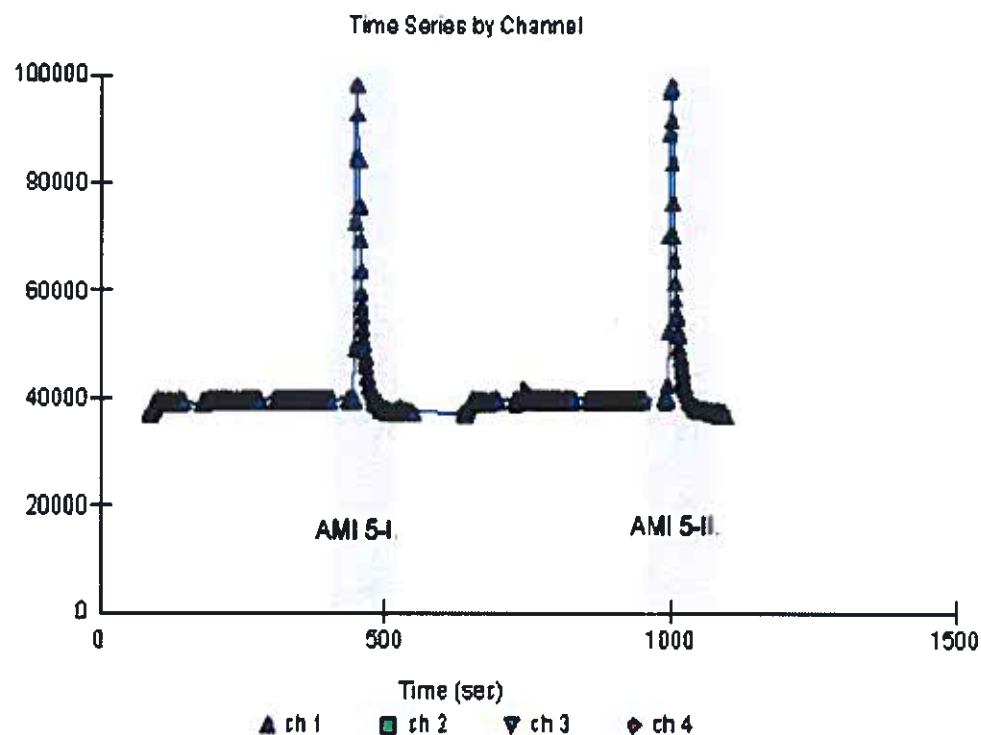
	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + H 90	101,52%	103,19%	97,75%	100,82%

3.5.6 Ovlivnění stanovení amiloridu chlorthalidonem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) chlorthalidonu o koncentraci 90 mg/l (dále jen CH 90). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnávala a vyhodnotila interferenci CH 90.

Tabulka č.17: Naměřené hodnoty AMI 5 +CH 90

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	99620,03	98952,27	101453,93	100008,74
AMI 5-II.	96269,83	98605,74	99861,10	98245,56
CH 90	42031,38	41403,27	42409,59	41948,08
R_t (AMI 5-I.)	43,53	42,98	43,10	43,20
R_t (AMI 5-II.)	44,96	44,69	44,78	44,81
R_t (CH 90)	20,10	19,39	20,00	19,83



Obrázek č. 10: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + CH 90

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. CH 90 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Chlorthalidon neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 18: Výsledné interference CH 90 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + CH 90	96,64%	99,65%	98,43%	98,24%

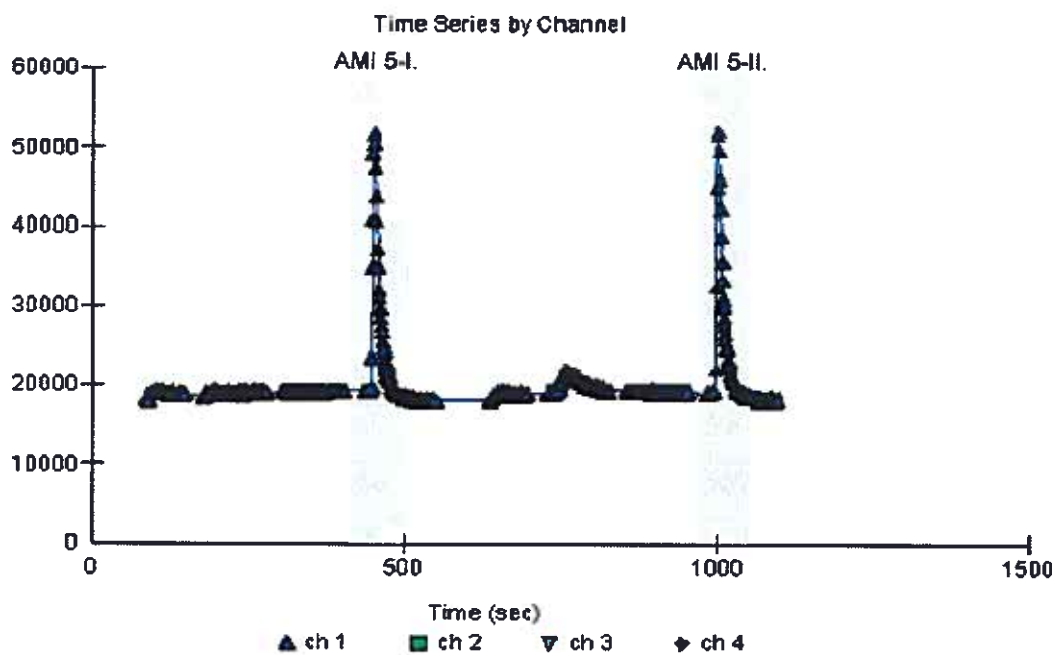
3.5.7 Ovlivnění stanovení amiloridu losartanem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále

AMI 5-II.) a losartanu o koncentraci 100 mg/l (dále jen LOS 100). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnávala a vyhodnotila interferenci LOS 100.

Tabulka č. 19: Naměřené hodnoty AMI 5 + LOS 100

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	55377,57	51897,66	51830,32	53035,18
AMI 5-II.	51679,95	49541,46	52203,55	51141,65
LOS 100	21735,25	21762,14	21872,89	21790,09
R_t (AMI 5-I.)	45,76	45,58	44,97	45,44
R_t (AMI 5-II.)	44,87	45,07	45,25	45,06
R_t (LOS 100)	36,75	36,49	37,43	36,89



Obrázek č. 11: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + LOS 100

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. LOS 100 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Losartan neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 20: Výsledné interference LOS 100 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + LOS 100	93,32%	95,46%	100,72%	96,50%

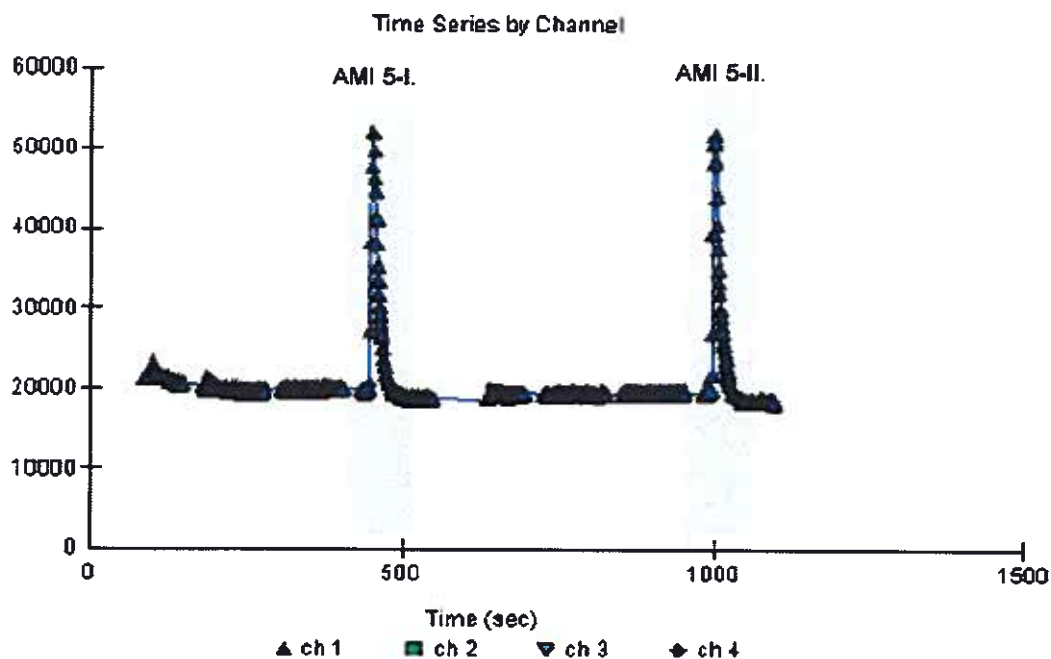
3.5.8 Ovlivnění stanovení amiloridu metoprololem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále AMI 5-II.) a metoprololu o koncentraci 200 mg/l (dále jen MET 200). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnála a vyhodnotila interferenci MET 200.

Tabulka č. 21: Naměřené hodnoty AMI 5 + MET 200

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	114642,20	52624,15	50960,50	*
AMI 5-II.	111986,60	51938,29	50970,74	*
MET 200	44545,45	20005,74	19460,43	*
R_t (AMI 5-I.)	44,03	46,10	45,53	45,22
R_t (AMI 5-II.)	43,65	44,69	45,47	44,60
R_t (MET 200)	147,90	223,49	207,44	192,95

*.....v průběhu měření jsem se potýkala s problémy s UV zdrojem a musela ho vyměnit. Přístroje měli odlišnou baseline, což je důvodem odlišné výšky píku u 1.měření.



Obrázek č. 12: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + MET 200

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. MET 200 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Metoprolol neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 22: Výsledné interference MET 200 vyjádřené poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + MET 200	97,68%	98,70%	100,02%	98,80%

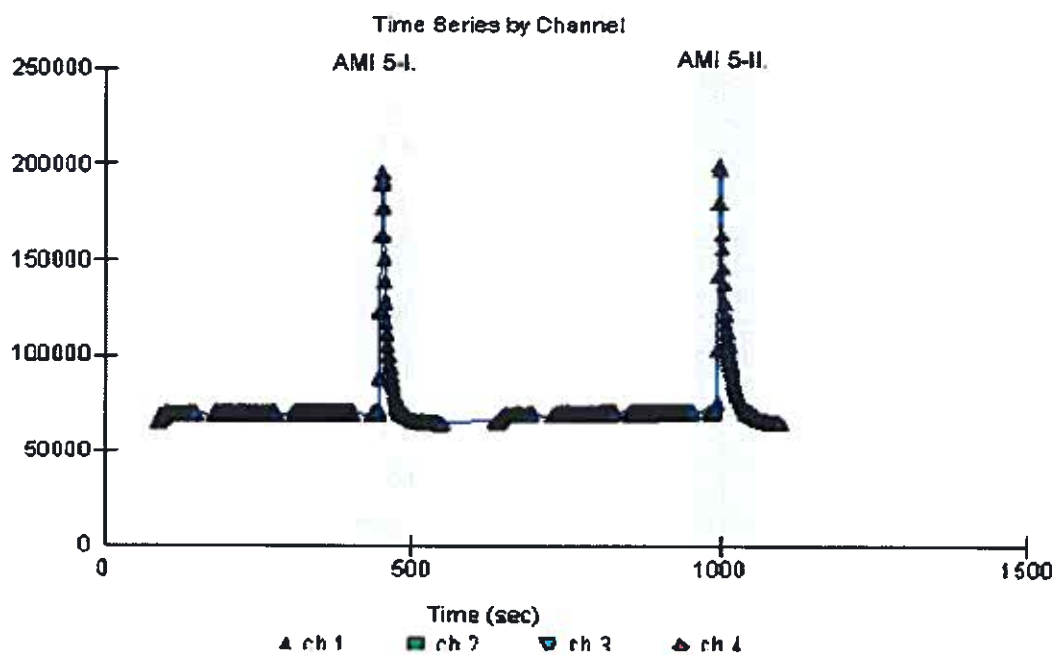
3.5.9 Ovlivnění stanovení amiloridu verapamilem

V prvním cyklu měření jsem stanovovala samotný amilorid (dále AMI 5-I.) o koncentraci 5mg/l, ve druhém cyklu následoval roztok amiloridu 5 mg/l (dále

AMI 5-II.) a verapamilu o koncentraci 360 mg/l (dále jen VER 360). Výšky výsledného píku amiloridu AMI 5-I. a AMI 5-II. jsem porovnávala a vyhodnotila interferenci VER 360.

Tabulka č. 23: Naměřené hodnoty AMI 5 + VER 360

	1.měření	2.měření	3.měření	průměr
AMI 5-I.	196146,70	210473,20	212544,70	206388,20
AMI 5-II.	202097,90	210184,80	207067,30	619350,00
VER 360	70914,18	70544,10	70227,18	70561,82
R_t (AMI 5-I.)	44,11	44,01	44,15	44,09
R_t (AMI 5-II.)	43,74	43,66	43,59	43,665
R_t (VER 360)	199,53	216,68	208,89	208,37



Obrázek č. 13: Záznam odezvy detektoru při stanovení interference AMI 5 + VER 360

Výšky píku AMI 5-I. a AMI 5-II. se téměř nelišily. VER 360 se na kolonu neadsorboval, prošel bez zachycení do detektoru. **Verapamil neovlivňuje stanovení amiloridu.**

Tabulka č. 24: Výsledné interference VER 360 vyjádřená poměrem výšky píků AMI 5-I. a AMI 5-II. v procentech.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
AMI 5 + VER 360	103,03%	99,86%	97,42%	100,10%

3.5.10 Souhrn výsledků

Ze všech zkoušených látek určitou interferenci vykázal pouze zástupce kardioselektivních betablokátorů s ISA aktivitou, acebutolol v koncentraci 400 mg/l.

	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr
ACE 400	131,05%	121,98%	128,15%	127,06%
ATE 100	96,87%	96,72%	97,23%	96,94%
BET 200	98,28%	102,60%	99,63%	100,17%
FUR 60	102,21%	103,33%	101,42%	102,23%
H 90	101,52%	103,19%	97,75%	100,82%
CH 90	96,64%	99,65%	98,43%	98,24%
LOS 100	93,32%	95,46%	100,72%	96,50%
MET 200	97,68%	98,70%	100,02%	98,80%
VER 360	103,03%	99,86%	97,42%	100,10%

4 ZÁVĚR

Metodou, kterou vypracoval kolega Pavlíček, jsem stanovila *amilorid* a otestovala 9 účinných látek z různých indikačních skupin nejčastěji kombinovaných s již výše zmiňovanou substancí. Převzala jsem parametry stanovení a měřicí program upravila dle vlastních potřeb do 2 cyklů. Podařilo se mi prokázat, že pouze jedna z těchto látek, *acebutolol* v koncentraci 400 mg/l, s amiloridem při stanovení interferuje.

Použitá *sekvenční injekční analýza* je v porovnání s HPLC sice méně citlivější, ale její nespornou výhodou je menší časová náročnost a díky automatizaci možnost stanovení vysokých množství vzorků bez velkých nároků na obsluhu. Díky on-line spojení s *SPE* lze vzorek velmi snadno zakoncentrovat a odstranit nečistoty obsažené v biologickém materiálu. Vliv nežádoucích biologických prvků v moči je odstraněn adsorbentem, výsledky tak nejsou ovlivněny interferencemi látek z matrice.

Bylo by vhodné otestovat i další zástupce kardioselektivních beta-blokátorů s ISA aktivitou, např. *pindolol*, *bopindolol*, *penbutolol*. Žádoucí by bylo též zhodnotit, zda bude *acebutolol* stanovení ovlivňovat i v koncentracích, v jakých se podává např. při dlouhodobé léčbě po infarktu myokardu, to je 200 mg/l. Měření bylo pouze orientační. V dalších zkouškách by se mohlo zvážít neúplné vstřebání látek, díky kterému budou skutečné poměry amiloridu a zkoušené substance odlišné od těch teoretických, které jsem ve své práci použila. Otestovala jsem pouze zlomek z látek, které se s amiloridem mohou kombinovat.

6 LITERATURA

1. ČESKÝ LÉKOPIS 2002, 2.-4. díl, Grada Publishing 2002, s.
2. Škop B., AISLIP, mikroverze, InfoPharm
3. Suchopár J., Šimík R., REMEDIA COMPENDIUM 2. vydání, Panax 1997, Praha
4. Lüllman H., Mohr K., Wehling M., FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE, Grada-Avicenum 2002, Praha
5. Firemní katalog SUPELCO, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA 16823-0048 USA
6. Ruzicka J.: Flow Injection, CD ROM 2.Edition, Fialab Instruments, Seattle 2002
7. Qin Y., Wang XB., Wang C., Zhao M., Wu MT., Xu YX., Peng SQ.: Application of high-performance liquid chromatography-mass spektrometry to detection of diuretics in human urine, J-Chromatogr, B-Anal-Technol-Biomed-Life-Sci. 25 Aug 2003; 794(1):193-203
8. Qin Y., Zhu ST., Wang C., Zhao M., Peng SQ.: Determination of 11 diuretics by micellar HPLC, Fenxi-Ceshi-Xuebao. 25 Sep 2002; 21(5): 85-87
9. Zecevic M., Zivanovic L., Agatonovic Kustrin S., Minic D.: The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methyl dopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets, J. Pharm. Biomed. Anal.; 2001, 24(5-6):1019-1025
10. Selinger K.: Measurement of amiloride in airway surface liquid utilizing HPLC and fluorescence detection, Biomed. Chromatogr. ,1994, 8(5):219-223
11. Alliegro M. A., Dyer K. D., Cragoe E. J., Glaser B. M., Alliegro M. C.: High-performance liquid-chromatographic method for quantitating plasma levels of amiloride and its analogues, J. Chromatogr, Biomed. Appl. 6, 120(1-2 (J. Chromatogr., 582));, 1992, 217-223
12. Xu D., Zhou J., Yuan Y., Liu X., Huang S.: HPLC determination of amiloride in plasma and urine, Yaowu-Fenxi-Zazhi, 11(4): 1991, 210-213
13. Reeuwijk H. J. E. M., Tjaden U. R., Van der Greef J.: Simultaneous determination of furosemide [frusemide] and amiloride in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr, Biomed. Appl. 27, 113(2 (J. Chromatogr., 575)): 1992, 269-274
14. Sane R. T., Bhate V.R., Nayak V. G., Ladge K. D.: Simultaneous determination of atenolol, hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride from marketed preparation by reversed-phase high-performance liquid chromatography, Indian Drugs.1991, 28(7): 322-325
15. Meng Q. C., Chen Y. F., Oparil S., Cragoe E. J.: High-performance liquid-chromatographic determination of amiloride and its analogues in rat plasma, J. Chromatogr, Biomed. Appl. 94(1 (J. Chromatogr., 529))1990, 201-209
16. Deventer K., Delbeke FT., Roels K., van-Eenoo P.: Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spektrometry, Biomed-Chromatogr. Dec 2002; 16(8): 529-535

17. Forrest G., McInnes G. T., Fairhead A. P., Thompson G. G., Brodie M. J.: Simple high-performance liquid-chromatographic method for the measurement of amiloride in body fluids, *J. Chromatogr, Biomed. Appl.* 24, 72(1 (J. Chromatogr., 428)) 1988, 123-130
18. Somogyi A., Keal J., Bochner F.: Sensitive high-performance liquidchromatographic assay for determination of amiloride in biologic fluids using an ion-pair extraction method, *Ther. Drug. Monit.*, 1988, 10(4): 463-468
19. Shi R. J. Y, Benet L. Z., Lin E. T.: High-performance liquidchromatographic assay of basic amine drugs in plasma and urine using a silica gel column and an aqueous mobile phase. I. Amiloride, *J. Chromatogr, Biomed. Appl.* 25, 50((J. Chromatogr., 377)): 1986, 399-404
20. Vincek W. C., Hessey G. A., Constanzer M. L., Bayne W. F.: Amiloride: biological fluid analysis by reversed-phase h.p.l.c. , *Pharm-Res.*, 1985, (3): 143-145
21. De Croo F., Van den Bossche W., De Moerloose P.: Simultaneous quantitative determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by high- performance liquid chromatography, *Chromatographia.*, 1985, 20(8): 477-481
22. Murillo Pulgarin J.A., Alanon Molina A., Fernandez Lopez P.: Direct analysis of amiloride and triamterene mixtures by fluorescence spectrometry using partial-least squares calibration, *Anal. Chim. Acta.* 2001, 10; 449(1-2): 179-187
23. Prasad C.V.N., Parihar C., Sunil K., Parimoo P.: Simultaneousdetermination of amiloride hydrochloride, hydrochlorothiazide and atenolol in combined formulations by derivative spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17(4-5): 877-884
24. Ferrari MCF., Castellano PM., Kaufman TS.: Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic symplex and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 7 Nov 2002; 30(4): 1121-1131
25. Ferrari MCF., Castellano PM., Kaufman TS.: A spectrometric-partial lest squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations, *J.Pharm.Biomed.Anal.* Oct 2001; 26(3): 443-451
26. Murillo Pulgarin J. A., Molina A. A., Lopez P. F.: Direct determination of amiloride in urine using isopotential fluorimetry, *Analyst (Cambridge, UK).* 1997, 122(3): 247-252
27. Sastry C. S. P., Suryanarayana M. V., Prasad Tipirneni A. S. R., Satyanarayana T.: Fluorimetric estimation of triamterene and amiloride hydrochloride in pure and pharmaceutical preparations, *Indian Drugs.* 1989, 26(11): 651
28. Devani M. B., Pandya S. S., Shah S. A.: Spectrophotometric determination of amiloride hydrochloride with MBTH, *Indian J. Pharm. Sci.* 1991, 53(3): 96-98
29. Calvo N., Montes R., Laserna J. J.: Surface-enhanced Raman spectrometry of amiloride on colloidal silver, *Anal. Chim. Acta.* 16, 1993, 280(2): 263-268