

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ FLUTAMIDU NA RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR
(projekt MSM 0021620857 a LC 06035)

Bakalářská práce

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233141195

Praha 2007

Markéta Průchová


Prohlášení

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 - 2007, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala.

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 8. června 2007

Handwritten signature in cursive script, reading "Markéta Peřichová". The signature is written over a dotted horizontal line.

podpis

Předmětová hesla:

protinádorová léčiva
voltametrie
rtuťová elektroda

Klíčová slova:

flutamid
DC voltametrie
diferenční pulzní voltametrie
visící rtuťová kapková elektroda

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych ráda poděkovala Mgr. Karolině Peckové Ph.D. za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytovala pomoc při práci.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, celé rodině i přátelům za podporu.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk	6
1 Úvod	8
1.1 Biologické vlastnosti	8
1.1.1 Farmakologické vlastnosti	8
1.1.2 Farmakokinetika u lidí	8
1.1.3 Toxikokinematika u zvířat	8
1.2 Analytické metody stanovení flutamidu dle Českého lékopisu	11
1.3 Pracovní elektroda	12
1.4 Cíl práce	13
2 Experimentální část	14
2.1 Reagencie	14
2.2 Studovaná látka	15
2.3 Aparatura	16
2.4 Pracovní postupy	17
2.5 Stabilita zásobních roztoků flutamidu	18
3 Voltametrické stanovení flutamidu na visící rtuťové kapkové elektrodě	20
3.1 DC voltametrie flutamidu	20
3.1.1 Vliv pH prostředí na DC voltamogramy flutamidu	20
3.1.2 Koncentrační závislost	23
3.1.3 Ověření difúzního charakteru limitního proudu	26
3.2 Diferenční pulzní voltametrie flutamidu	28
3.2.1 Vliv pH prostředí na DP voltamogramy flutamidu	28
3.2.2 Koncentrační závislost	31
3.3 Cyklická voltametrie	34
4 Aplikace vyvinuté metody	36
5 Závěr a diskuze	39
Literatura	41

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance
A_{294}	absorbance při vlnové délce absorpčního maxima 294 nm
c	koncentrace, mol dm ⁻³
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CNS	centrální nervová soustava
DCV	DC voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DP voltamogramy	diferenční pulzní voltamogramy
E	potenciál, mV
E_p	potenciál píku, mV
FLD	flutamid
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
I_p	proud píku, nA
Korel.koef.	korelační koeficient
L_Q	mez stanovitelnosti
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
$m_{FLD,nav}$	hmotnost FLD ve vzorku, mg
$m_{FLD,tab}$	hmotnost FLD v tabletě, mg
m_{NAV}	hmotnost navážky vzorku, g
m_{stan}	stanovená hmotnost, mg
m_{tab}	hmotnost tablety, g
m_{uved}	hmotnost FLD uvedená výrobcem, mg
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH ^f	výsledné pH směsi vodná fáze-methanol (9:1)
Pr-i	isopropyl
s	směrodatná odchylka mediánu
s_r	relativní směrodatná odchylka mediánu
$v_{sc}^{1/2}$	druhá odmocnina z rychlosti scanu, (mV s ⁻¹) ^{1/2}
ϵ	molární absorpční koeficient, dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹

λ	vlnová délka, nm
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima, nm
ρ	hustota, g cm ⁻³
\tilde{x}	medián

1 ÚVOD

Flutamid (FLD, strukturní vzorec viz **Obr. 2.1** v kapitole 2.2) je léčivo patřící do indikační skupiny cytostatik. Flutamid, 4-nitro-3-trifluoromethyl-isobutylanilide, je syntetický antiandrogen, který se používá při rakovinném onemocnění prostaty.¹

1.1 Biologické vlastnosti

1.1.1 Farmakologické vlastnosti

Flutamid je neobvyklá látka ze skupiny antiandrogenních léčiv bez steroidní struktury. Je podáván v lékové formě žlutých kulatých potahovaných tablet při pokročilých stádiích karcinomu prostaty. Vykazuje silný antiandrogenní účinek podmíněný inhibicí vychytávání androgenů nebo inhibicí vazby androgenů v jádrech buněk cílových tkání.²

1.1.2 Farmakokinetika u lidí

Flutamid je po orální aplikaci kompletně absorbován a následně vylučován po dobu 72 hodin hlavně močí, 4,2 % je vylučováno stolicí. Poločas metabolického rozkladu flutamidu je 6 hodin. Flutamid je metabolizován na 10 metabolitů, z nichž hlavní jsou 2-hydroxyflutamid v plazmě a 2-amino-5-nitro-4-(trifluoromethyl)fenol v moči.²

1.1.3 Toxikokinematika u zvířat

U potkanů byla vyzorována rovnováha po 6 hodinách a koncentrace je nejvyšší v gastrointestinálním traktu, játrech a ledvinách. Nedochozí ke kumulaci samotného léčiva a vzniklých metabolitů v pohlavních ani jiných orgánech.² Testování toxicity uvedené v bezpečnostním listě³ je shrnuto v **Tab. 1.1**, **Tab. 1.2**, **Tab. 1.3**.

Tab. 1.1 Testování akutní toxicity.³

AKUTNÍ TOXICITA			
Zvíře	Způsob podání	Dávka mg kg ⁻¹	Účinky
krysa	orální	787	snížení teploty těla inkontinence hematurie ^a
krysa	intraperitoneální	289	snížení teploty těla změna doby spánku cyanóza
pes	orální	> 2000	nevolnost zvracení

^a - příměs krve v moči.⁴

Tab. 1.2 Testování chronické toxicity.³

CHRONICKÁ EXPOZICE – KARCINOGENITA				
Zvíře	Způsob podání	Doba trvání expozice den	Účinky	
krysa	orální	14	tumory varlat	
CHRONICKÁ EXPOZICE – MUTAGENITA				
Zvíře	Dávka μmol dm ⁻³	Zkoumaný buněčný typ	Účinky	
krysa	50	Játra	inhibice DNA	
CHRONICKÁ EXPOZICE - TERATOGENITA				
Zvíře	Dávka mg kg ⁻¹	Způsob podání	Doba trvání expozice den	Lokalizace účinků
krysa	1050	orální	14 – 20	urogenitální systém
krysa	275	subkutánní	11 – 21	CNS
krysa	400	subkutánní	16 – 19	endokrinní systém
myš	300	subkutánní	14 – 16	urogenitální systém
vepř	1225	orální	42 – 112	embryo

Tab. 1.3 Testování rizik pro reprodukci.³ Pokud není uvedeno jinak pohlaví zkoumaného zvířete je samec.

CHRONICKÁ EXPOZICE – RIZIKA PRO REPRODUKCI				
Zvíře	Dávka mg kg ⁻¹	Způsob podání	Doba trvání expozice den	Lokalizace účinků
krysa	150	orální	30	varlata vývod spermatu, prostata, semenný váček, Cowperova žláza ^c , přídavné žlázy, nadvarlata ^d
krysa	280	intraperitoneální	7	prostata, semenný váček, Cowperova žláza ^c , přídavné žlázy
krysa	70	subkutánní	7	ovlivnění spermatogeneze
krysa ^a	65	intramuskulární	10 – 22 ^b	opožděnné následky u novorozenců
krysa	350	parenterální	7	varlata vývod spermatu, prostata, semenný váček, Cowperova žláza ^c , přídavné žlázy, nadvarlata
krysa ^a	200	parenterální	16 – 17 ^b	endokrinní systém
myš	80	subkutánní	10	ovlivnění spermatogeneze

a – samice, *b* - expozice v uvedených dnech gravidity, *c* - žláza produkující těsně před ejakulací zásaditý sekret, který neutralizuje zbytky moči v močové trubici, čímž se prodlužuje životnost spermií⁴,
d -epididymitida je zánětlivé onemocnění nadvarlat⁴.

1.2 Analytické metody stanovení flutamidu dle Českého lékopisu³

V Českém lékopise jsou popsány metody na stanovení totožnosti, na stanovení čistoty a obsahu.

Zkoušky na stanovení totožnosti jsou prováděny pomocí absorpční spektrofotometrie v infračervené oblasti od 4000 cm^{-1} do 650 cm^{-1} .

Pro stanovení čistoty je použita zkouška na těžké kovy, na ztrátu sušením, na síranový popel a na příbuzné látky, které jsou stanovovány pomocí metodiky HPLC.

Nečistoty, které by mohly znečišťovat zkoumaný vzorek FLD jsou např. 4-nitro-3-(trifluormethyl)anilin, N-[4-nitro-3-(trifluormethyl)fenyl]propanamid, 3-(trifluormethyl)anilin a 2-methyl-N-[2-nitro-5-(trifluormethyl)fenyl]propanamid.

Stanovení obsahu se provádí pomocí spektrofotometrického měření proměřením absorbance. Ověření zkoušky stanovení obsahu bylo provedeno souběžně v jiné bakalářské práci⁵ (výsledky nejsou v současné době k dispozici).

Vzhledem k lékařským aplikacím FLD byly prováděny studie stability. V práci⁸ byl studován vliv teploty, vlhkosti v pevném stavu, pH, teploty, iontové síly v roztocích FLD. Stabilita FLD v pevném stavu byla zkoumána při teplotách 5; 22 a 40 °C a při rozdílné vlhkosti. Analýza ukázala, že teplota a vlhkost nemá vliv na degradaci flutamidu v pevném stavu. Stabilita FLD v roztoku byla zkoumána při různé teplotě (5; 22 a 37 °C), pH a iontové síle (která byla upravena pomocí NaCl). Analýza ukázala, že degradace flutamidu v roztoku je velmi ovlivňována teplotou a pH. Nejstabilnější je flutamid v neutrálním pH, při teplotě 5 °C. Přídavek NaCl ovlivňuje stabilitu jen velmi málo.⁶

1.3 Pracovní elektroda⁷

Pro studium voltametrického chování FLD byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE). Každá analýza byla provedena na jediné kapce bez obnovování povrchu kapky v průběhu měření. Před další analýzou byla kapka mechanicky odklepnuta a vytvořena nová.

Výhodou této elektrody je menší spotřeba rtuti a menší nabíjecí proud, neboť povrch kapky se v průběhu měření nemění.

Nevýhodou v porovnání s kapající rtuťovou kapkovou elektrodou jsou možné vyšší problémy s pasivací vzhledem k neobnovovanému povrchu elektrody v průběhu jednoho voltametrického záznamu.

1.4 Cíl práce

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování protinádorového léčiva FLD. Cílem této práce je nalezení alternativní metody stanovení FLD současnou optimalizací podmínek pro toto stanovení na visící rtuťové kapkové elektrodě tak, aby bylo dosaženo co nejnižší meze stanovitelnosti. Za tímto účelem byla použita DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie.

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovaná látka: Flutamid (Sigma-Aldrich, Praha, ČR, čistota není uvedena)
Zásobní roztok flutamidu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 0,02762 g látky ve 100 ml methanolu (Lachema, Praha, ČR, 99,8%).

Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním zásobního roztoku látky methanolem. Všechny roztoky byly uchovány ve tmě, v ledničce a ve skleněných nádobách.

Analyzované léčivo: Apo-Futamid (Chanelle Medical, Nizozemí), s obsahem 250 mg FLD v 1 tabletě).

Další použité chemikálie: Kyselina boritá, octová kyselina, kyselina fosforečná, hydroxid sodný (Lachema, Praha, ČR, všechny čistoty p.a.).

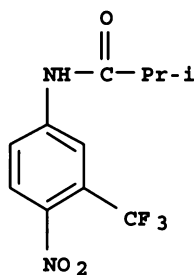
Brittonovy-Robisonovy pufrы (BR pufrы) o určitém pH byly připraveny smísením složky A o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a složky B obsahující kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$ (viz **Tab. 2.1**).

Tab. 2.1 Složení Brittonova-Robinsonova tlumivého roztoku.

SLOŽKA A (na 1 litr roztoku)	SLOŽKA B (na 2 litry roztoku)
8 g NaOH	5,488 g H_3BO_3 5,39 ml H_3PO_4 85%, $\rho = 1,71 \text{ g cm}^{-3}$ 4,54 ml CH_3COOH 99,8%, $\rho = 1,05 \text{ g cm}^{-3}$

2.2 Studovaná látka

Flutamid je nažloutlá, jemně krystalická látka, jejíž strukturní vzorec je uveden na **Obr. 2.1**. Je velmi obtížně rozpustný ve vodě (rozpustnost $1,46 \text{ mmol dm}^{-3}$)^[1] a velmi dobře rozpustný v methanolu a jiných organických rozpouštědlech. Souhrn fyzikálních vlastností a další charakteristiky FLD jsou uvedeny v **Tab. 2.2**.



Obr. 2.1 Strukturní vzorec FLD (Pr-i - isopropyl)

Tab. 2.2 Souhrn fyzikálních vlastností.

C.A.S. Name	flutamid
C.A.S. Registry number	13311-84-7
Sumární vzorec	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$
Molekulová hmotnost	$276,214 \text{ g mol}^{-1}$
Teplota tání ³	$112 \text{ }^\circ\text{C}$

2.3 Aparatura

Při voltametrických technikách byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1,(Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corp.).

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referenční elektroda byla použita argentochloridová elektroda ($1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$) typu RAE 113, Monokrystaly, Turnov. Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda. Pracovní elektroda byla visící rtuťová kapková typu UM μ E výrobního čísla 00406 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR).

Spektrofotometrické měření bylo prováděno na přístroji HP – Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer (Nizozemí) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,1 cm.

Přesná hodnota pH^f byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Uváděné hodnoty pH^f jsou hodnoty pH směsi vodná fáze-methanol (9:1) měřené tímto pH-metrem, který byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

2.4 Pracovní postupy

Při měření voltametrických křivek bylo postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem: Při studování vlivu pH na voltamogramy FLD (viz kapitoly 3.1.1 a 3.2.1) byl do odměrné baňky na 10 ml odpipetován 1 ml roztoku ze zásobního roztoku FLD v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a doplněn BR pufrem na 10 ml, při dalším studiu byl vždy doplněn roztokem NaOH o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly po promíchání převedeny do polarografické nádoby a zbaveny kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu s methanolem v poměru 9:1. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Všechny křivky byly měřeny třikrát za laboratorní teploty, pro vyhodnocení vlivu pH^f na voltamogramy FLD a kalibračních závislostí je uváděn medián \tilde{x} , pro vyhodnocení stanovované látky a opakovatelnosti je uváděna kromě mediánu \tilde{x} směrodatná odchylka s a interval spolehlivosti $L_{1,2}$ vypočtený na hladině významnosti 0,05 z rozpětí naměřených hodnot.

Rožtok připravovaný k analýze léčiva byl po rozdrcení tablety, odvážení asi 25 mg přesně a rozpuštění v 25 ml methanolu dále ředěn methanolem. Byly odebrány 4 ml roztoku a zředěny na 100 ml methanolem. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml a následně zředěn roztokem NaOH na 10 ml. Takto připravený rožtok byl použit k analýze.

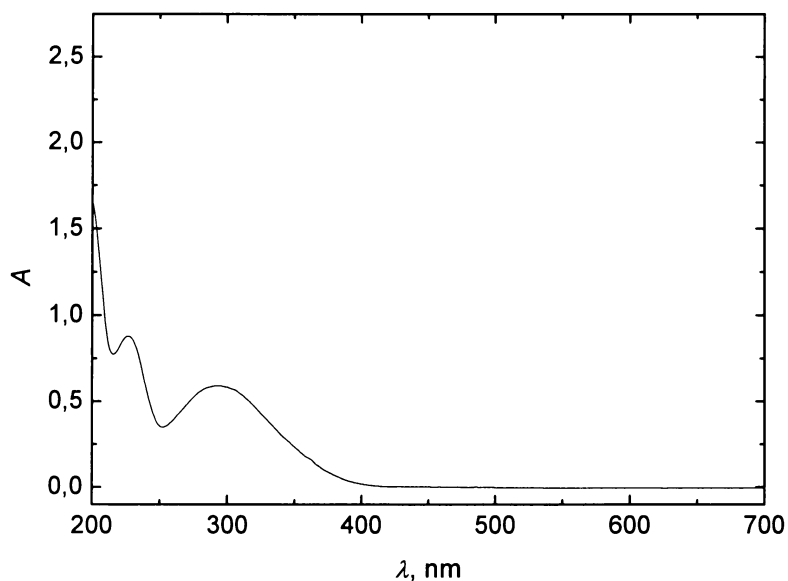
K zpracování naměřených dat a grafů byl použit program Microcal Origin 6.0 (Microcalsoftware, USA).

Mez stanovitelnosti byla spočtena jako koncentrace látky FLD, jejíž proudová odezva má hodnotu desetinásobku směrodatné odchylky tohoto stanovení.⁸

2.5 Stabilita zásobního roztoku flutamidu

Stálost zásobního roztoku studované látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v methanolu byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm. Referentní kyveta byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku byla měřena v rozmezí vlnových délek 170 až 700 nm. Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na **Obr. 2.2** Hodnota molárního absorpčního koeficientu (ϵ) při této vlnové délce činila $8113 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v **Tab. 2.3**.

Z výsledků uvedených v **Tab. 2.3** vyplývá, že v zásobním roztoku flutamidu v methanolu, uchovávaném za nepřístupu světla v chladničce, nedošlo k významnému poklesu koncentrace studované látky. Je tedy patrné, že zásobní roztok je při uchovávání za těchto podmínek dostatečně stálý.



Obr. 2.2 Absorpční spektrum roztoku flutamidu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm.

Tab. 2.3 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku flutamidu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku ($\lambda_{max} = 294 \text{ nm}$), měrná tloušťka kyvety byla 0,1 cm.

Dny	0	2	4	8	18	22	45
A_{294}	0,8113	0,8055	0,7839	0,7761	0,8030	0,7937	0,8028
[%]	100,00	99,29	96,62	95,66	98,98	97,83	98,95

3 Voltametrické stanovení flutamidu na visící rtuťové kapkové elektrodě

3.1 DC voltametrie flutamidu

Při DCV je potenciál vkládaný na pracovní elektrodu lineárně měněn s časem (roste či klesá). Proudová odezva neboli závislost měřeného proudu procházejícího pracovní elektrodou na vkládaném potenciálu je ve tvaru vlny až sigmoidálního píku.⁷

3.1.1 Vliv pH prostředí na DC voltamogramy flutamidu

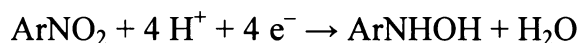
Vliv pH na chování flutamidu měřený metodou DCV na HDME byl sledován v prostředí BR pufr-methanol (9:1) o příslušném pH^f (2 – 12). Koncentrace látky byla 1.10⁻⁴ mol dm⁻³. Vybrané zaznamenané voltametrické křivky jsou ukázány na **Obr. 3.1**. Na změřených voltamogramech lze pozorovat jeden až dva dobře vyvinuté píky. Při pH^f 2 – 7 lze rozlišit dva píky, při pH^f 8 – 12 lze rozlišit pouze jeden pík. Potenciál všech píků E_p se s rostoucím pH^f posouvá k zápornějším hodnotám. Zjištěné hodnoty I_p a E_p v závislosti na pH^f jsou zaznamenány v **Tab. 3.1**. Graficky je závislost E_p na pH^f roztoku znázorněna na **Obr. 3.2**, závislost I_p na pH^f je znázorněna na **Obr. 3.3**.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku vypočten vztah:

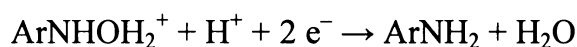
$$-E_p [\text{mV}] = 63,36 \text{ pH}^f - 40,13 \quad (\text{korel. koef. } 0,9966)$$

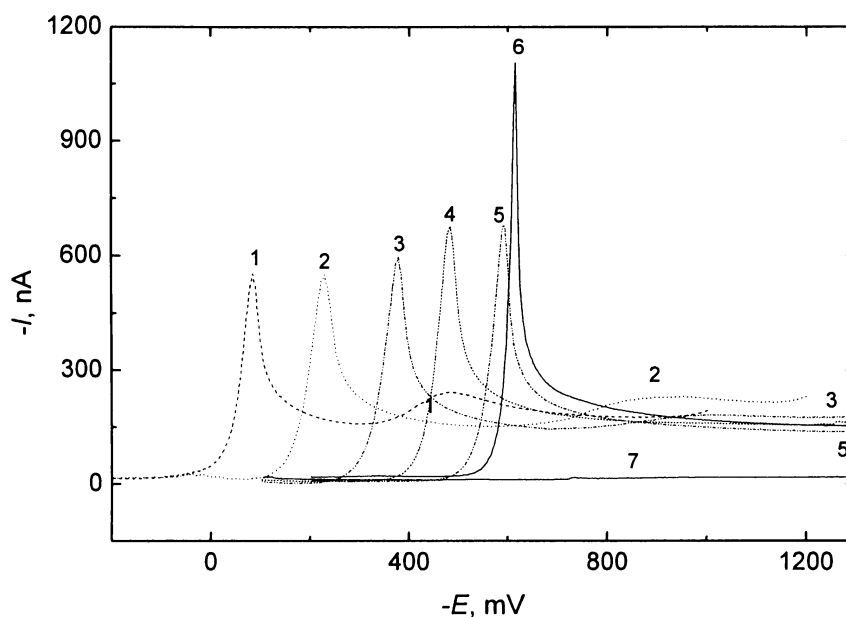
Na základě analogického chování FLD s již prostudovanými nitro aromáty lze pozorovaným píkům přisoudit tyto elektrodové děje.

První pík odpovídá reakci⁹:



Druhý pík vyskytující se pouze v kyselém prostředí odpovídá reakci⁹:



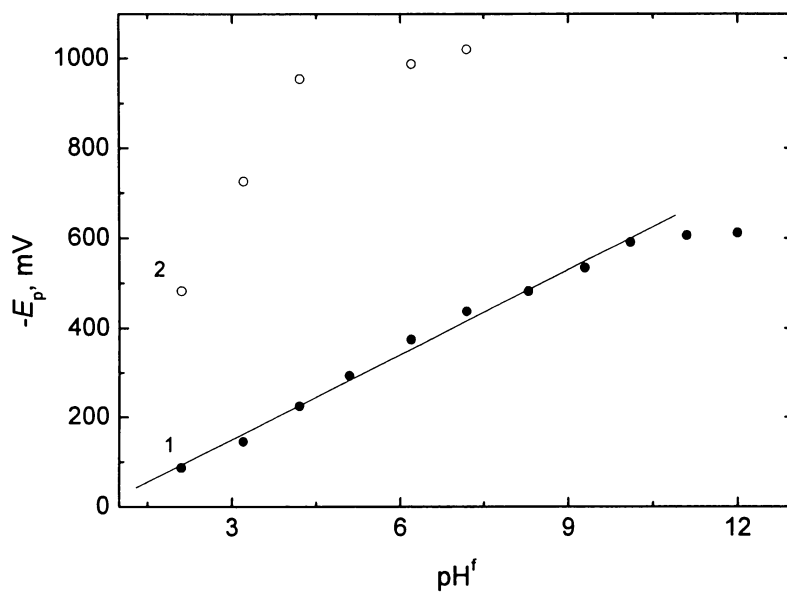


Obr. 3.1 Voltamogramy FLD ($c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr-methanol (9:1) o výsledném pH^f 2,1 (1), 4,2 (2), 6,2 (3), 8,3 (4), 10,1 (5), 12,0 (6) a voltamogram základního elektrolytu (7) měřený při pH^f 2.

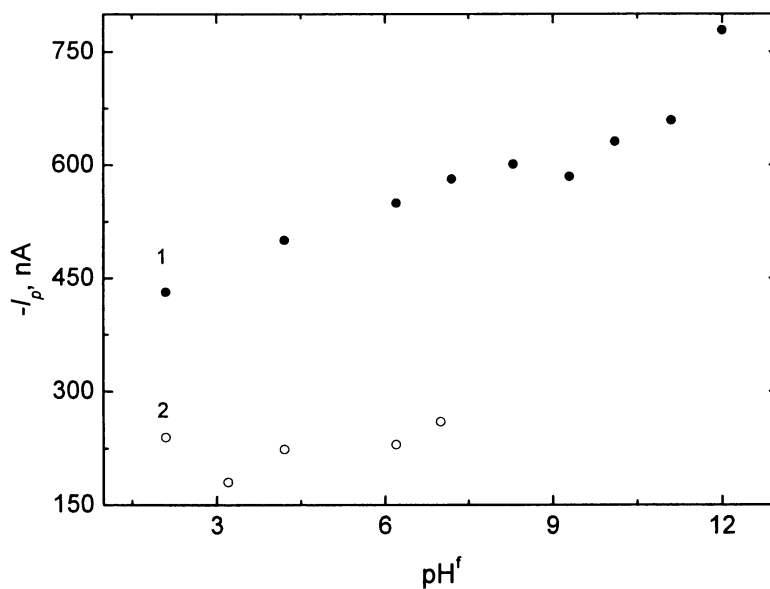
Tab. 3.1 Vliv pH^f na DC voltamogramy FLD ($c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené na HDME v prostředí BR pufr-methanol (9:1).

pH	pH^f	$-E_p^1$ mV	$-I_p^1$ nA	$-E_p^2$ mV	$-I_p^2$ nA
2,0	2,1	84	533	483	240
3,0	3,2	141	427	726	180
4,0	4,2	228	543	954	224
5,0	5,1	294	327	- ^a	- ^a
6,0	6,2	374	267	987	230
7,0	7,2	438	686	1020	260
8,0	8,3	483	677	-	-
9,0	9,3	531	629	-	-
10,0	10,1	591	680	-	-
11,0	11,1	606	738	-	-
12,0	12,0	615	1106	-	-

pH - pH použitého BR pufru, pH^f - výsledné pH směsi BR pufr-methanol (9:1), E_p^1 - potenciál prvního píku, E_p^2 - potenciál druhého píku, I_p^1 - proud prvního píku, I_p^2 - proud druhého píku, a - pík nelze vyhodnotit



Obr. 3.2 Závislost potenciálu píku E_p FLD ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na pH^f měřená metodou DCV v prostředí BR pufr-methanol (9:1). 1 - první pík, 2 - druhý pík.



Obr. 3.3 Závislost proudu píku I_p FLD ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na pH^f měřená metodou DCV v prostředí BR pufr-methanol (9:1). 1 - první pík, 2 - druhý pík.

3.1.2 Koncentrační závislost

Z **Obr. 3.3** je zřejmé, že I_p FLD roste s rostoucím pH^f . Kvůli zjednodušení základního elektrolytu bylo ověřováno zda-li FLD poskytuje podobný signál v roztoku NaOH ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Signál poskytnutý FLD ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) v roztoku NaOH ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) byl srovnatelný se signálem v BR pufru a tak byl roztok NaOH ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) zvolen jako základní elektrolyt pro všechna další měření.

Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3. Parametry koncentračních závislostí pro jednotlivé řády jsou shrnuty v **Tab. 3.2**. Pro nejnižší dosažené koncentrační rozmezí $(6 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ je ukázána závislost proudu píku I_p na určité koncentraci c v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 na **Obr. 3.4**. Na **Obr. 3.5** jsou ukázány voltamogramy proměřené metodou DCV v rozmezí koncentrací $(6 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. Kvůli pravidelným oscilacím byly křivky vyhlazeny v programu Origin pomocí funkce smoothing (po 7 bodech). Pro koncentraci nižší než $6 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci byla dále měřena opakovatelnost z deseti následných měření. Výsledky jsou shrnuty v **Tab. 3.3**.

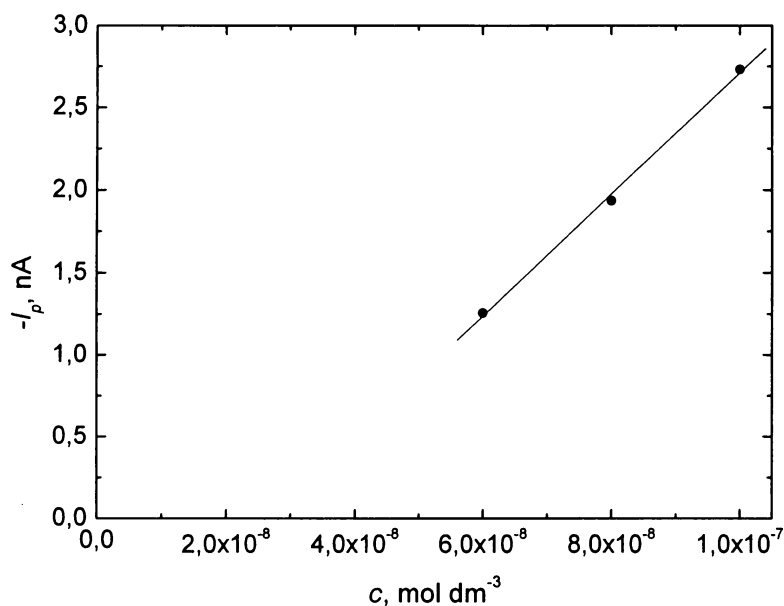
Z hodnoty směrodatné odchylky pro nejnižší možnou vyhodnotitelnou koncentraci byla určena mez stanovitelnosti jako $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.2 Parametry změřených koncentračních závislostí pro stanovení FLD metodou DCV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

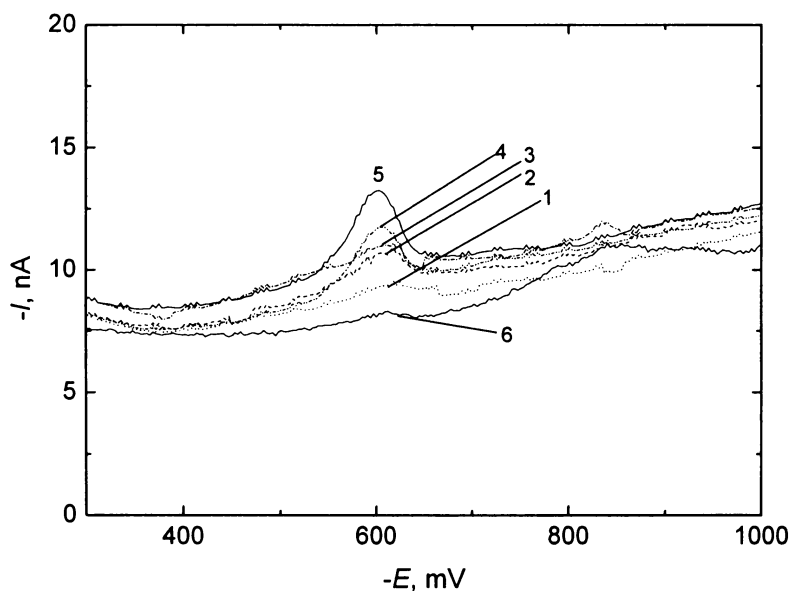
c mol dm ⁻³	Směrnice mA mol ⁻¹ dm ⁻³	Úsek nA	Korelační koeficient	L_0 mol dm ⁻³
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	6,3	108,59	0,9974	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	12,5	2,96	0,9997	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$	10,5	1,28	0,9949	-
$(6 - 10) \cdot 10^{-8}$	36,9	-0,98	0,9996	$4 \cdot 10^{-8}$

Tab. 3.3 Statisticky vyhodnocená opakovatelnost deseti měření měřených metodou DCV na HMDE v roztocích FLD o nejvyšší a nejnižší možné koncentraci v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

c mol dm ⁻³	\tilde{x} nA	$L_{1,2}$ nA	s nA	s_r %
$1 \cdot 10^{-4}$	-707,70	-18,98	-26,81	3,79
$6 \cdot 10^{-8}$	-1,24	-0,10	-0,14	11,30



Obr. 3.4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci c FLD měřená metodou DCV v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 v rozmezí koncentrací $(6 - 10) \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} .



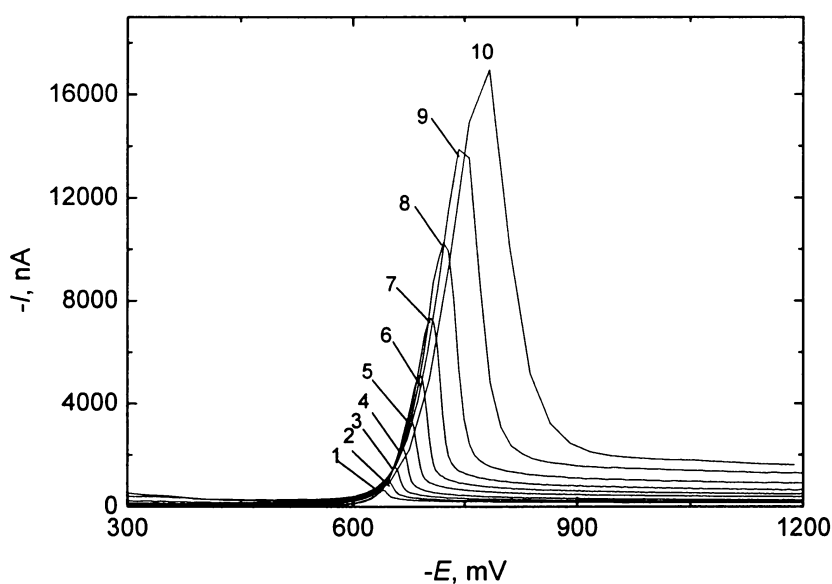
Obr. 3.5 Voltamogramy FLD měřené metodou DCV v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 roztoků s koncentracemi FLD $2 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (1), $4 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (2), $6 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (3), $8 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (4), $1 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} (5) a základního elektrolytu (6). Kvůli pravidelným oscilacím jsou křivky vyhlazeny v programu Origin s použitou funkcí smoothing (po 7 bodech).

3.1.3 Ověření difúzního charakteru limitního proudu

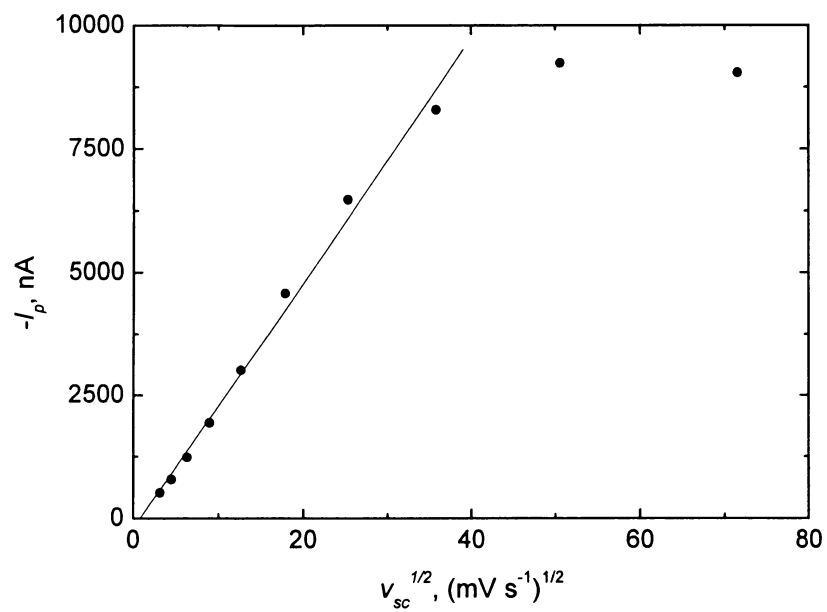
Pro ověření difúzního charakteru limitního proudu byla při měření měněna rychlost scanu vždy na dvojnásobnou hodnotu než byla předcházející v rozmezí $10 - 5120 \text{ mV s}^{-1}$. Naměřené voltamogramy jsou ukázány na **Obr. 3.6**. Závislost I_p na druhé odmocnině z rychlosti scanu v_{sc} je lineární od $10 - 640 \text{ mV s}^{-1}$ (viz **Obr. 3.7**). Metodou lineární regrese byl pro závislost velikosti proudu píku I_p na druhé odmocnině z rychlosti scanu v_{sc} vypočten vztah:

$$-I_p [\text{nA}] = 248,89 v^{1/2} - 210,60 \quad (\text{korel.koef. } 0,9958)$$

Je tedy zřejmé, že redukce FLD je řízena difúzí FLD k povrchu HMDE.



Obr. 3.6 Voltamogramy FLD o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ měřené metodou DCV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 při měnící se rychlosti scanu v_{sc} : 10 mV s^{-1} (1), 20 mV s^{-1} (2), 40 mV s^{-1} (3), 80 mV s^{-1} (4), 160 mV s^{-1} (5), 320 mV s^{-1} (6), 640 mV s^{-1} (7), 1280 mV s^{-1} (8), 2560 mV s^{-1} (9), 5120 mV s^{-1} (10).



Obr. 3.7 Závislost velikosti proudu píku I_p FLD na druhé odmocnině z rychlosti scanu v_{sc} .

3.2 Diferenční pulzní voltametrie flutamidu

Princip DPV je následující: Na potenciál, který je lineárně měněn s časem, jsou vkládány napěťové pulzy o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově několik desítek milisekund. Je registrován rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci v závislosti na potenciálu, přičemž tato závislost prochází maximem.⁷

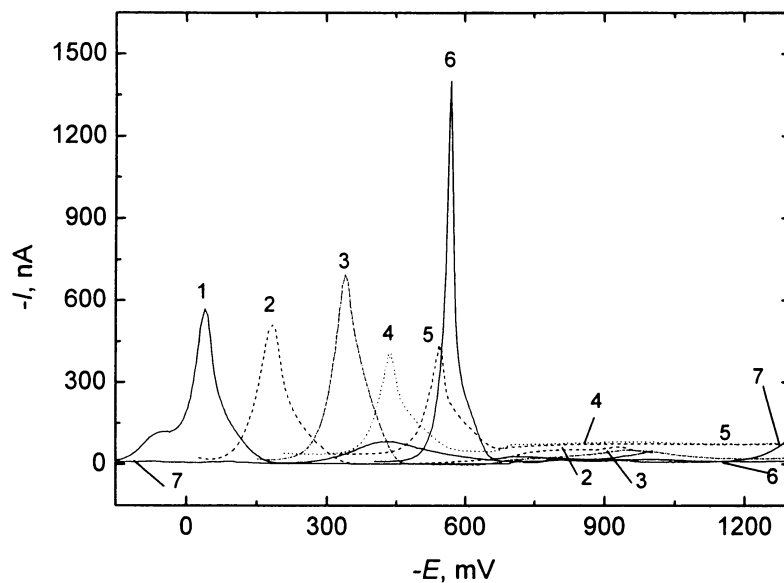
3.2.1 Vliv pH prostředí na DP voltamogramy flutamidu

Vliv pH na chování flutamidu měřený metodou DPV na HDME byl sledován v prostředí BR pufr-methanol (9:1) o příslušném pH^f (2 – 12). Koncentrace látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Vybrané DP voltamogramy jsou ukázány na **Obr. 3.8**. Na změřených voltamogramech lze pozorovat jeden až dva dobře vyvinuté píky. Při pH^f 2 – 6 lze rozlišit dva píky, při pH^f 7 – 12 lze rozlišit pouze jeden pík. Potenciál všech píků E_p se s rostoucím pH^f posouvá k zápornějším hodnotám. Zjištěné hodnoty I_p a E_p v závislosti na pH^f jsou zaznamenány v **Tab. 3.4**. Graficky je závislost E_p na pH^f roztoku znázorněna na **Obr. 3.9** a závislost I_p na pH^f je znázorněna na **Obr. 3.10**.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku vypočten vztah:

$$-E_p [\text{mV}] = 62,85 \text{ pH}^f - 80,29 \quad (\text{korel. koef. } 0,9951)$$

Příslušné píky odpovídají stejným reakcím, které jsou uvedeny v kapitole 3.1.1.

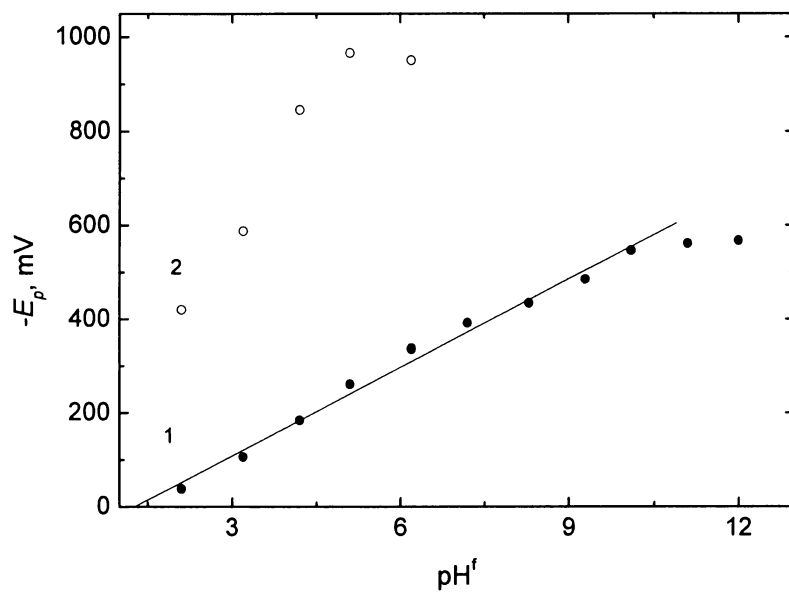


Obr. 3.8 Voltamogramy FLD ($c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr-methanol (9:1) o výsledném pH^f 2,1 (1), 4,2 (2), 6,2 (3), 8,3 (4), 10,1 (5), 12,0 (6) a voltamogram základního elektrolytu (7) měřený při pH^f 4.

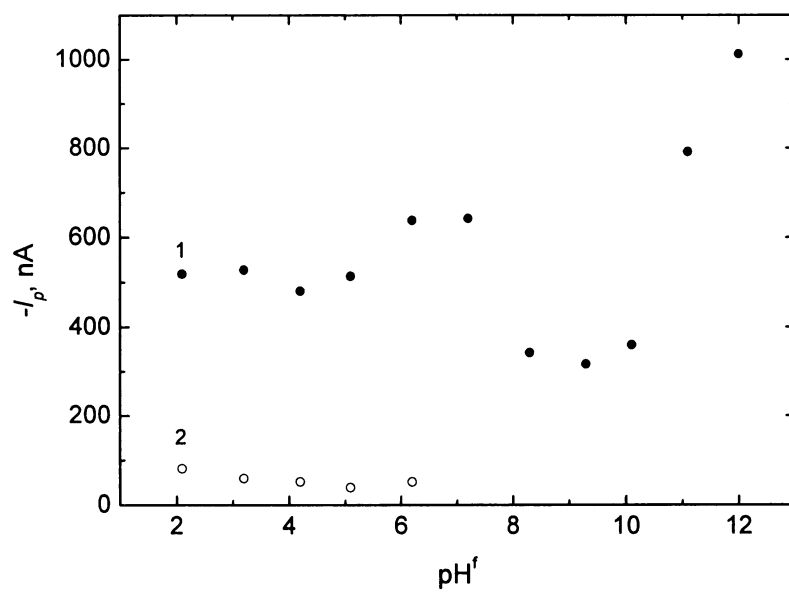
Tab. 3.4 Vliv pH^f na DP voltamogramy FLD ($c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené na HDME v prostředí BR pufr-methanol (9:1).

pH	pH^f	$-E_p^1$ mV	$-I_p^1$ nA	$-E_p^2$ mV	$-I_p^2$ nA
2,0	2,1	38	518,8	420	81,5
3,0	3,2	106	527,9	588	59,3
4,0	4,2	184	480,7	846	52,4
5,0	5,1	261	513,9	966	39,3
6,0	6,2	335	637,9	951	51,5
7,0	7,2	392	642,6	-	-
8,0	8,3	434	342,6	-	-
9,0	9,3	485	316,5	-	-
10,0	10,1	546	359,7	-	-
11,0	11,1	561	791,8	-	-
12,0	12,0	567	1012,0	-	-

pH - pH použitého BR pufru, pH^f - výsledné pH směsi BR pufr-methanol (9:1), $E_{1/2}^1$ - potenciál prvního píku, $E_{1/2}^2$ - potenciál druhého píku, I_p^1 - proud prvního píku, I_p^2 - proud druhého píku



Obr. 3.9 Závislost potenciálu píku E_p FLD ($c = 1.10^{-4}$ mol dm⁻³) na pH^f měřená metodou DPV v prostředí BR pufr-methanol (9:1). 1 - první pík, 2 - druhý pík.



Obr. 3.10 Závislost proudu píku I_p FLD ($c = 1.10^{-4}$ mol dm⁻³) na pH^f měřená metodou DPV v prostředí BR pufr-methanol (9:1). 1 - první pík, 2 - druhý pík.

3.2.2 Koncentrační závislost

Ze stejných důvodů již uvedených v kapitole 3.1.2 byl nahrazen základní elektrolyt roztokem NaOH ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$).

Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3. Parametry koncentračních závislostí pro jednotlivé řády jsou shrnuty v **Tab.** 3.5. Pro nejnižší dosažené koncentrační rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ je ukázána závislost proudu píku I_p na určité koncentraci c v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 na **Obr.** 3.11. Na **Obr.** 3.12 jsou ukázány voltamogramy proměřené metodou DPV v rozmezí koncentrací $(2 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. Pro koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci byla dále měřena opakovatelnost z deseti následných měření. Výsledky jsou shrnuty v **Tab.** 3.6.

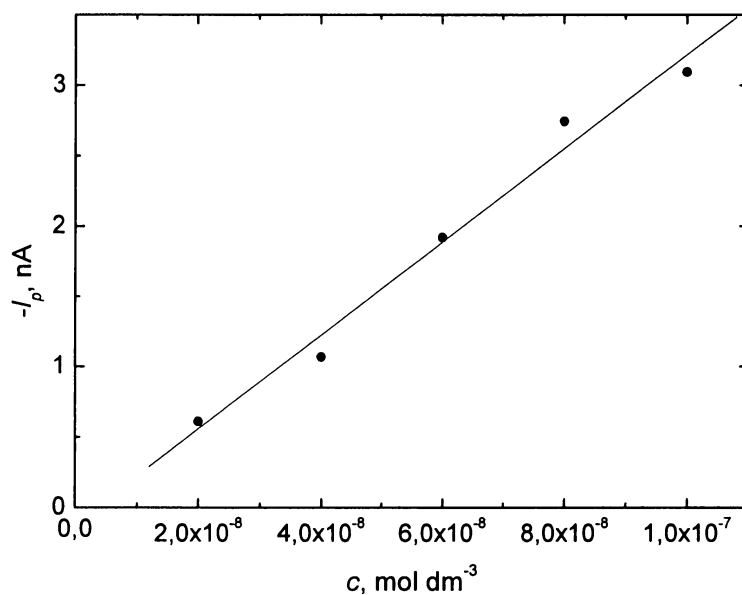
Z hodnoty směrodatné odchylky pro nejnižší možnou vyhodnotitelnou koncentraci byla určena mez stanovitelnosti jako $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.5 Parametry změřených koncentračních závislostí pro stanovení FLD metodou DPV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

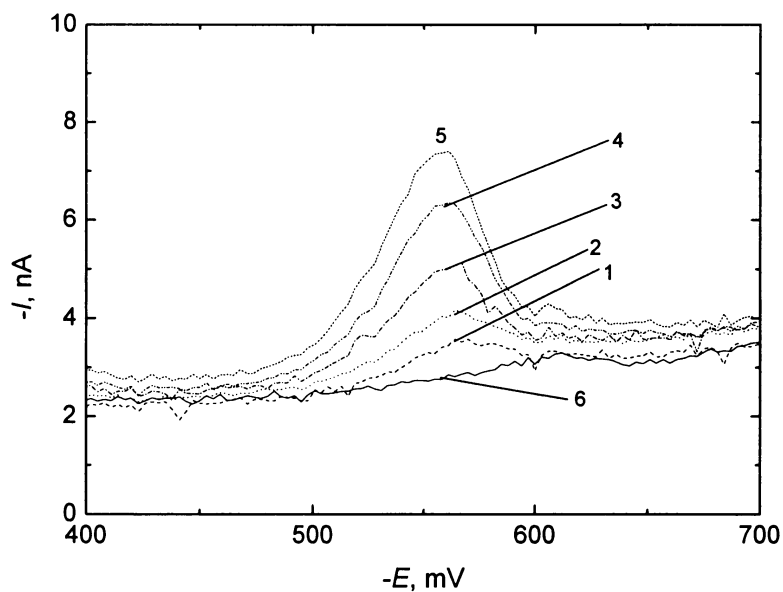
c mol dm ⁻³	Směrnice mA mol ⁻¹ dm ³	Úsek nA	Korelační koeficient	L_Q mol dm ⁻³
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	8,48	143,17	0,9902	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	14,9	9,30	0,9982	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$	14,1	1,70	0,9937	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-8}$	33,2	-0,11	0,9911	$2 \cdot 10^{-8}$

Tab. 3.6 Statisticky vyhodnocená opakovatelnost deseti měření měřených metodou DPV na HMDE v roztocích FLD o nejvyšší a nejnižší možné koncentraci v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

c mol dm ⁻³	\tilde{x} nA	$L_{1,2}$ nA	s nA	s_r %
$1 \cdot 10^{-4}$	-897,55	-8,35	-11,80	1,31
$2 \cdot 10^{-8}$	-0,67	-0,05	-0,07	10,20



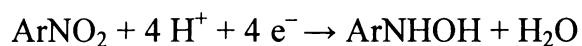
Obr. 3.11 Závislost proudu píku I_p na koncentraci c FLD měřená metodou DPV v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 v rozmezí koncentrací $(2 - 10) \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} .



Obr. 3.12 Voltamogramy FLD měřené metodou DPV v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 roztoků s koncentracemi FLD $2 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (1), $4 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (2), $6 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (3), $8 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} (4), $1 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} (5) a základního elektrolytu (6).

3.3 Cyklická voltametrie

Při proměření 24 voltamogramů roztoku flutamidu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} metodou cyklické voltametrie na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 byl v prvním měření pozorován katodický pík ($p(k_1)$), který zřejmě odpovídá reakci¹:



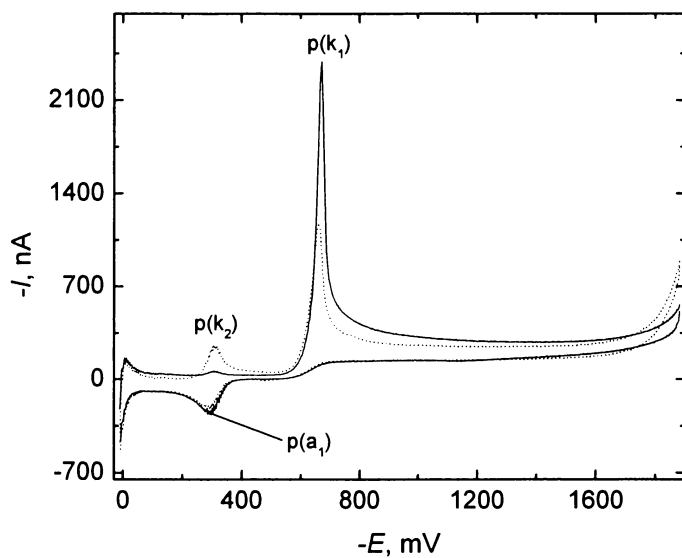
a anodický pík ($p(a_1)$), který odpovídá reakci¹:



Od druhého cyklu se kromě těchto dvou předešle uvedených píků objevil ještě jeden katodický pík ($p(k_2)$), který předchází předešlému katodickému píku ($p(k_1)$) a který odpovídá reakci¹:



Při zpětném skenu lze opět pozorovat $p(a_1)$, tj. oxidaci hydroxylaminu na nitroso skupinu. Ukázka voltamogramů změřených metodou cyklické voltametrie je uvedena na **Obr. 3.13**.



Obr. 3.13 Ukázky voltamogramů FLD o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ pro první (—) a pro poslední (·····) měření ze souboru 24 voltamogramů měřených cyklickou voltametrií na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3. $p(k_1)$ - katodický pík při prvním měření, $p(k_2)$ - katodický pík při posledním měření, $p(a_1)$ - anodický pík při prvním měření.

4 Aplikace vyvinuté metody

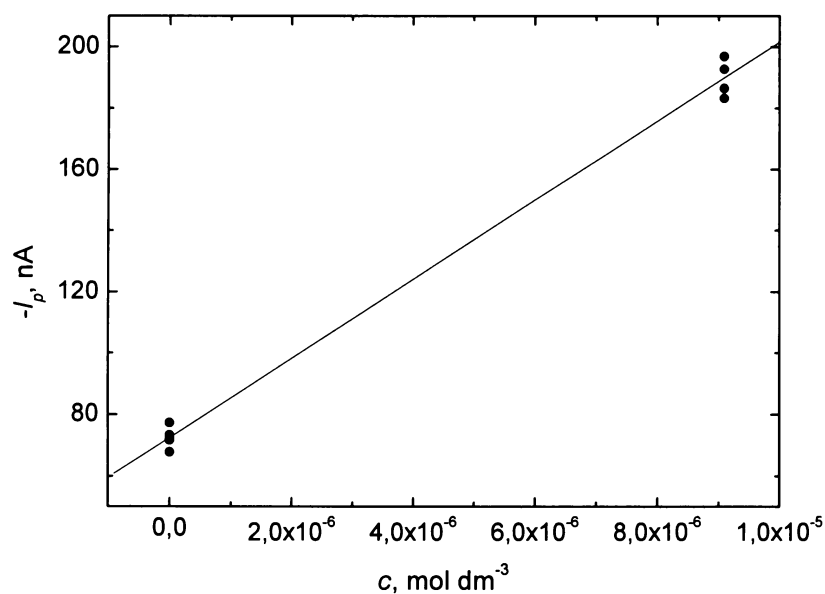
Cílem této práce bylo, jak již bylo uvedeno, vyvinutí alternativní metody stanovení FLD současnou optimalizací podmínek pro toto stanovení na visící rtuťové kapkové elektrodě tak, aby bylo dosaženo co nejnižší meze stanovitelnosti.

Pro zjištění použitelnosti takto vyvinuté metody byla provedena aplikace stanovení na léčivo Apo-Flutamid. Ke stanovení byla použita jedna tableta tohoto léčiva, která byla zpracována k analýze dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.

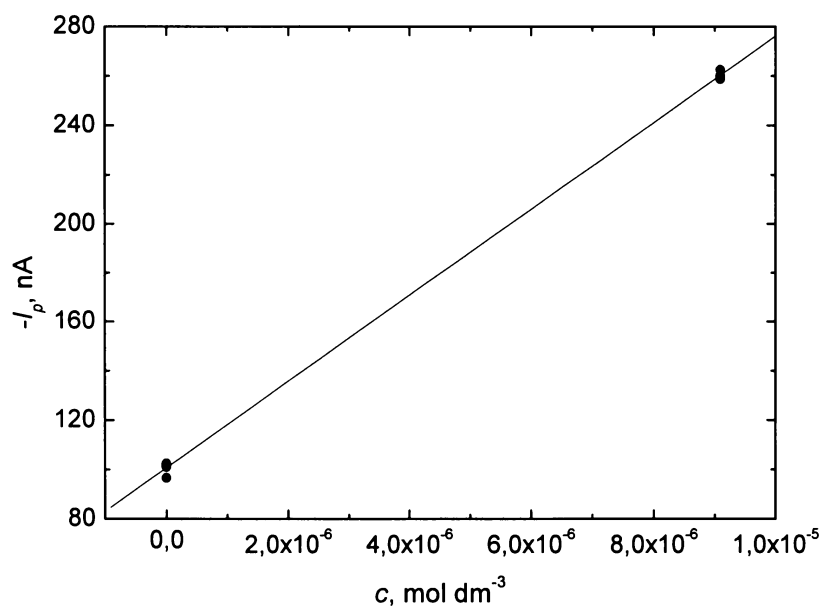
Dále byl také použit standardní roztok o koncentraci $9,09 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} v analyzovaném roztoku, který byl připraven ředěním zásobního roztoku FLD v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} .

Analyzovaný roztok připravený z navážky tablety léčiva Apo-Flutamid a po přidavku 1 ml standardního roztoku byl měřen metodou DCV a DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3. Závislosti výšek píku I_p před a po jednom přidavku standardního roztoku pro stanovení jednoho vzorku jsou ukázány na **Obr. 4.1** pro DCV, na **Obr. 4.2** pro DPV. V **Tab. 4.1** jsou shrnuty výsledky měření pro obě použité metody. Výsledky stanovení jsou shrnuty v **Tab. 4.2**.

Z **Tab. 4.2** je vidět, že metodou DCV stanovená hodnota množství FLD je $265,2 \pm 29,5$ mg a $247,5 \pm 46,56$ mg metodou DPV. Metoda DCV poskytla nesprávný, ale přesný výsledek ($s_r = 5,05$ %), metodou DPV byl získán správný a přesný výsledek ($s_r = 8,55$ %). Vzhledem k uvedené hodnotě hmotnosti FLD v jedné tabletě ($250 \pm 12,5$ mg) se ukázala jako přesnější metoda stanovení DPV s chybou 1,0 % než DCV s chybou 6,1 %.



Obr. 4.1 Závislost výšky píku I_p na koncentraci c FLD pro roztok připravený z tablety před a po jednom přidavku standardního roztoku FLD měřená metodou DCV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.



Obr. 4.2 Závislost výšky píku I_p na koncentraci c FLD pro roztok připravený z tablety před a po jednom přidavku standardního roztoku FLD měřená metodou DPV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

Tab. 4.1 Zpracované výsledky měření závislosti výšky píku I_p na koncentraci c FLD pro roztok připravený z tablety před a po jednom přidavku standardního roztoku FLD měřena metodou DCV a DPV na HMDE v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3 pro tři vzorky.

Metoda	vzorek	m_{tab} g	m_{nav} g	c_{vz} $\mu\text{mol dm}^{-3}$	$m_{FLD,nav}$ mg	$m_{FLD,tab}$ mg
DCV	1.	0,6954	0,02505	5,6087	9,5773	265,9
	2.		0,02503	5,5912	9,5475	265,2
	3.		0,02505	5,1306	8,7609	243,2
DPV	1.		0,02505	5,2215	8,9162	247,5
	2.		0,02503	5,7351	9,7932	272,1
	3.		0,02505	5,0895	8,6908	241,2

m_{tab} - hmotnost tablety, m_{nav} - navážka vzorku, c_{vz} - koncentrace FLD ve vzorku, $m_{FLD,nav}$ - hmotnost FLD ve vzorku, $m_{FLD,tab}$ - hmotnost FLD v tabletě

Tab. 4.2 Statisticky zpracované výsledky aplikace vyvinuté metody v porovnání s uvedenou hodnotou hmotnosti FLD (250 mg) v jedné tabletě léčiva Apo-Flutamid.

Metoda	\tilde{x} mg	$L_{1,2}$ mg	s mg	s_r %	Chyba %
DCV	265,2	29,5	13,39	5,05	6,1
DPV	247,5	46,56	21,17	8,55	1,0

5 Závěr a diskuze

Při stanovení flutamidu pomocí DCV a DPV na HMDE bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufr-methanol (9:1) až dva píky, jejichž poloha E_p a výška I_p závisí na pH^f prostředí. Z důvodů růstu výšky píku I_p v závislosti na vzůstajícím pH^f roztoku a zjednodušení základního elektrolytu byl použit roztok NaOH o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ jako základní elektrolyt místo BR pufru.

Cílem práce byla optimalizace podmínek stanovení a dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti na použité visící rtuťové kapkové elektrodě. Výsledky jsou shrnuty v **Tab. 5.1**. Metoda DPV vykazuje nižší mez stanovitelnosti ($L_Q = 2 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$) než metoda DCV ($L_Q = 4 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$). Jako citlivější metoda se ukázala technika DCV na HMDE než DPV na HMDE.

Pro aplikaci stanovení na léčivo Apo-Flutamid jsou výsledky shrnuty v **Tab. 5.2**. Jako přesnější metoda se ukázala metoda DPV, která byla vyhodnocena s výsledkem $247,5 \pm 46,56 \text{ mg}$ lišícím se o 1,00 % od uvedené hodnoty množství FLD $250 \pm 12,5 \text{ mg}$ v 1 tabletě.

Tab. 5.1 Srovnání použitých technik a dosažených výsledků pro stanovení FLD na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

Elektroda / technika	L_Q mol dm^{-3}
HMDE / DCV	$4 \cdot 10^{-8}$
HMDE / DPV	$2 \cdot 10^{-8}$

Tab. 5.2 Srovnání použitých technik a dosažených výsledků pro stanovení aplikované na léčivo Apo-Flutamid na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí 0,01 M NaOH-methanol (9:1) o pH^f 11,3.

Elektroda Technika	m_{uved} mg	m_{stan} mg	Chyba %
HMDE DCV	250 ± 12,5	265,2 ± 29,5	6,01
HMDE DPV		247,5 ± 46,56	1,00

m_{uved} - hmotnost FLD uvedená výrobcem, m_{stan} - stanovená hmotnost FLD

LITERATURA

- [1] Álvarez-Lueje A., Peña C., Núñez-Vergara L.J. a Squella J.A.:
Electroanalysis 10, 1043 (1998)
- [2] URL: <https://www.avicena.cz/moduly>, staženo 11.1.2007
- [3] Český lékopis 2005 a Doplněk 2006
Grada Publishing (2006), vydáno na CD
- [4] Kawaciuk I.:
Urologie, nakladatelství H+H, 2000
- [5] Radová J.:
Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha (2007), v tisku
- [6] Miranda A., Caraballo I., Millán M.:
Drug Development and Pharmacy 28(4), 413 (2002)
- [7] Barek J., Opekar F., Štulík K.:
Elektroanalytická chemie, Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum,
Praha, 2005
- [8] Eckschlager K.:
Chemometrie, Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha, 1991
- [9] Zuman P., Fijalek Z., Dumanovič D. a Sužnejvič D.:
Electroanalysis 4, 783 (1992)