

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Jana Zimmermannová

EXTRAKČNÍ STANOVENÍ LOSARTANU V LÉKOVÝCH FORMÁCH  
SEKVENČÍ INJEKČNÍ ANALÝZOU S UV/VIS  
A FLUORIMETRICKOU DETEKČÍ

Extraction method for losartan determination in pharmaceutical compounds  
by sequential injection analysis with UV/VIS and fluorimetric detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu UNCE/2014.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 20. května 2014.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé diplomové práce.

## Abstrakt

Tato diplomová práce je věnována extrakčnímu stanovení losartanu metodou sekvenční injekční analýzy s použitím spektrofotometrické a spektrofluorimetrické detekce. Princip stanovení je založen na vzniku iontového asociátu losartanu s činidlem orange II v kyselém prostředí, který je následnou extrakcí převeden do chloroformové fáze. Pro účely analytického stanovení losartanu se detekuje nárůst absorbance a emise fluorescenčního záření iontového asociátu extrahovaného do chloroformu v jeho absorpčním maximu. Jako standardní látka byla použita draselná sůl losartanu.

V první části práce byly nejprve ověřeny podmínky stanovení ve statickém uspořádání s UV/VIS detekcí, proměřeny základní optimalizační parametry stanovení a zjištěny základní charakteristiky stanovení.

V další části práce byla nejprve sestavena extrakční SIA aparatura a byl vytvořen ovládací program pro celý proces analýzy. Následně byly optimalizovány experimentální parametry stanovení a změřeny základní charakteristiky jak pro spektrofotometrickou detekci tak pro spektrofluorimetrickou detekci.

Spolehlivost stanovení losartanu zvolenými technikami bylo ověřeno analýzou reálných farmaceutických vzorků Losrista, Lozap, Losartan Stada a Losartan Teva. Získané výsledky pro spektrofluorimetrickou detekci dokládají vhodnost této metody pro stanovení losartanu.

Hodnoty základních charakteristik a obsahy analyzované látky ve vzorcích byly vyjádřeny v hmotnostních koncentracích  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro spektrofotometrickou detekci s barvivem orange II bylo dosaženo limitu detekce (LOD)  $1,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , limitu stanovitelnosti (LOQ)  $4,60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s lineárním dynamickým rozsahem (LDR) do  $115 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Při spektrofluorimetrické detekci s použitým barvivem orange II byl zjištěn LOD  $0,68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a LOQ  $2,26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s lineárním dynamickým rozsahem do  $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## Klíčová slova

sekvenční injekční analýza, extrakce kapalina - kapalina, spektrofotometrická detekce, spektrofluorimetrická detekce, losartan

## Abstract

The diploma thesis deals with the extraction method for determination of losartan using sequential injection analysis with spectrophotometric and spectrofluorimetric detection. The principle of determination is based on losartan ion-pair formation with the orange II and calmagite dyes in an acid buffer, which is then extracted into a chloroform phase. For the purposes of the analytical determination of losartan, an increase in absorbance and fluorescence emission of the ion-pair extracted into the chloroform in its absorption maximum is detected. Losartan potassium was used as the standard substance.

First, the conditions for determination in a static arrangement with UV/VIS detection were verified and the basic optimization parameters of determination were measured and the basic characteristics of the determination were identified in the first part of the thesis.

An SIA extraction apparatus was prepared and the control programme for the entire analytical process was created in the other part of the thesis. Then the experimental parameters of the determination were optimized and the basic characteristics for both spectrophotometric and spectrofluorimetric detection were measured.

The reliability of the losartan determination using the selected methods was verified by analysing real pharmaceutical samples – Lorista, Lozap, Losartan Stada and Losartan Teva. The results gained for the spectrofluorimetric detection demonstrate the suitability of this method for determination of losartan.

The values of the basic characteristics and the contents of the analysed substance in the samples were expressed as mass concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). As for the spectrophotometric detection with the orange II dye, the limit of detection (LOD) of  $1.38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and the limit of quantification (LOQ) of  $4.60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  with the linear dynamic range (LDR) up to  $115 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  were reached. As for the spectrofluorimetric detection with the orange II dye, the LOD of  $0.68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and the LOQ of  $2.26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  with the linear dynamic range up to  $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  were determined.

**Keywords:** sequential injection analysis, liquid-liquid extraction, spectrophotometric detection, spectrofluorimetric detection, losartanum

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>9</b> -
1.1 Cíl práce .....	9
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>10</b> -
2.1 Průtokové metody .....	10
2.1.1 Segmentová průtoková analýza .....	10
2.1.2 Průtoková injekční analýza .....	11
2.1.3 Sekvenční injekční analýza.....	12
2.1.4 SIA-LOV .....	14
2.2 Extrakční stanovení v průtokových metodách .....	15
2.3 Spektrofluorimetrie .....	16
2.3.1 Instrumentace spektrofluorimetrie .....	17
2.3.2 Analytické využití spektrofluorimetrie .....	18
2.4 Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti spektra .....	18
2.4.1 Instrumentace spektrofotometrie v UV/VIS .....	20
2.4.2 Analytické využití UV/VIS spektrofotometrie .....	21
2.5 Spektrometrické stanovení účinných látek v lékových formách.....	21
2.6 Losartan draselný .....	22
2.6.1 Metody stanovení losartanu .....	23
2.7 Zpracování dat.....	25
2.7.1 Měření .....	25
2.7.2 Popisné charakteristiky statistického souboru .....	25
2.7.3 Kalibrace .....	26
2.7.4 Šum .....	26
2.7.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	27
2.7.6 Opakovatelnost měření .....	27
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>28</b> -
3.1 Použité chemikálie .....	28
3.2 Reálné vzorky léčivých přípravků.....	28
3.3 Použité přístroje.....	29
3.4 SIA-LOV aparatura .....	30
3.5 UV/VIS a spektrofluorimetrická detekce .....	31
3.6 Ovládací a měřicí software.....	32
<b>4 Výsledky a diskuze</b> .....	<b>33</b> -
4.1 Volba vhodné vlnové délky pro stanovení losartanu (UV/VIS detekce).....	33

---

4.2 Stanovení losartanu ve statickém uspořádání s UV/VIS detekcí .....	- 35 -
4.2.1 Určení stability roztoku losartanu a iontového asociátu .....	- 35 -
4.2.2 Optimalizace doby extrakce.....	- 37 -
4.2.3 Optimalizace koncentrace párových činidel .....	- 38 -
4.2.4. Optimalizace pH Clark-Lubsova pufru.....	- 39 -
4.2.5 Optimalizace pořadí přidávaných roztoků .....	- 40 -
4.2.6 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu .....	- 41 -
4.3 Stanovení losartanu reakcí s orange II metodou SIA s UV/VIS detekcí .....	- 44 -
4.3.1 Optimalizace pořadí injektovaných zón látek.....	- 45 -
4.3.2 Optimalizace dávkovaných objemů pufru a činidla orange II.....	- 46 -
4.3.3 Vliv průtokové rychlosti chloroformu .....	- 48 -
4.3.4 Optimalizace koncentrace činidla orange II .....	- 51 -
4.3.5 Optimalizace pH Clark-Lubsova pufru.....	- 53 -
4.3.6 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu.....	- 54 -
4.3.8 Stanovení losartanu ve farmaceutických přípravcích .....	- 55 -
4.4 Stanovení losartanu metodou SIA s UV/VIS detekcí s činidlem calmagite .....	- 56 -
4.5 Stanovení losartanu metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí.....	- 56 -
4.5.1 Volba emisní vlnové délky pro stanovení losartanu .....	- 57 -
4.5.2 Optimalizace koncentrace činidla orange II .....	- 58 -
4.5.3 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu.....	- 59 -
4.5.4 Analýza farmaceutických preparátů s losartanem .....	- 60 -
<b>5 Porovnání výsledků .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>6 Závěr .....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>7 Použitá literatura .....</b>	<b>- 65 -</b>

## Seznam zkratk a symbolů

AU	absorbance
CE	kapilární elektroforéza
DPV	diferenční pulzní voltametrie
FIA	injekční průtoková analýza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
If	intenzita emitovaného záření
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
$\lambda_{exc.}$	vlnová délka budícího záření
$\lambda_{ems.}$	vlnová délka luminiscenční emise
$\lambda_{max.}$	vlnová délka maxima
n	počet měření
PEEK	polyether ether keton
s	směrodatná odchylka
SFA	segmentová průtoková analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
SIA-LOV	laboratoř na ventilu
ULTEM	amfoterní termoplastický polyetherimid
UPLC	extrémně účinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast spektra
VIS	viditelná oblast spektra
x	naměřená hodnota
$\bar{x}$	průměr



# 1 Úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu extrakčního stanovení losartanu technikou sekvenční injekční analýzy za využití reakce s činidly orange II a calmagite v kyselém prostředí. Stanovení losartanu v průtokovém uspořádání nebylo doposud v odborné literatuře popsáno. V této práci vycházíme ze statického extrakčně spektrofotometrického stanovení popsaného v literatuře [1]. Losartan je organické léčivo patřící do skupiny sartanů. Jedná se o nejčastěji předepisovanou účinnou látku pro léčbu hypertenze.

Prvním úkolem diplomové práce bylo navrhnout a sestavit extrakční SIA aparaturu a následně sestavit program pro řízení celého procesu analýzy. Dále bylo třeba nalézt optimální podmínky stanovení a dosažené výsledky v průtokovém uspořádání porovnat se statickým uspořádáním. Posledním úkolem práce byla aplikace vypracované metody pro analýzu reálných farmaceutických vzorků.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Průtokové metody

Průtokové metody představují moderní řešení automatických analýz velkého množství vzorků v minimálním čase. Velmi často se uplatňují ve farmaceutickém odvětví, protože se v posledních letech právní předpisy týkající se kontroly jakosti léčivých přípravků v souladu s mezinárodním lékopisem staly přísné a náročné, tudíž farmaceutické analýzy musejí být rychlé, spolehlivé a ekonomické výhodné [2].

Podstata těchto metod spočívá v nadávkování vzorku obsahující analyt do nosného proudu kapaliny. Vzniklá reakční směs proudí přes reakční cívku, kde chemickou reakcí vzniká produkt, který je detekován a následný analytický signál je zpracováván počítačem. Nosným proudem může být konstantní proud činidla, do kterého je injektován vzorek, neboť díky selekčnímu ventilu dochází k vytvoření jednotlivých zón činidel a vzorku.

Skupina průtokových analytických technik umožňuje racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšují produktivitu zejména rutinních stanovení [3]. Také zajišťují větší reprodukovatelnost naměřených výsledků. Díky uzavřenému měřicímu systému je možné pracovat se zdraví škodlivými činidly či analyty bez větších rizik. Tyto metody mají také potenciál pro rozvoj ekologičtějších analytických postupů, které vedou k minimalizaci spotřeby činidel a vzniku odpadů, aniž by tak bránily analytické výkonnosti dané metody [4].

#### 2.1.1 Segmentová průtoková analýza

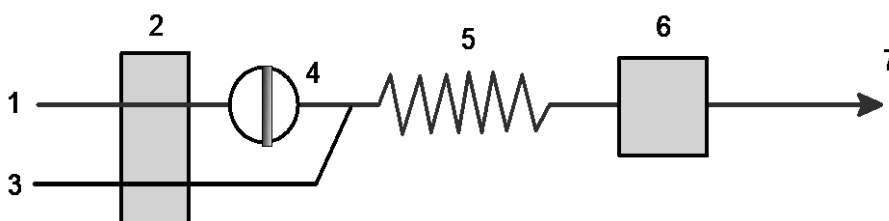
Segmentová průtoková analýza (SFA) byla poprvé popsána v roce 1957 L. Skeggsem a patřila vůbec k prvním průtokovým metodám [5]. Hlavním rysem této analytické techniky je zavedení dostatečně velkého objemu vzorku (až 2 ml) spolu s dalšími činidly do měřicího systému s následnou detekcí, která je prováděna až po dosažení rovnovážného stavu vlastní reakce [6]. Nasávané vzorky jsou segmentovány nejčastěji vzduchem, nicméně může být použit i dusík či olej [7]. Tyto bubliny jsou mezi jednotlivé vzorky zaváděny nejen pro zamezení křížové

kontaminace, ale i s cílem omezit disperzi vzorků a podpořit homogenní promíchání generováním turbulentního proudění uvnitř každého segmentu [7]. Segmentační bubliny musí být před samotnou detekcí odstraněny. Vlastní stlačitelnost vzduchu způsobuje pulzaci toku, což je podstatnou nevýhodou této techniky [8]. Tato metoda byla zaváděna především pro klinické a oceánografické laboratoře.

### 2.1.2 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA) byla první generací průtokových metod, u jejichž zrodu stáli J. Růžička a E. H. Hansen, kteří ji poprvé publikovali v roce 1975 [9]. Rozdíly mezi SFA a FIA jsou poměrně značné. Zatímco u SFA byly pro oddělení jednotlivých analýz využity vzduchové bubliny, u FIA bylo aplikováno časově odstupňované dávkování vzorků. Dále je u FIA užší vedení, které umožňuje laminární proudění kapalin [7]. Se zavedením této technologie také přišlo revoluční pojetí automatizace v chemické analýze tím, že instrumentální měření mohou být prováděny v nepřítomnosti jak fyzické rovnováhy (bez homogenizace vzorku a nosiče/činidla), tak i chemické rovnováhy (bez dokončení reakce) [10]. A to za předpokladu, že je zajištěn reprodukovatelný časový interval mezi nástřikem vzorku a detekcí analytu pro všechny vzorky i standardy.

Ve svém nejjednodušším uspořádání je FIA systém tvořen peristaltickou pumpou, dávkovacím ventilem, reakční cívkou a detektorem, viz obr. 2.1.



Obr. 2.1 Schéma FIA aparatury s dávkováním vzorku do proudu činidla.

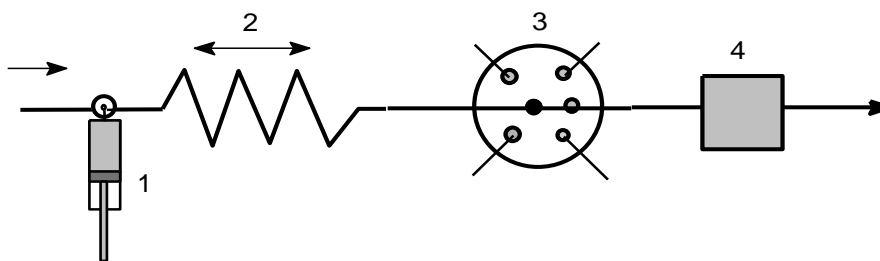
- 1- nosný tok, 2 – pumpa, 3 – činidlo, 4 – vzorek, 5 – reakční cívka,  
6 – detektor, 7 – odpad.

Základním principem FIA je nástřik přesně definovaného objemu vzorku do konstantního proudu činidla. Možnosti dávkování vzorku jsou následující: i) nosný proud je proud činidla a vzorek je injektován přímo do něj, ii) nosným proudem je rozpouštědlo, do kterého je vzorek nadávkován a až poté se přimísí činidlo a iii) nosným proudem je rozpouštědlo a vzorek spolu s činidlem se dávkuje najedou do činidla. Nadávkovaná zóna má v trubici parabolický profil rychlosti. Hlavním disperzním vlivem v této fázi je axiální proudění a radiální proudění v blízkosti stěn vedení [11]. Tím jak je vzorek při průchodu vedením rozmýván v nosném proudu činidel, vytváří se koncentrační gradient. Disperzi vzorku ovlivňují rozměry transportního vedení, objemem nadávkovaného vzorku a průtoková rychlost [12]. Výsledkem analýzy jsou píky; závislost signálu (např. absorbance) na čase jejichž, výška v maximu je mírou analytické koncentrace. Analytický signál, který je zaznamenáván detektorem, je výsledkem dvou procesů probíhajících současně: fyzikální proces (disperze vzorku – tvorba koncentračního gradientu) a chemický proces (vlastní reakce) [13]. Obecně lze tedy říci, že FIA je založena na třech principech: reprodukovatelný nástřik vzorku, řízená disperze zóny vzorku a reprodukovatelné načasování jeho pohybu z injektoru do detekčního systému [7].

### **2.1.3 Sekvenční injekční analýza**

Sekvenční injekční analýza (SIA) byla představena Růžičkou a Marshalllem v roce 1990 [14] jako následující generace ve vývoji průtokové injekční techniky. Principy, na nichž je založena SIA, vycházejí z FIA - řízená dílčí disperze a reprodukovatelná manipulace se vzorkem [15]. Fungování SIA je ovšem založeno na konceptu programovatelného obousměrného toku [3].

Základním SIA systémem se skládá z jednonábového dvousměrného pístového čerpadla, vícecestného selekčního ventilu, mísící cívky, která zároveň slouží i jako pojistka proti vniknutí reakční směsi do čerpadla, a detektoru, viz obr. 2.2 (str. 13). Nezbytnou součástí SIA systému je počítač s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data [3].



Obr. 2.2 Schéma uspořádání aparatury pro SIA.

1 – pístová pumpa, 2 – reakční cívka, 3 – selekční ventil, 4 – detektor

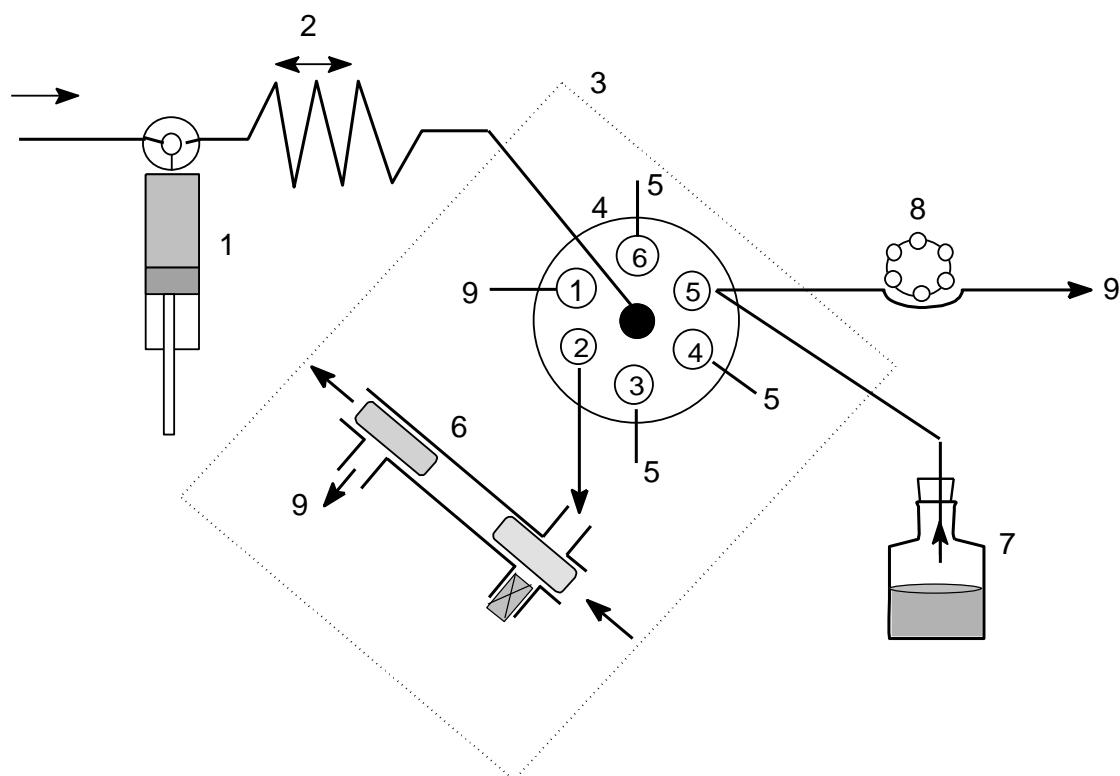
Charakteristickým rysem této techniky jsou oddělené měřicí cykly, kdy jsou nejprve zóny nosného média, vzorku a činidla postupně nadávkovány do jednonábového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístové pumpy, poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru; tím je jeden cyklus ukončen [3]. Pístová pumpa naproti peristaltické pumpě vytváří přesnější a prakticky bez pulzní tok [16, 17]. Podobně jako u FIA získává injektovaná zóna parabolický profil, protože střední proud se pohybuje dvakrát tak rychle, jak je střední rychlost proudění, tím se koncentrační gradient ve vedení rozšiřuje axiálně [12]. Je zde nutná přesná synchronizace naprogramovaných pohybů pístu pumpy s přepínáním pozic selekčního ventilu, aby bylo dosaženo reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu. Zaznamenávaný signál má tvar píku, jehož maximum odpovídá dané analytické koncentraci.

Velkou výhodou SIA je její flexibilita, protože jakoukoliv změnu v experimentálních podmínkách lze provést prostřednictvím klávesnice počítače, aniž je třeba manuálně přestavovat aparaturu. Protože SIA pracuje s malými diskrétními objemy vzorků a činidel jsou jejich spotřeby řádově až 20krát nižší než ve srovnání s FIA, kde jsou jednotlivé roztoky čerpány kontinuálně [3, 18]. Tím, že je zde využíván přímý i zpětný tok, je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt oproti kontinuálnímu toku ve FIA. Jediné výraznější omezení ve vztahu k FIA technice je snížení vzorkovací frekvence o 30-50%. I když toto může být omezující faktor, v obecné rovině výhody SIA techniky převažují nad nevýhodami.

#### 2.1.4 SIA-LOV

Další vývoj klasické sekvenční injekční analýzy představil již v pořadí třetí generaci průtokových metod, a to tzv. laboratoř na ventilu [19]. Předností této metody je především miniaturizace systému a také ponechání možnosti začlenit všechny nezbytné prvky pro využití nejrůznějších analytických aplikací.

K miniaturizaci přispělo především umístění průtokové detekční mikrocely přímo na selekční ventil, tyto dvě části jsou spojeny do jedné monolitické konstrukce z plexiskla, odtud laboratoř na ventilu (lab-on-valve neboli SIA-LOV) [20]. Prostřednictvím jednotky LOV dochází k nasávání činidel a vzorků přes jednotlivé kanálky pomocí čerpadla, které přes mikrofluidní systém přecházejí do detekční mikrocely. Tato cela je vybavena dvěma optickými vlákny. Jedno vlákno je napojeno na externí zdroj světla a druhé na detekční zařízení pro sledování probíhajících reakcí v reálném čase uvnitř cely [21]. Pokud jsou optická vlákna uspořádána proti sobě, lze měřit absorpční, anebo pokud jsou pod úhlem 90° lze měřit fluorescenci [19]. Díky strategickému umístění mikrocely na ventil došlo k výraznému zkrácení vedení a tím klesla spotřeba reakčních činidel a vzorků ve srovnání se SIA technikou. Celá aparatura je zobrazena na obr. 2.3 (str. 15).



Obr. 2.3 Schéma uspořádání SIA-LOV aparatury.

1 – pístová pumpa, 2 – reakční cívka, 3 – LOV jednotka, 4 – dávkovací ventil,  
5 – reagent, 6 – průtoková cela, 7 – roztok vzorku, 8 – peristaltická pumpa, 9 - odpad

## 2.2 Extrakční stanovení v průtokových metodách

Extrakce kapalina-kapalina je nejuniverzálnější a nejvyužívanější technika pro separaci analytu od matrice vzorku. Využívá se vzniku elektroneutrálních komplexů kovů i nekovů, iontových párů nebo solvátů, přičemž stechiometrické složení produktu v organickém rozpouštědle se zpravidla liší od složení analogických produktů ve vodném prostředí [22]. Ačkoliv má extrakce kapalina – kapalina ve statickém uspořádání široké uplatnění, představuje řadu nevýhod; především je to velká spotřeba vzorku a toxických organických rozpouštědel, možná ztráta analytu při samotné manipulaci a nízká frekvence analýz.

Mezi širokou oblast extrakčních technik jsou zařazeny i účinné on-line extrakce kapalina-kapalina, které jsou spojeny s průtokovými metodami [23, 24]. Poprvé byla on-line extrakce s průtokovou analýzou provedena Karlbergem a Thelanderem [25]. Takovéto uspořádání vedlo ke snížení spotřeby činidel a organických rozpouštědel

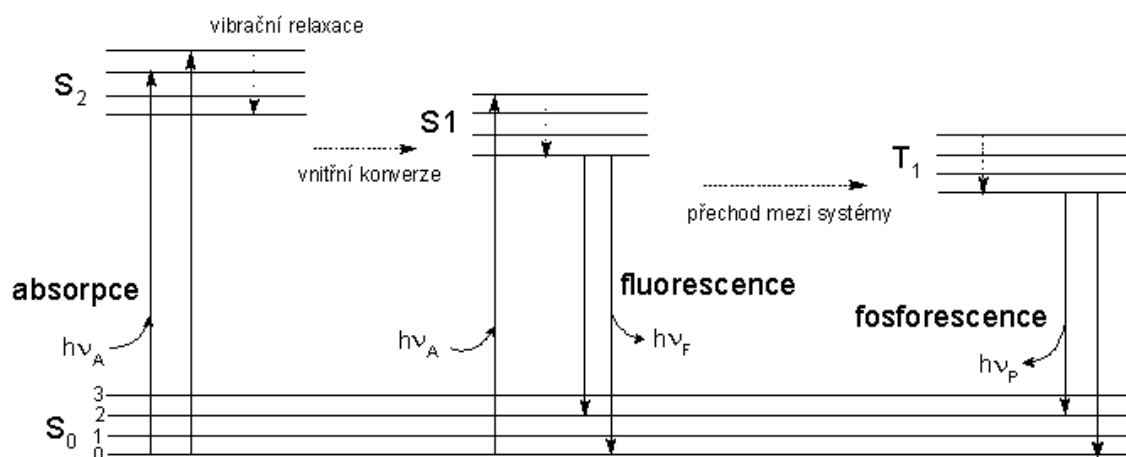
oproti manuálnímu postupu a zamezilo se ztrátám analytu během procesu analýzy. Tím došlo k celkovému zefektivnění celého postupu.

## 2.3 Spektrofluorimetrie

Luminiscence je složitý jev, kde se uplatňují nejrůznější přeměny energie, proto není snadné provést její třídění. Nejstarší dělení fotoluminiscence je na fluorescenci a fosforescenci, a to podle délky dohasínání luminiscenčního záření. Luminiscence je charakterizována pěti veličinami, a to intenzitou, spektrálním složením, koherentními vlastnosti, polarizací a délkou dohasínání. Vzhledem k tomu, že převážná část absorbované energie je nevratně přeměněná na teplo, dochází ke srážkám a z tohoto důvodu je vlnová délka luminiscenční emise větší nebo rovna vlnové délce budícího (excitujícího) záření. Jedná se o tzv. Stokesův zákon, tedy:

$$\lambda_{\text{lum.}} \geq \lambda_{\text{bud.}} \quad (1)$$

Princip fotoluminiscence názorně vysvětluje Jablonského diagram, viz obr 2.4, který představuje obecné schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy.



Obr. 2.4 Jablonského diagram. Upraveno podle [26].



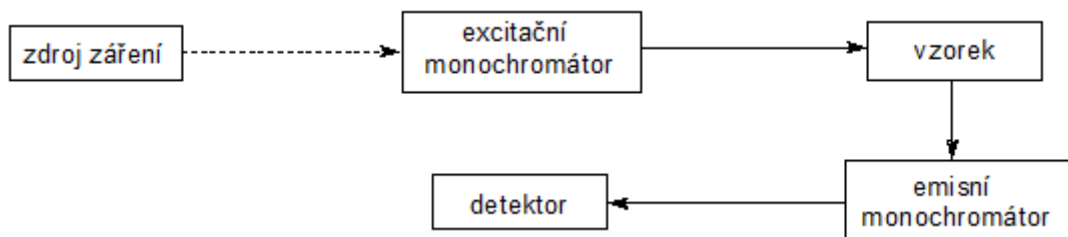
Fluorescence je spinově povolený přechod, protože se jedná o přechody ve stejné multiplicitě. Naopak u fosforescence se jedná o přechody mezi singletovými stavy a tripletovými stavy, tudíž nejsou spinově povoleny. U fluorescence, která je podstatou fluorimetrie, nejprve dochází k tomu, že molekula absorbuje světelné kvanta z budícího zdroje záření a přechází z rovnovážné vibrační hladiny singletového stavu  $S_0$  do vyšších vibračních hladin excitovaného singletového stavu  $S_2$ . Jelikož při tomto procesu nedošlo ke změně stavu multiplicity, absorpce proběhne za  $10^{-15}$  s. Při přechodu do excitovaného stavu získala molekula jak elektronovou excitační energii, tak i vibrační energii. V kondenzované fázi ztrácí velmi rychle nadbytek této vibrační energie jejím rozptýlením na okolní molekuly a přechází do termicky rovnovážného stavu se svým okolím [27]. Tento proces se nazývá vibrační relaxace, probíhá v čase  $10^{-12}$  až  $10^{-13}$  s a vše se děje na v témže singletovém stavu  $S_2$ . Následuje vnitřní konverze, kdy se jedná o intramolekulární přechod mezi dvěma stavy stejné multiplicity, tedy mezi  $S_2$  a  $S_1$ . Až na výjimky nastává fluorescence konjugovaných organických molekul právě z rovnovážného stavu  $S_1$ .

Jak vibrační relaxace, tak vnitřní konverze, potažmo i systémová konverze u fosforescence, jsou nezářivé přechody beze změn energie. Samotná fluorescence je zářivý přechod, který má délku dohasínání  $10^{-8}$  s a přechod je ze stavu  $S_1$  do stavu  $S_0$ .

### 2.3.1 Instrumentace spektrofluorimetrie

Důležitým rysem fluorimetrie je vysoká citlivost a selektivita detekce. Aparatura se skládá z intenzivního zdroje záření, excitačního monochromátoru, kyvety / průtokové cely, emisního monochromátoru a detektoru, viz obr. 2.5 (str. 18). Jako světelný zdroj se nejčastěji používají vysokotlaké xenonové výbojky, poskytující polychromatické záření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Excitační monochromátor vybere budící vlnovou délku záření a tím i velmi ovlivňuje výslednou citlivost stanovení. Kyveta / průtoková cely jsou vyrobeny z křemenného skla. Průběh luminiscence se zjišťuje emisním monochromátorem a k detekci je využíván fotonásobič. Lze měřit jak emisní tak excitační spektra. U emisních spekter je na excitačním monochromátoru nastavena pevná vlnová délka a emisní monochromátor snímá celé spektrum, u měření excitačních spekter je tomu naopak. Aby bylo zachyceno maximální množství fluorescenčního

záření, musí být fotonásobič chráněn před dopadem excitačního záření. V praxi to znamená použití interferenčních filtrů umístěných za měřeným vzorkem a umístěním násobiče kolmo na zdroj záření.



Obr. 2.5 Blokové schéma přístroje pro spektrofluorimetrii.

### 2.3.2 Analytické využití spektrofluorimetrie

Fluorimetrie díky vysoké citlivosti a selektivitě nachází uplatnění v řadě analýz prováděných v praxi. Velmi často je využívána jako detekční technika pro průtokové a separační techniky. Běžně se fluorimetrie využívá pro stanovení nízkých koncentrací širokého spektra fluoreskujících látek či fluoreskujících derivátů látek v matricích jakými jsou např. voda [28], půda [29], vzduch [30], potraviny [31] a biologické vzorky [32]. V bioanalytické chemii se využívá pro měření aktivity enzymů [33]. Pomocí fluorimetrie také lze sledovat vazbu některých ligandů na biopolymery, kdy mluvíme o tzv. fluorescenčních sondách [34]. Využití nachází i na poli imunologie, například při určování rozsahu bakteriální fagocytózy, která hraje důležitou roli při imunitní reakci [35]. Dále se využívá pro stanovení disociačních konstant u vybraných látek [36, 37].

## 2.4 Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti spektra

Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200-800 nm [22]. Metoda je založena na měření absorpce elektromagnetického záření molekulou. Při absorpci dochází k interakci fotonů záření s elektronovým obalem molekuly měřené látky. Podstatné jsou přechody

elektronů mezi energetickými hladinami v elektronovém obalu, tzn. přechod ze základního stavu do excitovaného stavu. Přechod může být uskutečněn z různé rotační a vibrační hladiny základního stavu do různé rotační či vibrační hladiny excitovaného stavu. Elektronové přechody jsou energeticky nejnáročnější, ale nedochází zde ke změně geometrie molekuly, Frank-Condonův princip. Naopak rotační stavy jsou nejméně energeticky náročné, rozdíl energie mezi těmito dvěma stavy může být až několik stovek  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Vzhledem ke kvantování elektronové energie a ke kvantování energie rotačního a vibračního stavu pohybu jader soustavy, čáry molekulových spekter často splývají v pásy. Přechody mezi jednotlivými stavy jsou pro každou molekulu specifické, jsou dány její strukturou a elektronovou konfigurací. U spektrálních pásů látek, jež byly rozpuštěny ve vodném rozpouštědle, zpravidla nelze rozlišit rotační ani vibrační strukturu, protože látky již nejsou izolovány, ale jsou solvatovány rozpouštědlem, vodou, a ta ruší jejich volnou rotaci a ovlivňuje vibraci molekul.

Látky poskytující absorpční spektrum obsahují chromofory, atomová uskupení s různým typem vazeb schopných excitace zářením. Ve většině molekul je současně přítomno více chromoforů; tím je zajištěno i více energetických přechodů. Tento fakt má za následek vzájemné překrývání dílčí pásů. Přechodem nejnáročnějším na energii je přechod z vazebného  $\sigma$  orbitalu do antivazebného molekulového orbitalu  $\sigma^*$ . Látky mající pouze jednoduché vazby absorbují pod 180 nm, a proto jsou vhodnými rozpouštědly pro UV/VIS spektrometrii. Příkladem mohou být nasycené alifatické uhlovodíky. Pro přechod z nevazebných orbitalů  $n$  do  $\sigma^*$  jsou potřeba heteroatomy nesoucí volný elektronový pár – kyslík, chlor mající  $\lambda_{\text{max}}$  pod 200 nm a nebo brom a jod, které mají absorpční maximum nad 200 nm. Čím je více heteroatomů přítomno v molekule, tím je vyšší hodnota absorpčního maxima. Takovéto látky jsou také vhodnými rozpouštědly pro UV/VIS spektrometrii; příkladem může být chloroform. Přechody  $\pi - \pi^*$  jsou charakteristické pro látky obsahující násobné vazby. S rostoucím počtem konjugovaných násobných vazeb roste i  $\lambda_{\text{max}}$ . Pokud je v molekule obsažena násobná vazba v konjugaci s atomem nesoucí elektronový pár, pak se jedná o přechod  $n - \pi^*$ . Energie přechodu je významně ovlivněna typem atomu nesoucím elektronový pár. U dvojice látek, z nichž je jedna donorem elektronu a druhá je akceptorem elektronu, dochází k přenosu náboje, jedná se o tzv. CT (charge-transfer) přechody. Tento přechod je méně energeticky náročný, než přechod jednotlivých složek.

Nejvýhodnějším přechodem z hlediska energie je přechod v ligandovém poli u komplexů kovů. Původně rovnocenné d orbitaly se rozštěpí na tři energeticky výhodné orbitaly  $t_{2g}$  a na dva méně energeticky výhodné orbitaly  $e_g$ .

### 2.4.1 Instrumentace spektrofotometrie v UV/VIS

Spektrofotometrii můžeme získat záznam spekter jak z viditelné, tak ultrafialové oblasti spektra. Přístroje mohou být jednopaprskové či instrumentálně náročnější dvouprskové. Měření monochromatické záření získáváme ze zdroje záření, které následně prochází monochromátorem, kyvetovým prostorem a detektorem. Počítač vyhodnocuje naměřená data. Jako zdroj záření pro UV oblast (180 – 380 nm) se používá nejčastěji deuteriová výbojka, pro VIS oblast (360 – 2200 nm) se používá halogenová výbojka. Xenonovou výbojku můžeme využít jak pro UV tak i pro VIS oblast. Pomocí monochromátoru získáváme monochromatické záření z původního polychromatického. Zde je důležitá volba vstupní a výstupní štěrbin, která nám udává výslednou spektrální čistotu. Měřený vzorek je měřen v kyvetě, která je vyrobena z materiálu (skla/plexiskla pro VIS oblast a křemenu pro UV oblast), který neabsorbuje použité záření. Spolu s výše uvedenými prvky je instrumentace doplněna pomocnou optikou. Pro detekci se využívají nejčastěji fotoelektrické detektory. Schéma jednopaprskového spektrofotometru je na obr. 2.6.



Obr. 2.6 Blokové schéma jednopaprskového spektrofotometru.

- 1 - zdroj záření, 2 - monochromátor, 3 - kyveta s měřeným vzorkem,  
4 - detektor, 5 – počítač

## 2.4.2 Analytické využití UV/VIS spektrofotometrie

Nejširší uplatnění nachází UV/VIS spektrofotometrie v kvantitativní analýze, kde se uplatňuje Lambert-Beerův zákon. Mohou být analyzovány jak jednoduché anorganické látky [38], tak i složité organické struktury, např. farmaceutická léčiva [39, 40] či proteiny [41]. Spektrofotometrie nachází uplatnění také při studiu nanočástic, kde byla stanovována jejich koncentrace a zároveň i jejich velikost [42, 43]. Také lze určit počet navázaných ligandů či asociační konstantu při nekovalentní vazbě ligandů na biopolymery. Dalším možným využitím je zjištění konformačních změn u proteinů.

## 2.5 Spektrometrické stanovení účinných látek v lékových formách

Vzorky pro farmaceutické analýzy se liší svou formou. Jedná se buď o pevné látky (tablety), pasty (masti, krémy) nebo kapaliny (emulze, roztoky). Kromě účinné látky jsou do těchto přípravků přidávány i pomocné látky, jako např. plniva, pojiva, suspenzní činidla či konzervační látky. Proto analytické metody pro stanovení účinných látek musejí být především selektivní, přesné a správné [44]. Jedna z možností analýzy je, že účinné látky jsou měřeny přímo po rozpuštění ve vhodném rozpouštědle, kdy látka poskytuje více či méně složité spektrum. Ovšem tento přístup má své nedostatky vzhledem k přítomnosti pomocných látek, které mohou interferovat; stanovení se tím stává málo citlivé a neselektivní. Druhý přístup analýzy účinné složky je založen na chromogenních reakcích. Tyto reakce jsou založeny na různých principech. Řadíme sem: komplexotvorné reakce, redoxní reakce a reakce založené na vzniku iontových párů.

Při komplexních reakcích vznikají definované stabilní komplexy s ionty kovů, např. Pd (II), Ni (II), Fe (II, III). Schopnost tvořit tyto komplexy závisí především na druhu, počtu a vzájemné poloze donorových atomů v jejich molekule a sterických vlastnostech molekuly [44]. Příkladem komplexní reakce z oblasti farmaceutické analýzy je stanovení bromazepamu s ionty železa (II) v kyselém prostředí, kdy vzniká růžovo – fialový komplex s  $\lambda_{\max}$  585 nm [45].

U redoxních reakcí reagent způsobuje oxidaci či redukci analytu za vzniku

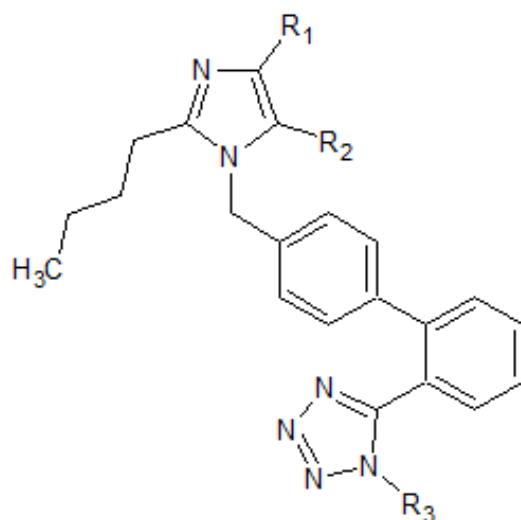
reakčního produktu s rozdílným absorpčním maximem jak od reagentu, tak od analytu. Staden a Tsanwani popisují ve své práci oxidaci paracetamolu hexakynoželezitanem draselným s následnou reakcí s fenolem v přítomnosti amoniaku; vzniklý modrý komplex byl měřen při 630 nm [46].

Vznik iontových párů je založen na reakci bezbarvého (resp. barevného) iontu analytu s barevným (resp. bezbarvým) iontem činidla opačného náboje. Absorbance vzniklého asociátu může být buď měřena v reakčním roztoku, jestliže jeho absorpční maximum je dostatečně vzdálené od absorpčního maxima původních složek asociátu, nebo po extrakci do vhodného nepolárního organického rozpouštědla (nemísitelného s vodou). Do takového rozpouštědla se extrahuje většinou jen nepolární iontový asociát [22]. Reakcí založenou na vzniku iontového páru je například stanovení imipraminu s aniontovým činidlem methylovanž po extrakci do 1,2 dichlorethanu. Vzniklý asociát byl měřen v absorpčním maximu 425 nm [47].

## 2.6 Losartan draselný

Losartan draselný systematickým názvem 2-butyl-4-chloro-1-[p-(O-1H-tetrazol-5-ylfenyl)benzyl]imidazol-5-methanol monodraselná sůl je bílá, krystalická a hygroskopická látka o molekulové hmotnosti  $461 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , která je dobře rozpustná ve vodě a metanolu [48].

Je to synteticky připravený nepeptidový antagonist (typ  $AT_1$ ) receptoru angiotensinu II. Jedná se o aktivní antihypertenzní látku, která se metabolizuje v játrech na aktivní metabolit E-3174, (2n-butyl-4-chloro-1-[(29-(1H-tetrazol-5-yl)bifenyl-4-yl)methyl]imidazol-5karboxylovou kyselinu, a jiné neaktivní metabolity [49-51]. Perorální biologická dostupnost losartanu je 33%; tuto nízkou dostupnost lze přičíst především "first-pass effectu" [52]. Po intravenózním nebo perorálním podání je losartan přeměn na aktivní metabolit ze 14 %.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>Losartan draselný</b>	-Cl	-CH <sub>2</sub> OH	-K
<b>E-3174</b>	-Cl	-COOH	-Cl

Obr. 2.7 Chemická struktura losartanu draselného a jeho metabolitu E-3174.

### 2.6.1 Metody stanovení losartanu

Losartan patří mezi nejčastěji předepisované léčivo na vysoký tlak, proto bylo jeho stanovení aplikováno napříč analytickými metodami vyjma průtokových metod. V českém lékopise je udána jako referenční metoda titrace s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence, kdy se analyt rozpustí v bezvodé kyselině octové a titruje se kyselinou chloristou. V následujícím textu je z vybraných prací vytvořen přehled doposud získaných výsledků ze separačních, spektrofotometrických a voltametrických stanovení losartanu v léčivých tabletách.

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) [53] byl losartan stanovován isokratickou elucí na koloně Supelcosil ODS (250×4,6 mm, 5 μm) se složením mobilní fáze acetonitril:fosfátový pufr (45:55 v/v, pH 3) a průtokem 1,2 ml·min<sup>-1</sup>, detekce byla prováděna v UV oblasti při 227 nm v retenčním čase 5,61 minut.

Extrémně účinnou kapalinovou chromatografií (UPLC) [54] byl analyzován také isokratickou elucí, kde byla použita kolona Zorbax C18 (50 mm x 4,6 mm, 1,8 μm),

mobilní fáze byla směsí vody:acetonitrilu:triethylaminu:kyseliny fosforečné (60:40:0,1:0,1 v/v) s průtokem  $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , retenční čas byl 2,3 min a analyt byl detekován při 227 nm.

U kapilární elektroforézy (CE) [55] byla použita křemenná nepokrytá kapilára o celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm s vnitřním průměrem  $50 \mu\text{m}$ , napětí bylo 15 kV a teplota  $25^\circ\text{C}$ . Kapilára byla naplněna boritanem sodným o pH 9 obsahující 6 mM trimethyl- $\beta$ -cyklodextrin. Absorpce losartanu byla měřena v UV oblasti při jejím maximu 200 nm.

Další metodou stanovení byla derivační spektrofotometrie [56], kdy účinná látka byla měřena v jednocentimetrové křemenné kyvetě. První derivace spektra byla prováděna při 232,5 nm. Ke stanovované látce nebylo přidáváno žádné reakční činidlo, bylo měřeno její nativní spektrum.

Také bylo vypracováno jednoduché kolorimetrické stanovení s orange II s následnou extrakcí iontového asociátu do chloroformu, absorpční maximum reakčního produktu bylo při 486 nm [1].

Z voltametrických stanovení byl losartan stanovován diferenční pulzní voltmetrií (DPV) [57] s tříelektrodovým zapojením, s dopovanou diamantovou elektrodou (měřicí), argent-chloridovou elektrodou (pracovní) a platinovým drátkem (pomocná). Jako základní elektrolyt byl použit Britton-Robinsonův pufr o pH 9,5 (kyselina fosforečná, octová a boritá spolu s hydroxidem sodným) s amplitudou pulsu 50 mV.

Přehled získaných lineárních rozsahů koncentrací, limitů detekcí a kvantifikace je zobrazen v tabulce 2.1 (str. 25).



Tab. 2.1 Přehled základních analytických charakteristik stanovení losartanu publikovanými analytickými metodami.

	<b>Lineární rozsah</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
<b>RP-HPC [53]</b>	1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,029 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,078 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<b>UPLC [54]</b>	25–75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$		
<b>CE [55]</b>	0,16–0,48 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,032 ng	0,096 ng
<b>Derivační spektrometrie [56]</b>	2–50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<b>Spektrofotometrie [1]</b>	10–100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$		
<b>DPV [57]</b>	1,3 - 31,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	

## 2.7 Zpracování dat

### 2.7.1 Měření

Měření je proces experimentálního získávání jedné nebo více hodnot veličiny, které mohou být důvodně přiřazeny veličině [58]. Obsahuje v sobě porovnání hodnot a také zjišťování počtu entit. Měření zároveň popisuje podmínky měřícího postupu a kalibrovaného měřícího systému.

### 2.7.2 Popisné charakteristiky statistického souboru

Jednou ze základních charakteristik vlastností základního souboru naměřených dat je parametr udávající informaci o středu souboru, tedy střední hodnota (např. aritmetický průměr, medián, modus a geometrický průměr). K těmto základním parametrům patří důležité indikátory udávající rozptýlení hodnot měřené veličiny kolem středu souboru. Tyto statistické charakteristiky se nazývají míra variability (např. variační rozptyl, rozptyl, směrodatná odchylka a variační koeficient).

V této práci byl pro vyhodnocení naměřených dat použit jako střední hodnota medián a pro vyjádření míry variability byla použita směrodatná odchylka.

Medián je definován jako střední hodnota variační řady v případě lichého počtu výsledků. V případě sudého počtu výsledků je medián aritmetickým průměrem dvou prostředních hodnot. Medián je vydatnějším odhadem střední hodnoty pro malý počet měření, protože eliminuje vliv odlehlého pozorování na střední hodnotu.

Odhad směrodatné odchylky  $s$  charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou vyskytnout výsledky opakovaných měření v mezích náhodné chyby.

$$s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n}} \quad (2)$$

Každá hodnota byla měřena nejméně třikrát.

### 2.7.3 Kalibrace

Kalibrace je postup, kterým vytváříme matematický popis závislosti mezi měřenou veličinou označovanou jako odezva nebo signál a jinou veličinou určující vlastnost měřeného systému [59]. Nalezená závislost se následně využívá pro odhad neznámých hodnot vlastnosti ze změřených hodnot signálu. Vždy se provádí pomocí standardů se známým obsahem analytu nebo pomocí referenčního materiálu se známým celkovým složením [60]. Zjištěná kalibrační závislost  $y = f(x)$ , resp.  $S = f(c)$ , může mít obecný průběh, výhodné jsou však závislosti lineární  $y = a(x) + b$ , protože pouze v nich je citlivost stanovení nezávislá na koncentraci analytu [62]. Směrnice přímky  $b$  charakterizuje již zmiňovanou citlivost, která vyjadřuje podíl změny odezvy měřicího systému na odpovídající změny hodnoty veličiny, která je měřena [58].

### 2.7.4 Šum

Šum je signál bez žádaného informačního obsahu. Pokud osciluje kolem základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou. Ovlivňuje jak správnost měření, tak i následně stanovení meze detekce. Jestliže je suma šumu nulová v časovém intervalu našeho pozorování, jedná se o bílý šum. Šum, jehož suma je nenulová, je šumem náhodným. Poslední typem šumu je drift, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování.

### **2.7.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti**

Mez detekce (LOD) daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno (s přijatelnou statistickou jistotou).

Mez stanovitelnosti (LOQ) vyjadřuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a pro kterou byla metoda validována (odpovídá zpravidla nejnižšímu bodu kalibrační křivky).

Podle uzance se v optických metodách mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek směrodatné odchylky slepého vzorku a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky slepého vzorku.

### **2.7.6 Opakovatelnost měření**

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření. Podmínka opakovatelnosti měření zahrnuje stejný postup (metoda) měření, stejného pracovníka, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky, stejné místo a opakování měření v krátkém časovém úseku. Opakovatelnost je vlastností metody ne výsledku.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a. pokud není uvedeno jinak. Roztoky látek byly připravovány v deionizované vodě ( $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ze zařízení MilliQPLUS (Millipore, USA).

Zásobní roztok losartanu byl připraven ze standardní látky losartanu draselného (deklarovaný obsah čisté látky  $\geq 99,5 \%$ ,  $M_r = 461,0$ , Sigma-Aldrich, USA).

Jako činidlo pro tvorbu iontového asociátu s losartanem bylo použito barvivo orange II, sodná sůl 4-(2-hydroxy-1-naftylazo)benzensulfonové kyseliny (deklarovaný obsah čisté látky  $\geq 85 \%$ ,  $M_r = 350,32$ , Sigma-Aldrich, USA) a nebo calmagite, 3-hydroxy-4-(2-hydroxy-5-methylfenylazo) naftalen-1-sulfonové kyseliny (obsah čisté látky není výrobcem udán,  $M_r = 507,56$ , Sigma-Aldrich, USA).

Pro úpravu pH prostředí reakční směsi byl použit Clark-Lubsův pufr [63, 64] složený z kyseliny chlorovodíkové (37%, Sigma-Aldrich, USA) a chloridu draselného (Lachema, ČR).

Jako extrakční činidlo byl použit chloroform obsahující 100-200 ppm 2-methyl-2-butenu, amylen, (deklarovaná obsah čisté látky  $\geq 99,5 \%$ ,  $M_r = 119,38$ , Sigma-Aldrich, USA).

Pro vysušení chloroformu byla použita molekulová síta o velikosti pórů 4A, peletky 3,2 mm (Sigma Aldrich, USA).

### 3.2 Reálné vzorky léčivých přípravků

Všechny reálné vzorky byly ve formě tvrdých lékových potahovaných tablet. Tablety byly zváženy, rozdrceny a příslušný podíl byl rozpuštěn v deionizované vodě. Takto připravené roztoky byly dále 20 min sonikovány pro úplné převedení účinné látky do roztoku. Roztoky byly následně filtrovány přes filtrační papír (KA4, Filab, ČR), převedeny do odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Pro další měření byly takto připravené roztoky dále ředěny.

Lorista 50, jedna potahovaná tableta obsahuje 50 mg účinné látky (č. šarže G02003, Krka, Slovinsko). Použitelné do ledna roku 2018.

Lozap 50, jedna potahovaná tableta obsahuje 50 mg účinné látky (č. šarže 2840612, Zentiva, Slovenská republika). Použitelné do května roku 2014.

Losartan Stada 50, jedna potahovaná tableta obsahuje 50 mg účinné látky (č. šarže 31740, Stada Arzneimittel AG, Německo). Použitelné do dubna roku 2016.

Losartam Teva 50, jedna potahovaná tableta obsahuje 50 mg účinné látky (č. šarže 0490110, Teva, Slovenská republika). Použitelné do ledna roku 2013. Vzhledem k propadlé době použitelnosti mohou analýzy prokazovat nižší obsah účinné látky.

Léčivé přípravky obsahovaly losartan a aditiva (monohydrát laktosy, mikroskopická celulóza, přebobtnalý kukuřičný škrob, magnesium stearát, hydrolyzovaný polyvinilalkohol, oxid titaničitý, oxid křemičitý, makrogol a mastek).

### **3.3 Použité přístroje**

Úpravy pH roztoků byly prováděny pomocí pH metru Adwa AD 1000 (Adwa, Maďarsko) vybaveného kombinovanou skleněnou elektrodou.

Ultrazvuková lázeň E 30 H Elamsonic (Elma, P-Lab a.s.) byla využívána k rozpouštění látek v roztocích a k odplynění připravených roztoků.

Statická měření experimentální části této práce, stabilita roztoku standardu a spektra jednotlivých látek byla měřena na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, USA) s křemennou kyvetou s tloušťkou absorpční vrstvy 1,0 cm.

Fluorescenční spektra chloroformu, iontového asociátu a standardu losartanu byla měřena na spektrofluorimetru Aminco AB2 firmy Thermo Spectronic, USA.

Pro odčerpávání chloroformu ze separátoru fází v průtokovém uspořádání stanovení bylo použito externí pomocné peristaltické čerpadlo Ismatec Reglo Y.O.78017-20 (Cole-Parmer, USA).

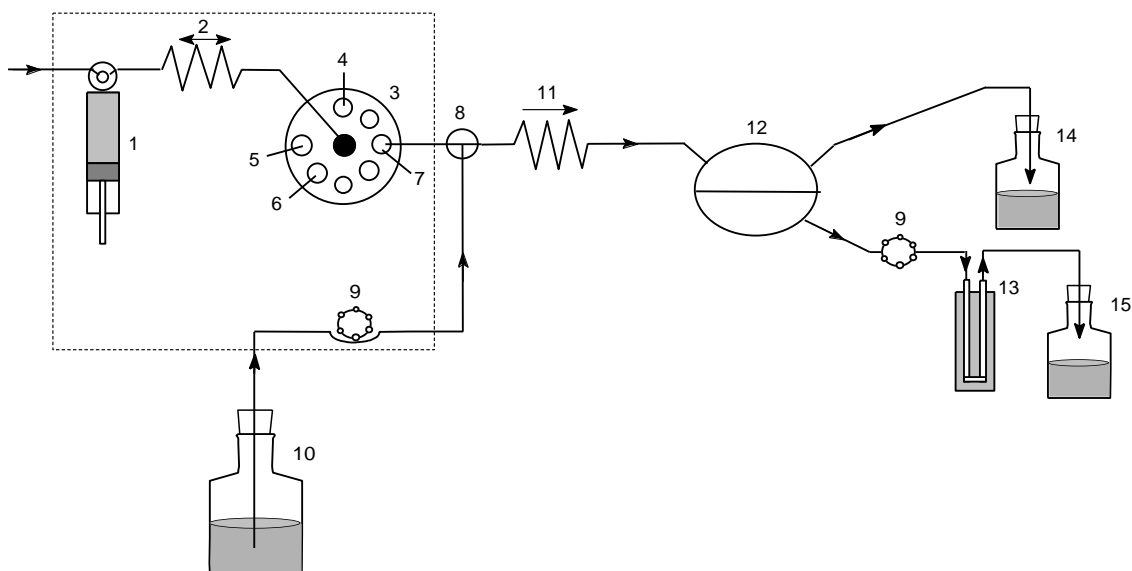
### 3.4 SIA-LOV aparatura

Aparatura pro SIA-LOV analýzu (viz obr. 3.1, str. 31) pro stanovení losartanu byla tvořena vlastním SIA-LOV přístrojem FIALab 3500 (FIALab Instruments Inc, USA), který je tvořen pístovým čerpadlem (1 ml), sekvenčním ventilem s LOV jednotkou, zadržovací cívkou (1 ml) a peristaltickou pumpou (označení v dalším textu jako SIA pumpa). Na LOV jednotku byl dále napojen přes spojovací materiál T-segmentor, kterým byl přiváděn chloroform do proudu vodné fáze. Extrakce iontového asociátu probíhala v extrakční cívce (po optimalizaci jejího objemu byla vybrána cívka s vnitřním objemem 150  $\mu$ l). V separátoru fází (laboratorní konstrukce) [65] byla následně chloroformová a vodná fáze oddělena. Účinnost oddělení organické fáze od vodné fáze byla podpořena zpětným odčerpáváním chloroformové fáze z prostoru za separátorem fází do odpadu. K tomu byla použita stejná peristaltická pumpa, která byla použita k čerpání čistého chloroformu do T-segmentoru. Měřená chloroformová fáze s reakčním produktem byla detekována v průtokové cele s UV/VIS detekcí nebo s fluorimetrickou detekcí. Vodná fáze odtékala ze separátoru samovolně do odpadu.

Jednotka LOV byla vyrobena z materiálu ULTEM (amorfní termoplastický polyetherimid); tento materiál není obecně kompatibilní s organickými rozpouštědly, tudíž ani s používaným chloroformem. Z tohoto důvodu musela být extrakce chloroformem a následná detekce extrahovaného produktu v chloroformu prováděna mimo tuto jednotku, aby nedošlo k jejímu poškození.

Separátor fází byl vyroben ze dvou teflonových částí, ve kterých byly vyfrézovány drážky pro průtok kapalin. Mezi těmito dvěma částmi separátoru byla vložena zpevněná polytetrafluorethylenová membrána s póry o definované velikosti 47  $\mu$ m (Cole-Parmer, USA).

Pro čerpání a odčerpávání chloroformu byly použity čerpací hadičky z materiálu Viton (Cole-Parmer, USA) o vnitřním průměru 0,56 a 0,35 mm. Segmentor byl vyroben z poly(ether ether ketonu) (PEEK) a ostatní spojovací materiál včetně cívek byl vyroben z teflonu.



Obr. 3.1 Schéma aparatury SIA-LOV pro extrakční stanovení losartanu.

- 1 – pístové čerpadlo, 2 – reakční/zadržovací cívka, 3 – LOV jednotka, 4 – pufr,  
 5 – činidlo, 6 – vzorek, 7 – výstup, 8 – T-segmentor, 9 – peristaltické čerpadlo,  
 10 – chloroform, 11 – reakční cívka, 12 – separátor fází, 13 – průtoková cela/detektor,  
 14 – odpad vodná fáze, 15 – odpad chloroformová fáze

### 3.5 UV/VIS a spektrofluorimetrická detekce

Veškeré optické prvky spojené s UV/VIS detekcí byly od firmy Ocean Optics, USA. Externí zdroj záření, typ DT-MINI-2-GS s deuteriovou a halogenovou výbojkou. Průtoková cela s tloušťkou absorpční vrstvy 10 mm a vnitřním objemem 30  $\mu\text{l}$ . Jako detektor byl použit spektrometr HR4000. Zdroj záření a detektor byl propojen s držákem absorpční průtokové kyvety pomocí dvou optických vláken (křemen, délka 0,5 m, průměr optického vlákna 600  $\mu\text{m}$ ).

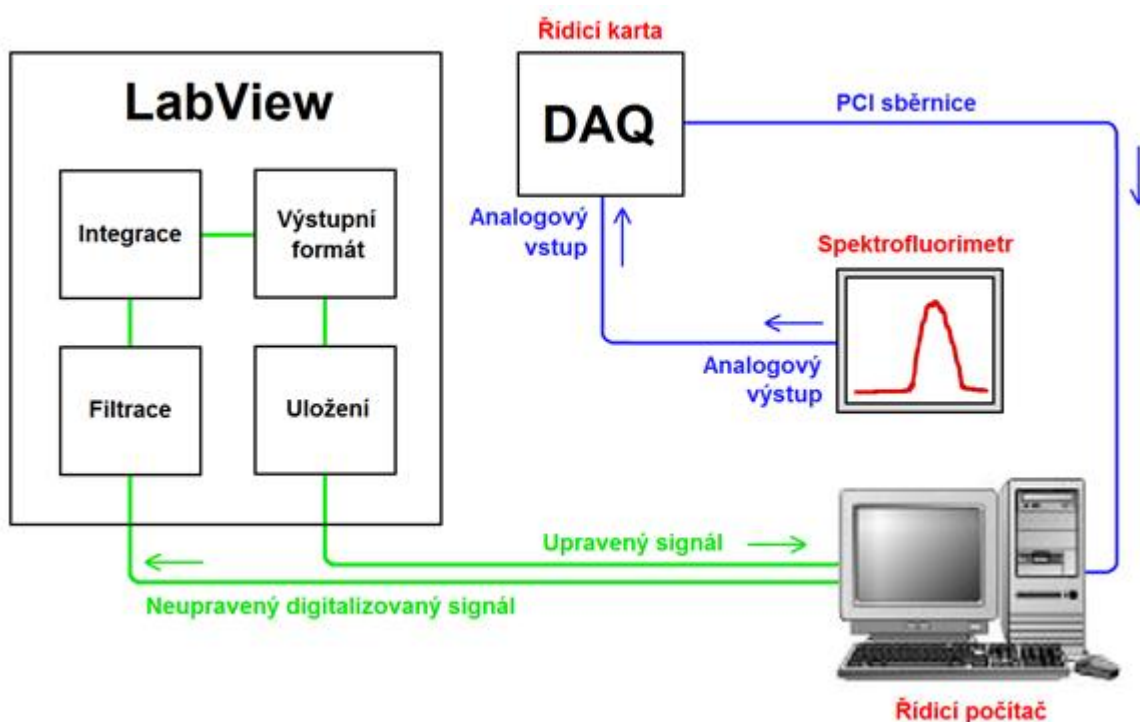
Pro spektrofluorimetrickou detekci byl používán průtokový fluorimetrický detektor Hitachi F-1050 (Hitachi, Japan) s fluorimetrickou průtokovou kyvetou s vnitřním objemem 10  $\mu\text{l}$ .

### 3.6 Ovládací a měřící software

Pro řízení SIA-LOV aparatury ve spojení se spektrofotometrickou detekcí byl používán software vytvořený přímo v programovacím jazyku přístroje FIALab 3500. Tento software zároveň umožňoval řídit připojený spektrometr HR4000 a sbírat z něj naměřená data.

Signál ze spektrofluorimetrického detektoru (analogový výstup pro připojení integrátoru, max. 1,0 V) byl přiveden na převodníkovou kartu NI 6036E (National Instruments, USA) a byl dále zpracován v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1. (National Instruments, USA). Blokové schéma činnosti programu je zobrazeno na obr. 3.6.

Pro zpracování naměřených výsledků z obou detektorů byl používán program Microcal Origin 6.1 (Microcal Software Inc., USA). Pro zpracování dílčích dat byl používán Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Dále pro tvorbu vlastní práce byl využíván textový editor Microsoft Word 2007 (Microsoft Corporation, USA) a ChemSketch (ACD/Labs).



Obr. 3.2 Schéma zpracování výstupních dat z spektrofluorimetru softwarem LabView.

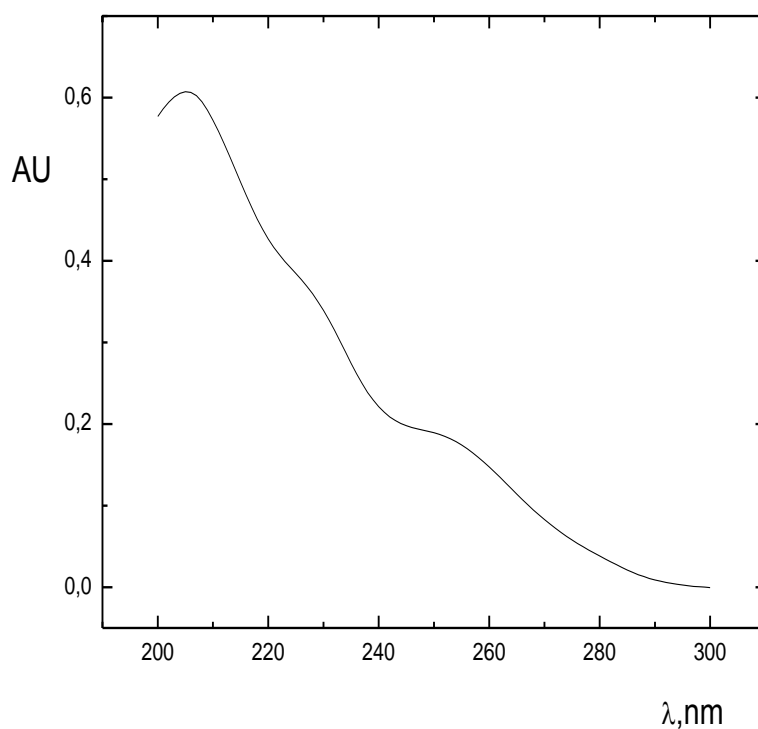


## 4 Výsledky a diskuze

Převedení statické extrakční metody stanovení losartanu v léčivých přípravcích do průtokového uspořádání předcházelo její ověření s UV/VIS detekcí podle původní práce [1].

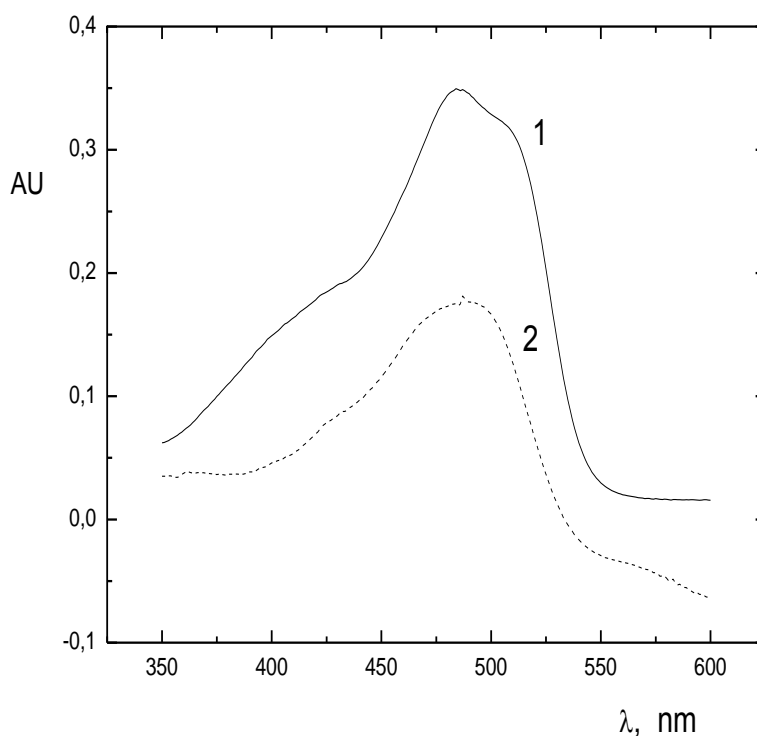
### 4.1 Volba vhodné vlnové délky pro stanovení losartanu (UV/VIS detekce)

Absorpce roztoku obsahujícího losartan draselný o koncentraci  $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla proměřena v UV oblasti spektra v rozsahu 200 – 300 nm (obr. 4.1). Vzhledem k nevýrazným absorpčním pásům čisté látky jak v UV tak i ve VIS oblasti spektra je vhodné ji převést na barevný reakční produkt s měřitelným maximem.



Obr. 4.1 Ultrafialové spektrum losartanu draselného ( $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ve vodném roztoku.

Ke stanovení losartanu v tvrdých lékových formách tablet bylo použito extrakční stanovení založené na vzniku iontového asociátu losartanu s barvivem (orange II, calmagite) v kyselém prostředí. Organickou složku extrakce tvořil chloroform. Vznikající oranžový a oranžovo-červený reakční produkt měl jedno absorpční maximum při 486 nm (orange II) a 490 nm (calmagite). Záznam spekter příslušných iontových párů je zobrazen na obr. 4.2.



Obr 4.2 Absorpční spektra iontových párů losartanu s orange II (1) a calmagite (2) v chloroformové fázi.

$$c_{\text{losartanu}} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, c_{\text{čínidla}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{čínidla}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

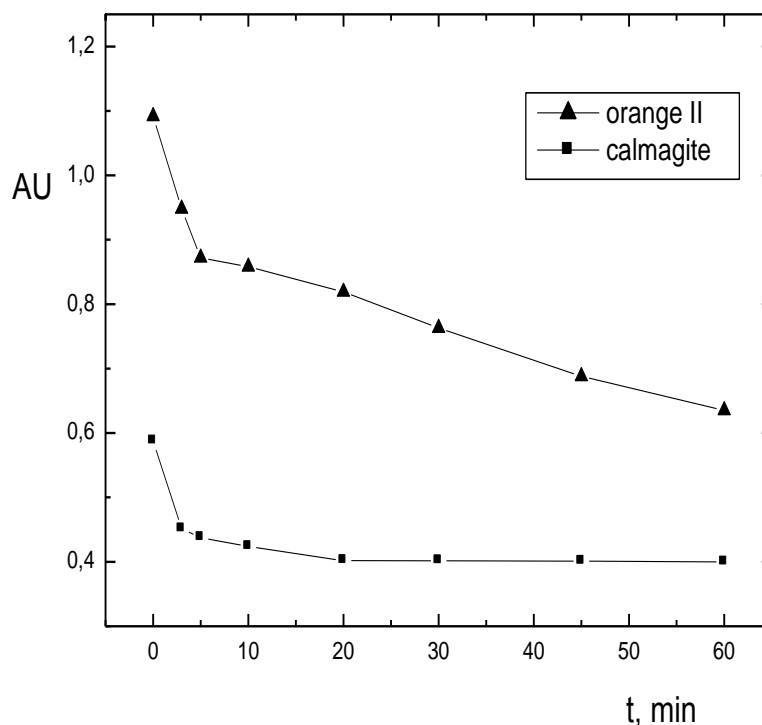
$$t_{\text{extrakce}} = 5 \text{ min, pořadí přidávaných látek: pufr, lék, barvivo}$$

## **4.2 Stanovení losartanu ve statickém uspořádání s UV/VIS detekcí**

### **4.2.1 Určení stability roztoku losartanu a iontového asociátu**

Stabilita roztoku losartanu o koncentraci  $230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla měřena v den přípravy a následně jedenkrát týdně po dobu jednoho měsíce. V tomto časovém rozmezí nebyly pozorovány žádné významné změny na proměřených spektrech; proto se dá roztok považovat za stabilní minimálně po dobu jednoho měsíce.

Dále byla studována stabilita vzniklého iontového asociátu. Provedení extrakce bylo vyzkoušeno několika postupy. V prvním případě nebyl použit vysušený chloroform. V tomto případě se vzniklý iontový asociát okamžitě po extrakci rozpadal. Ve druhém případě bylo experimentálně vyzkoušeno vysušení chloroformové fáze síranem sodným. Tento postup se také neosvědčil, protože docházelo k adsorpci vzniklého iontového asociátu na samotný síran a tím se výrazně snížila citlivost stanovení. V třetím případě byl pro extrakci použit chloroform vysušený molekulovými síty. Stability iontových asociátů po extrakci s vysušeným chloroformem jsou zobrazeny na obr. 4.3 (str. 36). Stability byly měřeny po dobu 1 hodiny v maximech absorpčních pásů, tj. 486 nm pro orange II a 490 nm pro calmagite.



Obr. 4.3 Stabilita extrahovaných iontových asociátů losartanu s orange II

a s calmagite v chloroformu sušeném molekulovými síty.

$c_{\text{losartanu}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $c_{\text{čínidla}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $\text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$

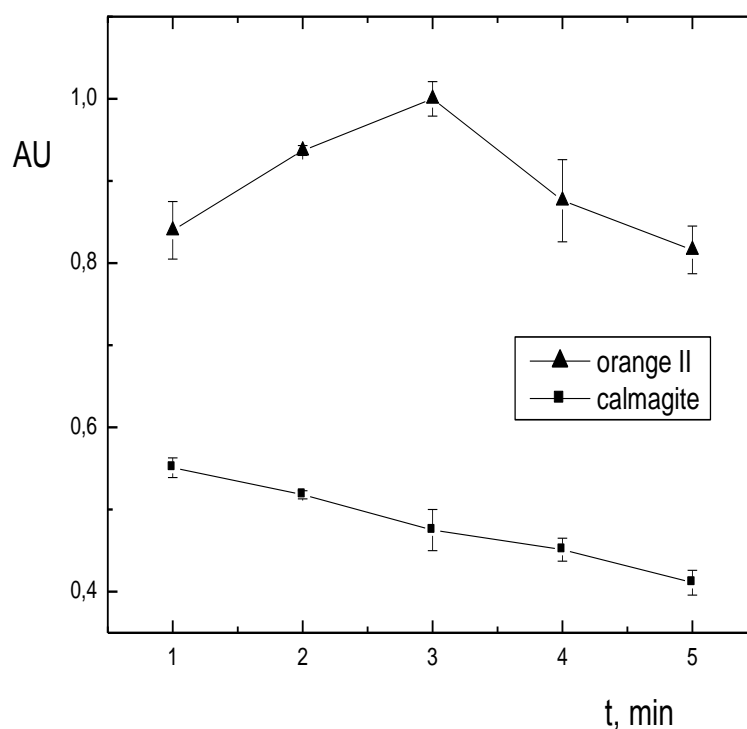
$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}$ ,  $V_{\text{čínidla}} = 1 \text{ ml}$ ,  $V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}$ ,  $V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$

$t_{\text{extrakce}} = 5 \text{ min}$ , pořadí přidávaných látek: pufr, lék, barvivo

Z grafu je patrné, že v případě iontového asociátu s orange II je stabilita obecně špatná a k největšímu rozpadu asociátu dochází v prvních 5 minutách od počátku extrakce. Po páté minutě je rozpad již pomalejší. V případě iontového asociátu s calmagite je extrahovaný iontový asociát stabilní po 20. minutě od začátku extrakce. Vzhledem k časové náročnosti byl nakonec pro další měření zvolen čas 5 minut. Vysušení chloroformu nejspíše napomohlo k vyšší stabilitě vzniklého iontového asociátu po extrakci. Proto další měření bylo prováděno v páté minutě po extrakci s vysušeným chloroformem molekulovými síty.

#### 4.2.2 Optimalizace doby extrakce

Prvním optimalizovaným parametrem byla doba extrakce potřebná k zajištění účinné extrakce vzniklého iontového asociátu. Doba byla experimentálně zjišťována v rozsahu 1 – 5 minut po jedné minutě. Průběh naměřené závislosti je zobrazen na obr. 4.4.



Obr. 4.4 Závislost signálu iontového asociátu na době extrakce.

$$c_{\text{losartanu}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, c_{\text{čínidla}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

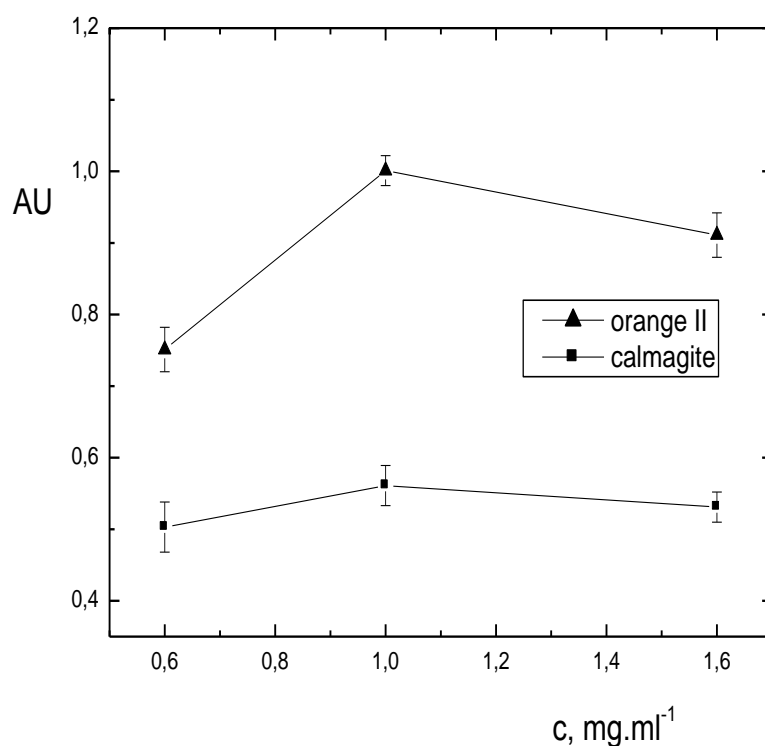
$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{čínidla}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

pořadí přidávaných látek: pufr, lék, barvivo

Z grafu je patrné, že v případě iontového asociátu losartanu s orange II bylo dosaženo nejvyššího signálu při tříminutové extrakci. To, že při delší době extrakce doházelo k poklesu signálu je důsledkem následného rozpadu asociátu. Iontový asociát s calmagite poskytl nejvyšší odezvu po jednodominutové extrakci.

### 4.2.3 Optimalizace koncentrace párových činidel

Pro tyto experimenty byly vybrány koncentrace činidel od  $0,06 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  do  $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Naměřené hodnoty absorbancí pro jednotlivé koncentrace jsou zobrazeny na obr. 4.5. Na optimalizačním grafu jednotlivých párových činidel lze pozorovat společný trend průběhu signálu v celém sledovaném koncentračním rozsahu. Se zvyšující se koncentrací barviva do  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  roste signál výsledné absorbance, kdy tato koncentrace byla zvolena jako optimální.



### 4.5 Závislost signálu iontového asociátu na koncentraci barviva.

$$c_{\text{losartanu}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

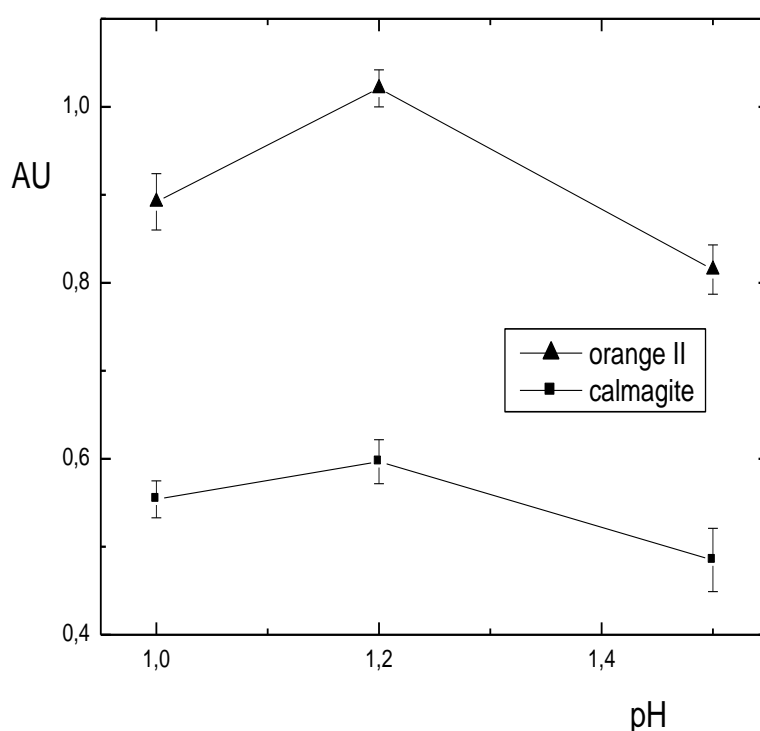
$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{činidla}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

$$t_{\text{extrakce ORANGE II}} = 3 \text{ min}, t_{\text{extrakce CALMAGITE}} = 1 \text{ min}$$

pořadí přidávaných látek: pufr, lék, barvivo

#### 4.2.4. Optimalizace pH Clark-Lubsova pufru

Tetrazolový kruh ( $pK_a \sim 5$ ) v molekule losartanu je zodpovědný za kyselý charakter léku ( $pK_a_{\text{LOSARTANU}} \sim 3,15$ ). Proto je zřejmé, že jeho stanovení by mělo být uskutečňováno v kyselém prostředí pro dosažení vysoké citlivosti stanovení. Z toho důvodu také optimalizace nebyla prováděna v širokém rozsahu pH až do zásaditého prostředí, ale pouze v rozmezí pH 1 – 1,6 s krokem 0,2; viz obr. 4.6. Jako optimální hodnota pH Clark-Lubsova pufru bylo stanoveno  $pH = 1,2$  pro obě činidla.



4.6 Závislost signálu na pH Clark-Lubsova pufru.

$$c_{\text{losartanu}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, c_{\text{činidlo}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$$

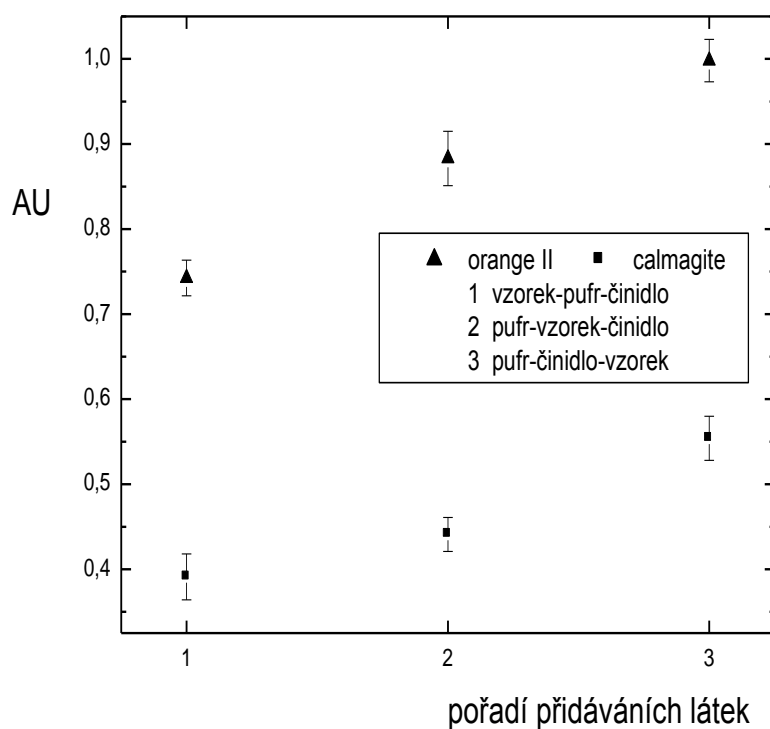
$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{činidla}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

$$t_{\text{extrakce ORANGE II}} = 3 \text{ min}, t_{\text{extrakce CALMAGITE}} = 1 \text{ min}$$

pořadí přidávaných látek: pufr, lék, barvivo

#### 4.2.5 Optimalizace pořadí přidávaných roztoků

Posledním krokem optimalizace statického stanovení bylo určení správného pořadí přidávaných reagentů do reakční směsi. Bylo testováno následující pořadí: i) vzorek, pufr a činidlo; ii) pufr, vzorek a činidlo a iii) pufr, činidlo a vzorek. Po každém přidání jedné látky byla směs promíchána a až poté byl přidán další roztok. Výsledky experimentu jsou uvedeny na obr. 4.7.



Obr. 4.7 Závislost signálu iontového asociátu na pořadí přidávaných roztoků.

$$c_{\text{losartanu}} = 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{činidla}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

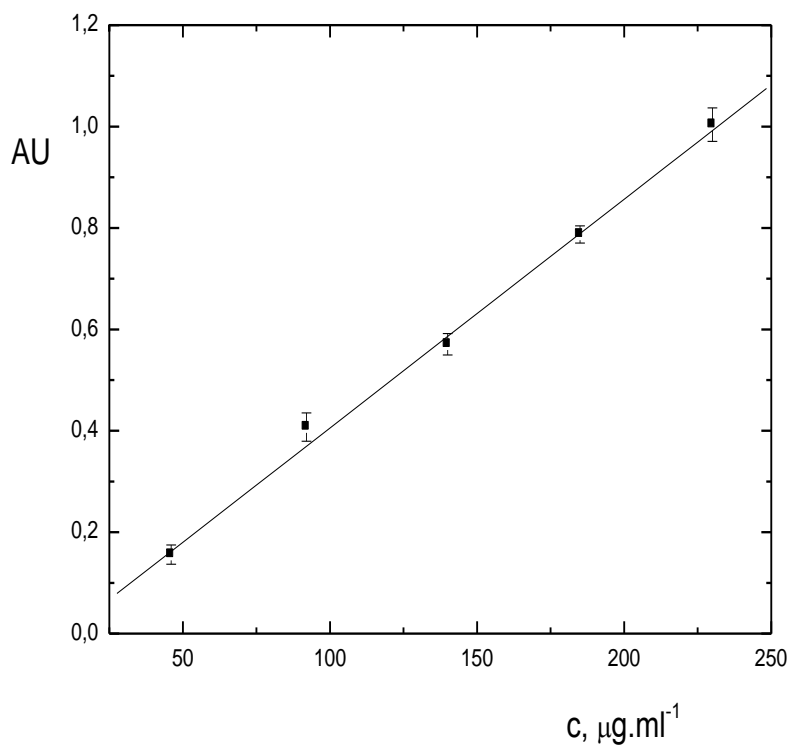
$$t_{\text{extrakce ORANGE II}} = 3 \text{ min}, t_{\text{extrakce CALMAGITE}} = 1 \text{ min}$$

Z experimentálního měření bylo určeno jako nejvhodnější pořadí pro obě reakce, pořadí pufr, činidlo a jako poslední vzorek. V tomto případě bylo dosaženo nejvyšší odezvy signálu.



#### 4.2.6 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu

Za nalezených optimálních experimentálních podmínek byla pro stanovení losartanu proměřena kalibrační závislost v rozsahu  $45 - 230 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s orange II a  $45 - 320 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s calmagite. Příslušné kalibrační závislosti jsou uvedeny na obr. č. 4.8 a na obr. č. 4.9 (str. 42). Dále byly zjištěny základní charakteristiky stanovení pro obě činidla. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.1 (str. 42) a 4.2 (str. 43).



Obr. 4.8 Kalibrační závislost extrakčního stanovení losartanu s činidlem orange II při  $\lambda_{\text{max}} 486 \text{ nm}$ .

$$c_{\text{orange II}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

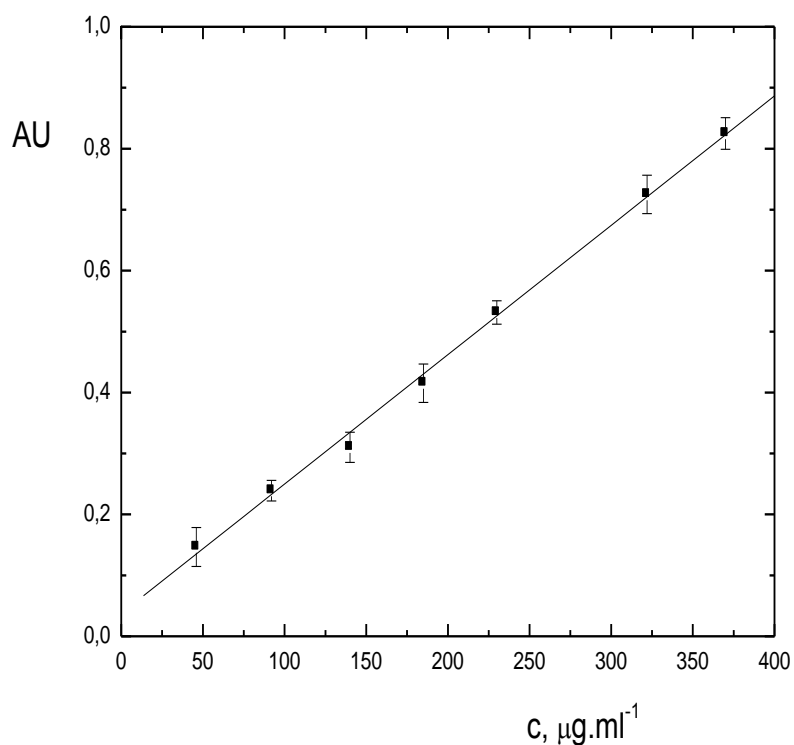
$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{orange II}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

$$t_{\text{extrakce}} = 3 \text{ min}, \text{pořadí přidávaných látek: pufr, činidlo, lék}$$

Tab. 4.1 Základní charakteristiky stanovení losartanu s činidlem orange II  
při  $\lambda$  486 nm.

	AU
citlivost [ $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]	0,045
opakovatelnost ( $180 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) [%]	5,5 %
absolutní LOD [ $\mu\text{g}$ ] *	1,1
relativní LOD [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	7,3
absolutní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] *	3,6
relativní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	24,4
R	0,9985
LDR do [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	45 – 230

\* bylo dávkováno 150  $\mu\text{l}$



Obr. 4.9 Kalibrační závislost extrakčního stanovení losartanu  
s barvivem calmagite při  $\lambda_{\text{max}}$  490 nm.

$$c_{\text{calmagite}} = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1,2$$

$$V_{\text{losartanu}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{calmagite}} = 1 \text{ ml}, V_{\text{pufru}} = 2 \text{ ml}, V_{\text{chloroformu}} = 6 \text{ ml}$$

$$t_{\text{extrakce}} = 1 \text{ min, pořadí přidávaných látek: pufr, činidlo, lék}$$

Tab. 4.2 Základní charakteristiky stanovení losartanu s činidlem calmagite  
při  $\lambda = 490$  nm.

	AU
citlivost [ $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]	0,021
opakovatelnost ( $230 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) [%]	4,7
absolutní LOD [ $\mu\text{g}$ ]*	2,1
relativní LOD [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	13,8
absolutní LOQ [ $\mu\text{g}$ ]*	6,9
relativní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	46,0
R	0,9986
LDR [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	45 – 370

\* bylo dávkováno 150  $\mu\text{l}$

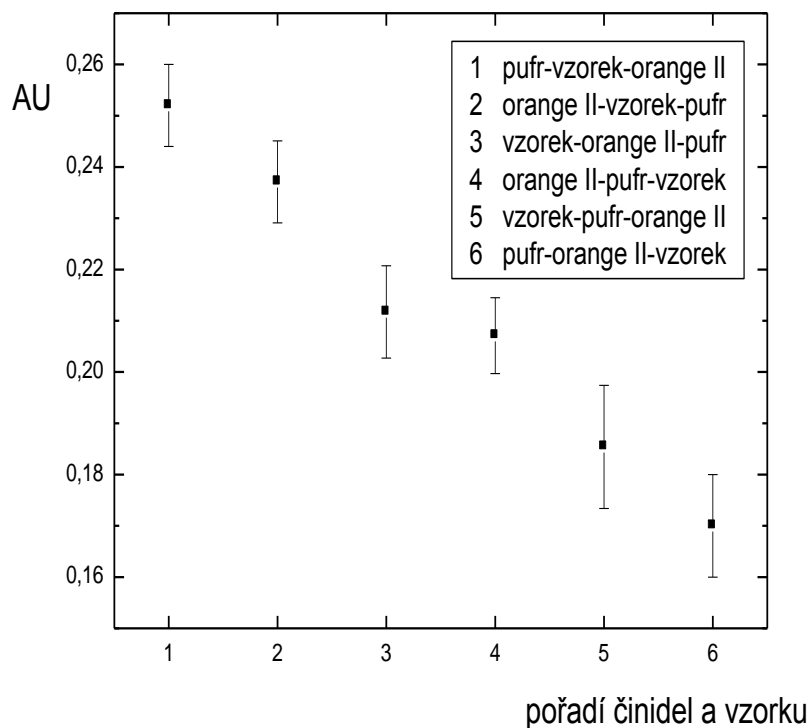
Z výše uvedených výsledků je patrné, že reakce s orange II je více citlivá v porovnání s reakcí s calmagite. Ovšem lineární dynamický rozsah je užší. Vzhledem k manuálnímu postupu při analýze se dá opakovatelnost hodnotit jako dobrá, i přes překročení 5 % u reakce s orange II.

### **4.3 Stanovení losartanu reakcí s orange II metodou SIA s UV/VIS detekcí**

Pro stanovení losartanu technikou SIA byla postavena aparatura podle obrázku č. 3.1 (str. 30). Rozšiřující zapojení klasické SIA aparatury o možnost provedení extrakčního stanovení. Byl zároveň vytvořen ovládací software pomocí vnitřního programovacího jazyka aparatury SIA, který umožňoval kompletně řídit celé stanovení. Bylo možné měnit pořadí injektovaných zón jednotlivých reagentů, dávkované objemy a rychlost jejich transportu do průtokové detekční cely. Ovládací software zároveň řídil připojený spektrofotometr s vláknovou optikou a sbíral naměřená data. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 486 nm (pro stanovení s orange II) a 490 nm (pro stanovení s calmagite). Sběr naměřených dat byl prováděn s frekvencí 10 Hz.

### 4.3.1 Optimalizace pořadí injektovaných zón látek

Prvním optimalizovaným parametrem bylo pořadí injektovaných zón látek do zadržovací cívky. Experimentálně bylo ověřeno šest různých sekvencí. Z dosažených výsledků (obr. 4.10) vyplynulo, že nejvyšší odezvy bylo dosaženo při dávkování jednotlivých složek v tomto pořadí: Clark-Lubsův pufr, vzorek a orange II. Při tomto pořadí bylo také dosaženo nejlepší opakovatelnosti.



Obr. 4.10 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na pořadí přidávaných látek.

$$c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

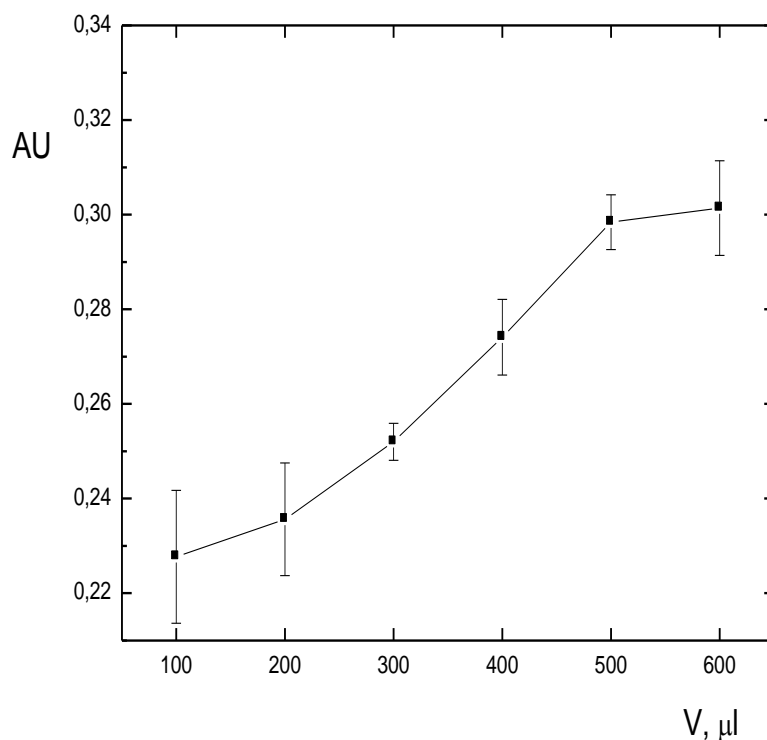
$$V_{\text{činidla}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 300 \text{ } \mu\text{l}$$

$$ID_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, ID_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,35 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,66 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

### 4.3.2 Optimalizace dávkovaných objemů pufru a činidla orange II

V další části práce byly optimalizovány poměry dávkovaných činidel, a to Clark-Lubsova pufru a orange II. Díky velikosti používané stříkačky v pístovém čerpadle a mísící cívky mohla být celková suma dávkovaných objemů maximálně 900  $\mu\text{l}$ . Vliv dávkovaného objemu činidla (obr. 4.11) a pufru (obr. 4.12, str. 47) byl tedy sledován v rozmezí 100 - 600  $\mu\text{l}$ .



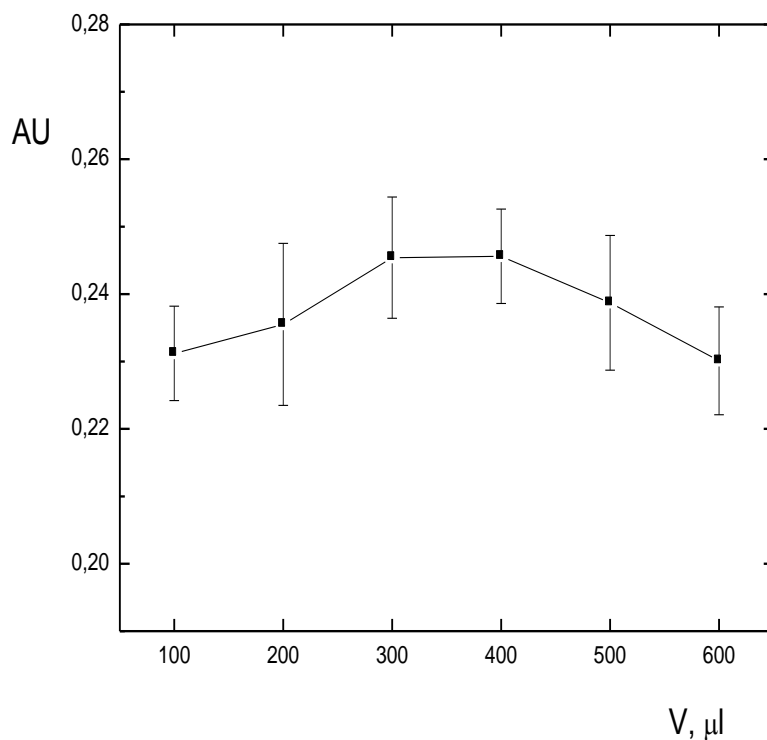
Obr. 4.11 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na objemu dávkovaného pufru.

$$c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

$$V_{\text{činidla}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{ID}_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, \text{ID}_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,35 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,66 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$



Obr. 4.12 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na objemu dávkovaného činidla orange II.

$$c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

$$V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ }\mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 150 \text{ }\mu\text{l}$$

$$\text{ID}_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, \text{ID}_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,35 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,66 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$$

Z výše uvedených závislostí vlivu dávkovaných objemů pufru a barviva na velikosti odezvy signálu (obr. 4.11 a 4.12) je zřejmé, že objem dávkovaného pufru má na citlivost stanovení mnohem větší vliv než objem činidla. U pufru byl rozdíl naměřené absorbance zhruba 0,7, zatímco u činidla byl tento rozdíl pod 0,02 jednotek absorbance.

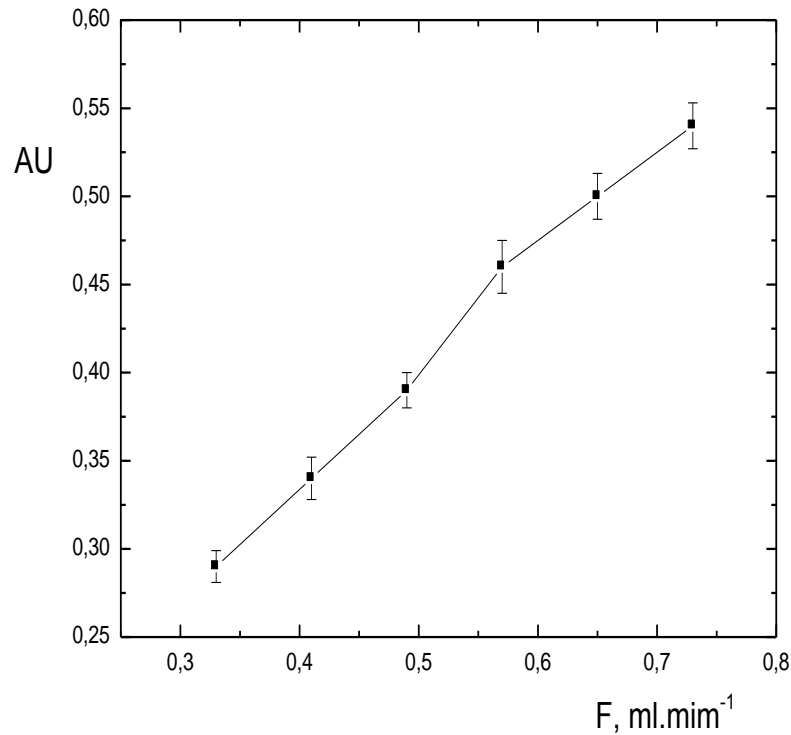
Jako optimální objem dávkovaného pufru byl zvolen objem 500  $\mu\text{l}$  a objem činidla 300  $\mu\text{l}$  jako kompromis mezi dosaženou citlivostí a velikostí disperze, která se zvyšuje s celkovým objemem reakční směsi.

### 4.3.3 Vliv průtokové rychlosti chloroformu

Podle předpokladu má u extrakčních stanovení velmi výraznou roli průtoková rychlost extrakčního činidla – chloroformu. Na rychlosti čerpaného chloroformu do extrakční cívky (na poměru průtokových rychlostí vodné a chloroformové fáze) záleží dosažená výsledná citlivost extrakčního stanovení; na rychlosti odčerpávání organické fáze za separátorem fází pak závisí dosažené procento návratnosti chloroformové fáze s extrahovaným asociátem a tedy také výsledná citlivost.

V předchozích měřeních nedocházelo k optimálnímu oddělení vodné a chloroformové fáze od sebe. Vodná fáze odcházející do odpadu obsahovala část fáze chloroformové, což ve svém důsledku způsobovalo snížení intenzity signálu. Tento fakt vedl ke snaze o účinnější oddělení obou fází v separátoru fází. Nejdříve byla k dosavadní aparatuře přidána externí peristaltická pumpa Ismatec reglo, která řídila odčerpávání chloroformu za separátorem fází; stávající SIA peristaltická pumpa řídila čerpání čistého chloroformu. V tomto uspořádání byla proměřena závislost absorbance na průtokové rychlosti odčerpávané chloroformové fáze v rozsahu  $0,33 - 0,73 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  s velikostí kroku  $0,09 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  při konstantní rychlosti SIA pumpy  $0,66 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (viz obr. 4.13, str. 49).





Obr. 4.13 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na průtokové rychlosti odčerpávaného chloroformu.

$$c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

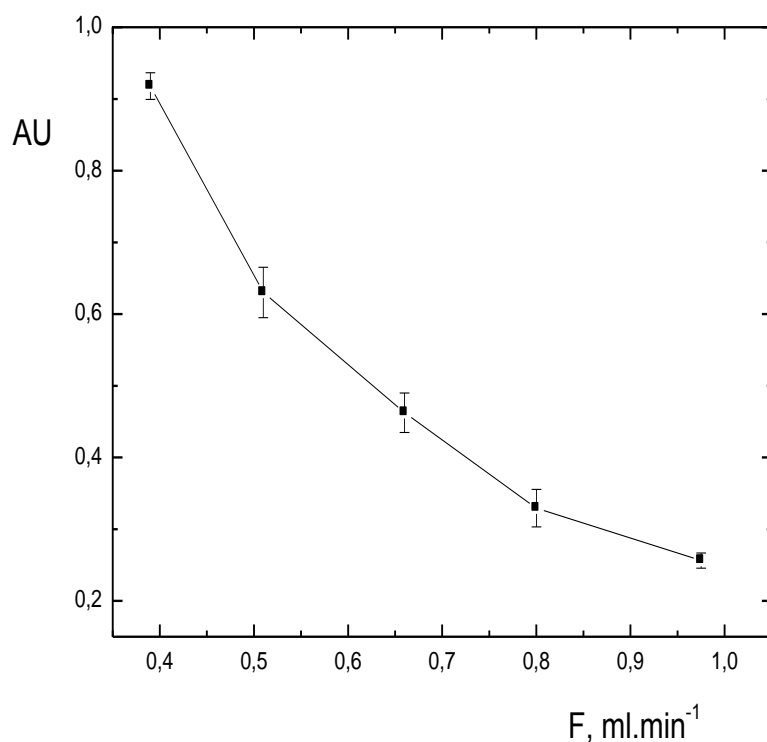
$$V_{\text{činidla}} = 300 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\text{ID}_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, \text{ID}_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,35 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,66 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

Z proměřené závislosti je patrné zvýšení citlivosti stanovení při nastavené větší průtokové rychlosti pro odčerpávání měřené chloroformové fáze. Tímto se do měřicí cely dostalo větší množství vzniklého asociátu, který byl měřen. Při větším průtoku než  $0,73 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  vznikal podtlak na výstupu ze separátoru fází, a tak docházelo k tvorbě vzduchových bublinek, které znemožňovaly stanovení. Vhodnou průtokovou rychlostí odčerpávání chloroformu by tedy byla maximální možná rychlost  $0,73 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Druhý zvolený přístup ke zlepšení oddělení obou fází od sebe spočíval v záměně odčerpávací hadičky, kdy byla použita čerpací hadička z Vitonu se stejným vnitřním průměrem jako hadička pro čerpání čistého chloroformu; tedy s vnitřním průměrem 0,56 mm. V tomto případě byl průtok čerpací i odčerpávací hadičkou řízen pouze SIA pumpou. Závislost signálu iontového asociátu a orange II na průtokové rychlosti čistého chloroformu, tedy na průtokové rychlosti odčerpávání chloroformové fáze ze separátoru fází, je zobrazena na obr. 4.14. Rozsah průtokových rychlostí chloroformu byl  $0,39 - 0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



Obr. 4.14 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na průtokové rychlosti čistého chloroformu.

$$c_{\text{činidla}} = 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

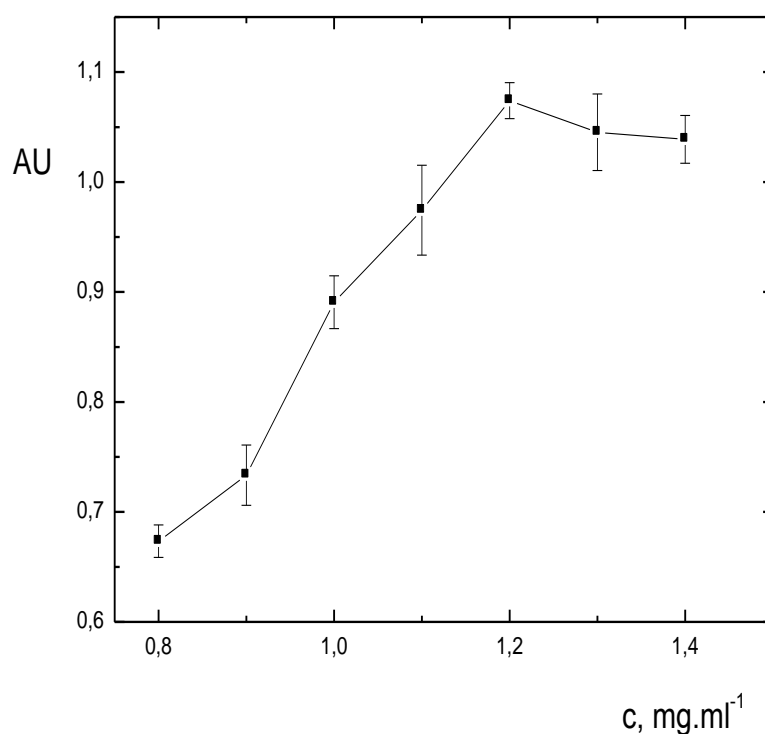
$$V_{\text{činidla}} = 300 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \text{ } \mu\text{l}$$

$$ID_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, ID_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}$$

Za těchto podmínek bylo dosaženo vyšších odezev signálů než v případě prvním, a proto pro další měření byla zvolena rychlost peristaltické pumpy  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  s hadičkami o stejném vnitřním průměru  $0,56 \text{ mm}$ , kterými bylo uskutečňováno jak čerpání, tak odčerpávání chloroformu.

#### 4.3.4 Optimalizace koncentrace činidla orange II

Další částí práce bylo určení optimální hodnoty koncentrace činidla orange II. Koncentrační rozsah byl proměřen v rozsahu  $0,8 - 1,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Průběh nalezené závislosti je znázorněn na obr. 4.15.



Obr. 4.15 Závislost signálu iontového asociátu na koncentraci orange II.

$$c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{ pH}_{\text{pufru}} = 1$$

$$V_{\text{činidla}} = 300 \text{ }\mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ }\mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \text{ }\mu\text{l}$$

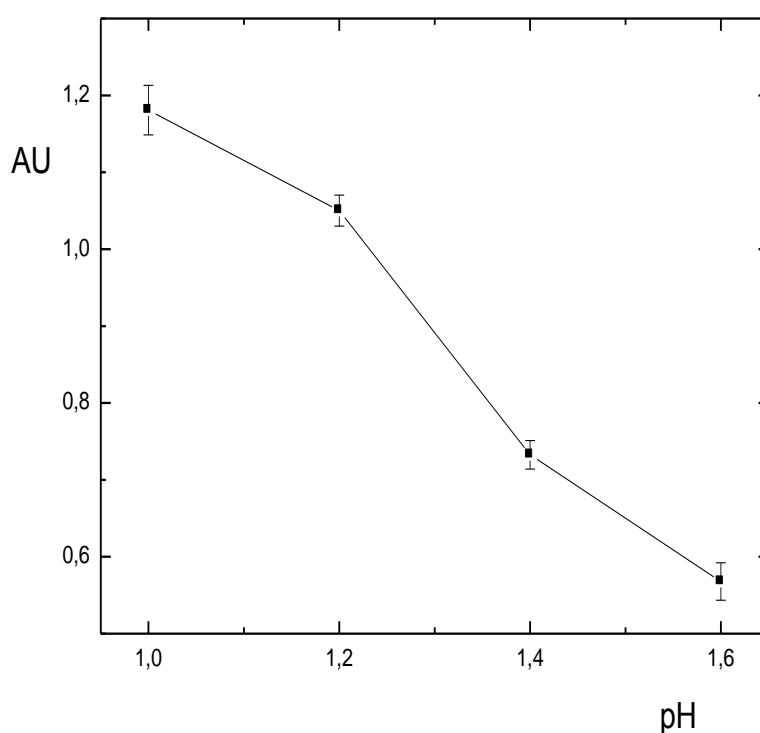
$$\text{ID}_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, \text{ ID}_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,39 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$$

Naměřená závislost má typický průběh pro vliv koncentrace činidla. Nejdříve dochází se vzrůstající koncentrací činidla k prudkému zvyšování signálu, po dosažení potřebné koncentrace činidla se vzestup signálu zastaví a po překročení určité koncentrace činidla naopak signál začíná klesat. U koncentrace činidla  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl zaznamenán nejvyšší signál, proto byla tato koncentrace určena za optimální.

### 4.3.5 Optimalizace pH Clark-Lubsova pufru

Posledním optimalizovaným parametrem bylo pH Clark-Lubsova pufru v rozsahu pH 1,0 - 1,6. Dolní mez pH pufru byla zvolena jak s ohledem na jeho puфраční kapacitu, tak také na kyselou chybu pH-metru, která u používaného zařízení nebyla přesně známa. V literatuře se uvádí, že obecně nad pH 4,0 nedochází ke vzniku reakčních produktů s losartanem. Trend, kdy se stoupajícím pH je stanovení méně citlivé díky nedostatečné tvorbě iontového asociátu, byl experimentálně potvrzen. Průběh závislosti je zobrazen na obr. 4.16. Jako optimální pH pufru bylo zvoleno pH 1,0.



Obr. 4.16 Závislost signálu iontového asociátu s orange II na pH Clark-Lubsova pufru.

$$c_{\text{čínidla}} = 1,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{losartanu}} = 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

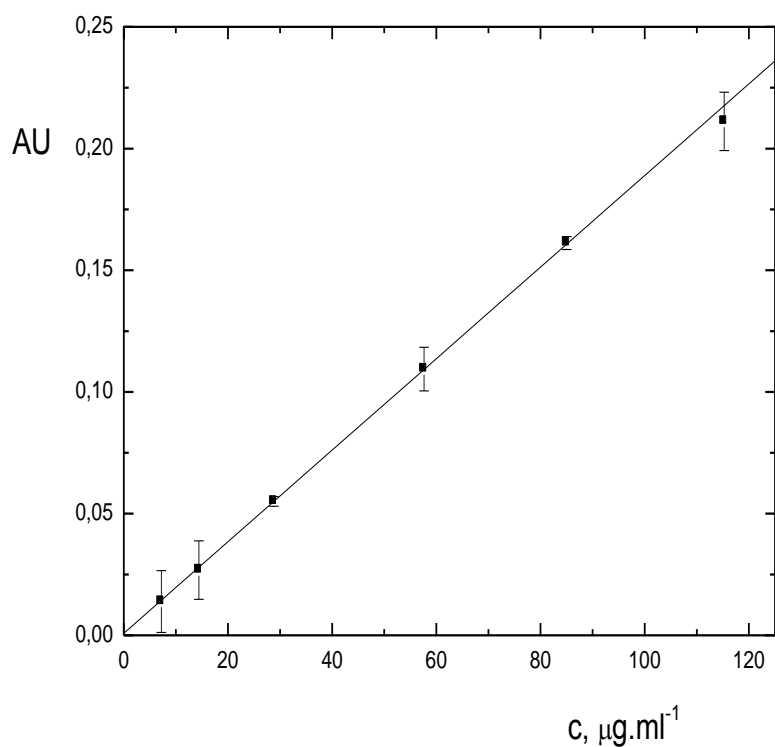
$$V_{\text{čínidla}} = 300 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \text{ } \mu\text{l}$$

$$ID_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, ID_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,39 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

### 4.3.6 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu

Při optimálních experimentálních podmínkách byla proměřena kalibrační závislost a byly určeny základní charakteristiky stanovení losartanu s činidlem orange II v prostředí kyselého pufru. Kalibrační závislost je zobrazena na obr. 4.17 a základní charakteristiky stanovení jsou uvedeny v tabulce 4.3 (str. 55).



Obr. 4.17 Kalibrační závislost stanovení losartanu s orange II při vlnové délce 486 nm.

$$c_{\text{činidla}} = 1,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

$$V_{\text{činidla}} = 300 \text{ }\mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \text{ }\mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \text{ }\mu\text{l}$$

$$\text{ID}_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, \text{ID}_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,39 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$$

Tab. 4.3: Základní charakteristiky stanovení losartanu s orange II při  $\lambda_{\max} = 486$  nm.

	AU
citlivost [ $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]	0,0018
opakovatelnost ( $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) [%]	1,8
absolutní LOD [ $\mu\text{g}$ ]*	0,21
relativní LOD [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	1,4
absolutní LOQ [ $\mu\text{g}$ ]*	0,69
relativní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	4,6
R	0,999
LDR do [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	115

\* bylo dávkováno 150  $\mu\text{l}$

Zvýše uvedených základních charakteristik vyplynulo, že lineární dynamický rozsah a opakovatelnost metody jsou bez problémů dostačující pro stanovení losartanu v jeho lékových formách. Doba trvání jedné analýzy za optimálních experimentálních podmínek byla díky použitému extrakčnímu stanovení 420 sekund. Množství odpadu chloroformové frakce vzniklé z jedné analýzy činilo 4 ml.

#### 4.3.8 Stanovení losartanu ve farmaceutických přípravcích

Pro stanovení obsahu losartanu v léčivých přípravcích metodou SIA s UV/VIS detekcí po tvorbě iontového asociátu s orange II byla použita metoda vnějšího standardu. Výsledky jdou uvedeny v tab. 4.4.

Tab. 4.4 Stanovení losartanu s orange II v reálných vzorcích metodou SIA s UV/VIS detekcí.

Identifikace vzorku	Deklarovaný obsah [mg/tableta]	Stanovení obsahu metodou vnějšího standardu [mg/tableta]
<b>Lorista</b>	50	$45,5 \pm 0,9$
<b>Teva</b>	50	$38,1 \pm 2,7$
<b>Stada</b>	50	$39,5 \pm 0,8$
<b>Lozap</b>	50	$44,1 \pm 0,9$

Vyvinutá extrakční SIA metoda s UV/VIS detekcí poskytovala nižší obsah analytu oproti deklarovaným hodnotám výrobcem. Lze tedy usuzovat, že nejspíše nebyly dodrženy podmínky kvantitativního rozpuštění tablet a tím i úplného převedení losartanu do rozpouštědla, vody. Další možnou příčinou zjištěných nižších obsahů mohla být nedostatečná extrakce detekovaného iontového asociátu do chloroformu. U léku Teva, u kterého vyšel obsah účinné látky oproti deklarované hodnotě nejnižší, mohla hrát roli jeho doba expirace, která byla překročena o 14 měsíců. Nevhodným skladováním léčiva mohlo dojít k jeho degradaci.

#### **4.4 Stanovení losartanu metodou SIA s UV/VIS detekcí s činidlem calmagite**

Pro stanovení losartanu, založeného opět na vzniku iontového asociátu s činidlem calmagite v prostředí Clark-Lubsova pufru, byla použita stejná sestavená aparatura s řídicím programem jako pro stanovení losartanu s činidlem orange II; pouze vlnová délka pro zaznamenávání signálu byla 490 nm.

Tato reakce ale nakonec nebyla aplikovatelná v průtokovém uspořádání. Ani při použití optimálních podmínek předešlé reakce a optimálních podmínek ze statických měření nebyl zaznamenán žádný měřitelný signál.

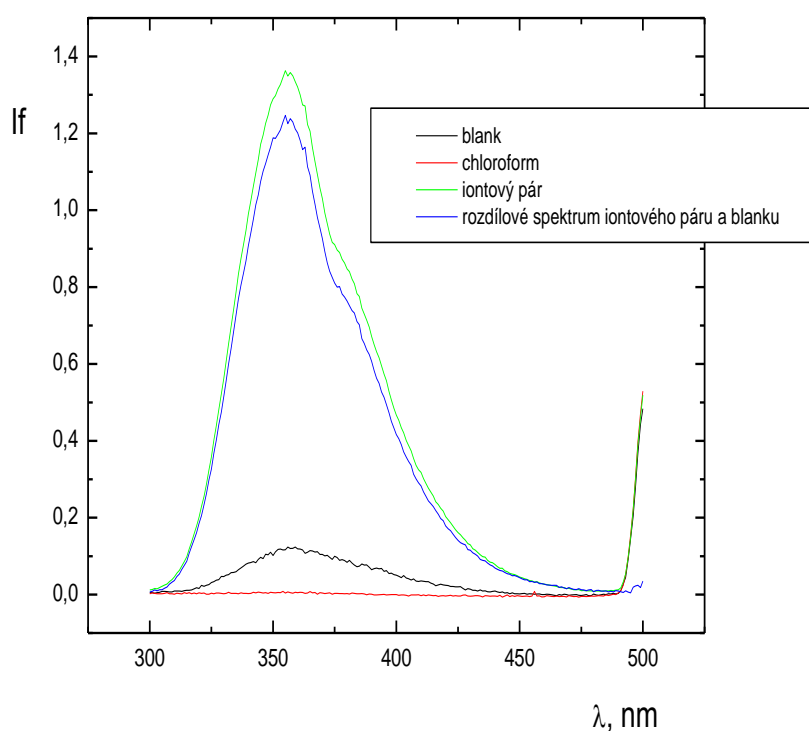
#### **4.5 Stanovení losartanu metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí**

Pro stanovení losartanu metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí byly použity optimální podmínky vyplývající z měření SIA s UV/VIS detekcí vyjma koncentrace barviva, která byla znovu optimalizována. Optimální podmínky tedy byly následující: pořadí injektovaných substancí Clark-Lubsov pufr (500  $\mu$ l) o pH 1,0, vzorek (150  $\mu$ l) a jako poslední bylo dávkováno činidlo orange II (300  $\mu$ l). K čerpání chloroformu a zároveň i k odčerpávání chloroformové fáze ze separátoru fází byly použity hadičky z Vitonu o vnitřním průměru (0,56 mm) a průtoková rychlost SIA pumpy 0,39 ml·min<sup>-1</sup>.



#### 4.5.1 Volba emisní vlnové délky pro stanovení losartanu

Pro určení vhodné emisní vlnové délky pro stanovení losartanu SIA extrakční metodou s fluorimetrickou detekcí byla změřena emisní spektra blanku, vzniklého iontového asociátu extrahovaného do chloroformu a samotného chloroformu v rozsahu 300 – 500 nm. Excitační vlnová délka při těchto měřeních byla 250 nm. Jejich záznam je zobrazen na obr. 4.18. Spektrum iontového páru bylo získáno za optimálních experimentálních podmínek smícháním Clark-Lubsova pufru (pH 1,0; 2,0 ml), činidla orange II ( $17,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 1,0 ml) a losartanu ( $14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 1,0 ml), vzniklý iontový asociát byl extrahován 2 minuty do 6 ml chloroformu. Stejným způsobem byl připraven i blank; zde ale místo losartanu byl do reakční směsi přidán 1,0 ml deionizované vody. Emisní spektrum chloroformu bylo naměřeno z vysušeného chloroformu. Excitační vlnová délka byla 250 nm ( $\lambda_{\text{exc}}$  deuteriové výbojky) a napětí na fotonásobiči bylo 700 V.



Obr. 4.18 Emisní spektra iontového asociátu losartanu a orange II, blanku, chloroformu a rozdílové spektrum iontového páru a blanku při excitační vlnové délce 250 nm.

Ze záznamů spekter jsou bohužel viditelné pozitivní signály pro blank, které u UV/VIS detekce nebyly zjištěny. Dochází tedy pravděpodobně i k částečné extrakci samotného činidla do chloroformu. Samotné emisní spektrum iontového asociátu má dva pásy, kdy maximum prvního intenzivnějšího pásu leží při 357 nm.

V dalších měřeních byla tato emisní vlnová délka použita pro detekci, ovšem později se ukázalo, že při této vlnové délce jsou naměřené intenzity emitovaného záření tak velké, že použitý průtokový spektrofluorimetr Shimadzu napojený na SIA aparaturu nebyl schopen tyto intenzity zaznamenat, a to ani v případě nízkých koncentrací losartanu. Jeho maximální měřitelný rozsah je do 1,3V (0 – 1,3V) (byl použit analogový výstup pro zpracování signálu). Samotný chloroform (pravděpodobně se stopami extrahovaného samotného barviva nebo nečistot v něm obsažených) svým emisním signálem při této vlnové délce prakticky zahltil detektor. Z tohoto důvodu musela být volena jiná emisní vlnová délka, a to i za cenu snížení citlivosti. Po experimentálních pokusech byla zvolena jako maximální možná měřitelná emisní vlnová délka hodnota 387 nm.

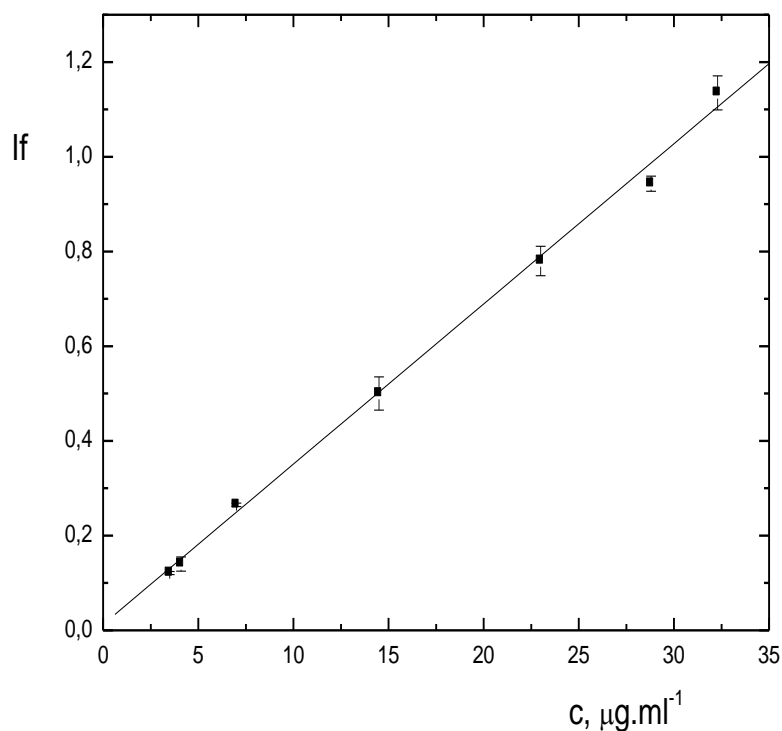
#### **4.5.2 Optimalizace koncentrace činidla orange II**

Jediný parametr, který byl optimalizován pro fluorimetrickou detekci byla koncentrace používaného činidla orange II, a to ze dvou důvodů. Prvním důvodem bylo to, že docházelo k jeho samotné extrakci do chloroformu a tím se zvyšoval získaný signál blanku; proto byla snaha o co největší potlačení tohoto vlivu. Druhým důvodem byl fakt, že při vyšších koncentracích barviva nedocházelo k jeho úplnému vymytí z detekční průtokové cely čistým chloroformem ani po dlouhodobém a opakovaném proplachu. Při manuálním čištění zanesené cely byl použit aceton. Ovšem toto řešení by nebylo možné aplikovat do průtokového uspořádání. Optimalizace byla proměřena s koncentracemi orange II 17,5; 35; 175 a 350  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Pouze u nejnižší proměřené koncentraci orange II, tedy 17,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , nebylo zaznamenáno znečištění průtokové cely samotnou orange II. Proto pro další měření byla zvolena koncentrace orange II 17,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.5.3 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení losartanu

Při optimálních experimentálních parametrech stanovení byla naměřena kalibrační závislost a byly zjištěny základní charakteristiky stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí při použití emisní vlnové délky 387 nm a excitační vlnové délky 250 nm. Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 4.19 a v tab. 4.5 (str. 59).



Obr. 4.19 Kalibrační závislost stanovení losartanu s orange II při emisní vlnové délce 387 nm.

$$c_{\text{činidla}} = 17,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}, \text{pH}_{\text{pufru}} = 1$$

$$V_{\text{činidla}} = 300 \mu\text{l}, V_{\text{losartanu}} = 150 \mu\text{l}, V_{\text{pufru}} = 500 \mu\text{l}$$

$$ID_{\text{hadičky na čerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}, ID_{\text{hadičky na odčerpání CHCl}_3} = 0,56 \text{ mm}$$

$$F_{\text{SIA pumpy}} = 0,39 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$$

Tab. 4.5 Základní charakteristiky SIA stanovení losartanu s orange II se spektrofluorimetrickou detekcí,  $\lambda_{\text{emisní}} = 387 \text{ nm}$ .

	If
citlivost [ $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]	0,0338
opakovatelnost ( $29 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) [%]	1,7
absolutní LOD [ $\mu\text{g}$ ]*	0,10
relativní LOD [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	0,68
absolutní LOQ [ $\mu\text{g}$ ]*	0,35
relativní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	2,3
R	0,996
LDR do [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	32

\*bylo dávkováno 150  $\mu\text{l}$

#### 4.5.4 Analýza farmaceutických preparátů s losartanem

Pro stanovení obsahu losartanu v léčivých přípravcích metodou SIA s fluorimetrickou detekcí byla použita metoda vnějšího standardu. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.6.

Tab. 4.6 Stanovení losartanu s orange II v reálných vzorcích metodou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí,  $\lambda_{\text{emisní}} 387 \text{ nm}$ .

Identifikace vzorku	Deklarovaný obsah [mg/tableta]	Stanovení obsahu metodou vnějšího standardu [mg/tableta]
<b>Lorista</b>	50	$48,4 \pm 0,7$
<b>Teva</b>	50	$53,1 \pm 0,8$
<b>Stada</b>	50	$54,0 \pm 1,2$
<b>Lozap</b>	50	$48,8 \pm 1,4$

Vyvinutá extrakční metoda pro stanovení losartanu sekvenční injekční analýzou s fluorimetrickou detekcí poskytovala vyšší hodnoty obsahů účinné látky v tabletách oproti deklarovaným hodnotám od výrobce. Z tohoto lze usuzovat, že v tomto případě byl všechen analyt kvantitativně převeden do rozpouštědla a zároveň i samotná extrakce byla účinná. Anebo lze tento fakt vysvětlit vlivem matrice. Obecně je známo, a i v této

práci bylo experimentálně potvrzeno, že fluorimetrická detekce je citlivější než UV/VIS detekce. Je tedy možné, že při extrakci došlo k převedení i jiné látky do chloroformové fáze než jen stanovovaný iontový pár losartan-orange II, a to se projevilo pozitivní chybou matrice na celkovém stanovovaném obsahu losartanu.

## 5 Porovnání výsledků

Bylo provedeno stanovení losartanu extrakčním stanovením průtokovou technikou SIA se spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí, zajištěnou reakcí s činidlem orange II v kyselém prostředí za vzniku iontového asociátu, který byl následně extrahován do chloroformu. V tab. 4.7 je uvedeno resumé naměřených základních charakteristik stanovení pro obě detekce.

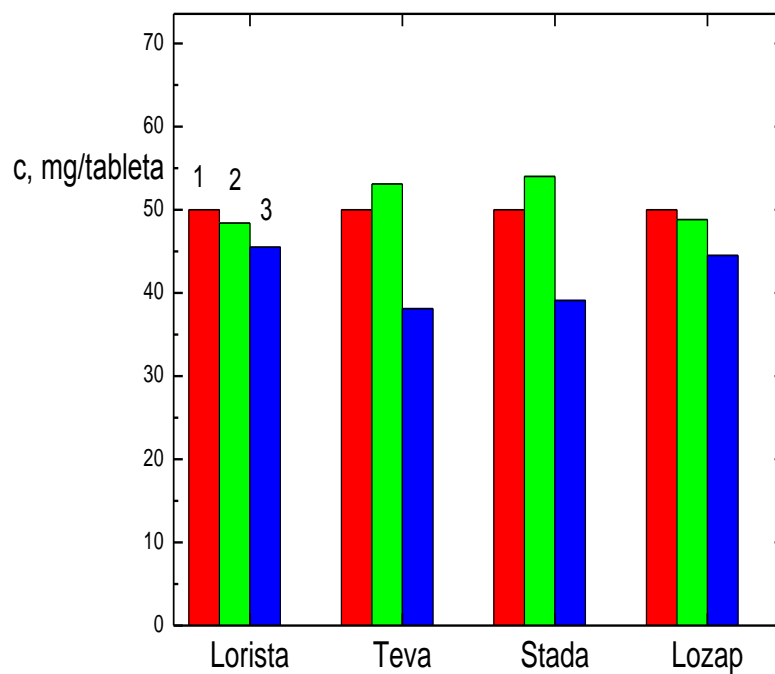
Tab. 4.7 Porovnání charakteristik spektrofotometrického a spektrofluorimetrického stanovení losartanu s orange II extrakční technikou SIA.

<b>Parametry</b>	<b>Spektrofotometrická detekce AU</b>	<b>Spektrofluorimetrická detekce If</b>
citlivost [ $\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]	0,0018	0,0338
opakovatelnost [%]	1,8	1,7
absolutní LOD [ $\mu\text{g}$ ]*	0,21	0,10
relativní LOD [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	1,4	0,68
absolutní LOQ [ $\mu\text{g}$ ]*	0,69	0,35
relativní LOQ [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	4,6	2,3
R	0,999	0,996
LDR do [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	115	32

\* bylo dávkováno 150  $\mu\text{l}$

Z uvedených základních charakteristik stanovení losartanu draselného je vidět, že je citlivější spektrofluorimetrická detekce, kdy zároveň bylo dosaženo nižších limitů detekce a stanovitelnosti. Hodnoty opakovatelnosti a korelační koeficienty jsou prakticky totožné.

Graf na obr. 4.20 poskytuje grafické srovnání dosažených obsahů losartanu v jednotlivých farmaceutických vzorcích s deklarovaným obsahem losartanu 50 mg/tableta.



Obr. 4.20 Porovnání analýz reálných farmaceutických vzorků technikou SIA se spektrofotometrickou a spektrofluorimetrickou detekcí.

1 – deklarovaná hodnota, 2 – spektrofluorimetrická detekce,  
3 – spektrofotometrická detekce

## 6 Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo převést a zoptimalizovat statické extrakční stanovení losartanu do průtokového uspořádání sekvenční injekční analýzy s využitím spektrofotometrické a spektrofluorimetrické detekce. Doposud v odborné literatuře nebyla publikována metoda pro stanovení losartanu v průtokovém uspořádání a z tohoto důvodu nebylo možné získané výsledky porovnat s jinými pracemi.

Principem obou stanovení je interakce losartanu s činidly (orange II a calmagite) v kyselém prostředí Clark-Lubsova pufru. Při reakcích vzniká barevný iontový asociát, který je extrakcí převeden do chloroformové fáze, ve které je následně detekován.

V prvním kroku této práce bylo nutné ověřit použitelnost reakcí ve statickém uspořádání s UV/VIS detekcí s původní prací [1]. Byly naměřeny základní optimalizace, kalibrační závislost a charakteristiky stanovení.

V další části měření bylo extrakční stanovení převedeno do průtokového uspořádání s UV/VIS detekcí, kdy nejprve bylo nutné navrhnout a sestavit aparaturu a následně byly změřeny optimalizace reakčních podmínek. Pro spektrofotometrickou detekci byly optimalizovány objemy jednotlivých látek, jejich pořadí dávkování do zadržovací cívky, dále byl měřen vliv průtokové rychlosti čerpaného a odčerpávaného chloroformu a v neposlední řadě byly optimalizovány parametry činidla, a to jeho koncentrace a pH Clark-Lubsova pufru.

Do průtokového uspořádání se nepodařilo převést reakci s calmagite, ale pouze reakci s orange II, která měla vyšší citlivost zjištěnou ze statických měření. Takto zoptimalizované stanovení bylo použito i pro spektrofluorimetrickou detekci, kde ovšem bylo nutné použít nižší koncentraci barviva. V obou případech byly změřeny kalibrace a základní charakteristiky stanovení. Při porovnání spektrofluorimetrické a spektrofotometrické detekce má spektrofluorimetrická detekce o jeden řád vyšší citlivost. Bylo zároveň dosaženo nižších limitů detekce a stanovitelnosti. Pokud se týká opakovatelnosti měření, jsou obě metody srovnatelné.

V závěrečné části byly tyto vypracované metody úspěšně aplikovány na reálné vzorky tvrdých lékových tablet s účinnou látkou losartanu, kde bylo dosaženo spektrofluorimetrickou detekcí dobrých výsledků.



## 7 Použitá literatura

- [1] Prabhakar, A. H.; Giridhar, R.: A rapid colorimetric method for the determination of Losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **27**:6, 861–866 (2002).
- [2] Pimenta, A. M.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Ara'ujo, A. N.; Martínez Calatayud, J.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 16–34 (2006).
- [3] Paseková, H.; Polášek, M.; Šolich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* **93**, 354-359 (1999).
- [4] Melchert, W. R.; Reisb, B. F.; Rochab, F. R. P.: Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* **714**, 8– 19 (2012).
- [5] Skeggs L. T. Jr.: An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. **28**, 311-22 (1957).
- [6] Trojanowicz, M.; Kaniewska, M.: Flow methods in chiral analysis. *Analytica Chimica Acta* **801**, 59– 69 (2013).
- [7] Segundo, M. A; Rangel, A. O. S. S: Flow Analysis: A Critical View of Its Evolution and Perspectives. *Journal of Flow Injection Analysis* **19**:1, 3-8 (2002).
- [8] Růžička, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analysis : Part X. theory, techniques and trends. *Analytica Chimica Acta* **99**:1, 37–76 (1978).
- [9] Růžička, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analysis : Part I. a new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **78**, 145-157 (1975).
- [10] Karlberg, B.; Pacey, G. E.: *Flow injection analysis: a practical guide*. Vol. 10, Amsterdam, Elsevier 1989.
- [11] Kolev, S.D.; McKelvie, I. D. (ed.): *Advances in flow injection analysis and related techniques*. Vol 54. Amsterdam, Elsevier 2008.

- [12] Růžička J.: *Flow-injection analysis* [Principy metod, návody a zásady, CD-ROM], 1999.
- [13] Růžička, J.; Hansen, E. H.: *Flow Injection Analysis*, 2nd ed. New York, J. Wiley 1988.
- [14] Růžička, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analyses. *Analytica Chimica Acta* **78**:1, 145–157 (1975).
- [15] Huclová, J.; Šatínský, D.; Pavlíček, O.; Vedralová, L.; Karlíček, R.: Using on-line solid phase extraction for determination of amiloride in human urine by sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, **573–574**, 376–382 (2006).
- [16] Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; Dias, A. C. B.; Ribeiro, M. F. T.; Zagatto, E. A. G.: Multi-pumping flow systems: an automatic tool. *Talanta* **64**:5, 1091–1098 (2004).
- [17] Economou, A.: Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry* **24**:5, 416–425 (2005).
- [18] Miró, M.; Cerdá, V.; Estela, J. M.: Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in analytical chemistry* **21**:3, 199–210 (2002).
- [19] Růžička, J.: Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst* **125**, 1053–1060 (2000).
- [20] Miró, M.; Hansen, E. H.: Recent advances and future prospects of mesofluidic Lab-on-a-Valve platforms in analytical sciences – A critical review. *Analytica Chimica Acta* **750**, 3–15 (2012).
- [21] Wang, J.; Hansen, E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **22**:4, 225–231 (2003).
- [22] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Karolinum, Praha 2004.

- [23] De Ruiter, C.; Wolf, J. H.; Brinkman, U. A.; Frei, R. W.: Design and evaluation of a sandwich phase separator for on-line liquid/liquid extraction. *Analytica Chimica Acta* **192**, 267–275 (1987).
- [24] Mauri-Aucejo, A. R.; Pascual-Marti, M. C.; Llobat, M.; Cerda, A.; Microchem, J.: Fluorimetric determination of amphetamine in urine by flow injection with on-line liquid-liquid extraction. *Microchemical Journal* **69**, 199-204 (2001).
- [25] Karlberg, B.; Thelander, S.: Extraction based on the flow-injection principle: Part I. Description of the Extraction System. *Analytica Chimica Acta* **98**:1, 1–7 (1978).
- [26] Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York, Springer 2007.
- [27] Diestler, D. J.: Vibrational Relaxation of molecules in condensed media. *Topics in applied physics* **15**, 169 – 238 (1976).
- [28] K erouel, R.; Aminot, A.: Fluorimetric determination of ammonia in sea and estuarine water by direct segmented flow analysis. *Marine Chemistry* **57**:3-4, 265-275 (1997).
- [29] Kayali-Sayadi, M. N.; Rubio-Barroso, S.; Díaz-Díaz, C. A.; Polo-Díez, L. M.: Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **368**:7, 697-701 (2000).
- [30] Possanzini, M.; Di Palo, V.: Determination of formaldehyde and acetaldehyde in air by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia* **46**:5-6, 235 – 240 (1997).
- [31] Qiu-e, C.; Yunkun, Z.; Xingguo, Ch.; Zhide, H.; Qiheng, X.: Sequential fluorescent determination of copper (II) and cobalt (II) in food samples by flow injection analysis. *Food chemistry* **65**:3, 405-409 (1999).
- [32] Toyoda, H.; Nagashima, T.; Hirata, R.; Toida, R.; Imanari, T.: Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the determination of heparin and heparan sulfate in biological samples: application

- to human urinary heparan sulfate. *Journal of chromatography B: Biomedical science and applications* **704**:1-2, 19-24 (1997).
- [33] Palamakumbura, A. H.; Trackman, P. C.: A fluorimetric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Analytical biochemistry* **300**:2, 245-251 (2002).
- [34] Stryer, L.: The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites. *Journal of molecular biology* **13**:2, 482-495 (1965).
- [35] Plasman, N.; Vray, B.: Quantification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorimetry. *Journal of Immunological Methods* **174**, 195-202 (1994).
- [36] Cagigal, E.; González, L.; Alonso, R. M.; Jiménez, R. M.: pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **26**:3, 477-486 (2001).
- [37] Drakopoulos, A. I.; Ioannou, P. C.: Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta* **354**:1-3, 197-204 (1997).
- [38] Wen, X.; Yang, Q.; Yan, Z.; Deng, Q.: Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV-VIS spectrophotometry. *Microchemical Journal* **97**:2, 249-254 (2011).
- [39] Čapka, L.; Zlámalová Gargošová, H.; Vávrová, M.; Urbánková, L.: Využití UV/VIS spektrofotometrie pro stanovení diklofenaku. *Chemické listy* **107**, 550-554 (2013).
- [40] Celebier, M.; Altinoz, S.: Determination of olmesartan medoxomil in tablets by UV-Vis spectrophotometry. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **62**:6, 419-422 (2007).
- [41] Dean Goldring; J. P.; Ravaioli, L.: Solubilization of Protein - Dye Complexes on Nitrocellulose to Quantify Proteins Spectrophotometrically. *Analytical biochemistry* **242**, 197-201 (1996).

- [42] Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G.: Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **79**, 4215-4221 (2007).
- [43] Calandra, P.; Goffedi, M.; Liveri, V. T.: Study of the growth of ZnS nanoparticles in water/AOT/n-heptane microemulsions by UV-absorption spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **160**:1, 9–13 (1999).
- [44] Pimenta, A. M.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Araújo, A. N.; Martínez Calatayud, J.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**:1, 16–34 (2006).
- [45] Sultan, S. M.; Hassan, Y. A. M.; Ibrahim, K. E. E.: Sequential injection spectrophotometric assay of bromazepam complexed with iron (II) in hydrochloric acid with chemometric optimization. *Talanta* **50**, 841–849 (1999).
- [46] Staden, J. K. F.; Tsanwani, M. M.: Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system. *Talanta* **58**, 1095-1101 (2002).
- [47] Perez - Ruiz, T.; Martinez - Lbzano, C.; Sanz, A.; Alonki, C.: Flow-injection extraction-spectrophotometric determination of imipramin in pharmaceutical withmethyl orange. *Talanta* **41**: 9, 1523-1527 (1994).
- [48] *British pharmacopoeia 2011*. London, Stationery Office 2010.
- [49] Weber, M.: Clinical Safety and Tolerability of Losartan. *Clinical therapeutics* **19**:4, 604-616 (1997).
- [50] Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. 2. přepracované vydání Praha, VŠCHT 2007.
- [51] Wong, P. C.; Price Jr, W.A.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Carani, D. J.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L.; Timmermans, P. B.: Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *Pharmacology* **255**:1, 211-217 (1990).

- [52] Lo, M. W.; Goldberg, M. R.; McCrea, J. B.; Lu, H.; Furtek, Ch. I.; Bjornsson, T. D.: Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **58**, 641–649 (1995).
- [53] Sivakumar, T.; Venkatesan, P.; Manavalan, R.; Valliapran, K.: Development of a HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium and atenolol in tablets. *Indian journal of pharmaceutical sciences* **69**:1, 154-157 (2007).
- [54] Rao, D. D.; Satyanarayana, N. V.; Sait, S. S.; Reddy, Y. R.; Mukkanti, K.: Simultaneous Determination of Losartan Potassium, Atenolol and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by Stability-Indicating UPLC. *Chromatographia*, **70**:3/4, 647-651 (2009).
- [55] Quaglia, M. G.; Donati, E.; Carlucci, G.; Mazzeo, P.; Fanali, S.: Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**, 981–987 (2002).
- [56] Ansari, M.; Kazemipour, M.; Khosravi, F.; Baradaran, M.: A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **52**:10, 1166—1170 (2004).
- [57] Santos, M. C. G.; Tarley, C. R. T.; Dall'Antonia, L. H.; Sartori, E. R.: Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. *Sensors and Actuators B* **188**, 263– 270 (2013).
- [58] ÚNMZ: *Terminologie z oblasti metrologie*. Dostupné z URL >> [http://homel.vsb.cz/~khe0007/opory/podklady\\_vyuka/terminologie\\_metrolog2010.pdf](http://homel.vsb.cz/~khe0007/opory/podklady_vyuka/terminologie_metrolog2010.pdf)<< [cit. 26. 2. 2014]
- [59] Pyleta, O.: *Chemometrie pro organické chemiky*. 4. přeprac. vyd. Pardubice, Univerzita Pardubice 2003.
- [60] Eckschlager, K.; Zima, J.; Císařová, I.: *Chemometrie II*. Praha, Karolinum 1994.

- [62] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum, 2007.
- [63] Sýkora, V.: *Chemicko analytické tabulky*. Praha, Nakladatelství technické literatury 1978.
- [64] Mohan, Ch.: *Buffers - A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. Dostupné z URL >>[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Buffers/Calbiochem\\_Buffers\\_Booklet.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Buffers/Calbiochem_Buffers_Booklet.pdf)<< [cit. 2. 4. 2014]
- [65] Němcová, I; Rychlovský, P; Havelcová, M: Flow-Injection analysis based on extraction and spectrophotometric determination of penicillins with thiazine dyes. *Analytical Letters* **42**, 989–999 (2009).