

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Zuzana Hrochová

**Voltametrické stanovení léčiva simvastatin na uhlíkové
pastové elektrodě a stříbrné pevné amalgámové elektrodě**

**Voltammetric Determination of Simvastatin at a Carbon
Paste Electrode and a Silver Solid Amalgam Electrode**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Pavel Teplý, Ph.D.

Praha 2015

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

Podpis

Tato diplomová práce vznikla na katedře analytické chemie za finanční podpory GAČR (projekt P206/12/G151) a TAČR (projekt TA04010954).

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli, RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, pomoc, trpělivost a cenné připomínky k mé práci. Dále mému konzultantovi RNDr. Pavlovi Teplému Ph.D. za poskytnutí prostor a přístrojů pro realizaci této diplomové práce.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a mým přátelům za všestrannou pomoc a podporu v průběhu celého mého studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývala stanovením simvastatinu metodou cyklické voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie s využitím uhlíkové pastové elektrody. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení simvastatinu v BR pufru a za těchto podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti a určeny hodnoty meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ).

Optimálním prostředím byl BR pufr (80%) o pH 3 pro DPV a pH 5,5 pro DCV a methanol (20%), (v/v). Pro obě techniky byly nalezeny lineární závislosti v rozmezí od 1 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro DCV byla mez detekce 0,36 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mez kvantifikace byla 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro DPV byla mez detekce 0,32 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace 1,09 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Optimální podmínky pro DPV byly využity při stanovení obsahu simvastatinu v léčivých přípravcích Simvax 20, Simvacard 20 a Simgal 10.

Pro stanovení simvastatinu v biologickém vzorku byla jako pracovní elektroda využita pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem. Bylo využito techniky DPV s podmínkami upravenými pro redukční oblast. Pro matrici desetinasobně zředěná moči byla zjištěna mez detekce 1,83 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikaci 6,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro matrici plné moči byla mez detekce 0,65 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace 2,15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pomocí CV a spektrofotometrie byla sledována stálost zásobního roztoku simvastatinu. Obě metody poskytly rozdílné výsledky. CV ukázala, že k degradaci simvastatinu v zásobním roztoku dochází již v průběhu prvního dne. U spektrofotometrie se degradace v absorpční spektru simvastatinu neprojevila. Stálost zásobního roztoku byla stanovena na jeden den.

Abstract

This master thesis is focused on determination simvastatin by cyclic voltammetry (CV), DC voltammetry (DCV), and differential pulse voltammetry (DPV) at a carbon paste electrode and a silver solid amalgam electrode. The optimum conditions for determination of simvastatin were found and under these conditions, concentration dependences were measured and the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were calculated for each method.

The optimum conditions for determination simvastatin were BR buffer pH 3,0 for DPV and pH 5,5 for DCV and methanol (20%). For both DCV and DPV the linear concentration dependences were obtained in concentration range from 1 to 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ with LOD 0.36 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and LOQ 1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DCV and LOD 0.32 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and LOQ 1.09 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DPV. Optimal conditions were used for determination simvastatin in drug Simvax 20, Simvacard 20 and Simgal 10.

For the determination of simvastatin in biological fluids a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode was used. Conditions were the same like for measurement conditions for DPV at CPE, but they were modified for reduction region. For ten times diluted urine LOD was 1.83 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and LOQ 6.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. For urine without dilution LOD was 0.65 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and LOQ 2.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

The stability of stock solution of simvastatin in methanol was monitored using UV/VIS Spectrometry and CV. Both methods gave different results. CV shows that simvastatin was degraded during first day. Degradation of simvastatin was not detected by UV spectrometry. The stock solution of simvastatin was stable for one day.

Předmětová hesla

Analytická chemie

Elektrochemie

Klíčová slova

Voltametrie

Cyklické voltametrie (CV)

Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

DC voltametrii

Uhlíková pastová elektroda

Stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem

Simvastatin

Objective words

Analytical chemistry

Electrochemistry

Key words

Voltammetry

Cyclic voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

DC voltammetry

Carbon paste electrode

Silver Solid amalgam electrode Modified with Mercury Meniscus

Simvastatin

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AV ČR	Akademie Věd České republiky
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
BR-MeOH	směs Brittonova-Robinsonova pufru o uvedeném pH (80%) a methanolu (20%),
c	molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklické voltametrie
CYP	cytochrom P450
č.š.	číslo šarže
DCE	kapající uhlíková elektroda
DCV	DC voltametrie
DHP	dihexadecylhydrogen fosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	elektrodový potenciál (V)
$E_{1/2}$	půl-vlnový potenciál
E_a	potenciál anodického píku
E_k	potenciál katodického píku
E_p	potenciál píku
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	elektrický proud (A)

I_p	proud píku (A)
$k_{BR-MeOH}$	směs kyselé části Brittonova-Robinsonova pufru o pH 1,6 (80%) a methanolu (20%)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
LD_{50}	letální dávka – dávka, při které zemře 50% testovaných jedinců ($mg \cdot kg^{-1}$)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
m-AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem
MS	hmotnostní detektor
MVCN	uhlíkové nanotrubičky
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
pH^f	pH směsi pufru s methanolem
r.č.	registrační číslo
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SV	Simvastatin
SWV	square wave voltametrie
t	čas (d)
t_0	čas na počátku měření
TBC	tuberkulóza
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
v_{scan}	rychlost skenu
λ	vlnová délka (nm)

Obsah

1. TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1. CÍL PRÁCE	10
1.2. SIMVASTATIN	10
1.2.1. <i>Toxikologické a chemické vlastnosti, syntéza</i>	12
1.2.2. <i>Metabolismus</i>	13
1.2.3. <i>Metody stanovení</i>	15
1.3. UHLÍKOVÁ PASTOVÁ ELEKTRODA.....	17
1.4. STŘÍBRNÁ TUHÁ AMALGÁMOVÁ ELEKTRODA	20
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.1. ZAŘÍZENÍ A PŘÍSTROJE	23
2.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	23
2.3. PRACOVNÍ POSTUPY	25
2.3.1. <i>Příprava pracovních roztoků</i>	25
2.3.2. <i>Příprava modelových roztoků léčiv</i>	25
2.3.3. <i>Příprava uhlíkové pastové elektrody</i>	26
2.3.4. <i>Aktivace amalgámové elektrody</i>	26
2.3.5. <i>Cyklická voltametrie</i>	27
2.3.6. <i>Diferenční pulzní voltametrie</i>	27
2.3.7. <i>DC Voltametrie</i>	28
2.3.8. <i>Měření stálosti zásobního roztoku</i>	28
2.3.9. <i>Měření obsahu simvastatinu v léčivech</i>	29
2.3.10. <i>Vyhodnocení výsledků</i>	29
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	30
3.1. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ SIMVASTATINU NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ.....	30
3.1.1. <i>Cyklická voltametrie na CPE</i>	31
3.1.2. <i>Stálost zásobního roztoku simvastatinu</i>	32
3.1.3. <i>DC voltametrie na CPE</i>	35
3.1.4. <i>Diferenční pulzní voltametrie na CPE</i>	41
3.2. STANOVENÍ SIMVASTATINU V LÉČIVĚCH	46
3.3. STANOVENÍ SIMVASTATINU NA RTUŤOVÝM MENISKEM MODIFIKOVANÉ STŘÍBRNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ	50
4. ZÁVĚR	66
5. LITERATURA	68

1. Teoretická část

1.1. Cíl Práce

Tato diplomová práce měla následující cíle:

1. Zjistit vhodné složení uhlíkové pasty pro stanovení simvastatinu.
2. Charakterizovat elektrochemické chování simvastatinu pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC („direct current“) voltametrie (DC) na uhlíkové pastové elektrodě.
3. Zjistit optimální podmínky pro stanovení a možnost využití uhlíkové pastové elektrody pro stanovení simvastatinu v různých lékových formách.
4. Charakterizovat elektrochemické chování simvastatinu pomocí stříbrné amalgámové elektrody modifikované rtuťovým meniskem (m-AgSAE) s využitím DPV a následná aplikace této metody pro stanovení simvastatinu v reálných vzorcích desetinasobně zředěné a neředěné moči.

1.2. Simvastatin

Simvastatin (viz obr 1.1) je látka používaná při léčbě hyperlipidémie, což je stav, při kterém dochází ke zvýšení hladiny lipidů v krvi. Tento stav zvyšuje riziko pro vznik aterosklerózy, cévní mozkové příhody nebo onemocnění kardiovaskulárního systému.[1,3,4] Chronické ukládání lipidů do cévní stěny může vést ke změnám v mozku a tyto strukturální změny mohou souviset se vznikem deprese. [4] Simvastatin patří mezi statiny, což jsou látky, které působí jako inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reductasy (HMG-CoA reductasy). Tento enzym se účastní metabolismu cholesterolu.[5-9] Hlavní úlohou statinů v organismu je snižovat hladinu cholesterolu v krvi, konkrétně hladinu LDL cholesterolu.[10-13] Simvastatin se nejčastěji podává perorálně ve formě tablet. Do organismu se simvastatin dostává jako proléčivo ve formě neaktivního laktonu, který je v játrech biotransformován pomocí hydrolytických procesů na vlastní aktivní léčivo.[2, 6-8]

Statiny mají v organismu mnoho dalších biologických funkcí, působí jako imunomodulátory, protizánětlivé látky nebo vazodilatační látky[13,20-23] Je třeba ovšem zmínit, že léčba statiny není bez rizika. Statiny, jako všechna léčiva, mohou mít řadu

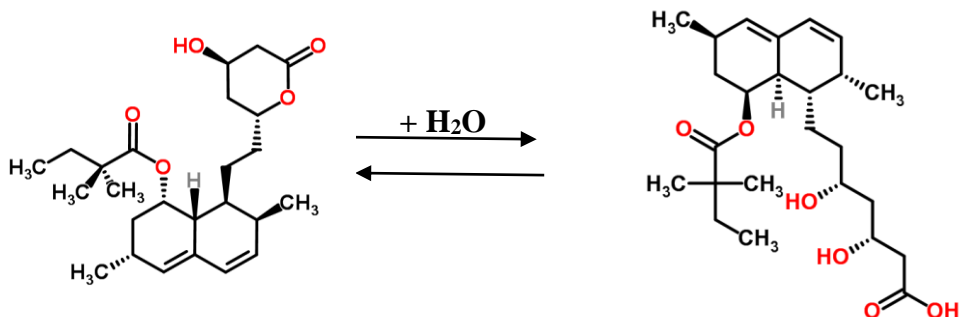
vedlejších efektů a ve většině případů nežádoucích efektů. Jedním z nich je statiny indukovaná myopatie. [10,14,15,19] Mezi klinické projevy myopatie patří svalová bolest a ochablost svalů. Přesný mechanismus vzniku myopatie zatím nebyl objasněn. Při myopatii dochází k degradaci svalové tkáně tzv. rabdomyolýze, která je provázena uvolněním velkého množství myoglobinu do krve, který může způsobit selhání ledvin. Bylo prokázáno, že před vlastním nástupem myopatie dochází k charakteristickému zvýšení hladiny kreatinkinasy. Pokud se hodnoty laboratorních testů zvýší trojnásobně, doporučuje se terapii ukončit. Předpokládá se, že poškození svalů nastává v důsledku poškození elektronového transportu v dýchacím řetězci v mitochondriích svalových buněk.[16-18,52] Dále dochází ke zvýšení rizika vzniku diabetu druhého typu. Na myších modelech bylo prokázáno, že dochází k inhibici syntézy i sekrece inzulinu v β buňkách pankreatu. [15] O simvastatinu se hovoří i v souvislosti s ovlivněním krevního tlaku. Předpokládá se, že simvastatin snižuje synaptickou odpověď a snižuje odpověď na angiotensin II.[24] Simvastatin by měl mít vliv na hladinu testosteronu [25], tachykardii [30] nebo léčbu tuberkulózy. Přesný mechanismus léčby TBC není znám, ale předpokládá se, že dochází ke snížení zásob lipidů v makrofázích, které se podílejí na výživě mykobaktérii a tím dochází k zastavení jejich růstu.[29] V poslední době se do popředí zájmu dostává také anabolická schopnost statinů, které se využívá zejména při léčbě nejruznějších onemocnění kostí. Byly provedeny různé studie, které ukázaly, že užívání simvastatinu vedlo k navýšení hustoty kostní tkáně a snížení výskytu zlomenin.[26-28]

Tab 1.1 základní informace o simvastatinu

Název	<i>Simvastatin</i>
Chemický název	(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8ahexahydronaphthalen-1-yl-2,2-dimethylbutanoat
Molekulový vzorec	C ₂₅ H ₃₈ O ₅
Molekulová hmotnost	418,60 g·mol ⁻¹
Registr. Číslo CAS	79902-63-9
Teplota tání	127 – 132 °C.[36]
Index lomu	1,63 [69]

1.2.1. Toxikologické a chemické vlastnosti, syntéza

Simvastatin použitý v této diplomové práci byl ve formě bílého prášku. Simvastatin je špatně rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v acetonitrilu nebo methanolu. [19,53] Doporučená denní dávka se pohybuje v rozmezí od 10 do 40 mg za den, konkrétní množství se přizpůsobuje podle individuálních potřeb pacienta.[16-18] Letální dávka pro akutní toxicitu při orálním podání pro krysou LD₅₀ je 4,438 mg·kg⁻¹. V chování krysy došlo k pozorovatelným změnám. Její aktivita byla celkově utlumena, došlo ke zkrácení doby spánku a dávka měla vliv i na vzpřimovací reflex. Smrtelná dávka při intraperitoneálním podání pro krysou LD₅₀ je 705 mg·kg⁻¹. Tato dávka měla vliv na smyslové orgány, hlavně na oči, které začaly slzet. Další působení bylo sledováno na svalstvu, které se křečovitě stáhlo.[36] Jak je vidět na obrázku 1.1, simvastatin je tvořen laktonovým kruhem. Tuto strukturu obsahuje neaktivní forma simvastatinu. Tato neaktivní forma je biologicky degradována na aktivní formu, kterou je hydroxykyselina simvastatinu. Přechod simvastatinu mezi těmito dvěma polohami je reverzibilní v závislosti na prostředí, ve kterém se simvastatin nachází. [45] Schéma přechodu mezi jednotlivými formami je vidět na obrázku 1.1



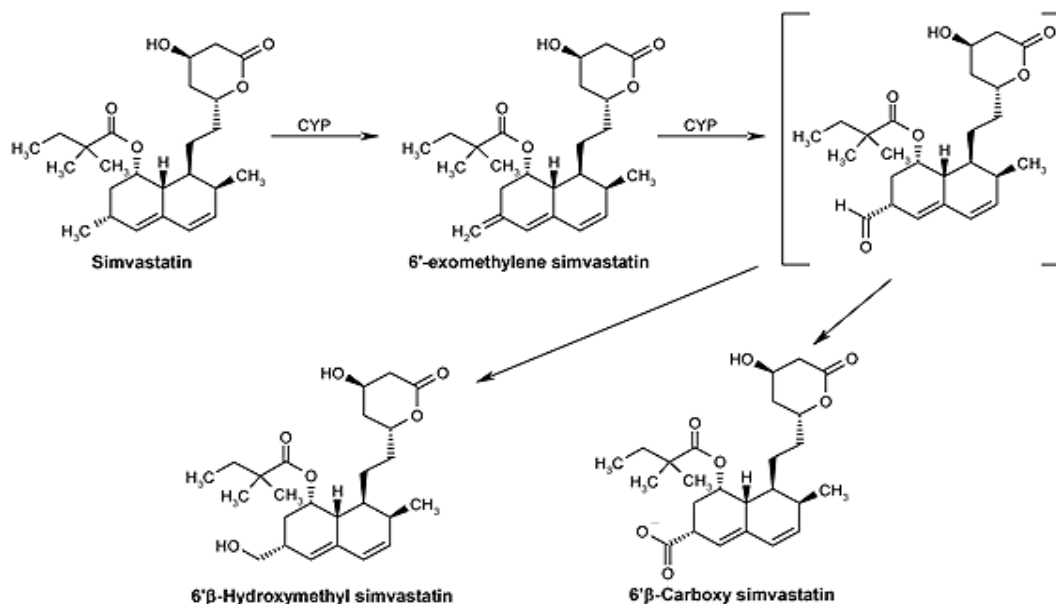
Obr 1.1 Reakce konverze simvastatinu na jeho hydroxykyselinu

Syntéza simvastatinu vychází z jeho prekurzoru, kterým je lovastatin. Struktura lovastatinu a struktura simvastatin jsou si velmi podobné a liší se pouze počtem methylů na esterovém postranním řetězci. Přeměna lovastatinu na simvastatin ovšem probíhá přes velké množství kroků a simvastatin nelze připravit přímou alkylací lovastatinu. Důvodem je vyšší kyselost α vodíků laktonu oproti α vodíkům postranního esterového řetězce.[40] Reakce mohou probíhat různými mechanismy. Jedním z nich je postup zahrnující osm kroků. Tento postup vychází z lovastatinu, který reaguje s benzylaminem za vzniku amidu. Tento amid podléhá další řadě reakcí. Posledním krokem je hydrolýza a laktonizace za vzniku konečného produktu, kterým je simvastatin.[37-40]

1.2.2. Metabolismus

Statiny patří mezi inhibitory HMG-CoA reductasy. Statiny inhibují enzym, který je zodpovědný za konverzi HMG-CoA na mevalonát. Tento krok je velmi důležitý, protože určuje rychlost biosyntézy cholesterolu. Statiny se podílejí na redukcí hladiny lipidů v krvi. Snižují hlavně hladinu LDL cholesterolu. LDL cholesterol vzniká z lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Ke snižování hladiny LDL cholesterolu dochází hlavně snížením syntézy VLDL částic a mechanismem inhibice receptoru pro LDL cholesterol. Inhibice receptoru má za následek zvýšení katabolismu a snížení syntézy LDL cholesterolu.[6-8] Simvastatin se do těla nejčastěji dostává perorální cestou ve formě neaktivního proléčiva. Neaktivní laktonová forma přechází vlivem jaterního metabolismu na aktivní hydroxykyselinu. [31,32] Simvastatin je metabolizován na 4 hlavní primární

metabolity 6 β -karboxy simvastatin, 6'-exomethylen simvastatin, 6 β -hydroxymethyl simvastatin, a 3'-hydroxy simvastatin.[2] Struktura hlavních metabolitů je vidět na obrázku 1.2.



Obr 1.2 Metabolity simvastatinu [70]

Simvastatin se přeměňuje na aktivní formy v játrech působením hydrolytických enzymů. Simvastatin velmi výrazně podléhá tzv. first pass efektu. Což je jiný název pro presystémovou eliminaci léčiva. Dochází k tomu, že se léčivo dostane do jater, kde podléhá metabolickým přeměnám. Do celkové cirkulace se tedy nedostane tolik účinné látky, kolik jí bylo v podané dávce a dané léčivo má na pacienta mnohem menší vliv. Při perorálním podání dochází k rozložení tablety v prostředí žaludečních kyselin. Z tablety se uvolní účinná látka, která přechází do krve a je transportována do jater, kde se metabolizuje. Z jater se do celkové cirkulace dostává jen nepatrné množství, asi jen 5% z podané dávky. Zůstává velmi silně vázána na proteiny krevního séra, konkrétně na albumin z 95 %. Močí je vyloučeno jen asi 0,03% aktivních metabolitů po intravenózní aplikaci dávky.[6-8,35,71] Clearance (objem plazmy očištěné ledvinami od určitého množství simvastatinu za jednotku času) simvastatinu je $525 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Biologický poločas simvastatinu je 2 hodiny. [35]

Hlavní enzymy, které se podílejí na metabolismu simvastatinu, patří do skupiny cytochromu P 450 (CYP 450). Simvastatin je z více jak 80% metabolizován pomocí CYP 450 z podskupiny CYP 3A4/5 a v menší míře, asi z 20%, z podskupiny CYP 2C8. [32,32] Simvastatin je aktivně vychytáván jaterními buňkami pomocí transportéru OATP1B1. [6-8] Metabolismus statinů je zatížen velkou interakcí s nejrůznějšími léčivými a v průběhu léčby je třeba na tyto interakce myslet, protože mohou přispět ke vzniku závažnějších komplikací, jako je statiny indukovaná myopatie. Mezi interagující léčiva patří např. Warfarin, Digoxin, Erytromycin, cyklosporin nebo fibráty. [34,35]

1.2.3. Metody stanovení

Simvastatin, jak již bylo řečeno, patří do skupiny léčiv zvané statiny. Tato skupina je v dnešní době hojně využívána. Díky této oblíbenosti existuje velké množství technik a postupů pro detekci simvastatinu v biologických vzorcích i v tabletách. Mezi nejčastěji užívané techniky patří chromatografie a to jak HPLC tak GC v kombinaci s MS detekcí [41-45,47,50]. Dále spektrofotometrie [55], kolorimetrie [48] a voltametrie [49,51,54,56,57] nebo micelární elektrokinetická chromatografie.[46] Elektroanalytické metody jsou metody rychlé, levné a technicky nenáročné.[41]

Z voltametrických technik byl simvastatin stanovován pomocí square-wave voltametrie (SWV). Toto měření bylo prováděno v tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla statická rtuťová elektroda s průměrem 0,026 cm². Měření bylo prováděno v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ Na₂B₄O₇ – KH₂PO₄ pufru, jehož pH bylo 7. Tato studie ukázala, že redukce simvastatinu na rtuťové elektrodě probíhá na jejím povrchu. Reakce je reverzibilní při nízké frekvenci a kvazireverzibilní při vysoké frekvenci. [54]

Dále byla použita cyklická voltametrie (CV). Pracovní elektrodou byla elektroda z uspořádaných uhlíkových nanočástic. Tyto nanočástice byly nanášeny na vodivý Ta substrát, pomocí katalytické parní depozice. Takto připravené uhlíkové nanočástice byly modifikovány dihexadecylhydrogen fosfátem (DHP). Měření bylo prováděno v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ PBS jehož pH bylo 4 a rychlost skenu byla 20 mV za sekundu. Byl sledován vliv reakčních podmínek a interferencí při stanovování simvastatinu a stanovení simvastatinu v tabletách. Ukázalo se, že při druhém a každém dalším skenu došlo k vymizení oxidačního píku simvastatinu. Toto vymizení je pravděpodobně dáno silnou adsorpcí simvastatinu na povrchu elektrody, v místě, kde se vyskytuje DHP. Při adsorpci

dojde k vytvoření kompaktního filmu, který brání kontaktu simvastatinu s povrchem pracovní elektrody. [49]

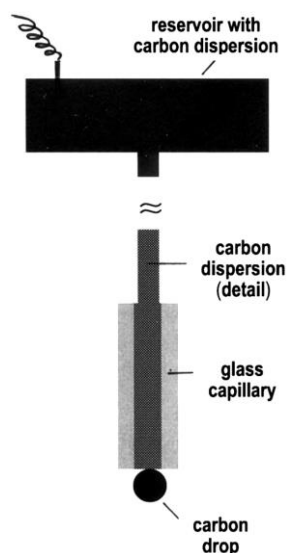
Při jiné voltametrické studii (CV, DPV, SWV), byla jako pracovní elektroda použita disková elektroda ze skelného uhlíku (GCE). Pro CV bylo měření prováděno v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. V průběhu celého měření byl zachován 20% obsah methanolu. Měření pomocí CV ukázalo, že oxidace simvastatinu probíhá ireverzibilně. Při druhém skenu došlo ke snížení výšky píku. Toto snížení je pravděpodobně opět dáno adsorpcí simvastatinu či produktů jeho elektrochemické transformace na povrchu elektrody. Při zvyšujícím se pH došlo k postupné změně píku na vlnu, a tím pádem došlo ke zhoršení kvantifikace. DPV i SWV byly využity při stanovení simvastatinu v lékových formách a při stanovení v biologických vzorcích. Pomocný elektrolyt byla opět $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. DPV byla využita pro stanovení obsahu simvastatinu v tabletách. Mez detekce pro DPV byla $2,7\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikaci byla $9,0\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U DPV nemusí být vzorek žádným způsobem upravován. Pomocí SWV byl sledován simvastatin i v biologických vzorcích, konkrétně v lidském séru a moči. Vzorky byly precipitovány pomocí acetonitrilu a následně zcentrifugovány. Ze zcentrifugovaného vzorku se odebral supernatant, který byl naředěn pomocným elektrolytem na požadovanou koncentraci a přímo stanovován. Mez detekce pro tuto techniku byla $5,50\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mez kvantifikace byla $1,83\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. [56] Přehled měřicích technik a podmínek měření je uveden v tabulce 1.2.

Tah 1.2 Přehled voltametrických technik pro stanovení simvastatinu

Druh voltametrie	Pracovní elektroda	Potenciál píku (V)	Měřící prostředí	Citace
SWV	Rtuťová statická elektroda	-1,45	0,1 mol·l ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ - KH ₂ PO ₄ , pH = 7	54
CV	MWCN elektroda, modifikovaná DHP	1,2	0,1 mol·l ⁻¹ PBS, pH= 4 v _{scan} = 20 mV·s ⁻¹	49
CV	GCE modifikovaná uhlíkovými nanočásticemi a DHP	1,18	0,1 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ (20% methanolu)	56

1.3. Uhlíková pastová elektroda

Před více jak půl stoletím byl publikován první článek, který představil nový typ elektrody. Touto elektrodou byla právě uhlíková pastová elektroda (CPE). Článek prezentoval Ralph Norman Adams z univerzity v Kansasu. Původní myšlenkou bylo vyrobit nový typ elektrody, která by byla vhodná pro měření anodických oxidací organických látek. Tato nová elektroda měla nahradit hojně využívanou kapající rtuťovou elektrodu, která se pro měření anodických oxidací nehodí. První model uhlíkové elektrody tedy napodoboval rtuťovou elektrodu. Tato první elektroda se nazývala kapající uhlíková elektroda (DCE). Její model je vidět na obrázku 1. 3. [64]



Obr 1.3 schéma DCE. Převzato z [64]

Model kapající elektrody se ovšem neosvědčil a přešlo se k jiné kompozici elektrodového materiálu a to k pastě. Tato pasta je složena z uhlíkového prášku a pojiva. Uhlíkový prášek tvoří hlavní komponentu pasty. Uhlíkových prášků, které se používají pro přípravu uhlíkových past, existuje velké množství variant např. grafitizovaný uhlík, prášek ze skelného uhlíku, prášek z uhlíkových nanočástic či uhlíkových nanovláken. Jednotlivé druhy uhlíkových částic musí splňovat několik základních požadavků: [57,60,62,65,66]

- Velikost uhlíkových částic musí být v řádech mikrometrů
- Částice by měly být uniformní a chemicky čisté
- Měly by mít nízkou absorpční kapacitu

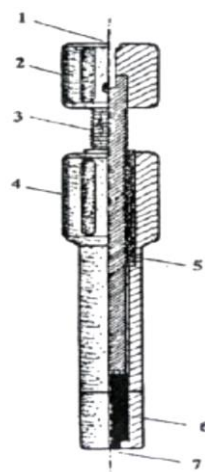
Další důležitou komponentou je pojivo. Jedná se o lipofilní organickou kapalinu, které drží pohromadě jednotlivé uhlíkové částice. Nejčastějším pojivem jsou různé druhy olejů např. minerální olej, silikonový olej, polychlortrifluorethylen, atd. [59,63]

CPE, mají celou řadu výhod, mezi které patří možnost chemické modifikace povrchu, rychlá obnovitelnost povrchu elektrody, nízký proud pozadí a široké potenciálové okno. [62,63] Potenciálové okno se u uhlíkových elektrod vyskytuje v rozmezí -1,5V až +1,3 V v závislosti na charakteru prostředí, ve kterém se elektroda

vyskytuje.[67] Nevýhodou uhlíkových pastových elektrod je poměrně nízká reprodukovatelnost výsledků, která je dána nestejným otírání povrchu o navlhčený filtrační papír.[63,67]

Další oblastí, která je v dnešní době poměrně populární, je oblast modifikace uhlíkových past. Tyto modifikace zlepšují elektrochemické vlastnosti elektrody. Mezi nejčastější modifikátory patří aromatické aminy, azosloučeniny, zeolity, silikáty nebo nejčastěji kovové filmy.[57,58] Jednou z nejnovějších oblastí je modifikace pomocí DNA. Této modifikaci se využívá pro sledování vlivu chemických látek na strukturu nukleových kyselin nebo na degradaci DNA.[61] K modifikaci pasty může docházet buď v celém jejím objemu, nebo jen na jejím povrchu. Pokud dochází k modifikaci v celém objemu pasty, jsou tyto pasty selektivní jen pro určitý analyt. V případě, že dochází k modifikaci jen na povrchu má tato elektroda širší využití, protože se modifikuje jen vrchní vrstva filmu, která může být snadno odstraněna a znovu modifikovaná jiným modifikátorem.[67] Pro stanovení statinů se využívají spíše jiné druhy uhlíkových elektrod zejména elektrody ze skelného uhlíku. Tyto elektrody se také modifikují. Mezi nejčastější modifikátory v případě statinů patří DHP nebo MVCN, které vylepšují povrchové vlastnosti elektrody.[68]

U přípravy uhlíkových past je potřeba dodržet určitá pravidla. Jedním s těchto pravidel je nutnost nechat ustanovit rovnováhu v čerstvě připravených pastách. Tato rovnováha se ustanovuje alespoň 24 h, po uplynutí této doby by již mělo být chování elektrody konstantní. Dalším pravidlem je nutnost uchování naplněné elektrody v nádobě s destilovanou vodou, aby se zabránilo postupnému vysychání pasty.[63] Připravená pasta se pak plní do dutiny v těle elektrody. Schéma těla elektrody je na obrázku 1.4.



Obr 1.4

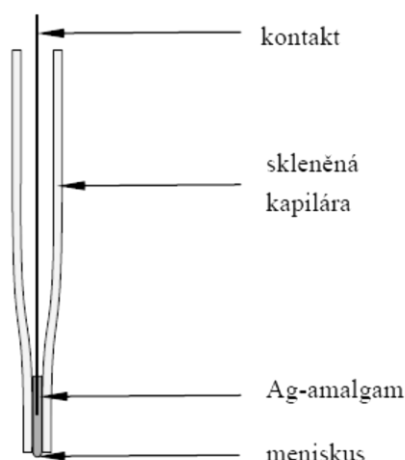
Schematický náčrt pouzdra uhlíkové pastové elektrody. 1- zdířka pro elektrický kontakt, 2- teflonová hlava, 3- píst se závitem, 4- tělo elektrodového pouzdra, 5- ocelová vložka se závitem, 6- dutina naplněná uhlíkovou pastou. Převzato z [67]

1.4. Stříbrná tuhá amalgámová elektroda

V posledních letech je novým trendem v analytických metodách tzv. zelená analytická chemie. Tento trend má za cíl snížit dopad analytické chemie na životní prostředí. V souvislosti s životním prostředím je velmi diskutovaným tématem toxicita rtuti. Díky nepodloženým obavám z toxicity došlo k omezení užívání rtuťových elektrod. Vznikla tedy potřeba nahradit rtuť jiným, méně toxickým materiálem. Jako vhodný adept se jeví právě amalgámové elektrody, které vznikly na ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR. [73-75,77] Amalgámové elektrody můžeme rozdělit na několik typů podle povrchu amalgámu: [74]

- Leštěné – pevná amalgámová elektroda bez obsahu kapalné rtuti (p-MeSAE)
- Filmové – leštěná amalgámová elektroda pokrytá filmem kapalné rtuti (MF-MeSAE)
- Meniskové – leštěná amalgámová elektroda se rtuťovým meniskem (m-MeSAE)
- Kompozitní – založeno na bázi jemného amalgámového prášku a pevného polymeru (MeSA CE)
- Pastové – pasta složená s jemného prášku pevného amalgámu a pastového pojidla.

V této práci byla využita stříbrná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem. Konstrukčně je amalgámová elektroda poměrně jednoduchá. Schéma elektrody je na obrázku 1.5. [77]



Obr. 1.5

Schéma těla amalgámové elektrody modifikované rtuťovým meniskem. Převzato z [77].

Amalgámové elektrody se svým elektrochemickým chováním podobají stříbrným elektrodám, ale potenciálové okno je srovnatelné s potenciálovým oknem rtuťové elektrody. [77] Amalgámové elektrody jsou spolu se rtuťovými elektrodami vhodné pro měření v katodické oblasti, díky velkému přepětí vodíku. Další výhodou je široké potenciálové okno, které umožňuje akumulovat řadu kovů. Pro oblast oxidací nejsou amalgámové elektrody příliš vhodné, protože dochází k oxidaci elektrodového materiálu. [74]

S amalgámovými elektrodami je možné stanovovat různé anorganické ionty kovů (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} a Cd^{2+}), což je velmi důležité pro monitoring těžkých kovů v životním prostředí, kontrolu biologických vzorků a technologických procesů. [73,76] Tvorby komplexů s různými kovy se využívá pro stanovení léčiv v biologických vzorcích, což umožňuje kontrolu správného nastavení léčby. [72, 79] Další možností je využít amalgámové elektrody pro sledování poškození DNA. [78, 81]

Pro správné fungování amalgámové elektrody je třeba zajistit amalgamací, regenerací a aktivací povrchu. Amalgamací se rozumí obnovení rtuťového menisku. Obnovení se provádí jednoduchým ponořením vyleštěné elektrody do kapalné rtuti. Regenerace povrchu slouží pro odstranění oxidů a adsorbovaných látek, což má za následek zlepšení citlivosti a reprodukovatelnosti výsledků. Regenerace se provádí vždy před začátkem každého měření. K regeneraci se může využít cesta chemická, elektrochemická a mechanická. Aktivace povrchu elektrody probíhá při vloženém potenciálu -2200 V po dobu 300 s v $0,2\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ KCl}$. [73,77,80]

2. Experimentální část

2.1. Zařízení a přístroje

Pro měření byl použit Eco-Tribo Polarograf (PolaroSensors, ČR) s využitím softwaru Polar PRO, verze 5.1. (PolaroSensors, ČR). K měření bylo použito tříelektrodového uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda o průměru 2mm nebo pevná amalgámová elektroda o průměru 0,5 mm modifikovaná rtuťovým meniskem (č. 04-2010-04, PolaroSensors, ČR). Referentní elektrodou byla elektroda argenchloridová ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, EcoTrend Plus, ČR) a pomocnou elektrodou byla elektroda platinová (EPT CZ, EcoTrend Plus, ČR).

K měření absorpčních spekter byl použit spektrofotometr Agilent Technologies 8453 a křemenné kyvety o měrné tloušťce 10 mm.

Chromatografické měření bylo prováděno technikou HPLC s UV detekcí na koloně LiChrosphere 100 RP-18 ($5\mu\text{m}$, průměr 4,6 mm, délka 25 cm). Byla použita gradientová pumpa (Beta, Ecom, ČR). Detekce probíhala na UV detektoru při vlnové délce 238 nm (Sapphire UV/VIS Variable Wavelength Detector, Ecom, ČR). Vzorokly léčiv byly dávkovány injekční stříkačkou o objemu 2,5 ml s využitím stříkačkových filtrů (membrane Nylon (PA), $0,45\mu\text{m}$, 25mm filter bright green). K vyhodnocování byl použit program Clarity Lite (DataApex, Praha).

Hodnota pH všech roztoků byla měřena pomocí pH metru (CyberScan pH/Ion 510, Eutech Instruments, Singapur), který byl kalibrován standardními vodnými pufrů při laboratorní teplotě.

2.2. Chemikálie a roztoky

- Simvastatin, (sekundární farmaceutický standart, 1g, Sigma Aldrich, ČR)
- Kyselina trihydrogenboritá (Lech-ner, Neratovice, čistota p. a.)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (84-87%, $\rho = 1,70 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, Lachema Brno, čistota p. a.)
- Kyselina octová (98 %, $\rho = 1,060 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, Lachema Brno, čistota p. a.)
- Hydroxid sodný (Lachema Brno, čistota p. a.)

- Deionizovaná voda, připravená systémem Millipore Q-plus System (Millipore, USA).
- Mikrokryalický grafit CR-2 (99,5%, zrnitost 3,5-5,5 μm , Graphite Týn, ČR)
- Mikrokuličky ze skelného uhlíku (zrnitost 0,4-12 μm , typ 2, Alfa Aesar)
- Minerální olej (Fluka)
- Methanol (pro LC-MS $\geq 99\%$, Fluka, chromatografická čistota)
- Chlorid draselný (Lachema Brno, čistota p. a.)
- Dusičnan kademnatý tetrahydrát (Lachema Brno, čistota p. a.)
- Kapalná rtuť (99,999%, Bono s.r.o., Bechyně)
- Léčivo Simvacard 20 (Zentiva, č. š. 3800814, r. č. 31/517/00-C spotřeba do: 07/2017, deklarovaný obsah simvastatinu 20 mg)
- Léčivo Simgal 10 (TEVA Czech industrie s.r.o., č. š. 35250034, r.č.31/195/00-C, spotřeba do: 11/2016, deklarovaný obsah simvastatinu 20 mg)
- Léčivo Simvax 20 (Sandoz a Novalis comp., č. š. ER2009, r. č.31/012/00-C, spotřeba do: 02/2017, deklarovaný obsah simvastatinu 10 mg)
- Kyselina sírová (36%, $\rho = 1,83 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, Lachema Brno, čistota p. a)
- Acetonitril (LiChrosolv Reag. PhEur, grafit gard for liquid chromatografy, Merck, Darmstadt, Německo)
- Stříkačkové filtry (membrane Nylon (PA), 0,45 μm , 25mm filter bright green)

2.3. Pracovní postupy

Všechna voltametrická měření byla prováděna v tříelektrodovém uspořádání. Pomocnou elektrodou byla vždy elektroda platinová a referentní elektrodou vždy elektroda argentschloridová ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{KCl}$). Měření probíhala za laboratorní teploty. Při voltametrických měřeních bylo do odměrné baňky odpipetováno určité množství zásobního roztoku simvastatinu v methanolu, byl přidán methanol pro dosažení požadovaného obsahu 20 % (v/v) a roztok byl doplněn BR pufrům o příslušném pH na celkový objem 10 ml.

2.3.1. Příprava pracovních roztoků

Pro úpravu prostředí byl používán Brittonův-Robinsonův pufr. Tento pufr byl složen z kyselé a bazické části. Bazická část byla tvořena hydroxidem sodným, jehož koncentrace byla $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kyselou část tvořil roztok vzniklý smícháním kyseliny borité, kyseliny trihydrogenfosforečné a kyseliny octové, každá z použitých kyselin měla koncentraci $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Samotný BR pufr vznikl smícháním kyselé a bazické složky. pH BR pufru se pohybovalo v rozmezí 2 až 12. Zásobní roztok simvastatinu o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vznikl rozpuštěním 0,0042 g simvastatinu v methanolu a doplněním methanolem na konečný objem 10 ml.

2.3.2. Příprava modelových roztoků léčiv

Simvastatin byl stanovován také v léčivech Simvax 20, Simvacard 20 a Simgal 10. Zásobní roztoky léčiv byly připraveny stejným způsobem. Jedna tableta léčiva byla rozdrcena a následně rozpuštěna v 20 ml methanolu. Tento objem byl převeden do odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku na celkový objem 50 ml. U léčiva Simgal 10 byly rozdrceny tablety 2, aby byla zajištěna stejná koncentrace zásobních roztoků. Předpokládaná koncentrace takto připravených modelových zásobních roztoků byla $1,91\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřený roztok vznikl odpipetováním 2,10 ml zásobního roztoku léčiva do odměrné baňky a doplněním BR pufrům o pH 3 na celkový objem 10 ml.

Pro přípravu modelových roztoků léčiv, pro HPLC analýzu, byly rozdrceny 4 tablety léčiva Simvax 20 či Simvacard 20. U léčiva Simgal 10 bylo rozdrceno 8 tablet.

Zásobní roztoky byly jinak připraveny stejným způsobem, jak bylo uvedeno výše. Koncentrace zásobních roztoků byla $3,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřený roztok pro HPLC analýzu vznikl desetinásobným nářadím zásobního roztoku léčiva. Standardní roztok vznikl rozpuštěním 40 mg simvastatinu v methanolu a doplněním methanolem na celkový objem 25 ml. Měřený roztok vznikl desetinásobným zředěním výše uvedeného roztoku methanolem. Předpokládaná výsledná koncentrace měřeného modelového roztoku při HPLC analýze byla $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

2.3.3. Příprava uhlíkové pastové elektrody

Uhlíková pasta z mikrokrystalického uhlíku byla připravena smícháním 250 mg mikrokrystalického uhlíku CR-2 (Mikrokrystalický grafit CR-2 ,99,5%, zrnitost 3,5-5,5 μm , Graphite Týn, ČR) a 100 μl minerálního oleje (Fluka). Uhlíková pasta z mikrokuliček byla připravena smícháním 250 mg mikrokuliček ze skelného uhlíku (zrnitost 0,4-12 μm , typ 2, Alfa Aesar) a 100 μl minerálního oleje (Fluka). Takto vzniklá směs byla homogenizována v třecí misce. Po minimálně 5 min homogenizace, byla vzniklá pasta vpravena do teflonového těla elektrody. Takto připravená elektroda se nechala 24 hodin v klidu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla elektroda připravena k měření. V případě, že se s elektrodou nepracovalo, byla uchovávána tak, aby byl její povrch ponořen v destilované vodě, aby se zabránilo vysychání pasty. Před každým měřením byl povrch elektrody obnoven ořením o navlhčený filtrační papír.

2.3.4. Aktivace amalgámové elektrody

Amalgámová elektroda podléhala v průběhu měření pasivaci, a proto bylo potřeba obnovovat její povrch. Amalgamace povrchu probíhala ponořením vyleštěné suché amalgámové elektrody do lahvičky s kapalnou rtuť. Namáčení probíhalo 3-5 sekund, až došlo k vytvoření rtuťového menisku na povrchu amalgámu. Následně byl povrch elektrody aktivován. Aktivace probíhala v prostředí $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl při vložení potenciálu -2,2 V po dobu 5 min. Roztok byl po celou dobu probubláván dusíkem. Aktivace byla prováděna na počátku každého dne, kdy se s elektrodou pracovalo a další aktivace a amalgamace probíhala dle potřeby.

2.3.5. Cyklická voltametrie

Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda. Měření probíhalo při rychlosti polarizace $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřicí prostředí bylo tvořeno kyselou částí BR pufru s 20% methanolu, (v/v) a zásobním roztokem simvastatinu jehož koncentrace byla $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.3.6. Diferenční pulzní voltametrie

Pro měření v anodické oblasti, byla pracovní elektrodou uhlíková pastová elektroda, měření probíhalo při rychlosti nárůstu potenciál $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, šířce pulzu 100 ms a modulační amplitudě +50 mV. Pracovní prostředí bylo tvořeno BR pufrem o pH 3 s 20% metanolu (v/v) a určitým množstvím zásobního roztoku simvastatinu, jehož koncentrace byla $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro měření v katodické oblasti byla pracovní elektrodou stříbrná pevná amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem. Rychlost nárůstu pulzu byla $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, šířka pulzu 100 ms a modulační amplituda byla -50 mV. Měřený roztok byl tvořen BR pufrem o pH 2 s 20% methanolu a příslušným množstvím zásobního roztoku simvastatinu. Před začátkem každého prvního měření dané série, byl roztok probublán dusíkem po dobu 5 minuty. Při každém dalším měření v dané sérii, byl roztok probublán dusíkem po dobu 1 min. U stanovení simvastatinu v biologickém vzorku byla jako matrice použita desetinasobně zředěná moč. Moč byla naředěna BR pufrem o pH 2. Vzniklý měřený roztok byl tedy tvořen devíti díly BR pufru o pH 2 a jedním dílem moči. Před prvním měřením série byl roztok opět probublán dusíkem po dobu 5 minut a před dalším bylo bubláno po dobu 1min. Jako další matrice pro stanovení biologického vzorku byla použita neředěná moč. Pracovní prostředí tvořilo devět dílů moči a jeden díl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírové. Kyselina byla přidána z důvodu udržení pH pracovního roztoku na požadované hodnotě. Vzniklý roztok byl probubláván stejným způsobem, jak bylo uvedeno výše.

2.3.7. DC Voltametrie

Měření bylo prováděno v tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda. Měření probíhalo při rychlosti skenu $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pracovní prostředí tvořil BR pufr o pH 5,5 s 20% methanolu (v/v) a zásobní roztok simvastatinu, jehož koncentrace byla $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztok simvastatinu byl připraven v methanolu.

2.3.8. Měření stálosti zásobního roztoku

Stálost zásobního roztoku simvastatinu byla sledována pomocí UV/VIS spektrofotometrie a cyklické voltametrie. Zásobní roztok simvastatinu o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním vypočítaného množství simvastatinu v methanolu a doplněním methanolem po rysku na celkový objem 10 ml. Pro CV byla pracovní elektrodou uhlíková pastová elektroda. Měření probíhalo v prostředí kyselé části BR pufru s 20% methanolu (v/v) a určitého objemu zásobního roztoku simvastatinu. Výsledná koncentrace simvastatinu v měřeném roztoku byla $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření probíhalo při rychlosti polarizace $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Před začátkem každého měření byl obnoven povrch elektrody otřením o navlhčený filtrační papír. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při teplotě -18°C .

U UV/VIS spektrofotometrie probíhalo měření v 10 mm křemenné kyvetě. Rozsah měření byl od 235 nm do 800 nm. Jako blank byl použit čistý methanol. Koncentrace zásobního roztoku byla $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztok byl uchováván v mrazáku při teplotě -18°C .

2.3.9. Měření obsahu simvastatinu v léčivech

Technika DPV byla použita i pro určení obsahu simvastatinu v tabletách. Měření probíhalo při rychlosti nárůstu potenciál $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, šířce pulzu 100 ms a modulační amplitudě +50 mV. Pracovní prostředí bylo tvořeno BR pufrům o pH 3 a určitým množstvím zásobního roztoku daného léčiva. Očekávaná koncentrace vzorků z tablet byla $4\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace simvastatinu v tabletě byla určena metodou standardního přídatku.

Srovnávací metodou byla HPLC s UV detekcí při 238 nm. Byla použita kolona LiChrosphere 100 RP-18 ($5\mu\text{m}$, průměr 4,6 mm, délka 25 cm). Rychlost průtoku byla jeden mililitr za minutu. Analýza probíhala isokraticky. Mobilní fáze byla složena ze dvou složek. Složka A obsahovala acetonitril a 0,1% kyselinu fosforečnou (V/V, 50+50), složka B obsahovala 0,1% kyselinu fosforečnou v acetonitrilu.[82] Obě složky byly v průběhu analýzy míchány v poměru 1:1. Obsah simvastatinu v tabletách léčiv byl získán na základě porovnání získaných dat s daty, které poskytl standardní roztok. Jednalo se tedy o jednobodovou kalibraci. Pracovní roztoky léčiv pro obě metody byly připraveny podle návodu v kapitole 2.3.2.

2.3.10. Vyhodnocení výsledků

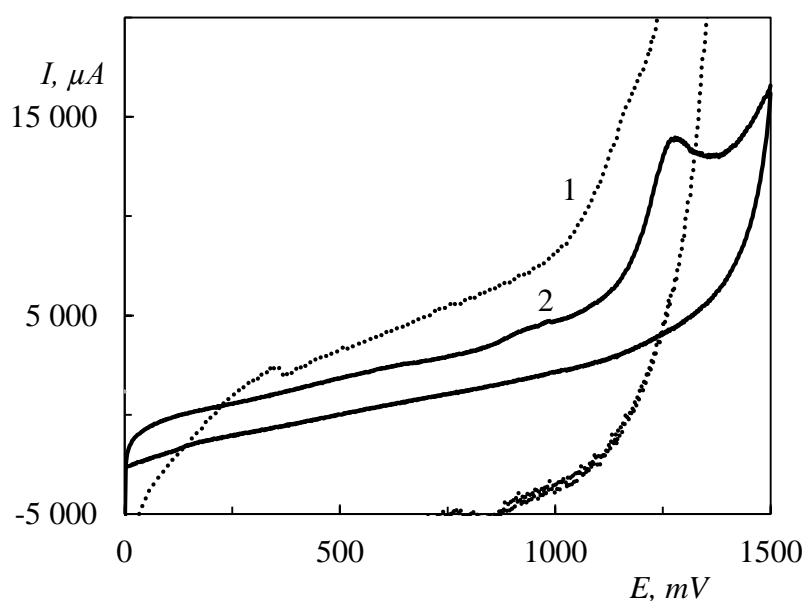
Způsob vyhodnocení výsledků se lišil podle použité techniky. U techniky DCV byla vzniklá vlna vyhodnocena pomocí protažení lineární části před nástupem vlny a po nástupu vlny a byl změřen proud odpovídající vzdálenosti těchto přímků při $E_{1/2}$, což je místo odpovídající polovině výšky vlny. U techniky DPV byla proložena spojnice minima u paty píku po jeho stranách a proud odpovídající výšce píku byl změřen od maxima píku k této spojnici. Grafy byly vytvořeny pomocí programu Excel 2013.

V grafech byly použity chybové úsečky, které ukazují interval spolehlivosti daného bodu. Interval spolehlivosti byl vypočítán s využitím Studentova rozdělení s hladinou významnosti 0,05. LOD byla určena výpočtem jako koncentrace odpovídající signálu vypočtenému z trojnásobku směrodatné odchylky patnácti opakovaných měření studované látky o nejnižší dosažené koncentraci v dané kalibrační závislosti. LOQ byla stanovena jako desetinásobek této směrodatné odchylky.

3. Výsledky a diskuze

3.1. Voltametrické stanovení simvastatinu na uhlíkové pastové elektrodě

Na počátku měření byly zvažovány dvě varianty složení uhlíkové pasty. První z nich byla uhlíková pasta, která byla tvořena minerálním olejem a grafitizovaným uhlíkem CR-2. Druhou variantou byla uhlíková pasta složená z minerálního oleje a mikrokuliček ze skelného uhlíku. Jak je vidět na obr 3.1 uhlíková pasta s grafitizovaným uhlíkem se simvastatinem neposkytovala žádný signál zřejmě vzhledem k užšímu potenciálovému oknu a většímu zbytkovému proudu. Proto byla v dalších měřeních používána jen uhlíková pastová elektroda naplněná pastou z mikrokuliček ze skelného uhlíku.

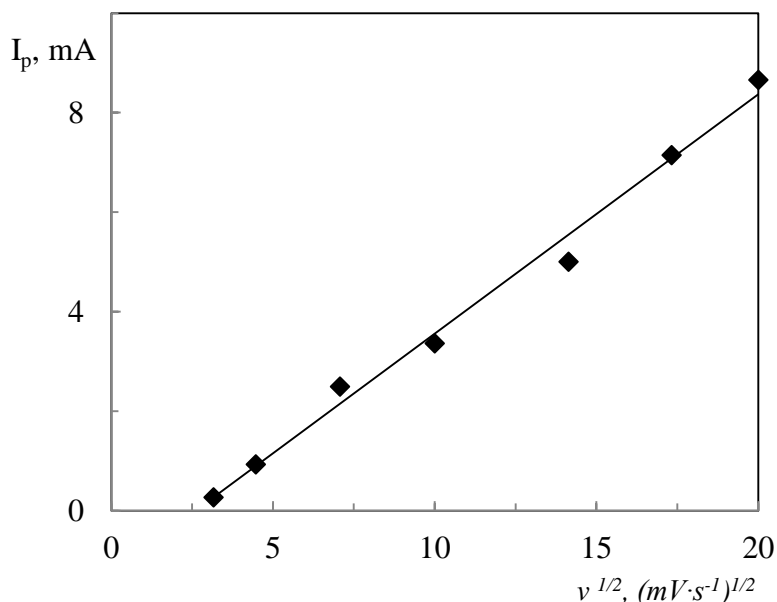


Obr 3.1

Cyklické voltamogramy simvastatinu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí kBR-MeOH na CPE. Pastová elektroda z grafitizovaného uhlíku CR-2 (1), uhlíková pasta z mikrokuliček ze skelného uhlíku (2).

3.1.1. Cyklická voltametrie na CPE

Cyklická voltametrie se používá pro charakterizaci elektrodoých procesů a reverzibility daného systému. V ideálním případě je pro reverzibilní redoxní systém rozdíl mezi potenciálem anodického a katodického píku roven $0,59/z$. Je-li systém reverzibilní, jsou píky při dopředném a zpětném sken stejně vysoké. V opačném případě, se jedná o systém ireverzibilní či kvazireverzibilní. Jak je vidět na obr 3.1 simvastatin v prostředí kyselé části BR pufru poskytuje signál, který odpovídá oxidaci simvastatinu. Redukční pík při zpětném skenu nebyl zaznamenán. Z toho vyplývá, že oxidace simvastatinu je ireverzibilní proces. Dále byla sledována závislost změny velikosti proudu píku simvastatinu I_p na druhé odmocnině rychlosti skenu. Rychlost skenu se pohybovala od 10 do 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Tato závislost je vidět na obrázku 3.2. Charakter této závislosti poskytuje informace o tom, je-li děj probíhající na povrchu elektrody řízen difúzí či adsorpcí. Difúzí je děj řízen v případě, že je výška proudu přímo úměrná odmocnině z rychlosti polarizace. Pokud je výška píku přímo úměrná rychlosti polarizace, pak je děj kontrolovaný adsorpcí. Ke stejným závěrům ohledně elektrodoých dějů dospěli i v článku [56].



Obr 3.2

Závislost velikosti proudu CV píku I_p na druhé odmocnině rychlosti skenu pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro CPE na bázi mikrokuliček ze skelného uhlíku v prostředí kBR-MeOH .

3.1.2. Stálost zásobního roztoku simvastatinu

Roztoky pro sledování stálosti zásobního roztoku byly připraveny podle návodu v kapitole 2.3.8. Ke sledování byla využita cyklická voltametrie a UV/VIS spektrofotometrie. Získané výsledky jsou vidět v tabulkách 3.1 a 3.2. Jak je vidět výsledky získané CV (tab. 3.1) a UV/VIS spektrofotometrii (tab. 3.2) se výrazně lišily. CV ukázala, že již v průběhu prvního dne dochází k výrazné degradaci simvastatinu. Od 8 dne dochází k ustanovení nové rovnováhy, a k další pozvolné degradaci až do 31 dne nedochází. Degradace v prvních 8 dnech se ve spektrofotometrickém měření neprojevila. Tento rozdíl výsledků je pravděpodobně dán tím, že degradace simvastatinu se neprojeví v absorpčním spektru zásobního roztoku simvastatinu. Míra degradace byla ověřena porovnáním hodnoty proudu či absorbance z měření v době t dní s hodnotou proudu či absorbance u čerstvě připraveného roztoku simvastatinu v daném dnu měření. Z výsledků stálosti získaných metodou CV, tedy jasně vyplývá, že díky degradaci látky je vhodné pro každý pracovní den připravovat čerstvý zásobní roztok. Ukázka spektra simvastatinu je na obrázku 3.3.

Tabulka 3.1

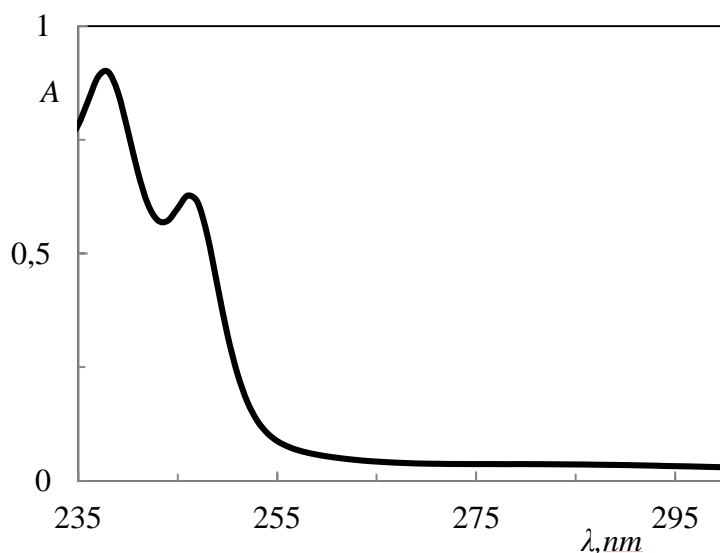
Výsledky sledování stálosti zásobního roztoku simvastatinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu. Stálost byla měřena pomocí CV na CPE v prostředí $\text{KBR} \cdot \text{MeOH}$ při potenciálu 1,2 mV.

Stáří zásobního roztoku (dny)	Velikost proud píku I_p (μA)	Poměr velikostí proudů píků v čase t a t_0 (%)
0	8,43	1
0,3	8,16	96
1	7,48	89
2	6,82	81
3	6,63	79
4	6,42	76
7	6,69	79
8	6,26	74
16	6,04	72
20	6,23	74
24	6,12	73
31	6,13	73

Tabulka 3.2

Výsledky sledování stálosti zásobního roztoku simvastatinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu. Stálost byla sledována pomocí UV/VIS spektrofotometrie, kdy bylo zaznamenáváno celé spektrum v rozsahu 235-800 nm. Měření bylo prováděno v 10 mm křemenné kyvetě proti methanolu. Absorpční maxima byla při 238 a 246 nm. Změna hodnoty absorpčních maxim je uvedena v tabulce.

Stáří zásobního roztoků (dny)	Hodnota A_{max} při 238 nm	Poměr A_{max} při 238 nm v čase t a t_0 (%)	Hodnota A_{max} při 246 nm	Poměr A_{max} při 246 nm v čase t a t_0 (%)
0	0,91	1	0,64	1
0,3	0,91	99	0,63	98
1	0,90	99	0,63	98
2	0,90	99	0,63	98
3	0,90	98	0,62	97
4	0,88	97	0,61	95
7	0,89	98	0,61	95
8	0,89	98	0,62	97
16	0,88	97	0,62	96
20	0,88	97	0,61	96
24	0,88	97	0,61	95
31	0,89	98	0,62	97



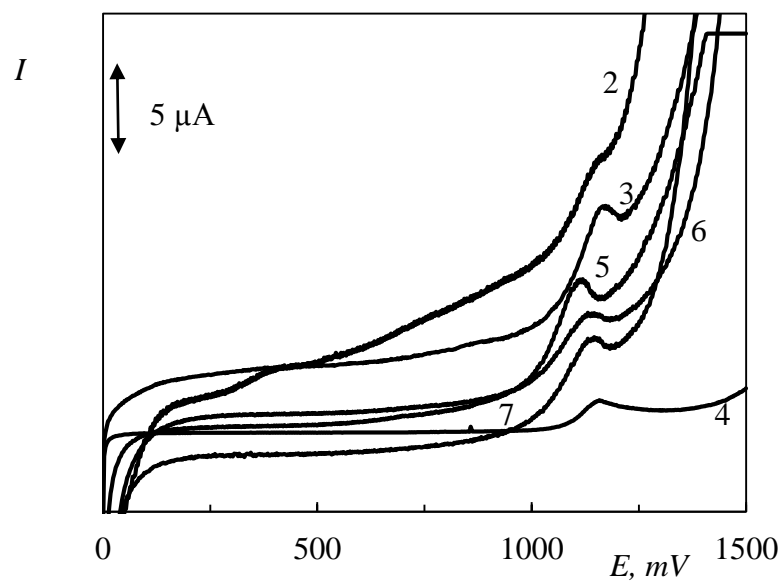
Obr 3.3

Absorpční spektrum simvastatinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu. Měřeno v křemenné kyvetě ($l = 10 \text{ mm}$) proti methanolu.

3.1.3. DC voltametrie na CPE

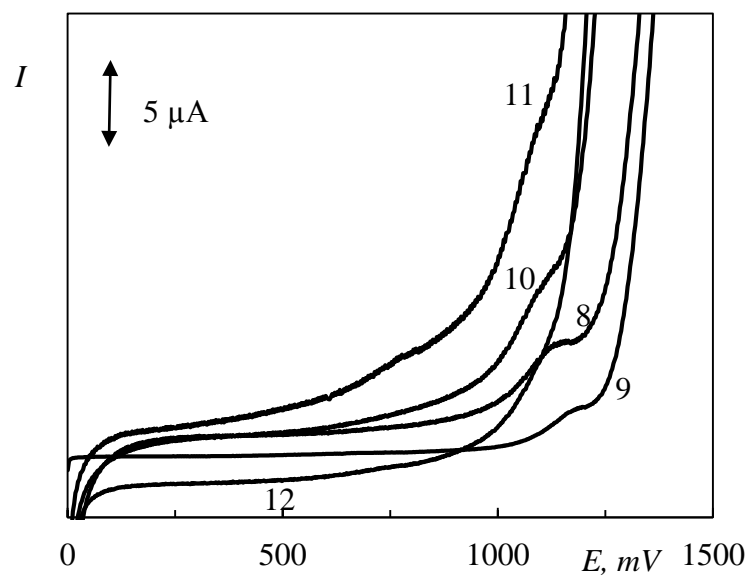
Pomocí DC voltametrie na CPE bylo sledováno chování simvastatinu v závislosti na pH BR pufru. Jak je vidět na obrázku 3.4 od pH 2 do pH 7 poskytoval simvastatin jeden dobře definovaný oxidační pík. S rostoucím pH docházelo ke změně dobře definovaného píku na hůře vyhodnotitelnou vlnu. Při pH větším než 10 už nebylo možné signál vyhodnotit. Změna píku znázorněna na obrázku 3.5. Nejlepší odezvu poskytovala CPE při pH 5,5. Závislost proudu píku na pH je uvedena v obrázku 3.6. Závislost potenciálu píku na pH je uvedena v obrázku 3.7.

K výraznému nárůstu hodnoty I_p i E_p došlo při pH 5,5. Tento nárůst je pravděpodobně dán přechodem simvastatinu na jeho hydroxykyselinu. Kyselina simvastatinu má hodnotu $pK_a 4,31 \pm 0,1$. Schéma přechodu je uvedeno v obrázku 1.1. Tato změna je reverzibilní v závislosti na hodnotě pH. Hydroxykyselina je účinnou formou simvastatinu, která se v organismu aktivně podílí na inhibici 3-HMGCo A reduktasy. Hodnota pH je tedy jedním z regulačních faktorů, který má vliv na účinek simvastatinu v organismu.[2]



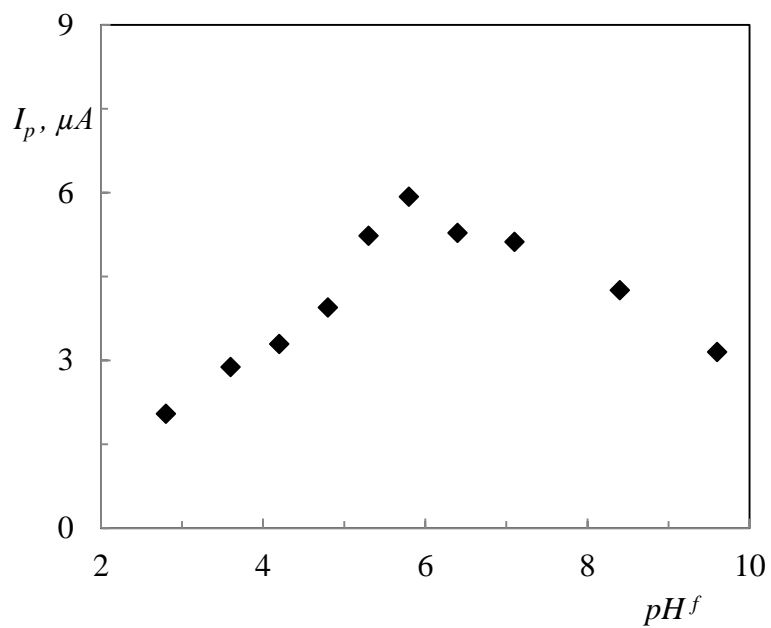
Obr 3.4

DC voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na CPE v prostředí BR-MeOH o pH 2 až 7. Čísla křivek odpovídají hodnotě pH.



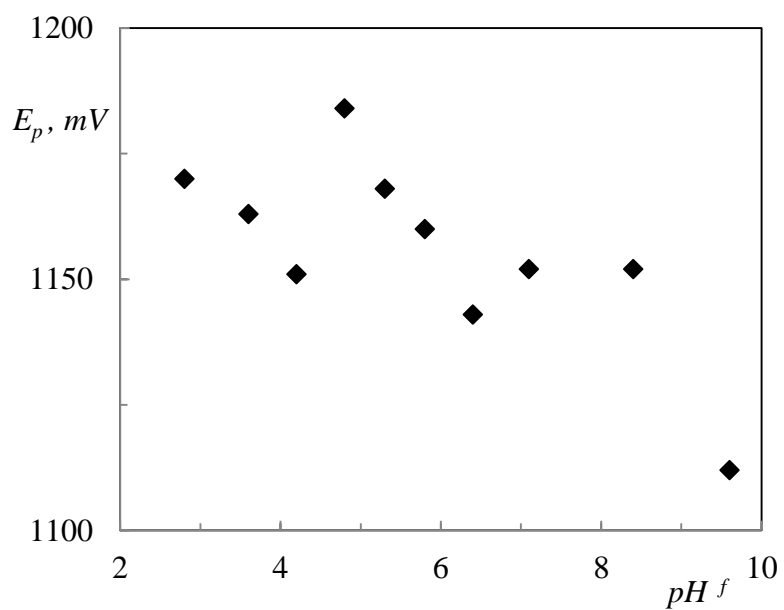
Obr 3.5

DC voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na CPE v prostředí BR-MeOH o pH 8 až 12. Čísla křivek odpovídají hodnotě pH.



Obr 3.6

Závislost výšky píku při DC voltametii na CPE na pH^f směsi BR-MeOH pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

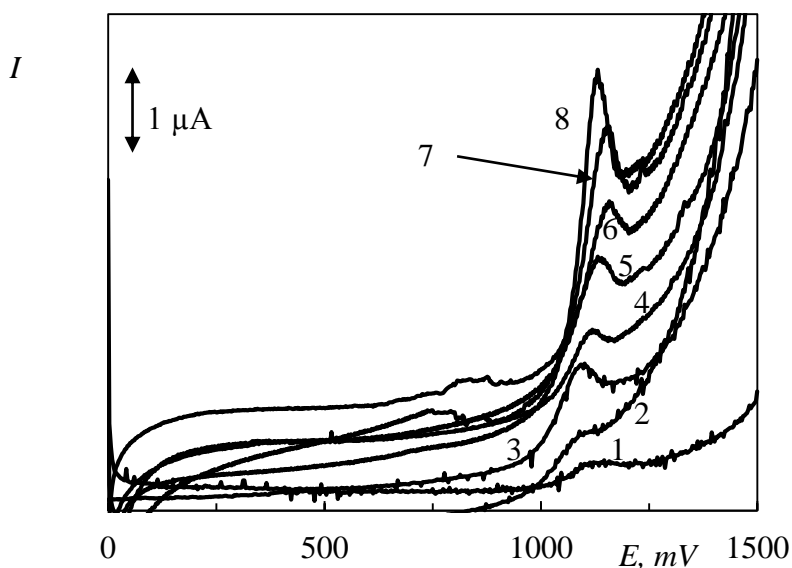


Obr 3.7

Závislost E_p při DC voltametii na CPE na pH^f směsi BR-MeOH pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

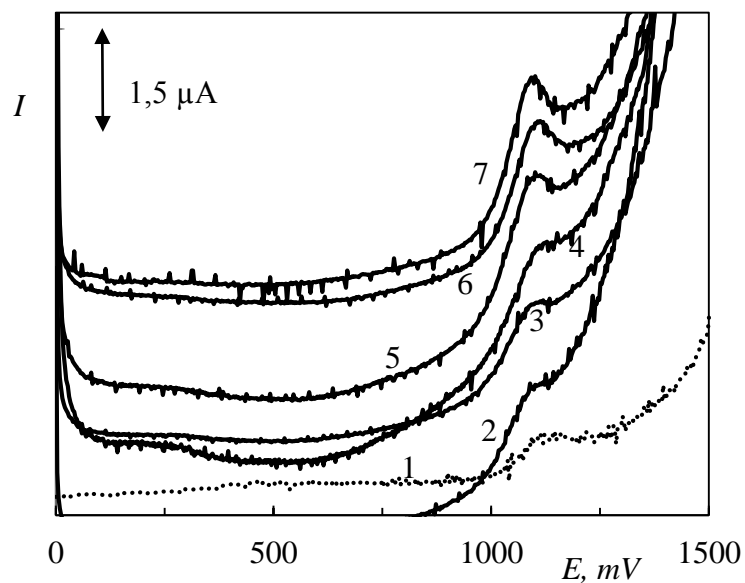
Kvůli nejlepší odezvě elektrody v BR pufru o pH 5,5, bylo právě toto pH zvoleno jako optimální prostředí pro měření kalibračních závislostí. Koncentrační závislost simvastatinu byla měřena v rozsahu 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí BR-MeOH. Rychlost skenu byla 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a potenciálový rozsah měření byl od 0 do 1500 mV. Závislost DC voltamogramů na koncentraci pro rozmezí od 10 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je na obrázku 3.9, pro rozmezí od 1 do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na obrázku 3.8. Závislost výšky píku na koncentraci je vidět na obrázku 3.10 a 3.11. Závislost byla v obou případech lineární. Parametry pro jednotlivé závislosti jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Kontrola opakovatelnosti měření byla prováděna opakovaným měřením nejnižší dosažené koncentrace ($c = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Z takto získaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka a z ní následně LOD a LOQ. Konkrétní hodnoty pro jednotlivé koncentrační rozmezí jsou uvedeny v tabulce 3.3. Nižší korelační koeficienty jsou pravděpodobně dány nestejným otírání povrchu elektrody o navlhčený filtrační papír.



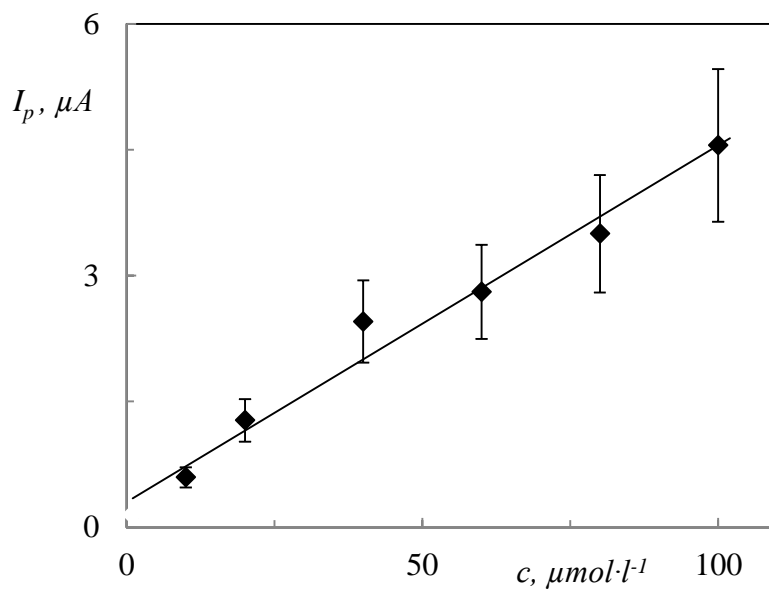
Obr 3.8

Kalibrační závislost simvastatinu pro DC voltametrii na CPE. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 1 (2), 10 (3), 20 (4), 40 (5), 60 (6), 80 (7) a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (8). Prostředí BR-MeOH o pH 5,5.



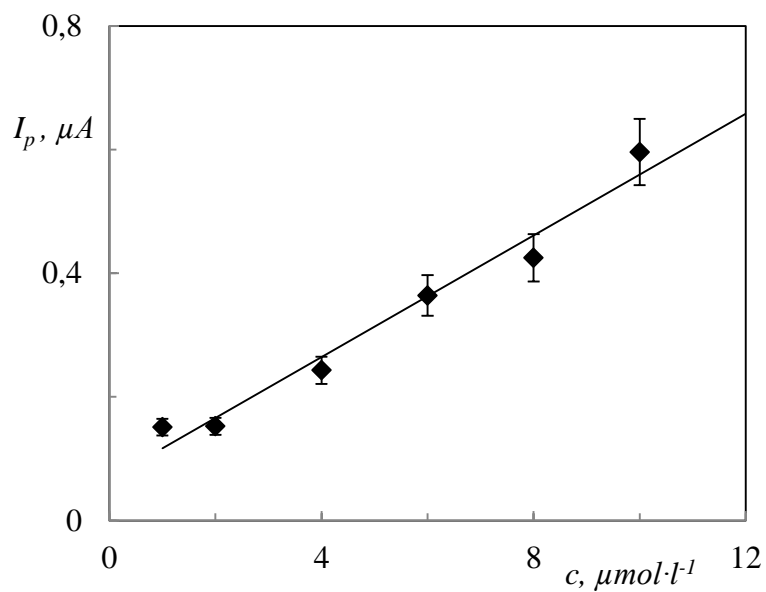
Obr 3.9

Kalibrační závislost simvastatinu pro DC voltametrii na CPE. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6) a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7). Prostředí BR-MeOH o pH 5,5.



Obr 3.10

Kalibrační závislost velikosti proudu při DC voltametrii na CPE na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 5,5 v rozmezí od 10 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr 3.11

Kalibrační závislost velikosti proudu při DC voltametii na CPE na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 5,5 v rozmezí od 1 do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

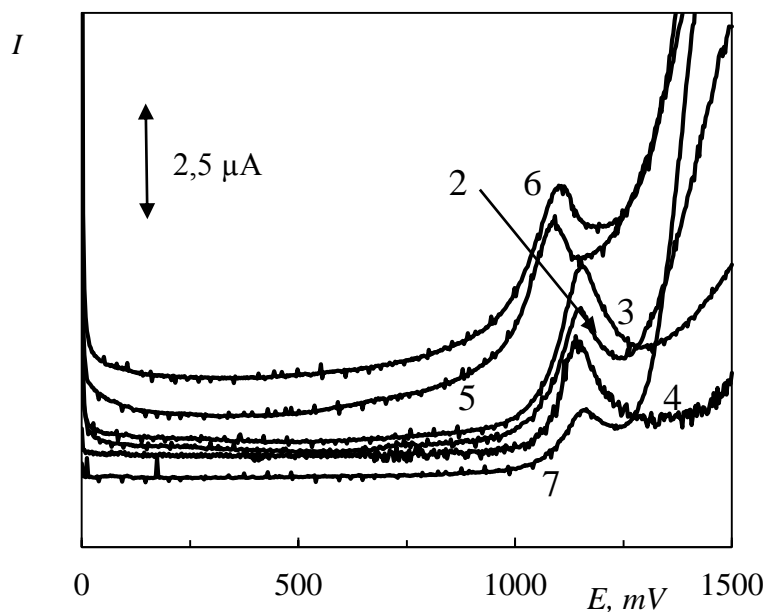
Tabulka 3.3

Souhrn parametrů kalibrační závislosti simvastatinu. Měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR-MeOH o pH 5,5.

Koncentrační rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směrnice ($\mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (μA)	Korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
10–100	0,0426	0,3018	0,9895	–	–
1-10	0,0492	0,0677	0,9852	0,36	1,2

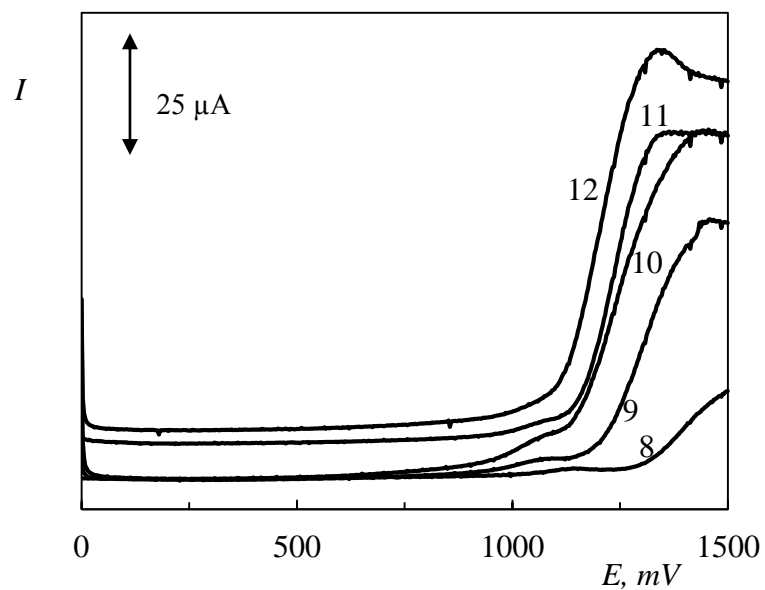
3.1.4. Diferenční pulzní voltametrie na CPE

Stejně jako u DC voltametrie bylo i u DPV sledováno chování simvastatinu při různých pH. Na obrázku 3.12 je vidět závislost do pH 7. Do tohoto pH tvořil simvastatin jeden dobře definovaný oxidační pík, který se většinou nacházel v rozmezí potenciálů 1,1-1,2 V. Přesná závislost velikosti potenciálu píku simvastatinu E_p na pH je vidět na obrázku 3.15. Je patrné, že při pH 5 došlo k odchylce E_p od lineárního trendu celé závislosti. Tento odchylka by mohla souviset s přechodem simvastatinu na aktivní formu, tedy na jeho hydroxykyselinu (viz kapitola 3.1.3). K podobnému odchýlení došlo také při DC voltametrii. Od pH 7 došlo ke změně tvaru píku na vlnu. Od pH 10 již nebylo možné signál vyhodnotit. Závislost pro pH větší jak 8 je vidět na obrázku 3.13. Závislost velikosti proudu píku simvastatinu I_p na pH je na obrázku 3.14. Zajímavé je, že zde se přechod simvastatinu na aktivní formu při pH 5 neprojevil. Nejlepší odezvu poskytovala elektroda při pH 3, proto bylo toto pH dále používáno pro měření kalibračních závislostí.



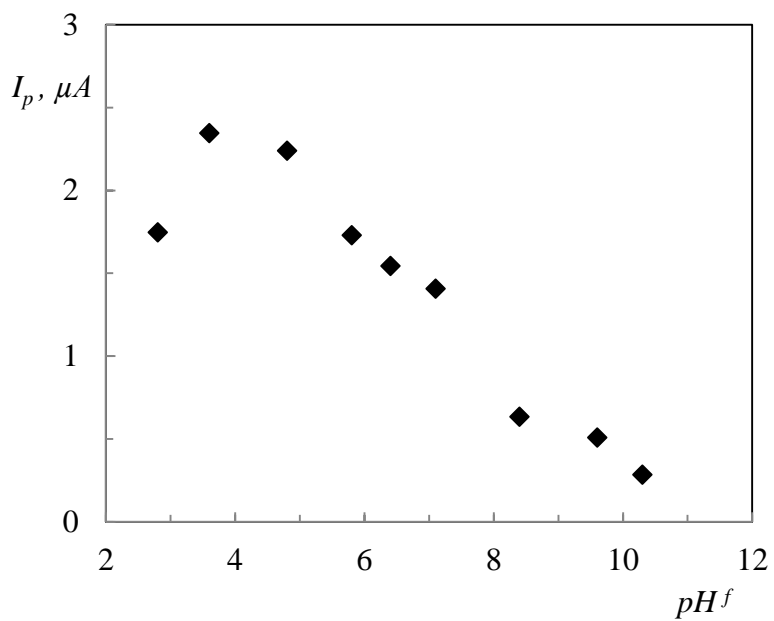
Obr 3.12

DP voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na CPE v prostředí BR-MeOH o pH 2 až 7. Čísla křivek odpovídají hodnotě pH.



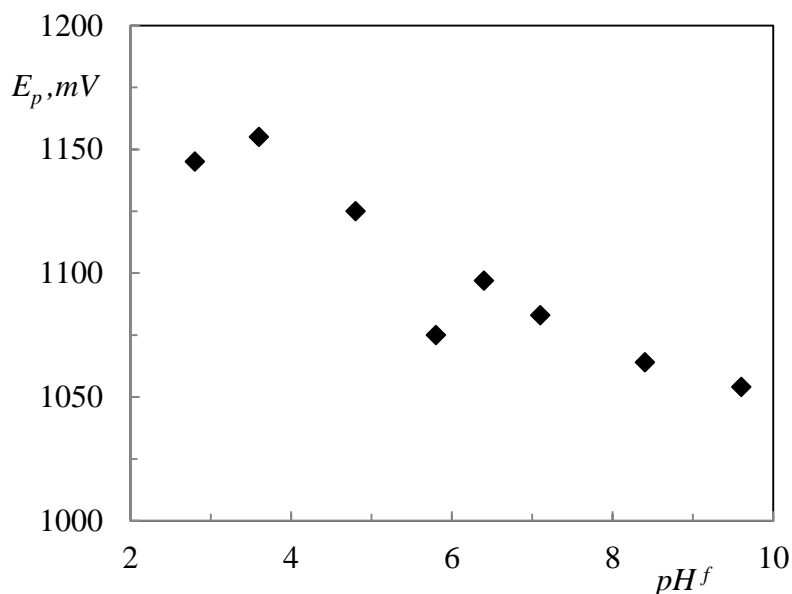
Obr 3.13

DP voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na CPE v prostředí BR-MeOH o pH bylo 8 až 12. Číslo křivek odpovídají hodnotě pH.



Obr 3.14

Závislost výšky píku při DP voltametii na CPE na pH^f směsi BR-MeOH pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

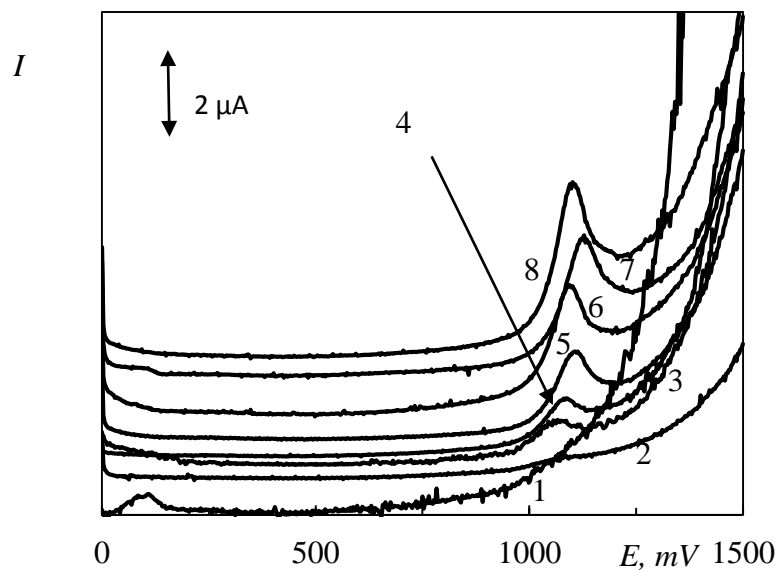


Obr 3.15

Závislost E_p při DP voltametii na CPE na pH^f směsi BR-MeOH pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

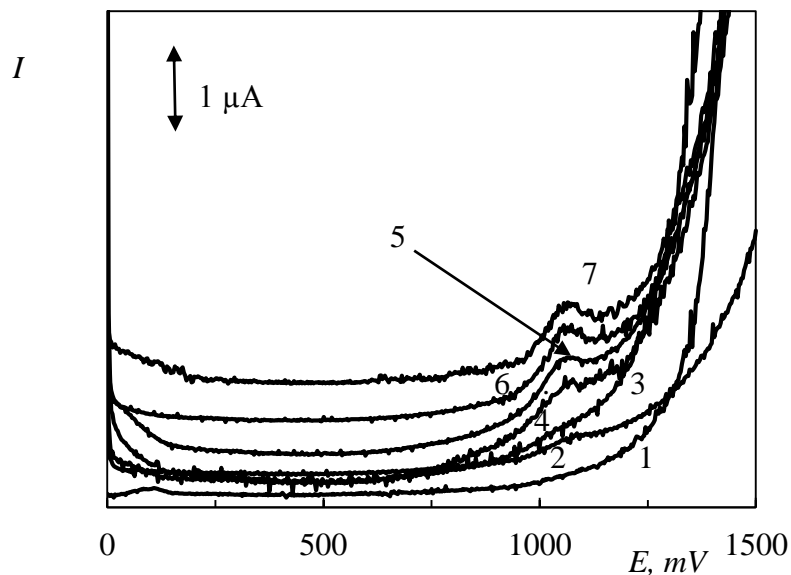
Jak již bylo řečeno výše. Nejlepší odezvu poskytovala uhlíková pastová elektroda při pH 3, proto bylo toto pH použito pro měření kalibračních závislostí. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozsahu koncentrací $1\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí BR-MeOH. Závislost v rozmezí $10\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je na obrázku 3.16, v rozmezí $1\text{-}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je závislost na obrázku 3.17. Závislost velikosti proudu píku simvastatinu I_p na koncentraci je na obrázku 3.18 a 3.19. Závislost má lineární charakter, přesné parametry jsou uvedeny v tabulce 3.4.

Kontrola opakovatelnosti měření byla prováděna opakovaným měřením vzorku s nejnižší dosaženou koncentrací, která byla $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z takto získaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka a z ní následně LOD a LOQ. Konkrétní hodnoty pro jednotlivá rozmezí jsou uvedeny v tabulce 3.4. Vyšší hodnoty relativní směrodatné odchylky jsou pravděpodobně dány nestejným otírání povrchu elektrody o navlhčený filtrační papír.



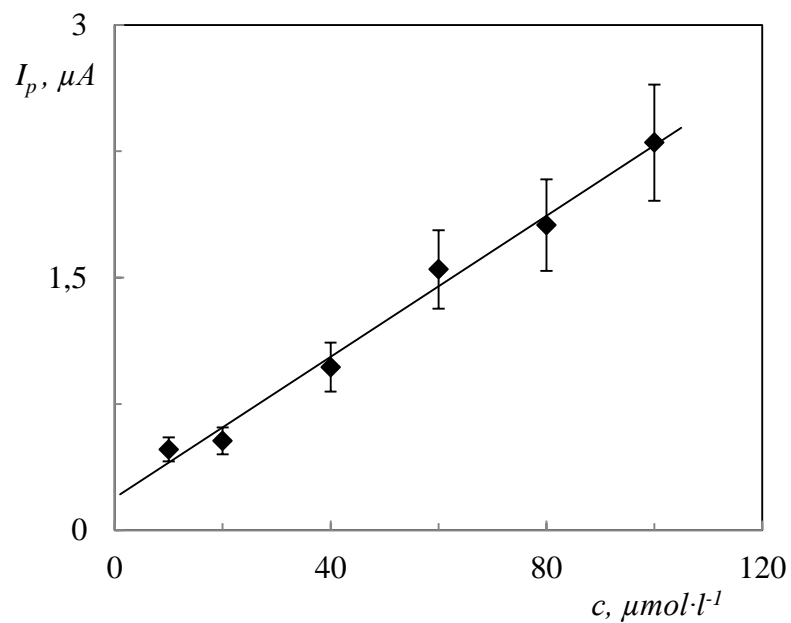
Obr 3.16

Kalibrační závislost simvastatinu pro DP voltametrii na CPE. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 1 (2), 10 (3), 20 (4), 40 (5), 60(6), 80(7) a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (8) v prostředí BR-MeOH o pH 3.



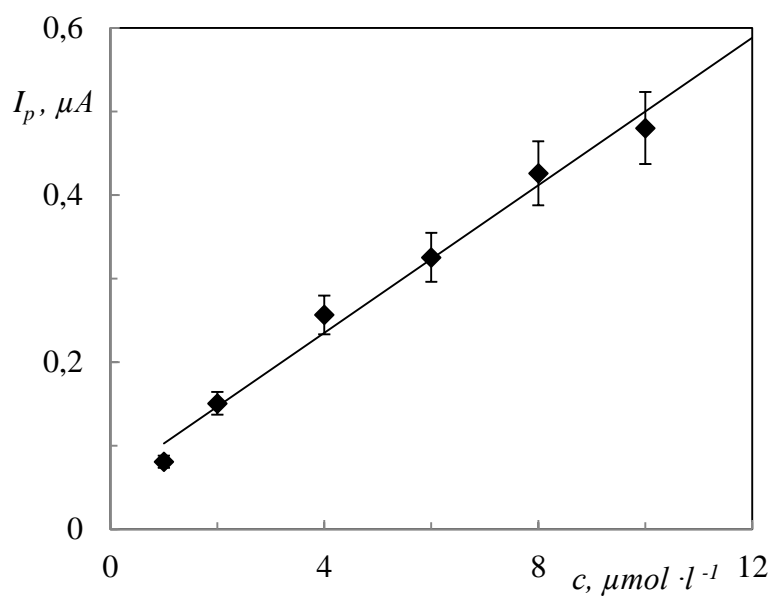
Obr 3.17

Kalibrační závislost simvastatinu pro DP voltametrii na CPE. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6) a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7) v prostředí BR-MeOH o pH 3.



Obr 3.18

Kalibrační závislost velikosti proudu při DP voltametii na CPE na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 3 v rozmezí od 10 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr 3.19

Kalibrační závislost velikosti proudu při DP voltametii na CPE na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 3 v rozmezí od 1 do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka 3.4

Souhrn parametrů pro kalibrační závislost simvastatinu. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR-MeOH o pH 3.

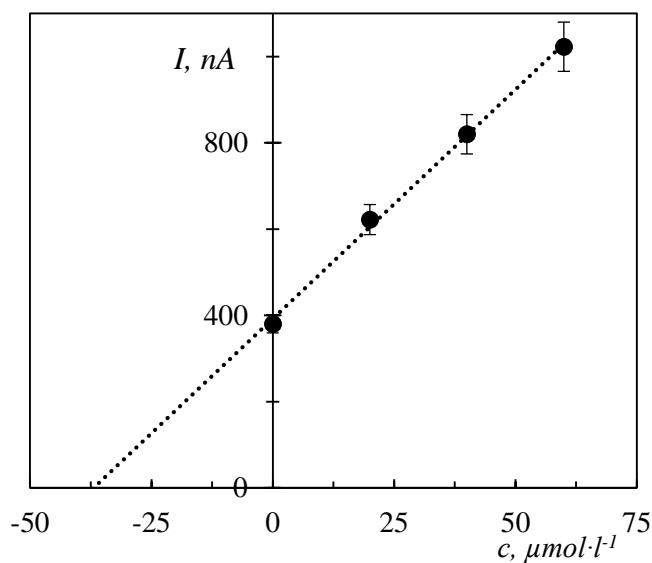
Koncentrační rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směrnice ($\mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (μA)	Korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
10–100	0,0209	0,1918	0,9945	–	–
1–10	0,0441	0,0586	0,9935	0,32	1,09

3.2. Stanovení simvastatinu v léčivech

Pro stanovení obsahu simvastatinu v léčivech byli vybráni tři zástupci a to Simvax 20, Simvacard 20 a Simgal 10 (registrační čísla a čísla šarží jednotlivých léčiv viz kapitola 2.2). Tyto léčiva byla vybrána s ohledem na množství aditiv, která by mohla ovlivnit výsledek analýzy. Deklarovaný obsah simvastatinu v jedné tabletě byl pro Simvax a Simvacard 20 mg simvastatinu a pro tablety Simgal 10 mg simvastatinu. Přesný postup přípravy zásobních roztoků viz kapitola 2.3.2. Výsledná předpokládaná koncentrace zásobních roztoků léčiv pro voltametrické stanovení byla $1,91\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

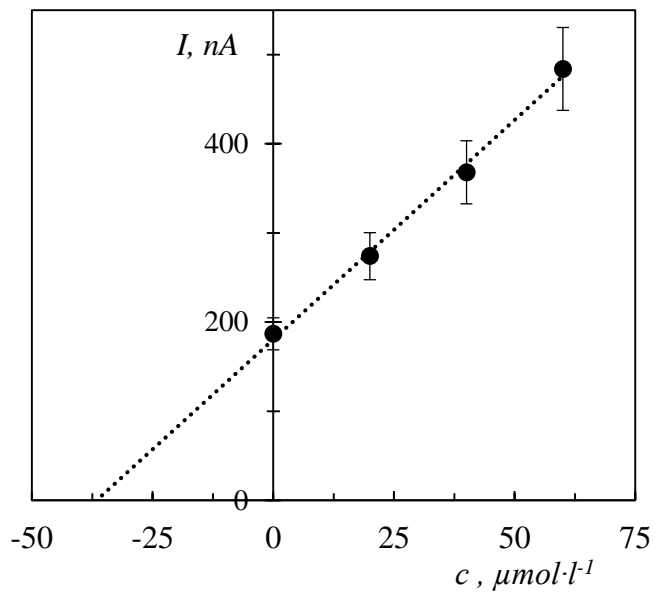
V kapitolách 3.1.3 a 3.1.4 byl simvastatin stanovován v čisté formě metodou DCV a DPV. Metoda DPV se ukázala jako citlivější a proto byla zvolena jako vhodná metoda pro stanovení simvastatinu v léčivech. Stanovení probíhalo metodou standardního přídatku v prostředí BR pufru o pH 3, při rychlosti skenu $20\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. 2,10 ml roztoku vzorku léčiva byl doplněn BR puftrem na celkový objem 10ml. Byla provedena první série pěti měření. K takto připravenému roztoku bylo následně přidáno 200 μl standardního roztoku simvastatinu o koncentraci $1\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po přídatku byla provedena druhá série pěti měření. Tento postup se zopakoval ještě dvakrát. Celkem bylo do vzorku léčiva přidáno 600 μl . Ze získaných dat byla utvořena lineární závislost. Z rovnice pro tuto závislost byla dopočtena koncentrace simvastatinu v jednotlivých tabletách. Lineární závislosti pro jednotlivá léčiva jsou vidět na obrázku 3.20 až 3.22. Parametry lineárních závislostí jsou uvedeny v tabulce 3.5. Z této tabulky je patrné, že výtěžek pro všechna tři léčiva byl kolem $92 \pm 3\%$. Srovnávací metodou pro stanovení simvastatinu v léčivech

byla HPLC se spektrofotometrickou detekcí při 238 nm. Toto stanovení bylo inspirováno lékopisnou metodou pro stanovení obsahu simvastatinu. [82] Díky nedostupnosti kolony, která byla použita v lékopisu, nebylo možné dodržet přesný postup pro stanovení obsahu léčiva tak, jak byl uveden v lékopisu. Z tohoto důvodu došlo k modifikaci tohoto postupu a z lékopisného návrhu byl převzat pouze návod na složení mobilních fází a zbytek parametrů byl upraven podle dostupného technického vybavení. Pracovní roztoky byly připraveny podle návod v kapitole 2.3.2. Nastavení metody a složení mobilních fází je uvedeno v kapitole 2.3.9. Obsah simvastatinu ve vzorcích léčiva byl stanoven na základě porovnání dat získaných z měření standardu a dat získaných z měření vzorků léčiv. Výtěžnost této metody je uvedena tabulce 3.6. Jak je vidět v této tabulce, nejvyšší výtěžnost byla u léčiva Simvax 20. Při HPLC stanovení mělo toto léčivo mnohem vyšší výtěžnost než zbylé dvě léčiva. Tento rozdíl by mohl být pravděpodobně dán odlišným chemickým složením léčiv a interferencí chromatografického píku s nějakou další látkou přítomnou v tabletách.



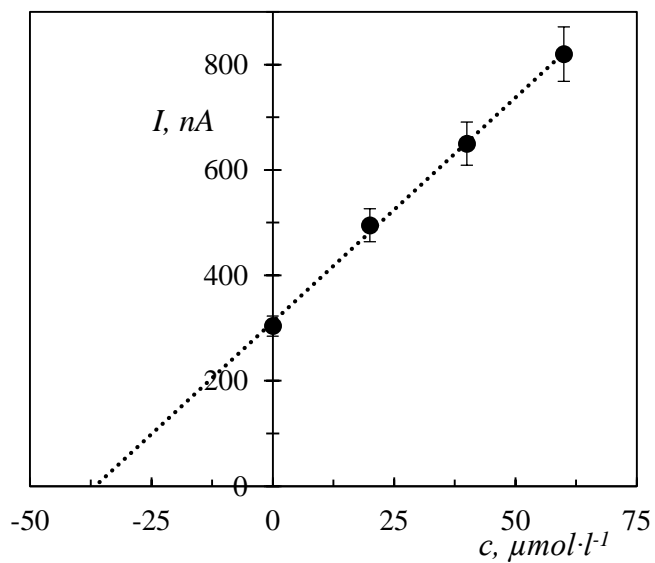
Obr 3.20

Stanovení simvastatinu v tabletě Simvax 20 metodou standardního přídatku. Měření bylo prováděno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 3.



Obr 3.21

Stanovení simvastatinu v tabletě Simvacard 20 metodou standardního přídávku. Měření bylo prováděno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 3



Obr 3.22

Stanovení simvastatinu v tabletě Simgal 10 metodou standardního přídávku. Měření bylo prováděno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 3.

Tabulka 3.5

Souhrn parametrů pro stanovení simvastatinu v léčivech metodou standardního přídávku.

Měřeno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 3 s 20% methanolu, (v/v).

Léčivo	Očekávaná koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Stanovená koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)	Směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	SD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RSD (%)
Simvax 20	40	36,9	92,3	10,6	392	0,9989	5,34	1,5
Simvacard 20	40	36,7	91,8	4,92	180	0,9977	8,03	4,3
Simgal 10	40	36,6	91,5	8,51	311	0,9991	11,8	3,9

Tabulka 3.6

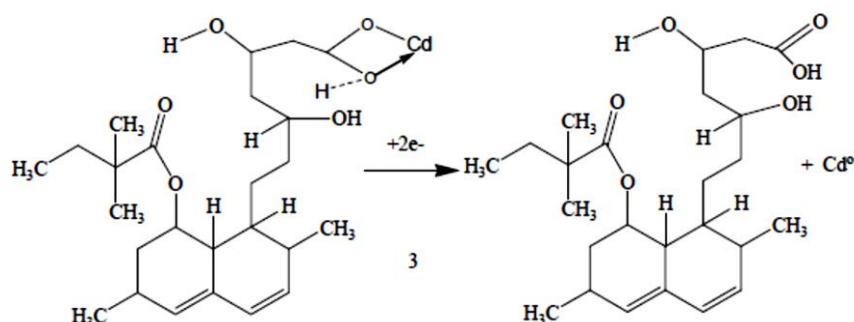
Souhrn parametrů pro stanovení simvastatinu v léčivech metodou HPLC.

Léčivo	Výška píku (mV)	Plocha píku ($\text{mV}\cdot\text{min}^{-1}$)	Výtěžnost (%)	Retenční čas (min)	SD (mV)	RSD (%)
Standard	114,1	2284	-	3,01	5,25	4,6
Simvax 20	151,1	2357	132	2,96	5,40	3,6
Simvacard 20	117,4	2246	103	3,00	2,66	2,3
Simgal 10	120,4	1851	106	2,95	2,24	1,9

V dalším kroku byla testována možnost využití CPE pro stanovení simvastatinu v biologických vzorcích moči, ale ukázalo se, že tato matrice obsahuje velké množství látek, které poskytují signál v anodické oblasti a dochází k překrytí signálu poskytovaného simvastatinem. Překrytí signálů je tak velké, že znemožňuje vyhodnocení signálu simvastatinu. Z tohoto důvodu byl simvastatin v biologických vzorcích testován v redukční oblasti s využitím stříbrné pevné amalgámové elektrody.

3.3. Stanovení simvastatinu na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné amalgámové elektrodě

Stanovení statinů v biologických vzorcích je v dnešní době založeno hlavně na metodách HPLC, UHPLC či GC.[41,45,47,50] Vzorkem pro tyto analýzy bývá ve většině případů krevní sérum. Výše zmíněné metody jsou ovšem velmi náročné a to jak finančně tak technicky. Odběr vzorku pro analýzu je invazivní, což je náročné i pro pacienta. Vzhledem k tomu, že metabolity statinů se v různé míře dostávají do moči, v závislosti na své metabolické dráze, vznikla potřeba a snaha, nalézt levnější metodu pro jejich stanovení. Stanovení ze séra klade další požadavky na předúpravu vzorku za použití dalších přístrojů a chemikálií [41]. V této diplomové práci jsme ověřovali, jestli je možné stanovit simvastatin v moči jako biologické matrici. Za matrici byla zvolena moč desetinásobně zředěná BR pufrem a následně i plná neředěná moč. Postup práce vycházel z článku [72], kde byl nastíněn postup pro stanovení simvastatinu pomocí tvorby komplexu s kademnatými ionty na visící rtuťové kapkové elektrodě. Mechanismus vzniku komplexu je zobrazen na obrázku 3.23.

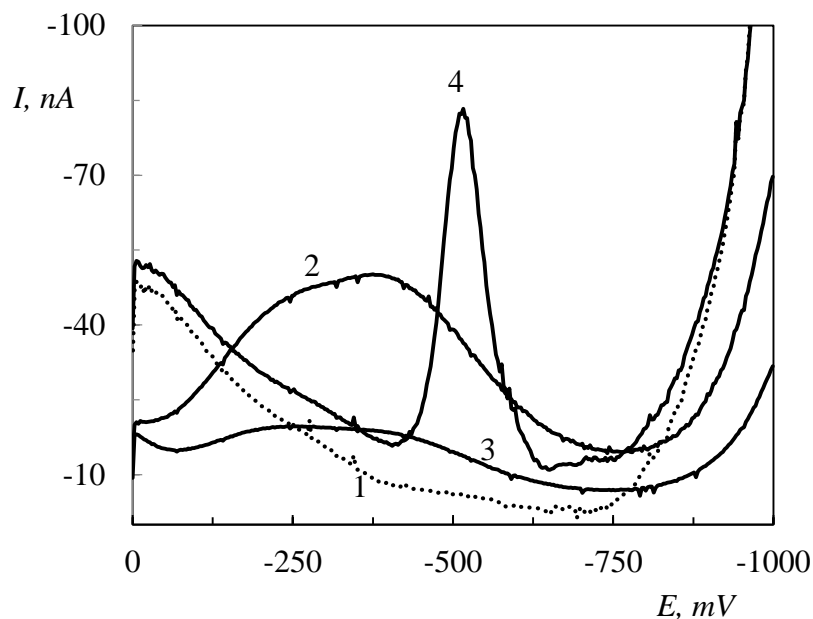


Obr 3.23

Mechanismus reakce vzniku komplexu simvastatinu s kademnatými ionty [71]

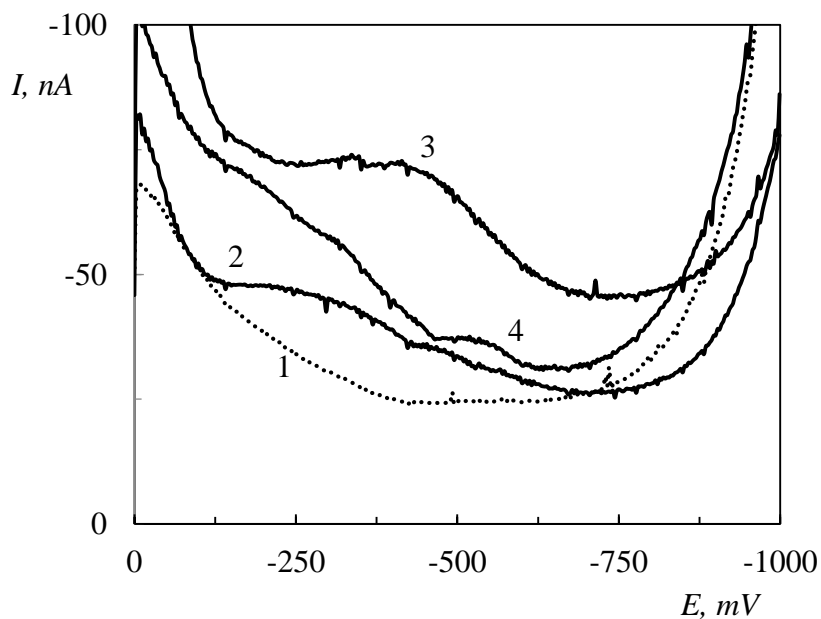
V této práci byla na rozdíl od citovaného článku použita jako pracovní elektroda amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem. Uhlíková pastová elektroda nebyla pro tuto analýzu vhodná, protože její potenciálové okno pro oblast redukce je úzké a stanovení komplikuje kyslík přítomný v pastě. Kyslík vázaný v pastě se v průběhu analýzy redukuje a překrývá signál poskytovaný kademnatými ionty. V citovaném článku nebyla příliš diskutována otázka optimálního poměru mezi simvastatinem a kademnatými

ionty. Pro sledování chování simvastatinu o koncentraci od $2 \cdot 10^{-6}$ a $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla zvolena technika DP voltametrie v prostředí BR-MeOH o pH 2,5. [72] Změna signálu poskytovaného pracovní elektrodou v základním elektrolytu BR pufru se samotným simvastatinem a po přidavku kademnatých iontů o různých koncentracích je vidět na obrázcích 3.24 a 3.25. Na obrázku 3.24 je vidět, že přidavek kademnatých iontů v poměru 1:1, při koncentraci simvastatinu $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, způsobí tvorbu komplexu, jehož signál je menší než signál poskytovaný samotným simvastatinem. Na obrázku 3.25 je ovšem situace jiná a při koncentracích v řádech jednotek μmol dochází po přidání kademnatých iontů ke vzniku komplexu, který poskytuje signál vyšší, než samotný simvastatinu. Dále byla zkoumána závislost mezi signálem komplexu simvastatinu a koncentrací kademnatých iontů v roztoku. Tyto závislosti jsou vidět na obrázku 3.26 a 3.27. U obrázku 3.26 byla nejvyšší odezva elektrody při stejné koncentraci simvastatinu a kademnatých iontů. Tato koncentrace byla $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. U obrázku 3.27 byla maximální odezva elektrody při koncentraci simvastatinu $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentraci kademnatých iontů $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tyto závislosti ukazují, že se zvyšující se koncentrací simvastatinu v měřeném roztoku dochází po přidání kademnatých iontů ke změně chování komplexu, který poskytuje maximální odezvu elektrody při nižších koncentracích kademnatých iontů. Obrázek 3.24 ukazuje situaci, kdy je koncentrace simvastatinu v měřeném roztoku tak vysoká, že přidavek kademnatých iontů způsobí tvorbu komplexu, který má signál nižší, než signál poskytovaný samotným simvastatinem. Bylo prozkoumáno i chování komplexu simvastatinu s kademnatými ionty v prostředí zvyšující se koncentrace simvastatinu. Koncentrace kademnatých iontů byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentrace simvastatinu se pohybovala v rozsahu od 1 do $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato závislost je vidět na obrázcích 3.28 a 3.29. Parametry této závislosti jsou uvedeny v tabulce 3.7.



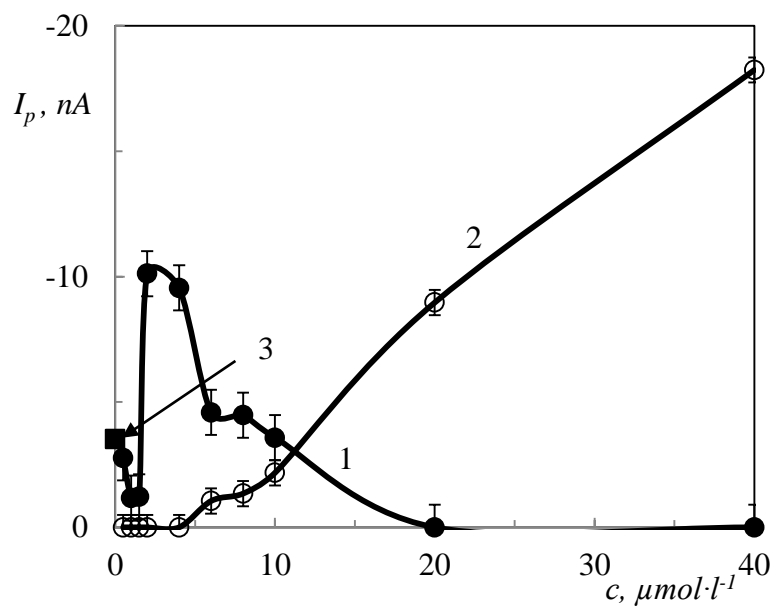
Obr 3.24

DP voltamogramy simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 2,5 o koncentraci simvastatinu 0 (1), $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2, $E_p = -375 \text{ mV}$), $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s přidavkem Cd^{2+} o koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3, $E_p = -243 \text{ mV}$) a samotné kadmnaté ionty o koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (4, $E_p = -516 \text{ mV}$) na m-AgSAE.



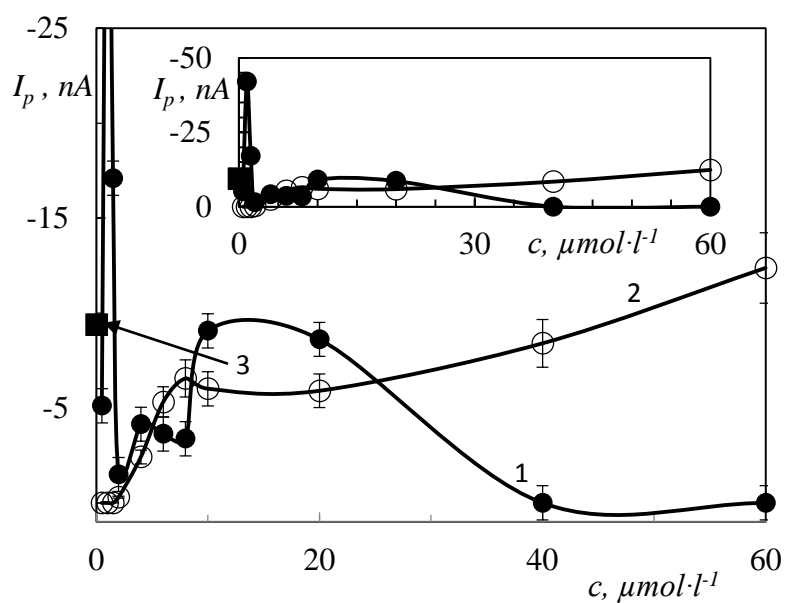
Obr 3.25

DP voltamogramy simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 2,5 o koncentraci simvastatinu 0 (1), $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2, $E_p = -332 \text{ mV}$), $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s přidavkem Cd^{2+} o koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3, $E_p = -420 \text{ mV}$) a samotné kadmnaté ionty o koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (4, $E_p = -516 \text{ mV}$) na m-AgSAE.



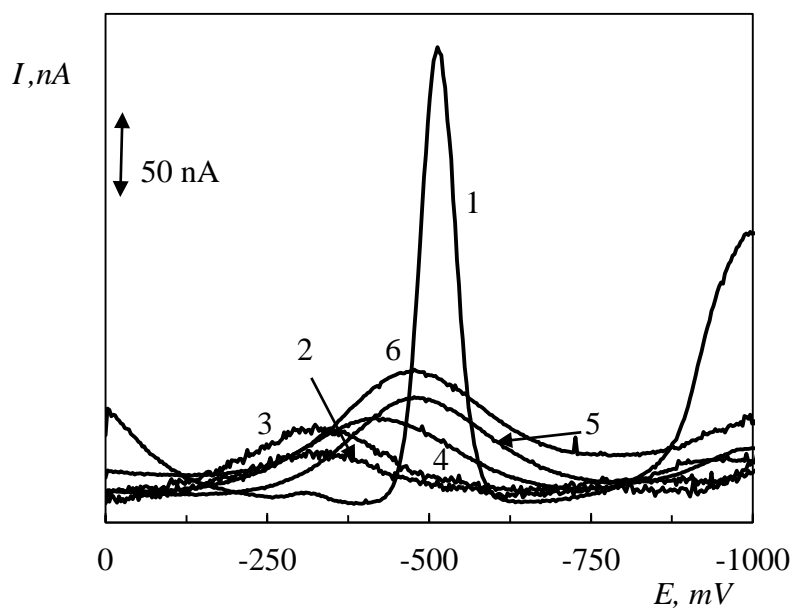
Obr 3.26

Závislost změny signálu komplexu simvastatinu s kademnatými ionty (1, $c_{\text{sv}}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na koncentraci kademnatých iontů (2) při DPV v prostředí BR-MeOH o pH 2,5. Čtvereček představuje pouze simvastatin (3, $c_{\text{sv}} = 2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).



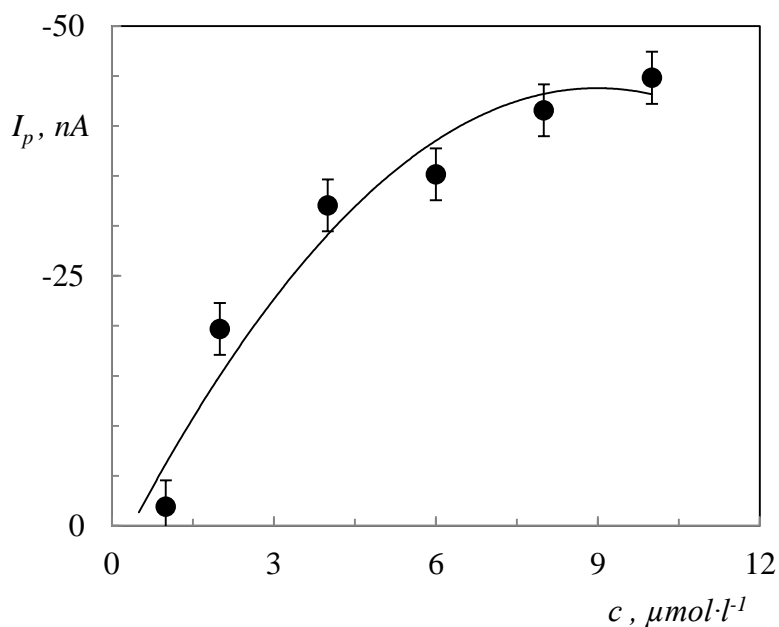
Obr 3.27

Závislost změny signálu komplexu simvastatinu s kademnatými ionty (1, $c_{\text{sv}}=5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na koncentraci samotných kademnatých iontů (2) při DPV v prostředí BR-MeOH o pH 2,5. Čtvereček představuje pouze simvastatin (3, $c_{\text{sv}}=2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).



Obr 3.28

DP voltamogramy ukazující změnu signálu komplexu simvastatinu s kadmennatými ionty v prostředí BR-MeOH o pH 2,5 v závislosti na rostoucí koncentraci simvastatinu. Koncentrace kadmennatých iontů byla $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace simvastatinu byla 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5) a 10 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$



Obr 3.29

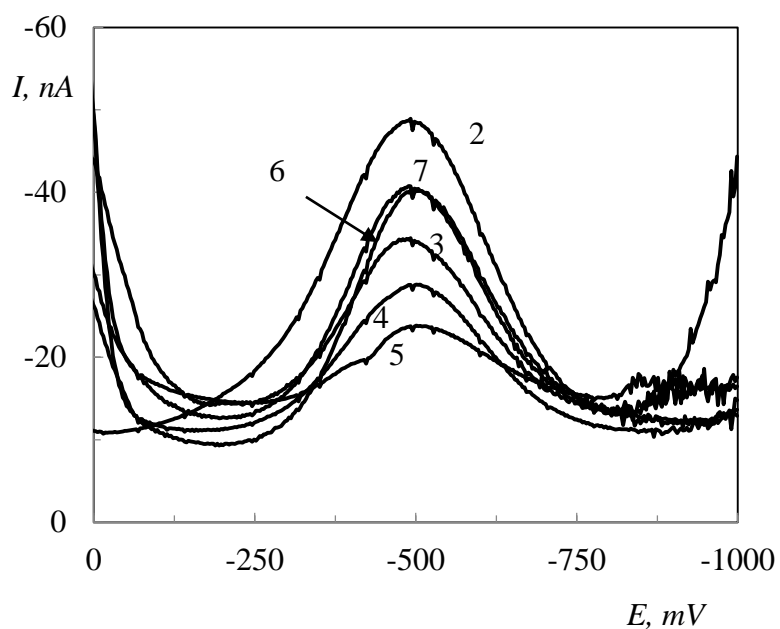
Závislost změny signálu komplexu simvastatinu s Cd^{2+} na koncentraci simvastatinu při DPV v prostředí BR pufru o pH 2,5 s 20% methanolu (v/v).

Závislosti v obrázcích 3.28 a 3.29 ukazují, že s narůstající koncentrací simvastatinu dochází ke zvyšování odezvy elektrody. Současně dochází k posunu potenciálu píku simvastatinu E_p k zápornějším potenciálům, jak je vidět na obrázku 3.28. Tento posun souvisí s nárůstem koncentrace simvastatinu. Obrázek 3.29 ukazuje pouze křivku pro nárůst odezvy komplexu simvastatinu s kademnatými ionty. Je vidět, že tato závislost nemá lineární charakter, ale je charakterizována polynomicou závislostí. Zobrazený polynom je polynomem druhého stupně. Rovnice tohoto polynomu je $y = 0,5892x^2 - 10,59x + 3,8047$ s korelačním koeficientem 0,9740.

Signál kademnatých iontů byl získán pouze při koncentraci simvastatinu $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, při vyšších koncentracích došlo k vymizení tohoto signálu. Mechanismus vzniku komplexu s kademnatými ionty je vidět na obrázku 3.23. Závislost na změně koncentrace kademnatých iontů nebyla lineární, proto byla pro další zkoumání zvolena koncentrace kademnatých iontů, při které poskytoval komplex nejvyšší signál, což byla koncentrace $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Se zvolenou konstantní koncentrací kademnatých iontů bylo přikročeno k pokusu stanovit simvastatin v biologické matrici. Touto matricí byla desetinasobně zředěná moč. Měřicí prostředí tvořil 1 díl moči a 9 dílů BR pufru o pH 2,5 s 20% metanolu (v/v). Do této směsi bylo přidáno 20 μl zásobního roztoku simvastatinu o koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což představovalo konečnou koncentraci simvastatinu v moči $20\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K měření byla použita metoda DPV. Do pracovního prostředí byly přidány kademnaté ionty a bylo sledováno chování komplexu simvastatinu v biologické matrici. Výsledky měření ovšem nebylo možno vyhodnotit. Z tohoto důvodu a z důvodu nelineárního chování komplexu simvastatinu byla metoda s přidavkem kademnatých iontů opuštěna.

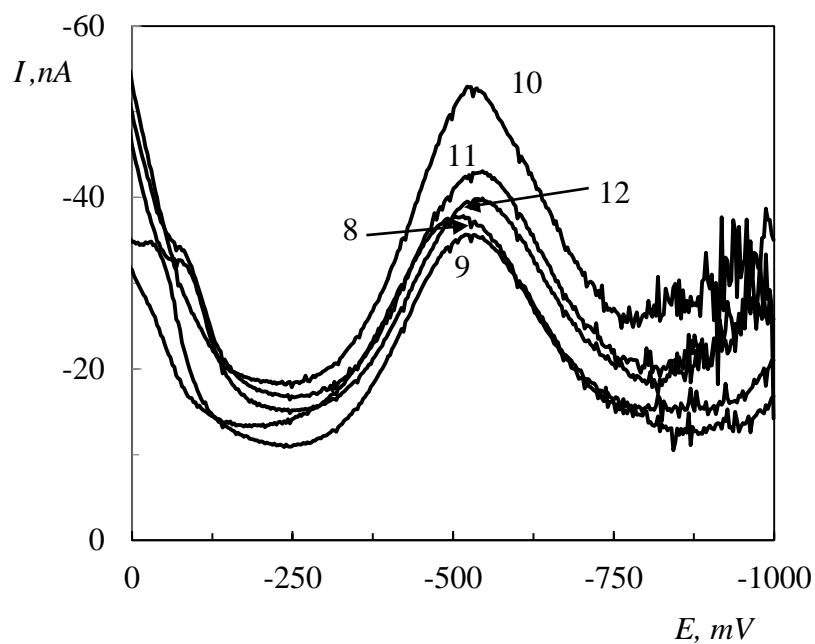
Další směr, kterým se výzkum ubíral, bylo sledování chování simvastatinu v prostředí BR pufru. Pro sledování chování simvastatinu v prostředí BR pufru byla použita opět technika DPV. Na obrázcích 3.30 a 3.31 je vidět změna signálu poskytovaného simvastatinem v závislosti na pH BR pufru. Nejvyšší signál poskytoval simvastatin při pH 2, proto bylo toto pH zvoleno jako optimální pro další měření. Závislost změny proudu píku simvastatinu I_p na pH BR pufru je vidět na obrázku 3.32. Jak z obrázku vyplývá s narůstajícím pH BR pufru dochází ke snižování signálu až do pH 5, následně dochází k opětovnému nárůstu signálu. Pokles signálu při pH 5 pravděpodobně souvisí s přechodem simvastatinu na jeho aktivní formu. Závislost změny

potenciálu píku E_p je vidět a obrázku 3.33. Změna potenciálu píku E_p je zanedbatelná a pozorované změny nesouvisí se změnami pH měřeného roztoku, ale jsou dány především rozlišením přístroje.



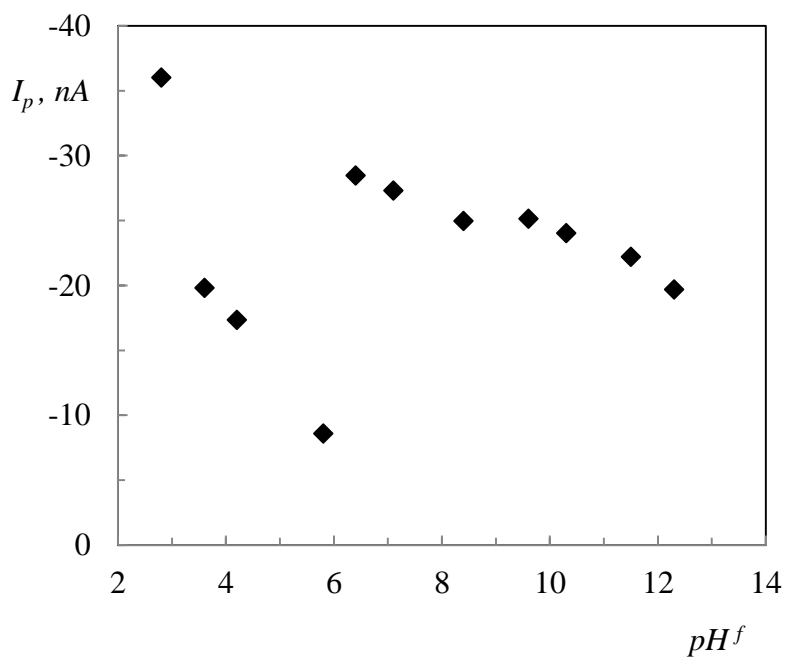
Obr 3.30

DP voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na m-AgSAE v prostředí BR-MeOH o pH 2 až 7 . Číslo křivek odpovídají hodnotě pH.



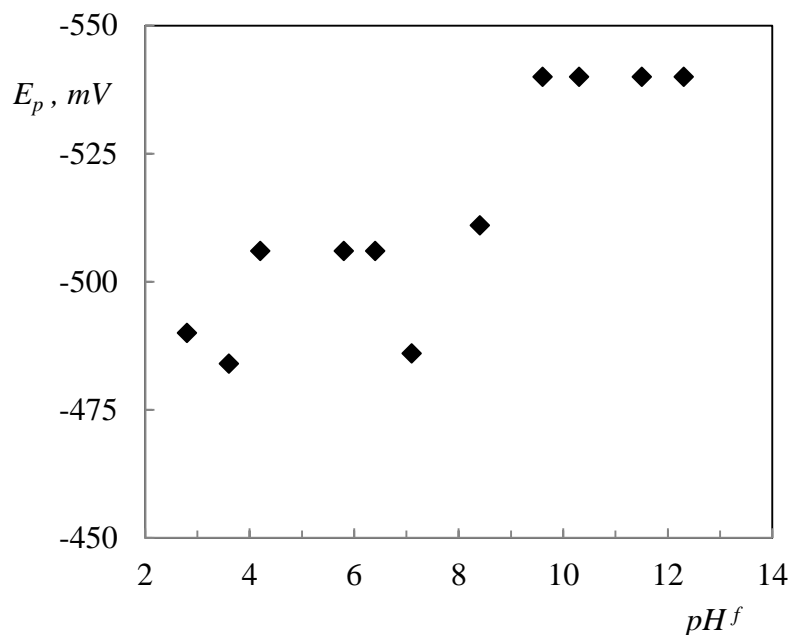
Obr 3.31

DP voltamogramy simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na m-AgSAE v prostředí BR-MeOH o pH 8 až 12. Čísla křivek odpovídají hodnotě pH.



Obr 3.32

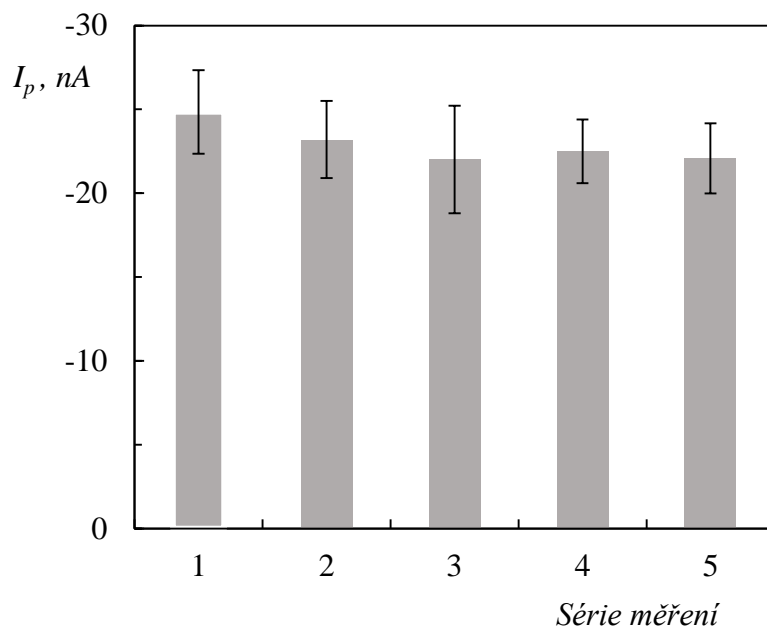
Závislost velikosti proudu píku při DP voltametii na pH^f směsi BR pufru s 20% methanolu (v/v) pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro m-AgSAE.



Obr 3.33

Závislost velikosti E_p při DP voltametrii na pH^f směsi BR pufru s 20% methanolu (v/v) pro roztok simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro m-AgSAE.

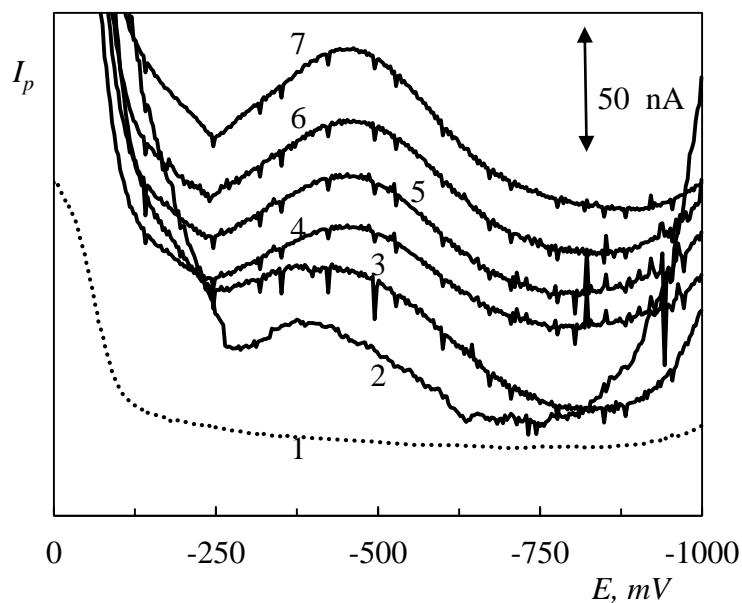
V průběhu měření se ukázalo, že dochází k pasivaci elektrody. Bylo vyzkoušeno několik postupů pro obnovení povrchu elektrody. Jako nejúčinnější se ukázala aktivace povrchu elektrody pomocí dvou pod sobě jdoucích aktivačních cyklů. Parametry pro aktivaci povrchu elektrody jsou uvedeny v kapitole 2.3.4. Ověření stálosti signálu poskytovaného amalgámovou elektrodou bylo ověřeno pomocí série pěti měření. Každá série měla pět po sobě jdoucích měření. Po každé sérii byl povrch elektrody aktivován způsobem, který byl zmíněn výše. Stálost signálu je vidět na obrázku 3.34.



Obr 3.34

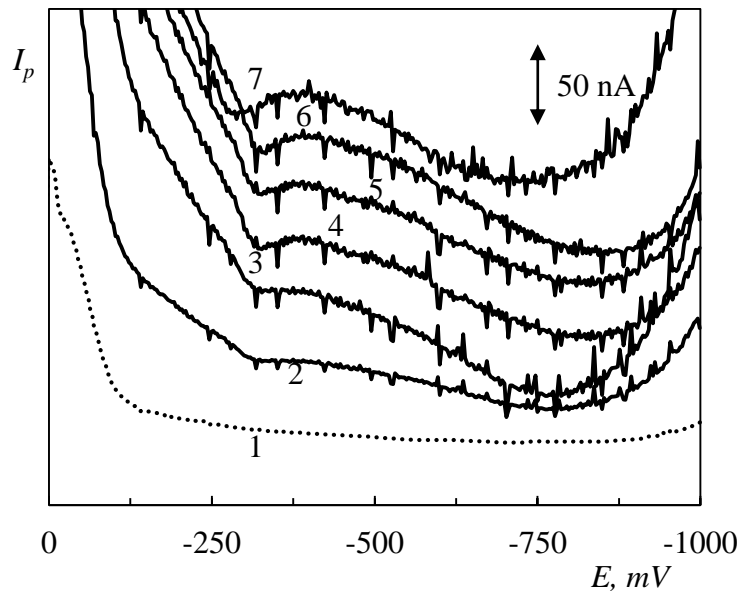
Stálost signálu simvastatinu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí BR-MeOH o pH 2 pro amalgámovou elektrodu. V každé sérii bylo provedeno 5 měření. Před začátkem každé série byl povrch amalgámové elektrody aktivován.

Nejvyšší signál simvastatinu byl získán při pH BR pufru 2, proto bylo toto pH zvoleno jako optimální pro měření kalibračních závislostí. Kalibrace byly měřeny pro koncentrační rozsah od 1 do $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jednotlivé závislosti jsou vidět na obrázcích 3.35 až 3.38. Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé koncentrační řady jsou uvedeny v tabulce 3.8.



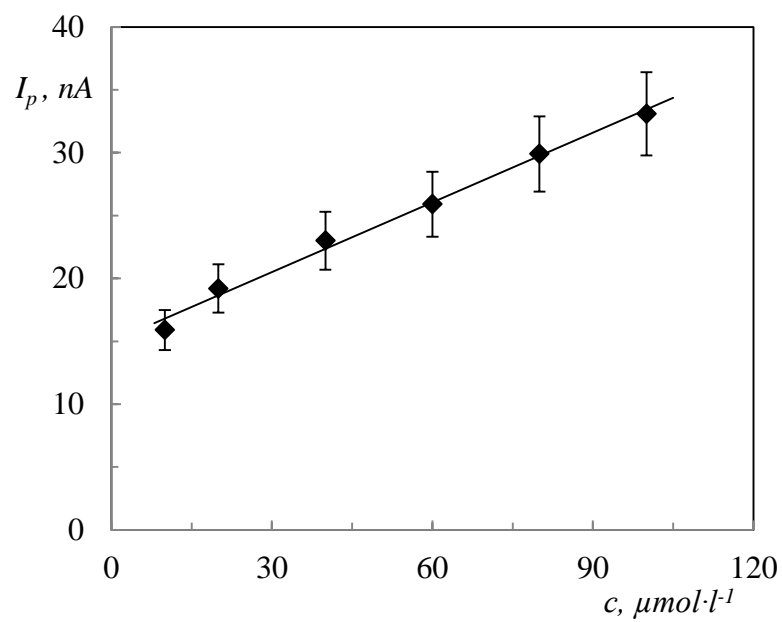
Obr 3.35

DP voltamogramy simvastatinu pro DP voltametrii. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 60(5), 80 (6) a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7) na m-AgSAE v prostředí BR-MeOH o pH 2.



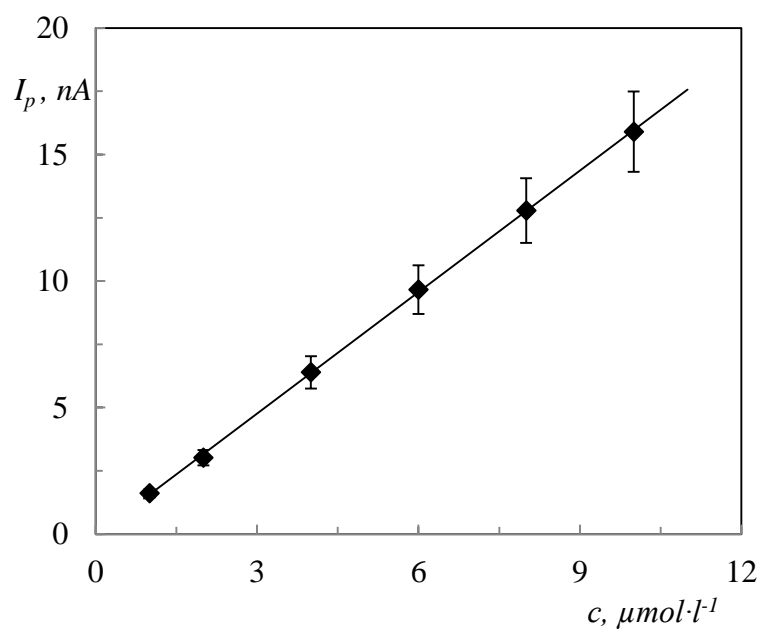
Obr 3.36

DP voltamogramy simvastatinu pro DP voltametrii. Koncentrace simvastatinu byla 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6) a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7) na m-AgSAE v prostředí BR-MeOH o pH 2.



Obr 3.37

Kalibrační závislost velikosti proudu při DP voltametii na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 2, pro m-AgSAE v rozmezí od 10 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr 3.38

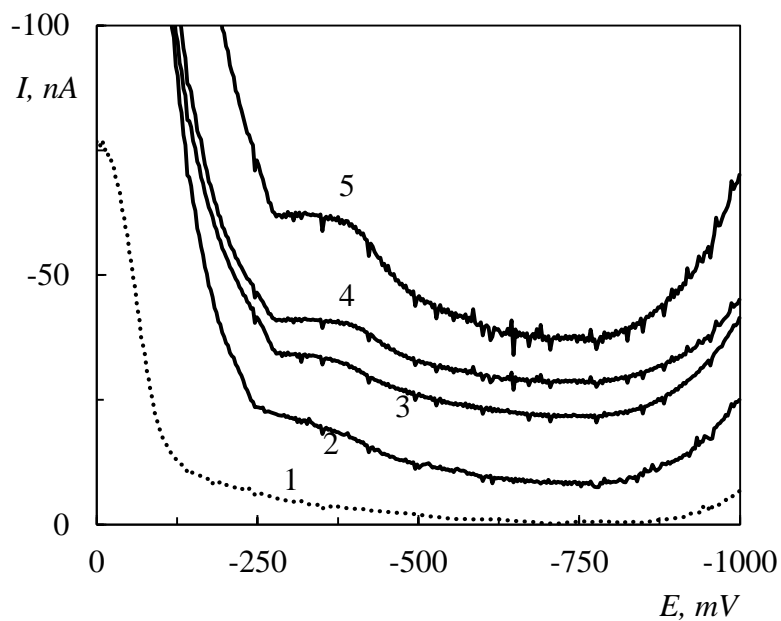
Kalibrační závislost velikosti proudu při DP voltametii na koncentraci simvastatinu v prostředí BR-MeOH o pH 2 pro m-AgSAE v rozmezí od 1 do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab 3.7

Souhrn parametrů pro kalibrační závislosti simvastatinu. Měřeno metodou DPV v prostředí BR-MeOH o pH 2 na m-AgSAE.

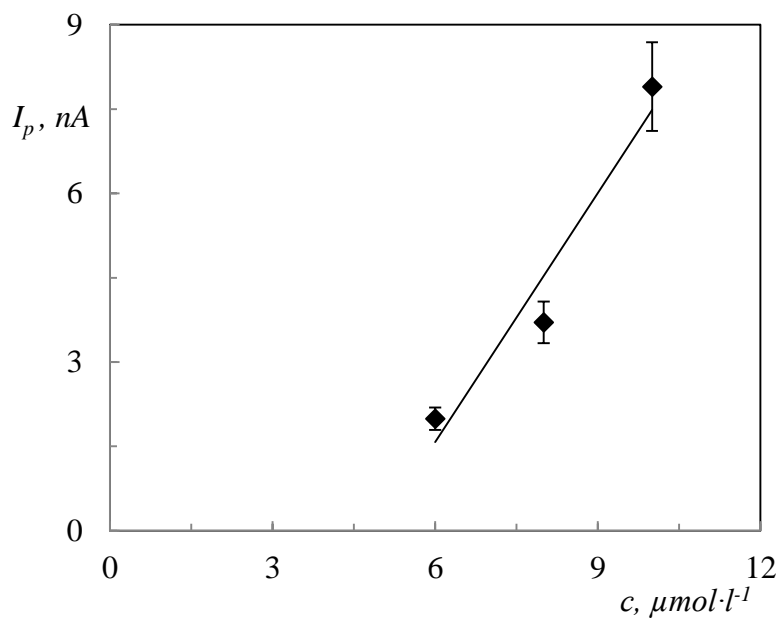
Koncentrační rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
10-100	0,1848	+14,954	0,9989	-	-
1-10	1,6008	-0,0442	0,9999	0,49	1,66

Po nalezení optimálních podmínek a ověření lineární kalibrační závislosti simvastatinu v ideálním prostředí BR pufru bylo sledováno chování simvastatinu v biologické matrici. První matricí byla zvolena desetinásobně zředěná moč. Moč byla ředěna BR pufrům o pH 2. Pracovní roztok byl tvořen jedním dílem moči a devíti díly pufru. Chování simvastatinu v této matrici je vidět na obrázku 3.39 a 3.40. Parametry této závislosti jsou uvedeny v tabulce 3.8. Na obrázku 3.39 je vidět, že v matrici desetinásobně zředěná moči bylo možno detegovat simvastatinu až od koncentrace $6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v měřeném roztoku. Koncentrace v moči by byla $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nemožnost stanovit simvastatin v nižších koncentracích by mohla být dána přítomností interferujících látek v moči, jako jsou např. bílkoviny, které se v moči v malé míře fyziologicky vyskytují a mohou na sebe tedy nízké koncentrace simvastatinu vyvízet. Druhou matricí byla zvolena plná moč. Pracovní roztok byl tvořen devíti díly moči a jedním dílem BR pufru o pH 2. Bohužel se ukázalo, že BR pufr nedokáže udržet pH pracovního roztoku na požadované hodnotě. Z tohoto důvodu byl BR pufr pro toto měření nahrazen $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinou sírovou, která po zředění požadované pH poskytla. Chování simvastatinu v této matrici je vidět na obrázcích 3.41 a 3.42. Parametry této závislosti jsou uvedeny v tabulce 3.9. Na rozdíl od zředěné moči bylo možno stanovit simvastatin v nízkých koncentracích od 2 do $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozdílnost při stanovení v matrici zředěné a plné moči by mohla být ovlivněna nestejným složením moči při jednotlivých stanoveních. Nalezení postupu pro úpravu základní matrice, tak aby byla při každém měření stejná, je námětem dalšího studia v budoucnu.



Obr 3.39

DP voltamogramy simvastatinu v matrici desetinasobně zředěná moči BR pufrém o pH 2 pro m-AgSAE. Koncentrace simvastatinu v měřeném roztoku byla 0 (1- BR pufr, 2- desetinasobně zředěná moč BR pufrém o pH 2), 6 (3), 8 (4) a 10 (5) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace simvastatinu v nezředěné moči by byla 60, 80 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



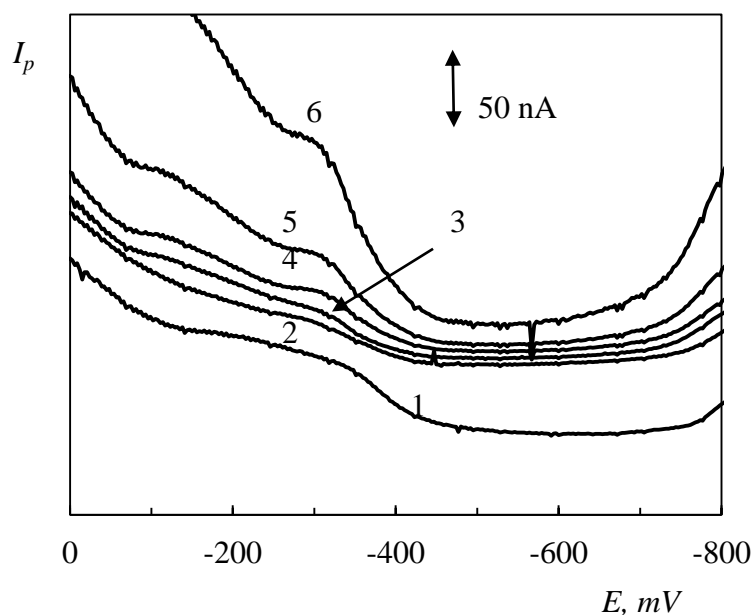
Obr 3.40

Kalibrační závislost velikosti proudu na koncentraci simvastatinu při DPV v matrici desetinasobně zředěná moči BR pufrém o pH 2 pro m-AgSAE.

Tab 3.8

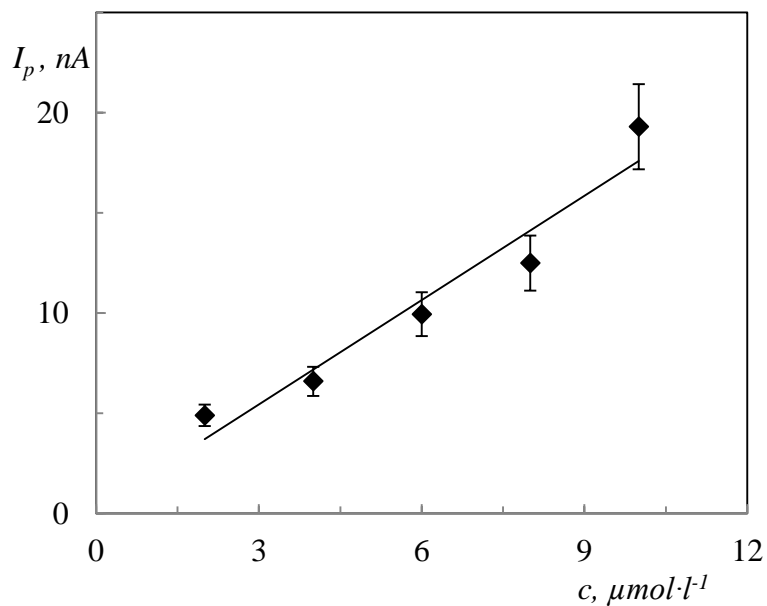
Souhrn parametrů pro kalibrační závislost simvastatinu. Měřeno metodou DPV v prostředí desetinásobně zředěné moči BR pufru o pH 2 na m-AgSAE.

Koncentrační rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
6-10	1,4775	-7,2887	0,9719	1,83	6,10



Obr 3.41

DP voltamogramy simvastatinu v matrici plné moči pro na m-AgSAE. Koncentrace simvastatinu v moči byla 0 (1- moč, poměr 9:1 s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinou sírovou), 2 (2), 4(3), 6 (4), 8 (5) a 10 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr 3.42

Kalibrační závislost velikosti proudu na koncentraci simvastatinu při DPV v matrici plné moči pro na m-AgSAE. Měřený roztok obsahoval 9dílů moči a jeden díl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírové.

Tab 3.9

Souhrn parametrů pro kalibrační závislost simvastatinu. Měřeno metodou DPV v prostředí plné moči. Měřený roztok obsahoval 9dílů moči a jeden díl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírové na m-AgSAE.

Koncentrační rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
2-10	1,735	+0,241	0,9691	0,65	2,15

4. Závěr

Pro stanovení simvastatinu byly vypracovány metody diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie na CPE. Jako ideální složení uhlíkové pasty bylo zvoleno složení s mikrokuličkami ze skelného uhlíku a minerálního oleje.

Uhlíková pastová elektroda byla použita pro určení reverzibility elektrochemické oxidace v roztoku simvastatinu technikou cyklické voltametrie. Měření probíhalo v κ BR-MeOH. Měření bylo zjištěno, že oxidace simvastatinu je ireverzibilní proces. Pomocí sledování závislosti velikosti proudu píku I_p na rychlosti skenu, bylo zjištěno, že děje probíhající na povrchu elektrody jsou pravděpodobně řízené difúzí. CV se stejnými podmínkami měření jako pro studium elektrodoových procesů, byla použita i pro sledování stálosti zásobního roztoku simvastatinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Srovnávací metodou pro stálost zásobního roztoku byla UV/VIS spektrofotometrie v rozsahu 235-800 nm proti methanolu. Srovnání ukázalo, že degradace simvastatinu, která se projevila v CV, není pomocí spektrofotometrie detegovatelná. Zásobní roztok simvastatinu byl stabilní po dobu 7 hodin.

Pro metodu DCV bylo jako optimální prostředí zvolena směs Brittonova-Robinsonova pufru o pH 5,5 (80%) a methanolu (20%). Pro DPV bylo jako optimální prostředí zvolena směs Brittonova-Robinsonova pufru o pH 3 (80%) a methanolu (20%). Tyto pH byly použity pro sledování kalibračních závislostí. Pro DC voltametrii byla mez detekce $0,36 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace $1,2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro techniku DPV byla mez detekce $0,32 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace $1,09 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Metoda DPV byla nepatrně citlivější a snáze vyhodnotitelná, než DC voltametrie, proto byla tato technika použita pro stanovením obsahu simvastatinu v léčivech Simvax 20, Simvacard 20 a Simgal 10. Obsah simvastatinu byl stanoven metodou standardního přídatku. Výtěžnost stanovení pro všechna léčiva byla $92 \pm 3\%$. Srovnávací metodou bylo HPLC stanovení s UV detekcí při 238 nm. Obsah simvastatinu byl určen z porovnání naměřených dat mezi roztokem standardu a roztokem léčiva. Nejvyšší výtěžek poskytovala tato metoda pro léčivo Simvax 20 a to $132 \pm 3,6\%$. Pro zbylá dvě léčiva byl výtěžek 103 a $106 \pm 2\%$.

Byla také zkoumána možnost využití voltametrického stanovení simvastatinu v matici biologického vzorku. Jako matrice byla zvolena desetinásobně zředěná moč

a následně i plná neředěná moč. Pro matrici desetinásobně zředěné moči byla mez detekce $1,83 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace $6,10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro matrici plné moči byla mez detekce $0,65 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace $2,15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření ukázalo, že touto technikou je principálně možné simvastatin v moči stanovit, ale do budoucna je třeba nalézt optimální postup pro předúpravu vzorku moči.

5. Literatura

- [1] **HECHT, H. S., HARMAN, S. M.** Comparison of the Effects of Atorvastatin Versus Simvastatin on Subclinical Atherosclerosis in Primary Prevention as Determined by Electron Beam Tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003, vol. 91, p. 42–45.
- [2] **KIM, K., KANG, J., KIM, D., PARK, S., PARK, S. H., KIM, D., PARK, K. D., LEE, Y. J., JUNG, H., PAN, J., AHN, T.** Generation of Human Chiral Metabolites of Simvastatin and Lovastatin by Bacterial CYP102A1 Mutants. *Drug Metab. Dispos.*, 2011, vol. 39, no. 1, p. 140–150.
- [3] **XU, Q., LIU, Y., ZHANG, Q., MA, B., YANG, Z., LIU, L., YAO, D., CUI, G., SUN, J., WU, Z.** Metabolomic analysis of simvastatin and fenofibrate intervention in high-lipid diet-induced hyperlipidemia rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, vol. 35, p. 1265–1273.
- [4] **LIN, P., CHANG, A. Y., LINC, T.** Simvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in rats exposed to chronic mild stress. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, 2014, vol. 124, p. 174–179.
- [5] **TULBAH, A. S., ONG, H. X., COLOMBO, P., YOUNG, P. M., TRAINI, D.** Novel Simvastatin Inhalation Formulation and Characterisation. *AAPS PharmSciTech*, 2014, vol. 15, no. 4, p. 956–962
- [6] **STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV**, Souhrn údajů o přípravku Simgal.
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0032579&tab=texts>
(staženo 28.4 2015).
- [7] **STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV**, Souhrn údajů o přípravku Simvacard.
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0058775&tab=texts>
(staženo 28.4 2015).
- [8] **STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV**, Souhrn údajů o přípravku Simvax.
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0049912&tab=texts>
(staženo 28.4 2015).

- [9] **WANG, X., LIU, M., YANG, M., ZHANG, Y., ZHANG, D., ZHANG, L., HAN, J., LIU, H.** Gender differences in pharmacokinetics of a combination tablet of niacin extended-release/simvastatin in healthy Chinese volunteers. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2014, vol. 39, p. 321–326.
- [10] **KADDURAH-DAOUK, R., BAILLIE, R. A., ZHU, H., ZENG, Z., WIEST, M. M., NGUYEN, U. T., WOJNOONSKI, K., WATKINS, S. M., TRUPP, M., KRAUSS, R. M.** Enteric Microbiome Metabolites Correlate with Response to Simvastatin Treatment. *Plos one*, 2011, vol. 6, no. 10, p. 1-11.
- [11] **CONSTANTINIDES, A., DE VRIES, R., VAN LEEUWEN, J. J., GAUTIER, T., VAN PELT, L. J., TSELEPIS, A. D., LAGROST, L., DULLAART, R. P.** Simvastatin but not bezafibrate decreases plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 mass in type 2 diabetes mellitus: Relevance of high sensitive C-reactive protein, lipoprotein profile and low-density lipoprotein (LDL) electronegativity. *Eur. J. Inter. Med.*, 2012, vol. 23, p. 633–638.
- [12] **WANG, Ch., FU, Y., JIAN, S., WANG, Y., LIU, P., HO, M., WANG, Ch.** Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, vol. 432, p. 190–199
- [13] **SA'NCHEZ-QUESADA, J. L., OTAL-ENTRAIGAS, C., FRANCO, M., JORBA, O., GONZA' LEZ-SASTRE, F., BLANCO-VACA, F., ORDO'NEZ-LLANOS, J.** Effect of Simvastatin Treatment on the Electronegative Low-Density Lipoprotein Present in Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1999, vol. 84, no. 15, p. 655–659
- [14] **GALTIER, F., MURA, T., RAYNAUD DE MAUVERGER, E., CHEVASSUS, H., FARRET, A., GAGNOL, J., COSTA, F., DUPUY, A., PETIT, P., CRISTO, J., MERCIER, J.** Effect of a high dose of simvastatin on muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling in healthy volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, vol. 263, p. 281–286
- [15] **ZHOU, J., LI, W., XIE, Q., HOU, Y., ZHAN, S., YANG, X., XU, X., CAI, J., HUANG, Z.** Effects of Simvastatin on Glucose Metabolism in Mouse MIN6 Cells. *J. Diab. Res.*, 2014, p. 1–10
- [16] **KATZUNG, B. G.** *Základní a klinická farmakologie*. Látky používané při hyperlipidemii, H+H, Praha 2006, 2.vyd., Kapitola 35, p. 563–565.

- [17] **LULLMAN, H., MOHR, C., WCHLING, M.** *Farmakologie a toxikologie*. Krev, terapie hyperlipoproteinnemie, Garda, Praha 2009, 2.vyd., p. 238–243.
- [18] **LINCOVÁ, D., FARGHALLI, H.** *Základní a aplikovaná farmakologie*. Látky ovlivňující kardiovaskulární a renální systém, Galén, Praha 2007, 2. vyd., p. 266–267.
- [19] **YANG, H., CHOI, M., WEN, H., KWON, H. N., JUNG, K. H., HONG, S., KIM, J. M., HONG, S., PARK, S.** An Effective Assessment of Simvastatin-Induced Toxicity with NMR-Based Metabonomics Approach. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 2, p. 1-12.
- [20] **KAMINSKY, Y. G., KOSENKO, E. A.** Molecular mechanisms of toxicity of simvastatin, widely used cholesterol-lowering drug. A review. *Cent. Eur. J. Med*, 2010, vol. 5, no. 3, p. 269–279.
- [21] **KNAPIK-CZAJKA, M.** Simvastatin increases liver branched-chain α -ketoacid dehydrogenase activity in rats fed with low protein diet. *Toxicology*, 2014, vol. 325, p. 107–114.
- [22] **AHMED, O. A., HOSNY, K. M., AL-SAWAHL, M. M., FAHMY, U. A.** Optimization of caseinate-coated simvastatin-zein nanoparticles: improved bioavailability and modified release characteristics. *Drug Des., Dev. Ther.*, 2015, vol. 9, p. 655–662.
- [23] **BENI´TEZ, S., ORDO´NEZ-LLANOS, J., FRANCO, M., MARI´N, C., PAZ, E., LO´PEZ-MIRANDA, J., OTAL, C., PE´REZ-JIME´NEZ, F., SA´NCHEZ-QUESADA, J. L.** Effect of Simvastatin in Familial Hypercholesterolemia on the Affinity of Electronegative Low-Density Lipoprotein Subfractions to the Low-Density Lipoprotein Receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2004, vol. 93, p. 414–420.
- [24] **DRAPALA, A., ALEKSANDROWICZ, M., ZERA, T., SIKORA, M., SKRZYPECKI, J., KOZNIIEWSKA, E., UFNAL, M.** The effect of simvastatin and pravastatin on arterial blood pressure, baroreflex, vasoconstrictor, and hypertensive effects of angiotensin II in Sprague–Dawley rats. *J.Am. Soc. Hyperten*, 2014, vol. 8, no. 12, p. 863–871.
- [25] **BEVERLY, B. E. J., LAMBRIGHT, Ch. S., FURR, J. R., SAMPSON, H., WILSON, V. S., McINTYRE, B. S., FOSTER, P. M. D., TRAVLOS, G., GRAY, JR, L. E.** Simvastatin and Dipentyl Phthalate Lower Ex Vivo Testicular Testosterone Production and Exhibit Additive Effects on Testicular Testosterone and Gene Expression Via Distinct Mechanistic Pathways in the Fetal Rat. *Tox.Sci.*, 2014, vol. 141, no. 2, p. 524–537.

- [26] **PISKIN, E., ISOGLU, A., BOLGEN, N., VARGEL, I., GRIFFITHS, S., CAVUSOGLU, T., KORKUSUZ, P., GUZEL, E., CARTMELL, S.** In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2008, p. 1137–1151.
- [27] **JIA, Z., ZHANG, Y., CHEN, Y. H., DUSAD, A., YUAN, H., RENA, K., LI, F., FEHRINGER, E. V., PURDUE, P. E., GOLDRING, S. R., DALUISKI, A.** Simvastatin prodrug micelles target fracture and improve healing. *J. Controlled Release*, 2015, vol. 200, p. 23–34.
- [28] **NATHA, S. D., SONA, S., SADIASAA, A., MINB, Y. K., LEEA, B. T.** Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electro spraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *Int. J. Pharm.*, 2013, vol. 443, p. 87–94.
- [29] **SKERRY, C., PINN, M. L., BRUINERS, N., PINE, R., GENNARO, M. L., KARAKOUSIS, P. C.** Simvastatin increases the in vivo activity of the first-line tuberculosis regimen. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, p. 2453–2457.
- [30] **KHORI, V., ALIZADEH, A. M., MOHEIMANI, H. R., ZAHEDI, M., NAJAFI, S. A., SHAKIB, D., NAYEBPOUR, M.** Acute effects of simvastatin to terminate fast reentrant tachycardia through increasing wavelength of atrioventricular nodal reentrant tachycardia circuit. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2015, vol. 29, p. 41–53.
- [31] **PRUEKSARITANONT, T., MA B., YU, N.** The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2003, vol. 56, p. 120–124.
- [32] **KITZMILLERA, J. P., LUZUMA, J. A., BALDASSARREC, D., KRAUSSB, R. M., MEDINAB, M. W.** CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort. *Pharmacogenet. and Genom.*, 2014, vol. 24, p. 486–491
- [33] **MORÓN, B., VERMA, A. K., DAS, P., TAAVELA, J., DAFIK, L., DIRAIMONDO, T. R., ALBERTELLI, M. A., KRAEMER, T., MÄKI, M., KHOSLA, Ch., ROGLER, G.** CYP3A4-Catalyzed Simvastatin Metabolism as a Non-Invasive Marker of Small Intestinal Health in Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*, 2013, vol. 108, p. 1344–1351

- [34] **GEHIN, M., SIDHARTA, P. N., GNERRE, C., TREIBER, A., HALABI, A., DINGEMANSE, J.** Pharmacokinetic interactions between simvastatin and setipiprant, a CRTH2 antagonist. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2015, vol. 71, p. 15–23.
- [35] **CORSINI, A., BELLOSTA, S., DAVIDSON, M. H.** Pharmacokinetic Interactions Between Statins and Fibrates. *Amer. J. Cardi.* 2005, vol. 96, p. 44K–49K.
- [36] **SIGMA ALDRICH, Bezpečnostní list Simvastatin.** www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=SIMVASTATIN&interface=DAI&N=0&mode=match%2520partialmax&lang=Den®ion=DCZ&focus=product (staženo 27. 4 2015)
- [37] **TIAN, L., TAO, J., CHEN, L.** Synthesis of deuterium-labeled simvastatin. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2011, vol. 54, p. 625–628.
- [38] **SINGAMSETTY, R. K., VUJJINI, S. K., MANNE, N., NAGA, B. M., HIMABINDU, V., BATTACHARYA, A., GHANTA, M., BANDICHHOR, R.** New Synthesis of Simvastatin. *Synth. Commun.*, 2008, vol. 38, p. 4452–4459.
- [39] **BERTACCHE, V., MILANESE, A., NAVA, D., PINI, E., STRADI, R.** Structural elucidation of an unknown Simvastatin by-product in industrial synthesis starting from Lovastatin. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2007, vol. 45, p. 642–647
- [40] **DABAK, K., ADIYAMAN, M.** A New Method for the Synthesis of Antihypercholesterolemic Agent Simvastatin. *Helv. Chem. Act.*, 2003, vol. 86, p. 673–677
- [41] **ALARFAJ, N. A., ALY, F. A., EL-TOHAMY, M.** Electrochemical sensors for direct determination of simvastatin in pharmaceutical formulations and biological fluids. *J. Chil. Chem. Soc.*, 2012, vol. 57, no. 2, p. 1140–1146.
- [42] **MUNIR, A., AHMAD, M., MALIK, M. Z., MINHAS, M. U.** Analysis of Simvastatin using a Simple and Fast High Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet Method: Development, Validation and Application in Solubility Studies. *Trop. J. Pharmaceut. Res.*, 2014, vol. 13, no. 1, p. 135–139.
- [43] **SILVA, S. C. R., DE REZENDE, G. R., BERGAMIN BORALLI, V.** Quick and simple LC-MS/MS method for the determination of simvastatin in human plasma: application to pharmacokinetics and bioequivalence studies. *Braz. J. Pharmaceut. Sci.*, 2014, vol. 50, no. 3, p. 543–550.

- [44] **RAMALINGAM, P., UDAYA BHASKAR, V., PADMANABHA, Y., REDDY, K., KUMAR, V.** Stability-indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Sitagliptin and Simvastatin in Tablets. *Ind. J. Pharmaceut. Sci.*, 2014, vol. 8, p. 407–414.
- [45] **BEWSA, H. J., CARLSONA, J. C., JHAC, A., BASUC, S., HALAYKOC, A. J., WONGA, Ch. S.** Simultaneous quantification of simvastatin and simvastatin hydroxyacid in blood serum at physiological pH by ultrahigh performanceliquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC/MS/MS). *J. Chromatograp. B*, 2014, vol. 947, p. 145–150.
- [46] **SRINIVASU, M., NARASA RAJU, A., OM REDDY, G.** Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, vol. 29, p. 715–721.
- [47] **ZHAOA, L., ZHAOB, P., WANGB, L., MAB, X., HOUB, X., LIA, F.** A dispersive liquid–liquid microextraction method based on the solidification of a floating organic drop combined with HPLC for the determination of lovastatin and simvastatin in rat urine. *Biomed. Chromatogr.*, 2014, vol. 28, p. 895–900.
- [48] **SHARAF EL-DINA, M. M., ATTIA, K. A., NASSARB, M. W., KADDAH, M. M.** Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, vol. 76, p. 423–428
- [49] **FAYAZFAR, H., AFSHAR, A., DOLATI, A., GHALKHANI, M.** Modification of well-aligned carbon nanotubes with dihexadecyl hydrogen phosphate: application to highly sensitive nanomolar detection of simvastatin. *J. Appl. Electrochem.*, 2014, vol. 44, p. 263–277
- [50] **WANG, H., WU, Y., ZHAO, Z.** Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2001, vol. 36, p. 58–70.
- [51] **ZHANG, H., HU, Ch, WU, S., HUA, S.** Enhanced Oxidation of Simvastatin at a Multi-Walled Carbon Nanotubes-Dihexadecyl Hydrogen Phosphate Composite Modified Glassy Carbon Electrode and the Application in Determining Simvastatin in Pharmaceutical Dosage Forms. *Electroanalysis*, 2005, vol. 17, no. 9, p. 749–754.
- [52] **YANG, H., CHOI, M., WEN, H., KWON, H. N., JUNG, K. H., HONG, S., KIM, J. M., HONG, S., PARK, S.** An Effective Assessment of Simvastatin-Induced Toxicity with NMR-Based Metabonomics Approach. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 2, p. 1-12

- [53] **NUNES, T. G., VICIOSA, M. T., CORREIA, N. T., DANÈDE,, F., NUNES, R. G., DIOGO, H. P.** A Stable Amorphous Statin: Solid-State NMR and Dielectric Studies on Dynamic Heterogeneity of Simvastatin. *Mol. Pharmaceutics*, 2014, vol. 11, p. 727–737.
- [54] **KOMORSKY-LOVRIC, S. E., NIGOVIC, B.** Electrochemical characterization of simvastatin by abrasive stripping and square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, 2006, vol. 593, p. 125–130.
- [55] **MAGDY, N., AYAD, M. F.** Two smart spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of Simvastatin and Ezetimibe in combined dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molec. Biomolec. Spectroscop.*, 2015, vol. 137, p. 685–691.
- [56] **CORUH, O., OZKAN, S. A.** Determination of the antihyperlipidemic simvastatin by various voltammetric techniques in tablets and serum samples. *Pharmazie*, 2006, vol. 61, no. 4, p. 285–290.
- [57] **STOZHKO, N. Y., MALAKHOVA, N. A., FYODOROV, M. V., BRAININA, K. Z.** Modified carbon-containing electrodes in stripping voltammetry of metals, Part I. Glassy carbon and carbon paste electrodes. *J Sol. Stát. Electrochem*, 2008, vol. 12, p. 1185–1204.
- [58] **IBRAHIM, H., TEMERK, Y.** Novel sensor for sensitive electrochemical determination of luteolin based on In₂O₃ nanoparticles modified glassy carbon paste electrode. *Sensors and Actuators B*, 2015, vol. 206, p. 744–752
- [59] **NEMCOVA, L., BAREK, J., ZIMA, J.** A voltammetric comparison of the properties of carbon paste electrodes containing glassy carbon microparticles of various sizes. *J. Electroanal. Chem.*, 2012, vol. 675, p. 18–24.
- [60] **MIKYSEK, T., STOČES, M., ŠVANCARA, I., VYTRÁS, K.** Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod. *Chem. Listy*, 2014, vol. 108, p. 513–518.
- [61] **PEDANO, M. L., RIVAS, G. A.** Adsorption and electrooxidation of DNA at glassy carbon paste electrode. *Analytical Letters*, 2010, vol. 43, p. 1703–1712.
- [62] **WANG, J., KIRGOZ, U., MO, J., LU, J., KAWDW, A. N., MUCK, A.** Glassy carbon paste electrodes. *Electrochemistry communications*, 2001, vol. 3, p. 203–208.

- [63] **NĚMCOVÁ, L.** Příspěvek k využití nových typů uhlíkových pastových a vlakových elektrod pro voltametrické a amperometrické stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu a reserpatrolu: *disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, 2012.
- [64] **ŠVANCARA, I., VYTRŘAS, K., KALCHER, K., WALCARIUS, A., WANG, J.** Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, no. 1, p. 7–28.
- [65] **ANTIOCHIA, R., LAVAGNINI, I., MAGNO, F., VALENTINI, F., PALLESCHIB, G.** Single-Wall Carbon Nanotube Paste Electrodes: a Comparison with Carbon Paste, Platinum and Glassy Carbon Electrodes via Cyclic Voltammetric Data. *Electroanalysis*, 2004, vol. 16, no. 17, p. 1451–1458.
- [66] **DEJMKOVA, H., ZIMA, J., BAREK, J., MIKA, J.** Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in Flowing Methanolic Solutions. *Electroanalysis*, 2012, vol. 24, no. 8, p. 1766–1770.
- [67] **HRANICKÁ, Z.** Stanovení vybraných nitrofenolů na modifikovaných uhlíkových pastových elektrodách: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [68] **ŠVANCARA, I.** *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Praha, 2006. 5, Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami, p. 49–58.
- [69] **Index lomu simvastatinu.** www.chemnet.com.
<http://www.chemnet.com/cas/supplier.cgi?terms=79902-63-9&l=cz&exact=dict&f=plist&mark=&submit.x=0&submit.y=0&submit=search> (staženo 3.5 2015)
- [70] **REINOSO, R. F., SANCHEZ NAVARRO, A., GARCIA, M. J., PROUS, J. R.** Preclinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2002, vol. 24, no. 9, p. 593.
- [71] **JIN, S.; BAE, K.; CHO, S.; JUNG, J.; KIM, U.; CHOE, S.; GHIM, J.; NOH, Y.; PARK, H.; KIM, H.; LIM, H.** Population Pharmacokinetic Analysis of Simvastatin and its Active Metabolite with the Characterization of Atypical Complex
- [72] **AL-GHAMDI, A. F., HEFNAWY, M. M., EL-SHABRAWY, Y.** Non-extractive ultra-trace determination of simvastatin in biological fluids by voltammetric method via complexation with cadmium. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2014, vol. 9, no. 1, p. 355–368.

- [73] **YOSYPCHUK, B., NOVOTNY, L.** Voltametrické stanovení Cu, Pb, Cd, Zn a Tl pomocí stříbrné pevné amalgámové elektrody. *Chem. Listy*, 2002, vol. 96, p. 756–760.
- [74] **YOSYPCHUK, B., BAREK, J.** Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chem. Listy*, 2009, vol. 103, p. 284–290.
- [75] **YOSYPCHUK, B., BAREK, J.** Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2009, vol. 39, p. 189–203.
- [76] **YOSYPCHUK, B., NOVOTNÝ, L.** Nontoxic Electrodes of Solid Amalgams. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2002, vol. 32, no. 2, p. 141–151.
- [77] **DAŇHEL, A.** *Voltametrické stanovení genotoxických dinitroftalenů pomocí stříbrné pevné amalgámové elektrody: diplomová práce.* Univerzita Karlova v Praze, 2006.
- [78] **YOSYPCHUK, B., NAVRÁTIL, T., LUKINA, A. N., PECKOVÁ, K., BAREK, J.** Solid Amalgam Composite Electrode as a New Sensor for the Determination of Biologically Active Compounds. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2007, vol. 52, p. 897-910
- [79] **AL-GHAMDI, A. F.** Stripping Voltammetric Determination of Timolol Drug in Pharmaceuticals and Biological Fluids. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2011, vol. 2, p. 174–181.
- [80] **YOSYPCHUK, B., ŠESTÁKOVÁ, I.** Working Electrodes from Amalgam Paste for Electrochemical Measurements. *Electroanalysis*, 2008, vol. 20, no. 4, p. 426–433.
- [81] **YOSYPCHUK, B., FOJTA, M., BAREK, J.** Preparation and Properties of Mercury Film Electrodes on Solid Amalgam Surface. *Electroanalysis*, 2010, vol. 22, no. 17-18, p. 1967–1973.
- [82] **MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR** *Český lékopis 2009-Doplněk 2010.* Grada Publishing a.s, Praha 2010, p.5067-5069