

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

STANOVENÍ AMINOGLUTETHIMIDU
POMOCÍ HPLC-ED
NA UHLÍKOVÝCH PASTÁCH

Determination of aminoglutethimide
using HPLC-ED on carbon pastes

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Karolína Vlachová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a konzultantky Mgr. Hany Dejmkové, a že jsem všechny použité prameny 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 1. května 2010.

Na úvod bych chtěla poděkovat především svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. a konzultantce Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady při tvorbě této diplomové práce. Současně bych chtěla poděkovat rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.

Vypracování této diplomové práce bylo finančně podpořeno MŠMT České republiky (projekty č. LC 0603, MSM 0021620857 a RP 14/63).

Karolína Vlachová

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá stanovením aminogluethimidu (AGT), dříve využívaného jako protinádorové léčivo, zejména při léčbě karcinomu prsu u žen po menopauze nebo při léčbě karcinomu prostaty, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV spektrofotometrickou detekcí (HPLC-UV) a elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) na uhlíkových pastových elektrodách (CPEs). CPEs byly připraveny z uhlíkových mikrokuliček a různých pastovacích kapalin – běžně používaného minerálního oleje (CPE-MO) a méně běžných trikresylfosfátu (CPE-TCP) a silikonového oleje (CPE-SO).

Kalibrační závislosti AGT byly proměřeny pomocí HPLC-UV při 242 nm, HPLC-ED při potenciálu vloženém na pracovní elektrodu +1,3 V pro CPE-MO a +1,1 V pro CPE-TCP v mobilní fázi obsahující fosfátový pufr o pH 4 a MeOH 50:50 (v/v). Bylo dosaženo těchto mezí detekce - $3,6 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ pro UV spektrofotometrickou detekci, $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ pro elektrochemickou detekci na CPE-MO a $9,7 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ pro elektrochemickou detekci na CPE-TCP. Vzhledem k nestálosti CPE-SO další měření s touto pastou již nebyla prováděna.

AGT byl stanoven v modelových vzorcích moči. Metodou HPLC-UV nebylo možné AGT stanovit, kvůli velké interferenci dalších látek. Pomocí HPLC-ED na CPE-MO bylo dosaženo meze detekce $5,2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ AGT.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aminoglutethimid

HPLC s UV spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí

Uhlíkové pastové elektrody

ABSTRACT

In this thesis, the determination of AGT, sooner used as anticancer drug, especially for the treatment of breast cancer in postmenopausal women or for the treatment of prostate cancer, by high performance liquid chromatography with UV spectrophotometric detection (HPLC-UV) and electrochemical detection (HPLC-ED) on carbon paste electrodes (CPEs) was studied. CPEs were prepared from glassy carbon microspheres and different pasting liquids – routinely used mineral oil (CPE-MO) and less commonly used tricresylphosphate (CPE-TCP) and silicone oil (CPE-SO).

The concentration dependences of AGT were measured by HPLC-UV with detection wavelength 242 nm, by HPLC-ED with a working potential of +1,3 V for CPE-MO and + 1,1 V for CPE-TCP in mobile phase containing phosphate buffer (pH 4) and methanol 50:50 (v/v). The following limits of detection were achieved – $3,6 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ for UV spectrophotometric detection, $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ for electrochemical detection with CPE-MO and $9,7 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ for electrochemical detection with CPE-TCP.

AGT was also determined in model samples of urine. With HPLC-UV it was not possible to detect AGT, because of the interferences of other compounds. With HPLC-ED on CPE-MO the limit of detection $5,2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ AGT was achieved.

KEY WORDS

Aminoglutethimide

HPLC with UV spectrophotometric and electrochemical detection

Carbon paste electrodes

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1 CÍL PRÁCE.....	10
1.2 AMINOGLUTETHIMID JAKO LÉČIVO	11
1.3 METODY STANOVENÍ AGT	13
1.4 UHLÍKOVÁ PASTOVÁ ELEKTRODA	16
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	18
2.2 POUŽITÁ APARATURA.....	19
2.2.1 HPLC.....	19
2.2.2 OSTATNÍ PŘÍSTROJE	19
2.3 STUDOVANÁ LÁTKA.....	20
2.4 POUŽITÉ POSTUPY	21
2.4.1 HPLC STANOVENÍ S UV A ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ	21
2.4.2 STANOVENÍ V MODELOVÝCH VZORCÍCH MOČI.....	22
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	23
3.1 CPE OBSAHUJÍCÍ MINERÁLNÍ OLEJ.....	23
3.1.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK.....	23
3.1.2 STÁLOST CPE	25
3.1.3 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI	27
3.1.3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÁ DETEKCE	27
3.1.3.2 ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE	30
3.2 CPE OBSAHUJÍCÍ TRIKRESYLFOSFÁT.....	35
3.2.1 STÁLOST CPE	35
3.2.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK.....	37
3.2.3 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI	39
3.2.3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÁ DETEKCE	39

3.2.3.2	ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE	39
3.3	CPE OBSAHUJÍCÍ SILIKONOVÝ OLEJ	43
3.3.1	STÁLOST CPE	43
3.4	STANOVENÍ V MODELOVÝCH VZORCÍCH MOČI.....	45
4	ZÁVĚR.....	49
	LITERATURA.....	50

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A</i>	Absorbance
AGT	Aminoglutethimid
A_p	Plocha píku
AU, mAU	Jednotky absorbance (Absorbance unit)
<i>c</i>	Koncentrace
CAS	Chemical Abstract Services
CPE	Uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
CPE-MO	Uhlíková pastová elektroda obsahující minerální olej
CPE-TCP	Uhlíková pastová elektroda obsahující trikresylfosfát
CPE-SO	Uhlíková pastová elektroda obsahující silikonový olej
ED	Elektrochemická detekce, elektrochemický detektor
E_{prac}	Potenciál vložený na pracovní elektrodu
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
h_p	Výška píku
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<i>I</i>	Proud
λ	Vlnová délka
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MeOH	Methanol
Mr	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
p.a.	Pro analýzu
QTOF	Kvadrupólový průletový analyzátor (Quadrupole Time of Flight)
R	Korelační koeficient
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)
<i>s</i>	Směrodatná odchylka
s_r	Relativní směrodatná odchylka
T_t	Teplota tání

UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialová oblast
v/v	Poměr objemů
VIS	Viditelná oblast

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 CÍL PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se zabývá srovnáním běžně využívané uhlíkové pastové elektrody (CPE) připravené z uhlíkových mikrokuliček a minerálního oleje s pastami obsahujícími jako pastovací kapalinu trikresylfosfát a silikonový olej ve vývoji nových metod stanovení aminoglutethimidu.

Aminoglutethimid (AGT) je látka inhibující enzym aromatasu, která v lidském těle přeměňuje androgeny na estrogeny. Díky této vlastnosti byla hlavně v 80. letech využívána jako protinádorové léčivo, později však byla nahrazena modernějšími léčivy. V současné době je AGT na seznamu zakázaných látek pro sportovce jako jeden z inhibitorů aromatasu.

Úkolem bylo ověřit stálost jednotlivých CPE, nalezení a následné využití optimálních podmínek pro stanovení studované látky metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě a dosažení co nejnižší meze detekce.

Posledním úkolem bylo stanovit AGT metodou HPLC-ED v modelových vzorcích moči.

1.2 AMINOGLUTETHIMID JAKO LÉČIVO

Aminoglutethimid je účinnou složkou léků Cytadren, Orimeten aj. využívaných při léčbě karcinomu, zejména karcinomu prsu u žen po menopauze, dále karcinomu prostaty nebo při léčbě Cushingova syndromu¹. Inhibuje enzym aromatasu, který katalyzuje přeměnu androstendionu a testosteronu na estron a estradiol. Tento enzym je v lidském těle přítomen v ovariích, mozku, tukové tkáni, svalech, játrech, prsní tkáni a v buňkách zhoubných nádorů prsu. Hlavním zdrojem estrogenů jsou u premenopauzálních žen ovaria, u žen po menopauze je to tuková tkáň. Snížením jejich koncentrace v těle dochází k regresi karcinomu².

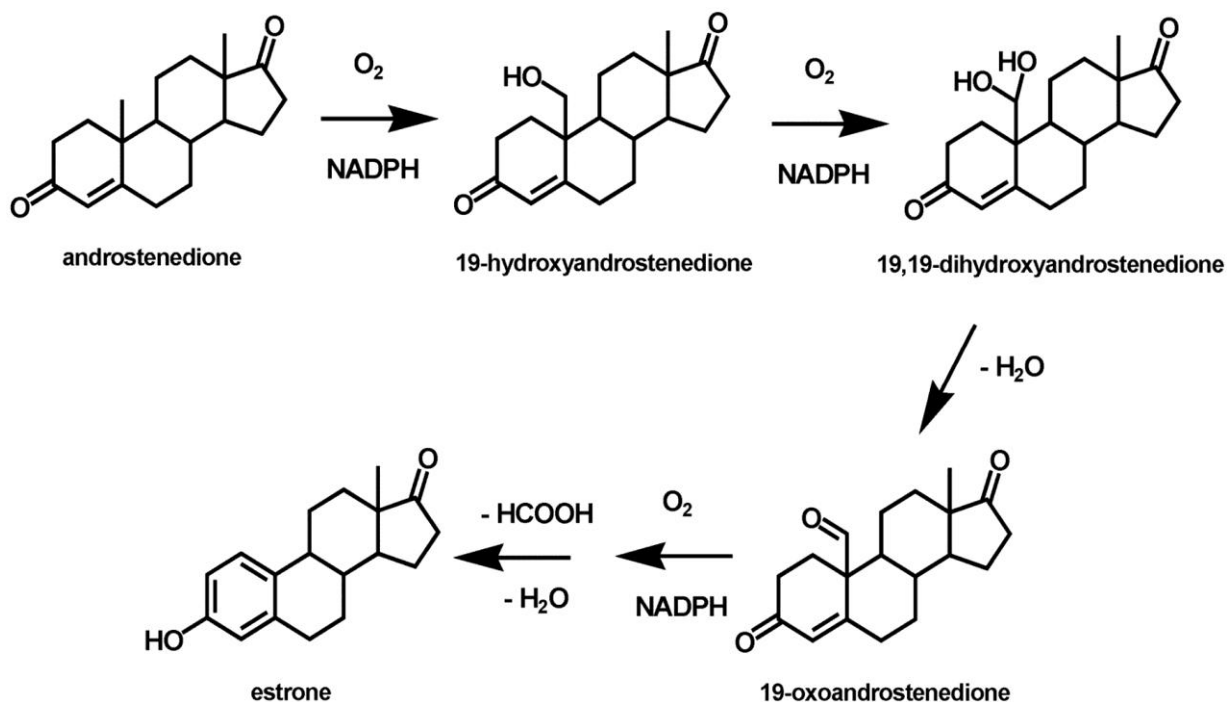
Snížení účinků estrogenů stimulujících rakovinné bujení při léčbě karcinomu prsu lze dosáhnout dvěma různými způsoby – narušit schopnost estrogenů vázat se na příslušné receptory nebo snížit množství estrogenů v organismu, čehož je možné dosáhnout inhibicí enzymu přeměňujícího androgeny na estrogeny – aromatasu. Schéma této přeměny je znázorněno na Obr. 1.1.

AGT byl původně využíván jako antiepileptikum, kvůli mnoha nežádoucím vedlejším účinkům, včetně vlivu na některé enzymy z rodiny cytochromů P450, byl později zakázán³. Díky zjištění jeho vlivu na enzym aromatasu se začal AGT počátkem 70. let využívat klinicky při léčbě karcinomu prsu. Bylo však zjištěno, že AGT kromě inhibice aromatasu současně působí na další enzymy z rodiny cytochromů P450, významně pak na enzym ovlivňující produkci hormonů nadledvin⁴. Pacientky proto musely být substituovány kortikosteroidy. Při dlouhodobé léčbě se navíc výrazně projevovaly nežádoucí účinky jako bolest hlavy, letargie, nevolnost a vyrážka⁵.

Bylo snahou vyvinout specifitější a účinnější léčivo pro léčbu karcinomu prsu s minimem nežádoucích účinků. Takovou látkou byl steroidní Tamoxifen, který působí na estrogenové receptory. AGT i tamoxifen řadíme do 1. generace inhibitorů aromatasu. Do druhé generace řadíme nesteroidní látky, jako rogletimid, fadrozol a steroidní formestan. V současné době jsou terapeuticky využívána léčiva již třetí generace, jejichž účinnost je přibližně tisíckrát² vyšší než u AGT. Jsou to nesteroidní vorozol, letrozol, anastrozol a steroidní látka exemestan. V současné době je věnována pozornost sloučeninám rostlinného původu, a to především flavonoidům. Deriváty flavonu fungují jako inhibitory aromatasu, izoflavony vykazují schopnost vazby na estrogení receptor⁶.

AGT obsahuje v molekule jedno chirální centrum, existují tedy dva optické izomery – (R)-AGT a (S)-AGT. Léčivo obsahuje jejich racemát, přesto, že bylo prokázáno, že (S)-forma je přibližně čtyřicetkrát účinnější inhibitor aromatasu než (R)-forma AGT⁷. Řada publikací se zabývá stereoseparací těchto optických izomerů⁽⁸⁻¹²⁾.

Jak už bylo zmíněno výše, AGT byl v léčbě karcinomu prsu nahrazen novějšími, účinnějšími léčivy, již 3. generací inhibitorů aromatasu, stále je však v literatuře zmiňován, a to v souvislosti s dopingem. AGT je na seznamu zakázaných látek a metod dopingů pro sportovce.



Obr. 1.1 Schéma přeměny androstendionu na estron pomocí enzymu cytochrom P450_{aromatasa}⁴.

1.3 METODY STANOVENÍ AGT

Aminoglutethimid byl řadu let využíván jako protinádorové léčivo. Je tedy logické, že musely být nalezeny spolehlivé metody, kterými by bylo možno stanovit AGT v biologických materiálech, a to především stanovení plazmatické koncentrace, která je důležitá pro kontrolu optimální hladiny léčiva v organismu, a stanovení v moči.

Nejčastěji používanými metodami jsou kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-LC) a vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) s UV spektrofotometrickou detekcí. Pro stanovení AGT byla také použita spektrofotometrie (SPFM), plynová chromatografie (GC) nebo plynová rozdělovací chromatografie (GLC). V tab. 1.1 jsou blíže popsány některé v literatuře uvedené metody stanovení AGT.

V posledních letech jsou v souvislosti s dopingem kladeny stále vyšší nároky na metody používané při testování sportovců na zakázané látky a samozřejmě i technický pokrok umožňuje dosahování nižších koncentrací stanovovaných látek. Tyto metody jsou vyvíjeny především pod záštitou světové antidopingové agentury. Některé metody stanovení AGT jsou shrnuty v tab. 1.2.

Tab. 1.1 Metody stanovení AGT.

Metoda	Vzorek	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Mez detekce
RP-LC ¹³	Plazma	ODS Hypersil, 3 µm	11% acetonitril: mravenčanový pufr pH 3,5	spfm 242 nm	0,1 µg.ml ⁻¹
RP-HPLC ¹⁴	Plazma	oktadecyl C ₁₈ 100 x 8 mm, 10 µm	<i>terc</i> -butyl- amoniumfosfát: acetonitril:voda 3:100:100 (v/v/v) pH 6,3	Spfm 240/254 nm	1 µmol.l ⁻¹
RP-HPLC ¹⁵	Plazma	Nucleosil C ₁₈ 100 x 4,8 mm, 5 µm	acetonitril:methanol: voda 5:20:75 (v/v/v)	spfm 235 nm	0,02 µg.g ⁻¹
RP-HPLC ¹⁶	Moč	Spherisorb ODS 300 x 4 mm, 5 µm	acetonitril:fosfátový pufr 22:68 (v/v) pH 6,8	spfm 234 nm	0,2 µg.ml ⁻¹
RP-HPLC ¹⁷	Tableta	Chiralcel OD 250 x 4,6 mm, 10 µm	ethanol:cyklohexan: methanol 95:5:2 (v/v/v)	derivat. fluorescenční λ _{ex} 360 nm λ _{em} 530 nm	20 ng. ml ⁻¹
GLC ¹⁸	Plazma	2% cyklohexandi- methanol sukcinát na Chromosorbu W 1500 x 0,4 mm	dusík		0,1 µg.ml ⁻¹
SPFM ¹⁹	Moč			derivat. Spfm 273 nm, 368 nm, 558 nm	27,3 ng. ml ⁻¹ 10,6 ng. ml ⁻¹ 9,3 ng. ml ⁻¹
GC-MS ²⁰	Tableta	24 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 µm	helium		0,1 µg.ml ⁻¹

Tab. 1.2 Metody stanovení AGT.

Metoda	Vzorek	Kolona	Mobilní fáze	Mez detekce
LC-MS-MS ²¹	Moč	C18 50 x 2,1 mm, 3 µm	0,1% k. mravenčí: 15mM: mravenčan amonný: acetonitril	100 ng. ml ⁻¹
GC-MS ²²	Moč	17 m x 0,2 mm, tloušťka filmu 0,11 µm		200 ng. ml ⁻¹
LC-MS-MS ²³	Moč	C18 150 x 2,1 mm, 5 µm	0,1% k. mravenčí: acetonitril	50 ng. ml ⁻¹
UHPLC-QTOF ²⁴	Moč	BEH C18 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	0,1% k. mravenčí: acetonitril	25 ng. ml ⁻¹

1.4 UHLÍKOVÁ PASTOVÁ ELEKTRODA

První zmínku o uhlíkové pastové elektrodě (Carbon Paste Electrode, CPE) přinesl Ralph Norman Adams v článku vydaném v roce 1958²⁵. Jeho snahou bylo vytvořit tzv. kapající uhlíkovou elektrodu, jako analog Heyrovského rtuťové kapkové elektrody (dropping mercury electrode, DME), se kterou by bylo možno měřit anodické oxidace směsí organických látek. DME nelze využít při měření v oblasti kladných potenciálů, protože dochází k anodické oxidaci rtuti. Původní záměr R. N. Adamse nevyšel, ale směs uhlíkového prášku a kapaliny - uhlíková pasta - představovala vhodný materiál pro konstrukci elektrod se zajímavými vlastnostmi²⁶.

Je to právě pastovací kapalina, která jednak spojuje jednotlivé částice grafitu, a která určuje důležité vlastnosti uhlíkových past. Hlavními požadavky na pastovací kapalinu jsou chemická netečnost a elektroinaktivita, vysoká viskozita a malá těkavost, minimální rozpustnost ve vodě a snížená mísitelnost s organickými rozpouštědly. Nejčastěji používanými pojivy jsou minerální oleje (např. Nujol, Uvasol), dále pak silikonové oleje, tuky, organické estery nebo halogenované uhlovodíky. Důležitými kritérii pro grafitový prášek jsou vysoká chemická čistota, velikost zrna v řádu μm , uniformní distribuce velikosti částic a snížená absorpční schopnost.

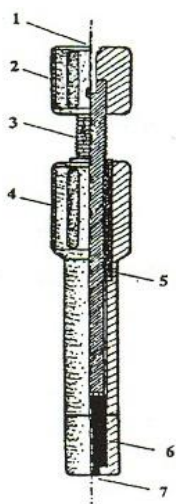
Elektrody typu CPE jsou řazeny mezi heterogenní elektrody. Můžeme je rozdělit na dvě základní skupiny – chemicky nemodifikované elektrody, připravené pouze z grafitového prášku a pastovací kapaliny a elektrody chemicky (případně biologicky) modifikované, které obsahují přídavek další látky. Modifikaci uhlíkové pasty lze provést několika způsoby - rozpuštěním organické látky do pastové kapaliny, vetřením modifikátoru do pasty nebo použitím elektroaktivní kapaliny²⁷. První modifikaci CPE provedl už R. N. Adams, využívat se začaly až počátkem 80. let.

Příprava uhlíkové pasty je rychlá a velmi jednoduchá. Pouzdro elektrody (Obr. 1.2) je naplněno pastou, připravenou z grafitového prášku a pastovací kapaliny v poměru cca 1 g uhlíku na 0,4 ml kapaliny. Připravenou pastu je doporučeno nechat tzv. odstát přes noc, aby mohlo dojít k její úplné homogenizaci. Naopak při dlouhodobém skladování elektrody může dojít k jejímu vysychání. Tomu lze částečně zabránit tím, že ji ponecháme ponořenou koncovým otvorem v destilované vodě.

Rozsah oblasti potenciálů, při kterých lze s CPEs měřit je poměrně široký. Pohybuje se v rozmezí -1,5 V až +1,5 V vs Ag/AgCl, v závislosti na pH. Pro měření při potenciálech

nižších než $-0,5\text{ V}$ však CPEs nejsou příliš vhodné, protože měření znesnadňuje nezanedbatelný proud, jenž vzniká v důsledku redukce kyslíku rozpuštěného v pastě²⁸.

CPEs mají velmi širokou oblast využití. Uplatňují se především při analýze organických látek, environmentálních polutantů, farmaceutických preparátů a léčiv. Dále pak při elektroanalýze anorganických iontů, částic a molekul, při studiu a stanovení biologicky důležitých sloučenin. Kromě praktických aplikací mohou být CPEs využity při konstrukcích elektrochemických detektorů na bázi uhlíkové pasty, jež slouží při analýzách složitých směsí organických látek nebo při studiu reakčních mechanismů či elektrochemického chování organických látek²⁹.



- 1 otvor pro elektrický kontakt
- 2 teflonová hlava
- 3 píst se závitem
- 4 tělo elektrody
- 5 ocelová vložka se závitem
- 6 dutina s uhlíkovou pastou
- 7 koncový otvor

Obr. 1.2 Uhlíková pastová elektroda²⁸

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Zásobní roztok AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství látky v methanolu (p.a., Penta, Chrudim). Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny přesným naředěním zásobního roztoku směsí methanol:voda ve stejném poměru jako složení mobilní fáze. Roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Zásobní roztok byl stálý minimálně po dobu 4 měsíců³⁰.

Fosfátové pufrý o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema Brno) a hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) v deionizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Pro dosažení pH 2,5 a pH 4 tlumivých roztoků byla použita kyselina fosforečná (85%, $\rho = 1,71 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, p.a., Lachema Brno), pro pH 6 vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Přesné pH tlumivých roztoků bylo měřeno pH metrem.

Mobilní fáze byla připravena smísením stejného objemového množství methanolu a fosfátového tlumivého roztoku. V práci uváděná hodnota pH mobilní fáze vždy odpovídá hodnotě pH tlumivého roztoku před smísením s methanolem.

Uhlíkové pasty byly připraveny smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku o průměru $0,4 - 12 \text{ }\mu\text{m}$ (Alpha Aesar, USA) a 100 μl pastovací kapaliny. Jako pastovací kapaliny byly použity minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko), trikresylfosfát (Fluka Biochemika, Švýcarsko) a silikonový olej (Lučební závody, Kolín). Kvůli vysoké viskozitě silikonového oleje byla odpovídající hmotnost navážena. Pro přípravu pasty bylo použito 108 mg silikonového oleje, což odpovídá 111 μl .

2.2 POUŽITÁ APARATURA

2.2.1 HPLC

HPLC systém:

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

Dávkovač: LCI 30 se smyčkou 20 μl (Laboratorní přístroje, Praha), pro plnění byla používána injekční stříkačka

Kolona: Lichrospher[®]RP-18, 100 (5 μm), 125 x 4 mm (LichroCART)

Detektor: Spektrofotometrický UV/VIS detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Praha)

Amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha):

Amperometrický detektor pracoval v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní byla použita argentchloridová elektroda s 3 mol l^{-1} KCl, pomocnou elektrodou byla elektroda platinová a pracovní elektrodou byla CPE.

Programové vybavení: Clarity Lite (Data Apex) pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)

2.2.2 OSTATNÍ PŘÍSTROJE

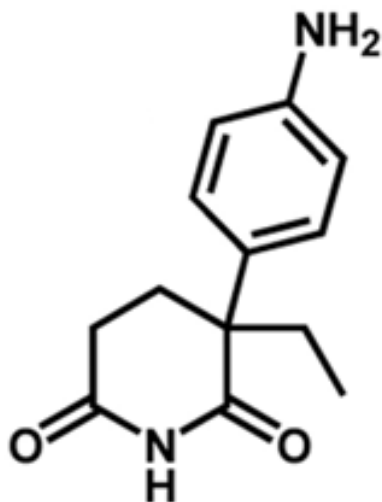
Digitální pH metr Jenway 4330 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Essex, Velká Británie)

Spektrofotometr Pye-Unicam PU 8800 UV/VIS spectrophotometer (Unicam, Cambridge, Velká Británie), použity byly křemenné kyvety měrné tloušťky 1 mm

Ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

2.3 STUDOVANÁ LÁTKA

Aminoglutethimid⁴



Triviální název: Aminoglutethimid

Systematický název: (3*RS*)-3-(4-aminofenyl)-3-ethylpiperidin-2,6-dion

CAS Registry number: 125–84-8

Sumární vzorec: C₁₃H₁₆N₂O₂

M_r: 232,27

T_f: 150 až 154 °C

Vlastnosti: Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v methanolu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,5 % sloučeniny C₁₃H₁₆N₂O₂³¹.

2.4 POUŽITÉ POSTUPY

2.4.1 HPLC STANOVENÍ S UV A ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

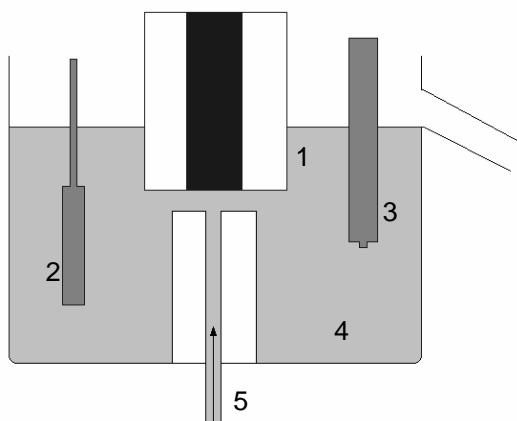
Do chromatografického systému byl dávkován roztok AGT ve směsi methanol:voda v poměru 50:50 (v/v), dávkovaný objem byl vždy 20 μl . Mobilní fáze byla připravena z fosfátového pufru o daném pH a methanolu v poměru 50:50 (v/v), vzduch byl odstraněn pomocí ultrazvuku. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

UV detekce probíhala při 242 nm, což je absorpční maximum AGT. Elektrochemický detektor (Obr. 2.1) byl zapojen sériově za UV detektor. Pracoval v tříelektrodovém zapojení, pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda (CPE), referentní elektrodou argentchloridová elektroda s 3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a pomocnou elektrodou byla elektroda platinová. Konec kapiláry byl přiveden k povrchu pracovní elektrody, která byla spolu s ostatními elektrodami ponořena v mobilní fázi.

Hydrodynamické voltamogramy byly získány proměřením roztoku AGT o koncentraci $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro pH mobilní fáze 2,5, 4 a 6. Potenciál na CPE byl vkládán v rozmezí +0,6 V až +1,5 V.

Stálost CPE byla ověřována opakovaným nadávkováním roztoku AGT o koncentraci $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dávkováno bylo třicetkrát v intervalu po 60 sekundách, měření probíhalo za nalezených optimálních podmínek.

Kalibrační závislosti AGT byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $2\cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získaná data byla vyhodnocena metodou lineární regrese. Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku absolutní hodnoty šumu.



Obr. 2.1 „Wall-jet“ detektor s uhlíkovou pastovou elektrodou, 1 – pracovní uhlíková pastová elektroda, 2 – pomocná platinová elektroda, 3 – referenční argentchloridová elektroda, 4 – mobilní fáze, 5 – přívodní kapilára.

2.4.2 STANOVENÍ V MODELOVÝCH VZORCÍCH MOČI

Modelové vzorky AGT byly připraveny smísením 1 ml vzorku moči s přidavkem AGT odpovídající koncentrace, 5 ml MeOH a doplněny po rysku fosfátovým pufrům o pH 4, dávkováno bylo vždy 20 μl tohoto roztoku. Před nástřikem do kolony byl vzorek přefiltrován přes filtr (0,45 μm , Sartorius, Minisart[®]).

Měření probíhalo za optimálních podmínek, zjištěných v experimentální části. UV detekce probíhala při 242 nm, elektrochemická detekce na CPE-MO při potenciálu +1,3 V. Do mobilní fáze byl přidán dodecylsulfát sodný v celkové koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, aby bylo zajištěno vytvoření micel pro zamaskování proteinů³².

Byly proměřeny kalibrační závislosti AGT v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Získaná data byla vyhodnocena metodou lineární regrese. Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 CPE OBSAHUJÍCÍ MINERÁLNÍ OLEJ

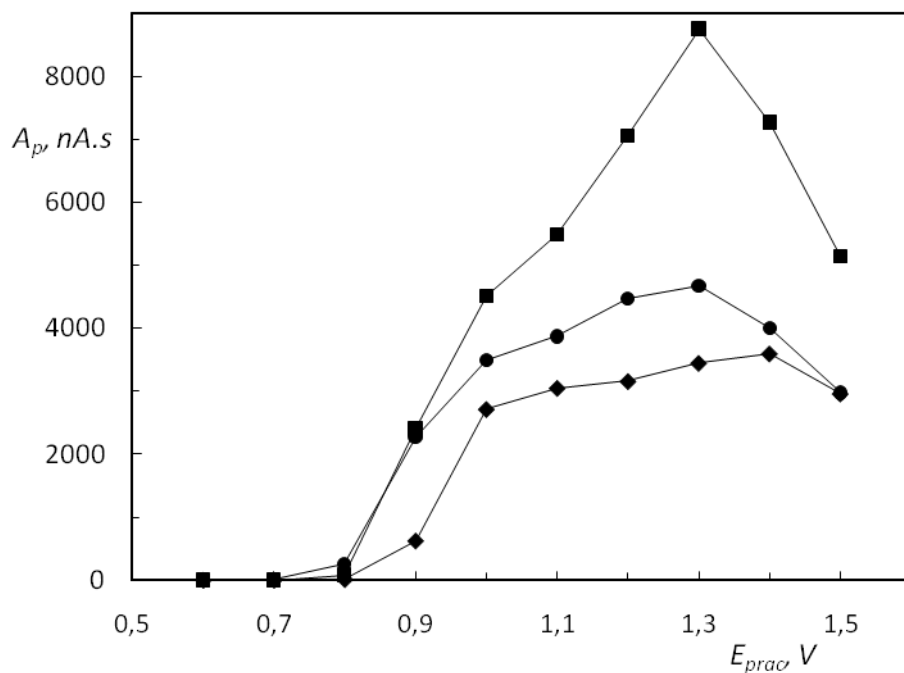
Jako první bylo měřeno na CPE připravené z uhlíkových mikrokuliček a minerálního oleje (CPE-MO). Již dříve bylo zjištěno, že tato elektroda, je stálá v methanolickém prostředí i průtokových systémech, proto byly rovnou optimalizovány podmínky pro stanovení AGT.

3.1.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK

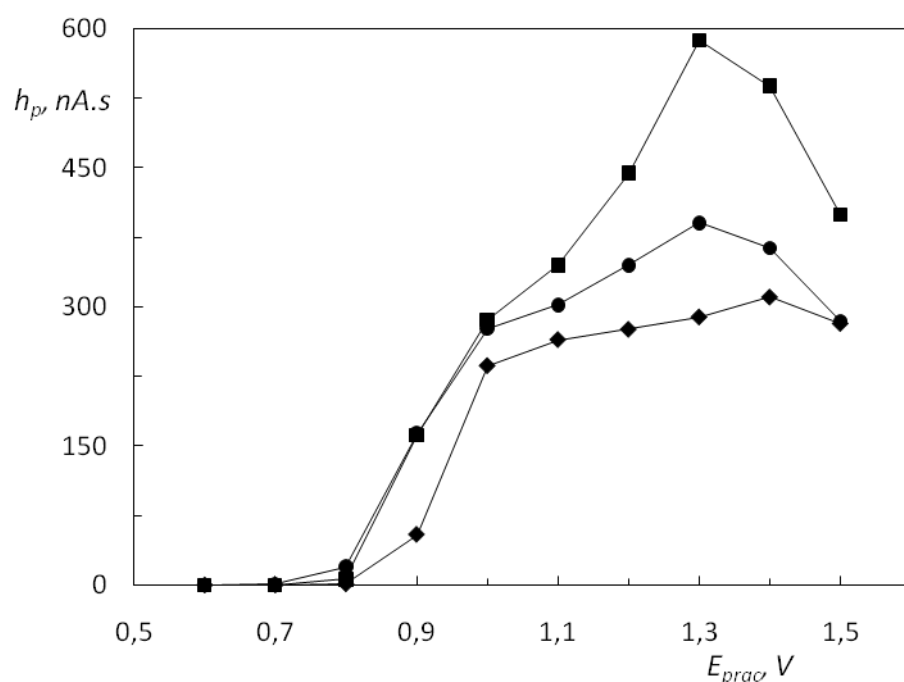
Pro dosažení nejlepších výsledků je třeba zajistit optimální podmínky pro měření. Hlavními faktory při chromatografických měřeních s elektrochemickou detekcí jsou potenciál vkládaný na pracovní elektrodu a složení mobilní fáze, hodnota pH a procentuální obsah methanolu. Pro optimalizaci těchto podmínek byly měřeny hydrodynamické voltamogramy AGT, tj. závislosti plochy resp. výšky píku na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu, pro pH mobilní fáze 2,5, 4 a 6 v rozsahu potenciálů +0,6 V až +1,5 V. Procentuální obsah methanolu by měl být zvolen tak, aby pík eluoval v dostatečné vzdálenosti od mrtvého času a nedocházelo tak k jeho deformaci, ale aby analýza netrvala příliš dlouho. Jako optimální obsah bylo zvoleno 50% methanolu. Toto množství lze samozřejmě při řešení konkrétních analytických problémů upravovat tak, aby došlo k dostatečnému oddělení stanovovaného analytu od analytů případně interferujících.

Na Obr. 3.1 jsou uvedeny získané hydrodynamické voltamogramy pro plochy píků, na Obr. 3.2 pro výšky píků.

Jako optimální podmínky pro další měření bylo vybráno pH mobilní fáze 4, kde byly naměřeny téměř dvojnásobně vyšší hodnoty výšek píků, než u zbylých hodnot pH. Maxima dosáhla tato křivka při potenciálu pracovní elektrody +1,3 V.



Obr. 3.1 Závislost plochy píků AGT na potenciálu vkládaném na (CPE-MO) v mobilní fázi o pH 2,5 (\blacklozenge), 4 (\blacksquare) a 6 (\bullet), dávkováno 20 μ l roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.



Obr. 3.2 Závislost výšky píků AGT na potenciálu vkládaném na (CPE-MO) v mobilní fázi o pH 2,5 (\blacklozenge), 4 (\blacksquare) a 6 (\bullet), dávkováno 20 μ l roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 ml \cdot min $^{-1}$.

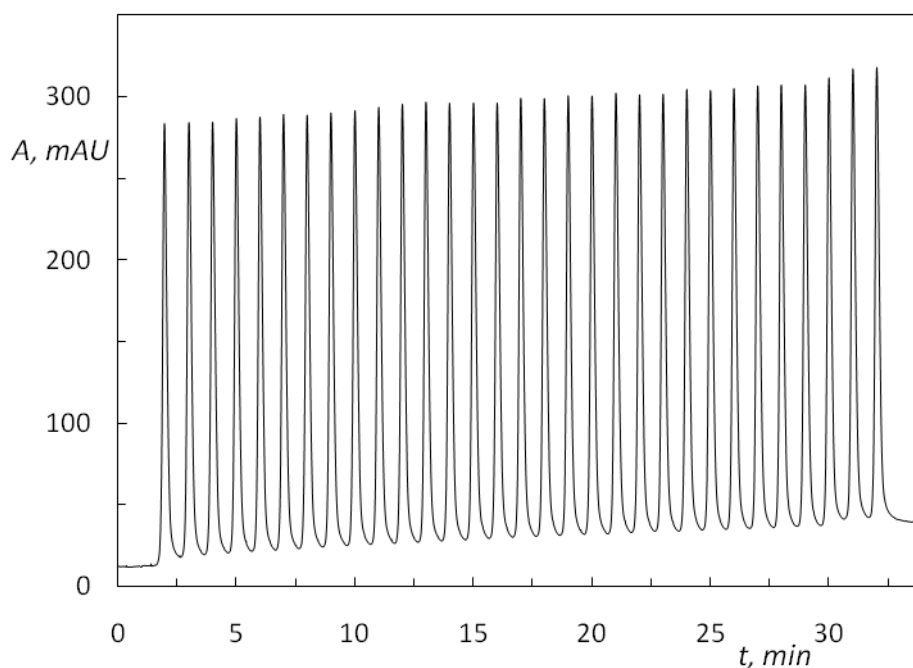
3.1.2 STÁLOST CPE

Pro ověření stálosti odezvy AGT na CPE-MO bylo provedeno opakované stanovení této látky. Dávkováno bylo třicetkrát v intervalu po 60 sekundách vždy 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ve směsi voda:metanol v poměru 50:50 (v/v). Měření probíhalo za optimálních podmínek.

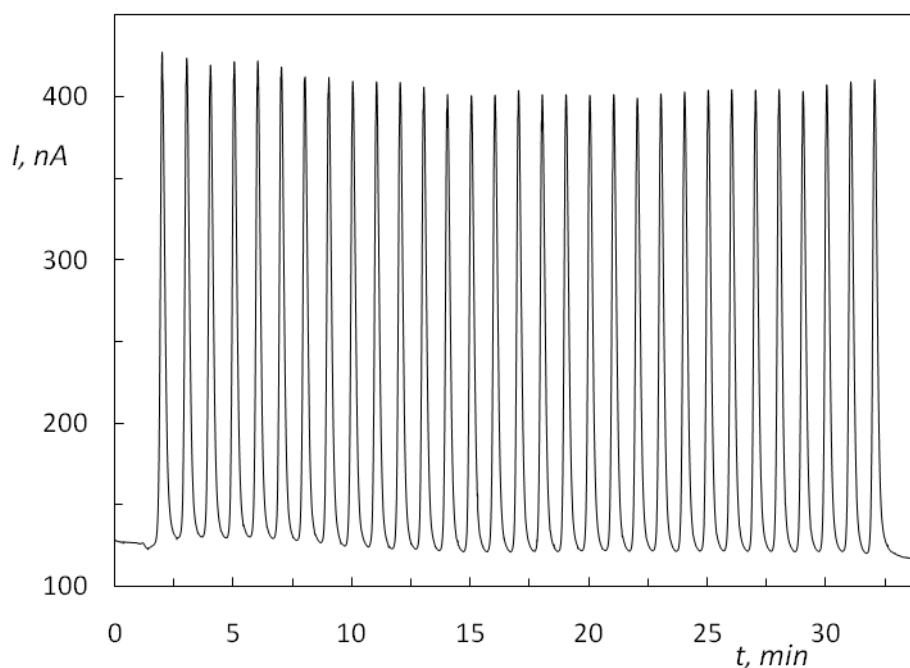
Chromatogramy získané spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí jsou ukázány na obr. 3.3 a 3.4, statisticky zpracované naměřené hodnoty ploch a výšek píků spektrofotometrickým a elektrochemickým detektorem jsou zaznamenány v tab. 3.1. Stanovené relativní směrodatné odchylky UV detektorem jsou 1,9 % pro plochy a 0,8 % pro výšky píků, pro elektrochemický detektor jsou to hodnoty 1,4 % pro plochy a 1,8 % pro výšky píků.

Tab. 3.1 Vyhodnocení stálosti odezvy pro měření s ED a UV detekcí AGT na CPE-MO, UV spektrofotometrické detekce AGT při 242 nm a amperometrické detekce na CPE při potenciálu +1,3 V

	<i>HPLC-UV</i>		<i>HPLC-ED</i>	
	A_p [mAU.s]	h_p [mAU]	A_p [nA.s]	h_p [nA]
průměr	3875,8	273,8	4085,4	285,1
s	75,3	2,3	57,4	5,2
s_r	1,9 %	0,8 %	1,4 %	1,8 %



Obr. 3.3 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.4 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.1.3 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI

Kalibrační závislosti AGT byly proměřeny za nalezených optimálních podmínek, při pH mobilní fáze 4, procentuálním obsahu methanolu 50 procent a potenciálu pracovní elektrody +1,3 V.

3.1.3.1 Spektrofotometrická detekce

Koncentrační závislosti AGT s použitím spektrofotometrické detekce byly měřeny při vlnové délce 242 nm, v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ - $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků, získaná data byla zpracována metodou lineární regrese. V tab. 3.2 a 3.3 jsou zaznamenány parametry kalibračních závislostí pro plochy resp. výšky píků, grafy kalibračních závislostí koncentračního rozmezí $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ - $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ jsou znázorněny na Obr. 3.5 a 3.7, logaritmická forma celého koncentračního rozmezí na Obr. 3.6 pro plochy a 3.8 pro výšky píků.

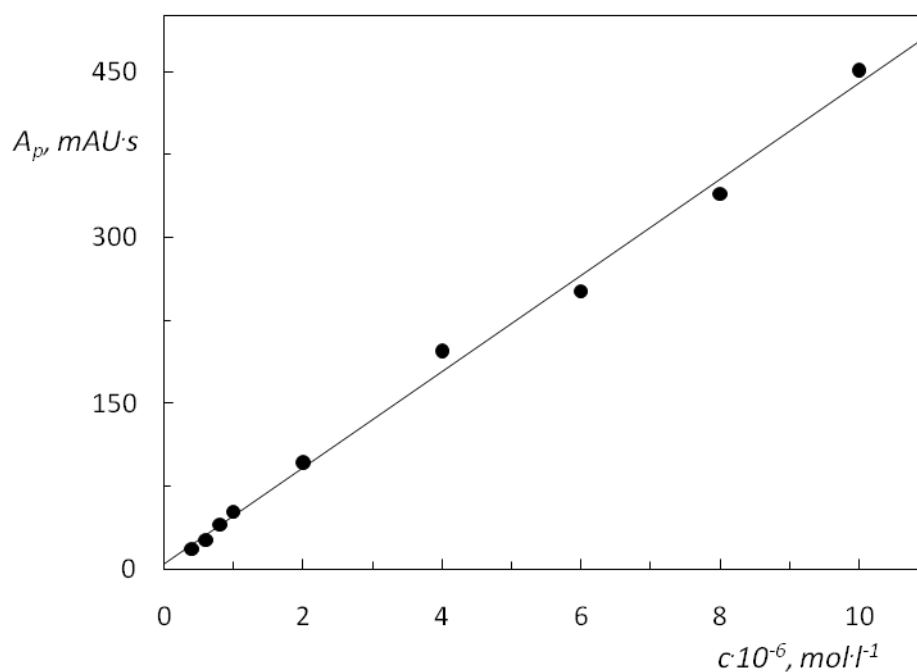
Naměřené kalibrační závislosti jsou lineární v celé oblasti měření, korelační koeficient se pohybuje v rozmezí 0,9942 – 0,9997. Směrnice logaritmických závislostí se blíží hodnotě jedna, což potvrzuje linearitu závislostí. Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Její hodnota je $3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Tab. 3.2 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 242 nm vyhodnoceno z ploch píků

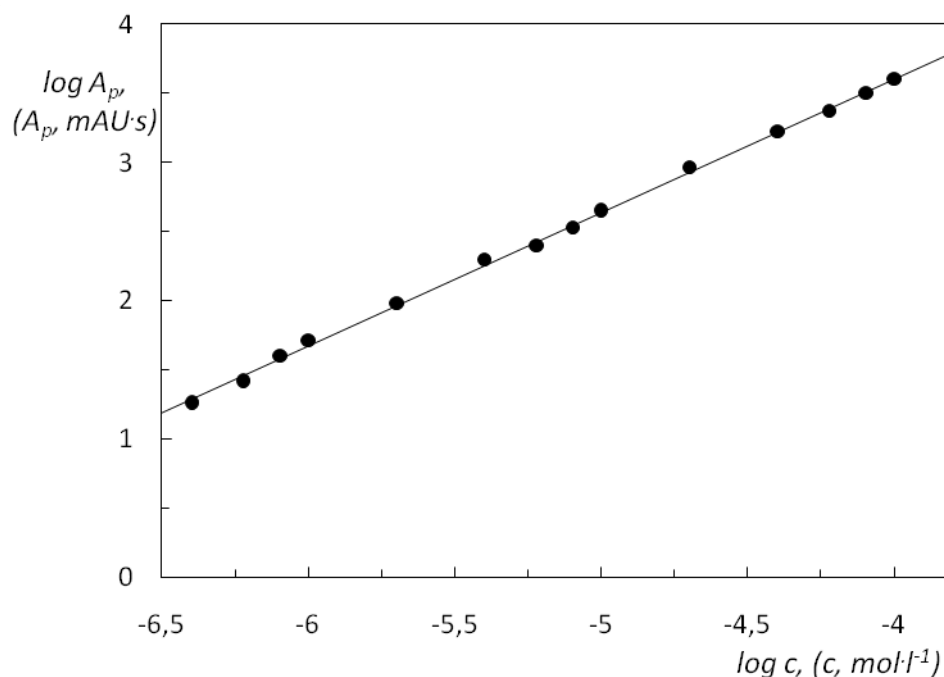
<i>c</i> [mol l^{-1}]	<i>směrnice</i> [mAUs mol l^{-1}]	<i>úsek</i> [mAUs]	<i>R</i>
$2 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-4}$	39,0	104,8	0,9992
$2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$	42,6	11,9	0,9942
$4 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$	56,8	-5,7	0,9952
$4 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$	40,0	28,5	0,9996
Závisl. $\log A_p$ na $\log c$	0,97	7,5	0,9994

Tab. 3.3 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 242 nm vyhodnoceno z výšek píků

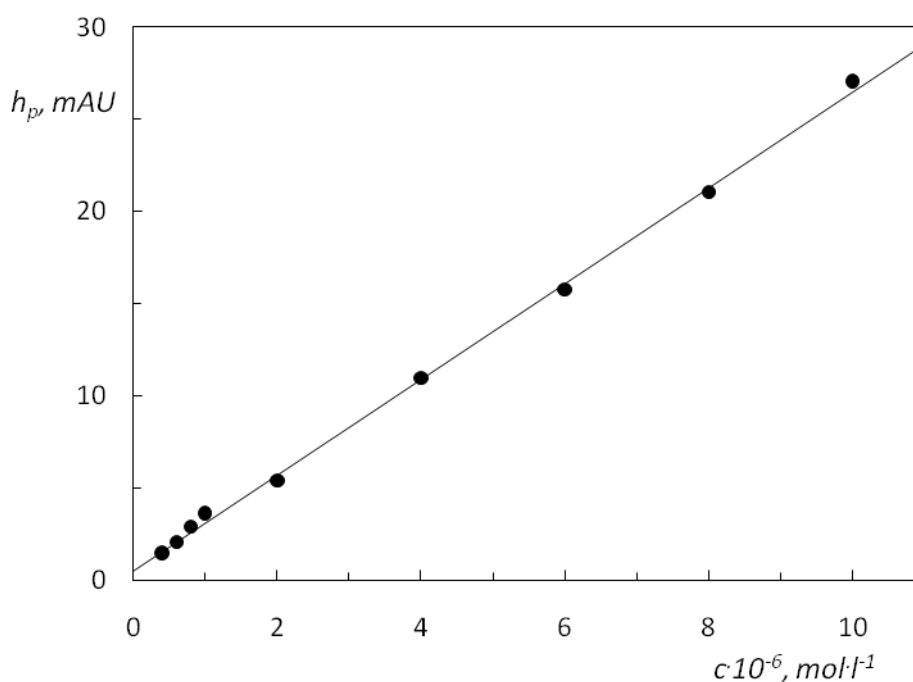
c [mol l ⁻¹]	směrnice [mAU·mol l ⁻¹]	úsek [mAU]	R
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	2,3	7,7	0,9997
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	2,7	0,1	0,9993
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	3,6	-0,1	0,9982
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	2,4	1,8	0,9997
Závisl. log h _p na log c	0,93	6,1	0,9992



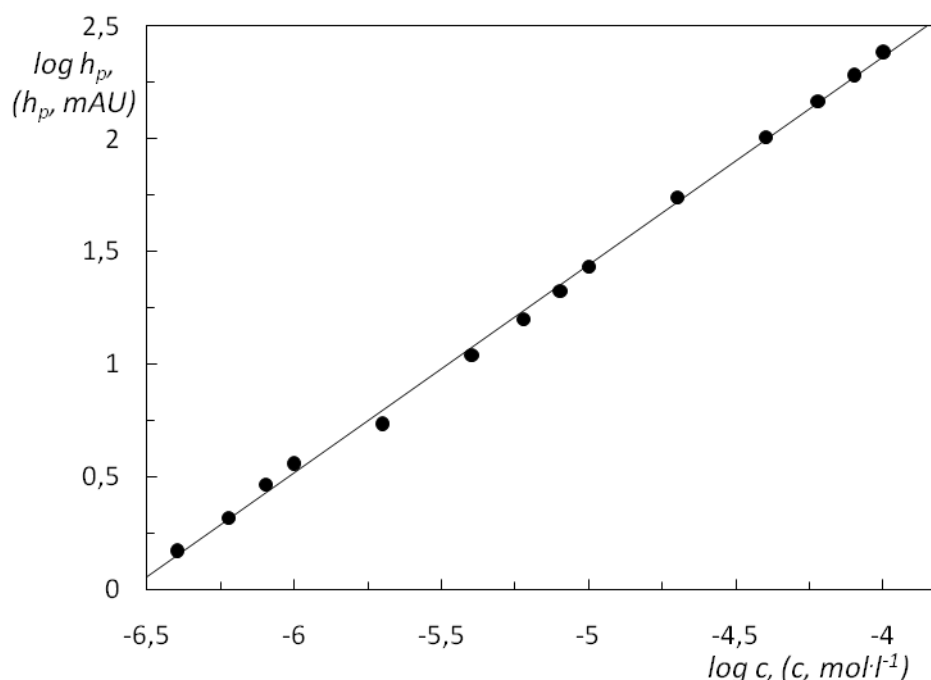
Obr. 3.5 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.6 Kalibrační závislost AGT vynesena v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $4\cdot 10^{-7}$ - $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyhodnocena z ploch píků, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, c ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), A_p (mAU·s).



Obr. 3.7 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $4\cdot 10^{-7}$ - $1\cdot 10^{-5}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyhodnocena z výšek píků, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.8 Kalibrační závislost AGT vynesená v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ vyhodnocená z výšek píků, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, c (mol l^{-1}), h_p (mAU).

3.1.3.2 Elektrochemická detekce

Kalibrační závislosti AGT s použitím elektrochemické detekce na CPE-MO byly naměřeny v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ až $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Na pracovní elektrodu byl vložen potenciál +1,3 V. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků, získaná data byla zpracována metodou lineární regrese. Vypočtené parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.4 a 3.5 pro plochy, resp. výšky píků.

Graf znázorňující kalibrační závislost AGT v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, vyhodnocený z ploch píků, znázorňuje Obr. 3.9, graf vyhodnocený z výšek píků Obr. 3.11. Logaritmická forma obou grafů v celém koncentračním rozmezí je ukázána na Obr. 3.10 a 3.12 pro plochy resp. výšky píků. Na Obr. 3.13 je zachycen chromatogram v nejnižším měřeném koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Získané kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, což potvrzuje

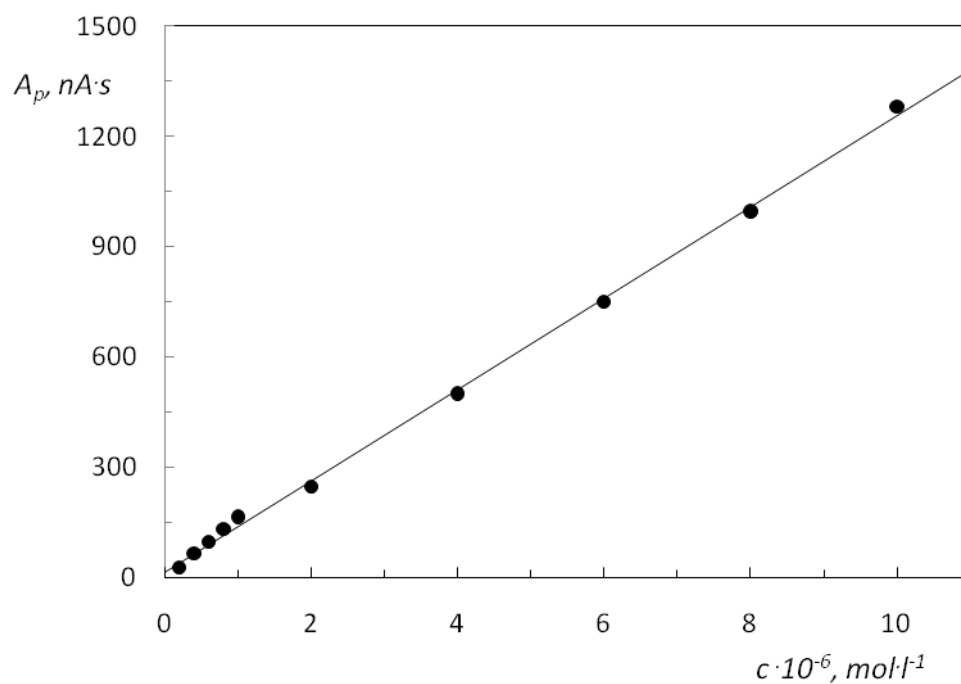
korelační koeficient, jež se pohybuje v rozmezí 0,9951 - 0,9999. Směrnice logaritmických závislostí linearitu potvrzují, jejich hodnota se blíží jedné, nicméně je poněkud nižší, než u spektrofotometrické detekce. Hodnota meze detekce je $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, což je nižší hodnota než u spektrofotometrického stanovení. Lze tedy říci, že pro stanovení AGT metodou HPLC je citlivější elektrochemická detekce s CPE-MO jako pracovní elektrodou.

Tab. 3.4 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s ED při potenciálu CPE-MO +1,3 V vyhodnoceno z ploch píků

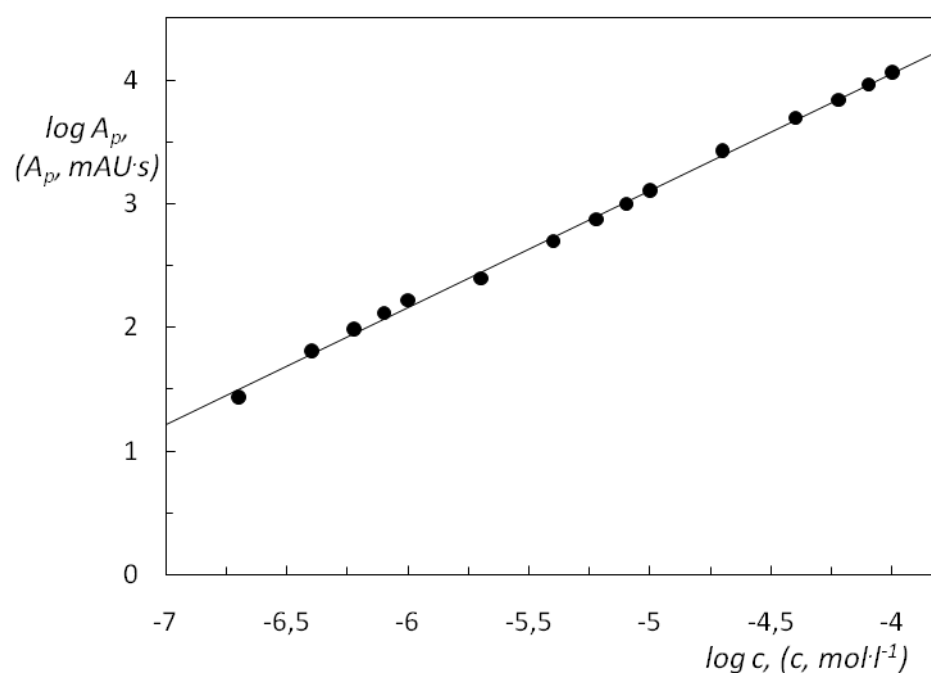
c [mol l^{-1}]	<i>směrnice</i> [$\text{mA} \cdot \text{s mol l}^{-1}$]	<i>úsek</i> [$\text{nA} \cdot \text{s}$]	<i>R</i>
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	110,5	443,5	0,9996
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	128,2	-13,5	0,9996
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	170,8	-5,5	0,9998
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	115,4	78,7	0,9995
Závisl. $\log A_p$ na $\log c$	0,95	7,8	0,9991

Tab. 3.5 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s ED při potenciálu CPE-MO +1,3 V vyhodnoceno z výšek píků

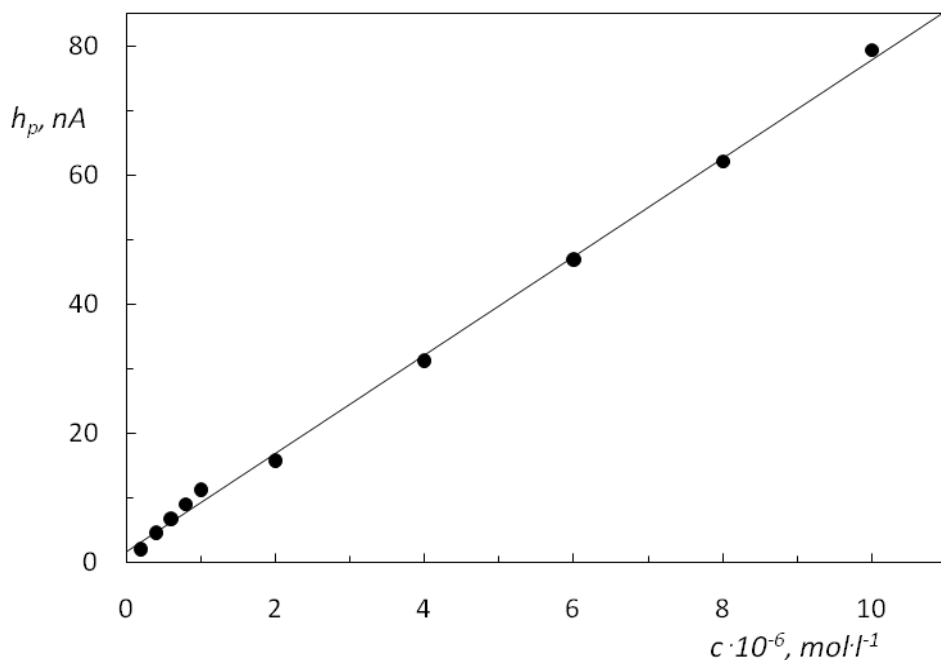
c [mol l^{-1}]	<i>směrnice</i> [mA mol l^{-1}]	<i>úsek</i> [nA]	<i>R</i>
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,4	37,3	0,9999
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	7,9	-0,3	0,9997
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	11,3	-0,1	0,9996
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,7	3,2	0,9951
Závisl. $\log h_p$ na $\log c$	0,90	6,4	0,9976



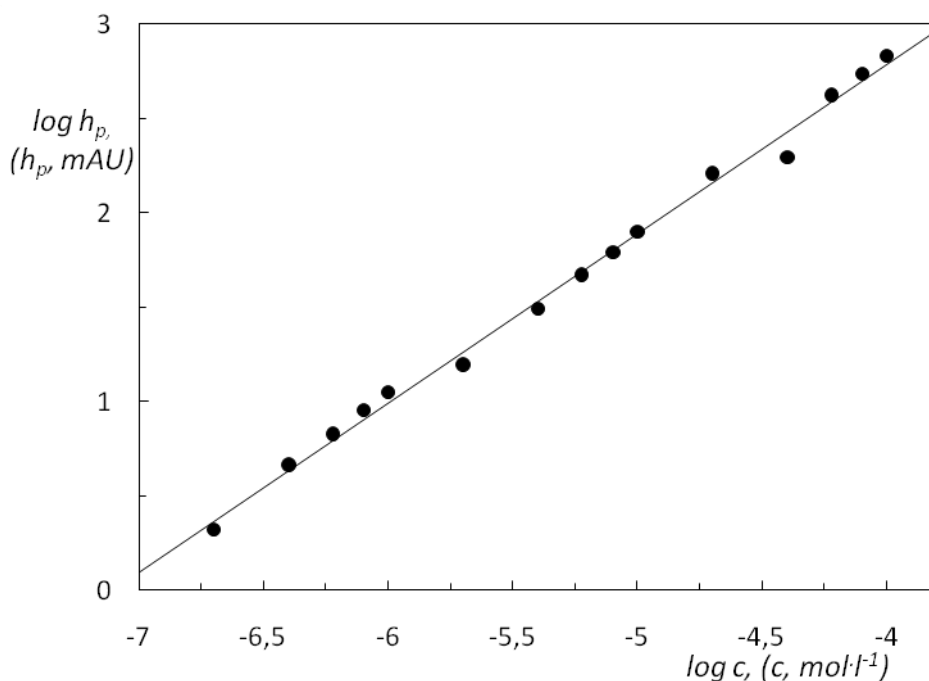
Obr. 3.9 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



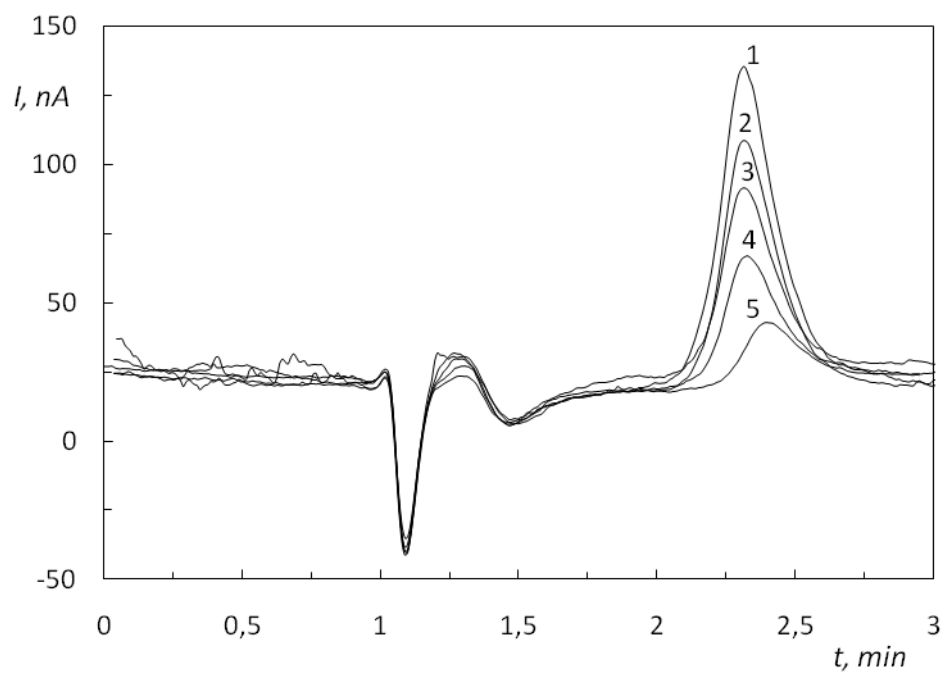
Obr. 3.10 Kalibrační závislost AGT vynesena v logaritmicke formě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), A_p (mAUs).



Obr. 3.11 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ vyhodnocená z výšek píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.12 Kalibrační závislost AGT vynesena v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, c (mol l^{-1}), A_p (mAUs).



Obr. 3.13 Chromatogram AGT pro koncentrace $1\cdot 10^{-6}$ (1), $8\cdot 10^{-7}$ (2), $6\cdot 10^{-7}$ (3), $4\cdot 10^{-7}$ (4), $2\cdot 10^{-7}$ (5) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, HPLC s ED při potenciálu +1,3 V na CPE-MO, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2 CPE OBSAHUJÍCÍ TRIKRESYLFOSFÁT

3.2.1 STÁLOST CPE

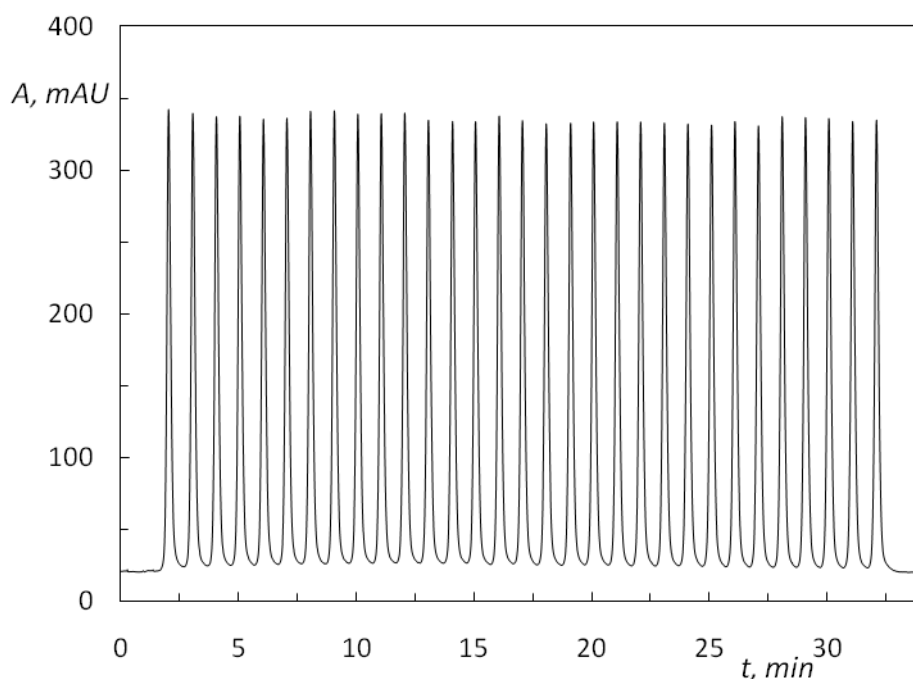
Pro ověření, zda CPE připravená z uhlíkových mikrokuliček a trikresylfosfátu (CPE-TCP) poskytuje spolehlivé výsledky, byla nejprve ověřena stálost této CPE. Dávkováno bylo třicetkrát v intervalu po 60 sekundách vždy 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ve směsi voda:metanol v poměru 50:50 (v/v). Měření probíhalo za optimálních podmínek nalezených pro CPE-MO.

Chromatogramy získané se spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí jsou ukázány na obr. 3.14 a 3.15, statisticky zpracované naměřené hodnoty ploch a výšek píků spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí shrnuje tab. 3.6.

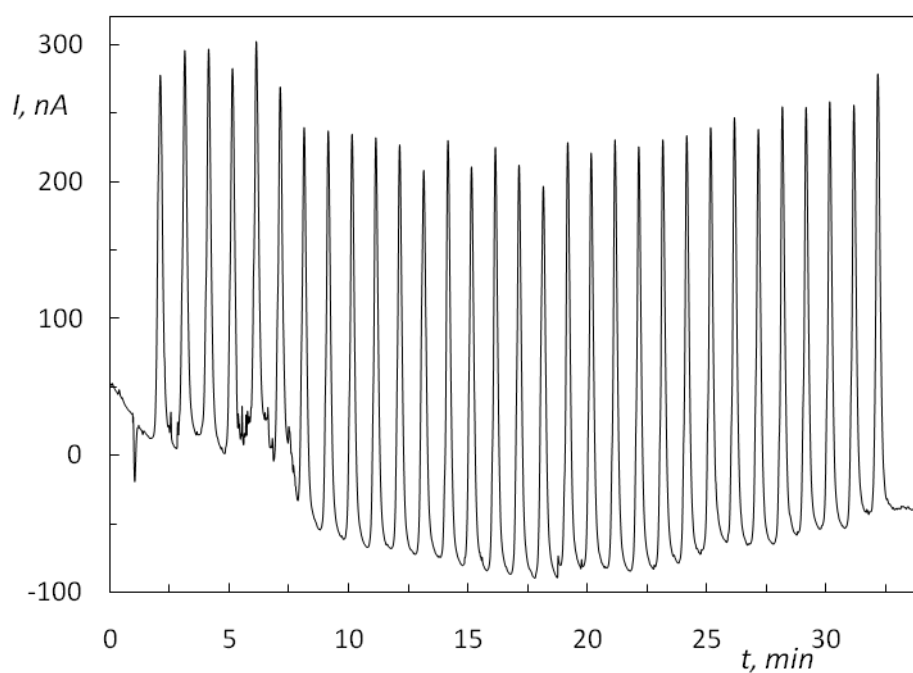
Vypočtené relativní směrodatné odchylky pro UV detektor jsou 1,4 % pro plochy píků a 0,9 % pro výšky, pro elektrochemický detektor je to 3,3 % pro plochy a 4,3 % pro výšky píků. S oběma pastami bylo dosaženo velmi podobných hodnot ploch i výšek píků, relativní směrodatné odchylky CPE-MO byly asi 2,5 krát nižší, tzn. opakovatelnost měření je lepší než u CPE-TCP. Navíc při měření s CPE-TCP dochází k driftování základní linie, což ztěžuje vyhodnocení.

Tab. 3.6 Vyhodnocení stálosti odezvy pro měření s ED a UV detekcí AGT na CPE-TCP, UV spektrofotometrické detekce AGT při 242 nm a amperometrické detekce na CPE při potenciálu +1,3 V

	<i>HPLC-UV</i>		<i>HPLC-ED</i>	
	A_p [mA.U.s]	h_p [mA.U]	A_p [nA.s]	h_p [nA]
průměr	4082,8	315,6	4098,9	299,3
s	55,4	2,7	136,4	12,8
s _r	1,4 %	0,9 %	3,3 %	4,3 %



Obr. 3.14 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



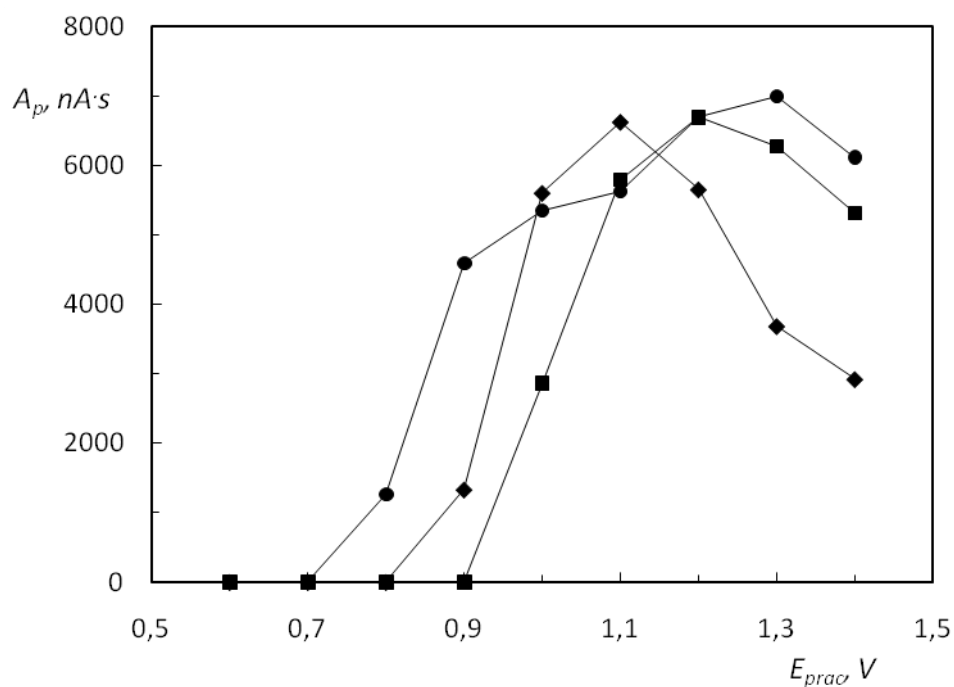
Obr. 3.15 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK

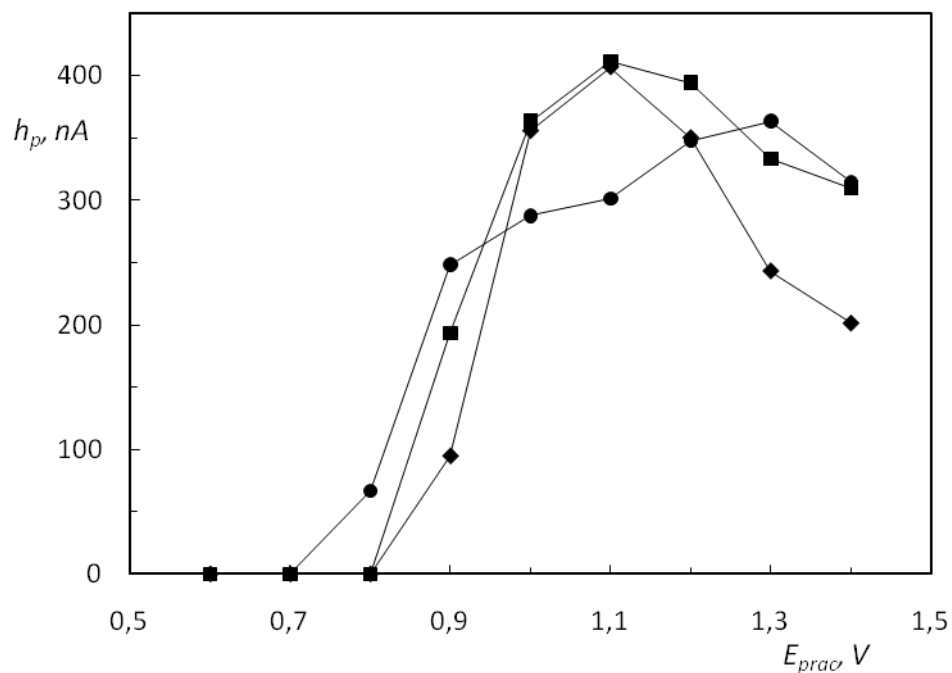
Pro zjištění optimálních podmínek byly naměřeny hydrodynamické voltamogramy AGT. Na elektrodu byl vložen potenciál +0,6 V až +1,4 V, měřeno bylo při hodnotách pH mobilní fáze 2,5, 4 a 6.

Získané voltamogramy závislosti plochy píků na vkládaném potenciálu na pracovní elektrodu jsou znázorněny na Obr. 3.16, závislost výšky píků na potenciálu na Obr. 3.17.

Z grafů je patrné, že hodnota pH nemá na odezvu této elektrody tak velký vliv jako u CPE-MO, kde hodnoty pro pH 4 jasně převyšovaly nad hodnotami pro pH 2,5 a 6. Jako optimální bylo vybráno pH 4 pro lepší možnost srovnání obou past. Nejvyšší hodnoty výšek píků byly dosaženy při potenciálu pracovní elektrody +1,1 V, maxima pro plochy píků křivka dosáhla při potenciálu CPE-TCP +1,2 V. Jako optimální hodnota pro další měření byl zvolen potenciál pracovní elektrody +1,1 V.



Obr. 3.16 Závislost plochy píků na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu v mobilní fázi o pH 2,5 (♦), 4 (■) a 6 (●), dávkováno 20 μ l roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.17 Závislost výšky píků na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu v mobilní fázi o pH 2,5 (◆), 4 (■) a 6 (●), dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.3 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI

Kalibrační závislosti AGT byly proměřeny za nalezených optimálních podmínek, při pH mobilní fáze 4, procentuálním obsahu methanolu 50 % a potenciálu pracovní elektrody +1,1 V.

3.2.3.1 Spektrofotometrická detekce

Kalibrační závislosti AGT byly měřeny při 242 nm v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ - $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků a dále zpracovány metodou lineární regrese. Získané hodnoty se shodují s hodnotami uvedenými v kapitole 3.1.3.1.

3.2.3.2 Elektrochemická detekce

Kalibrační závislosti AGT byly proměřeny v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ - $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Na uhlíkovou pastovou elektrodu byl vložen potenciál +1,1 V. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků a zpracovány metodou lineární regrese.

Získané parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v tab. 3.9 a 3.10. Obr. 3.22 znázorňuje kalibrační závislost, v celém rozmezí koncentrací, vyhodnocenou z ploch píků, na Obr. 3.23 je její logaritmická forma. Obr. 3.24 a 3.25 byly vyhodnoceny z výšek píků. Na Obr. 3.26 je zachycen chromatogram v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ - $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

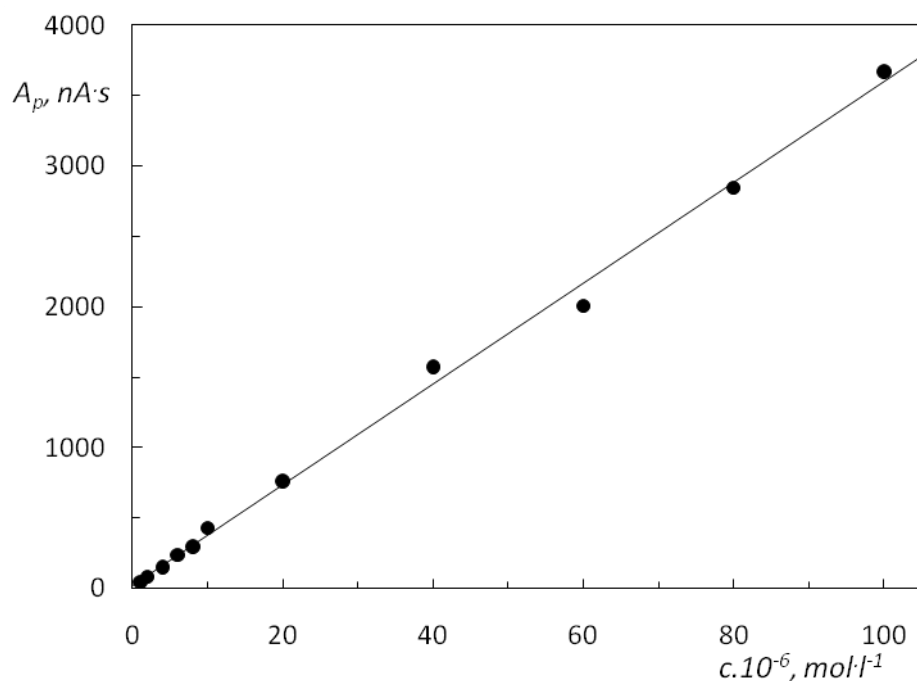
Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Získaná hodnota je $9,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. S CPE-TCP bylo dosaženo horších výsledků než s CPE-MO. Tato hodnota je dvojnásobná ve srovnání s UV spektrofotometrickou detekcí. Korelační koeficient se pohybuje v rozmezí 0,9922 - 0,9993, kalibrační závislosti jsou tedy lineární v celém rozsahu měření. Směrnice logaritmických závislostí se blíží jedné, což potvrzuje linearitu závislostí.

Tab. 3.9 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s ED při potenciálu CPE-TCP +1,1 V vyhodnoceno z ploch píků

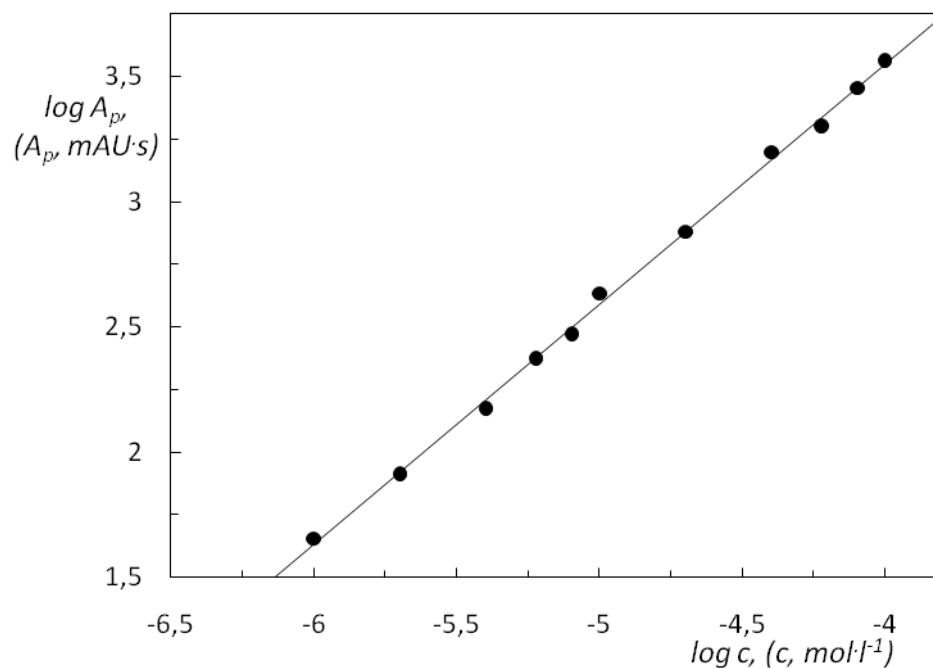
c [mol l ⁻¹]	směrnice [mA·s mol l ⁻¹]	úsek [nA·s]	R
2·10 ⁻⁵ - 1·10 ⁻⁴	35,5	44,8	0,9954
1·10 ⁻⁶ - 1·10 ⁻⁵	41,2	-5,4	0,9922
1·10 ⁻⁶ - 1·10 ⁻⁴	35,8	25,0	0,9984
Závisl. log A _p na log c	0,96	7,4	0,9992

Tab. 3.10 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s ED při potenciálu CPE-TCP +1,1 V vyhodnoceno z výšek píků

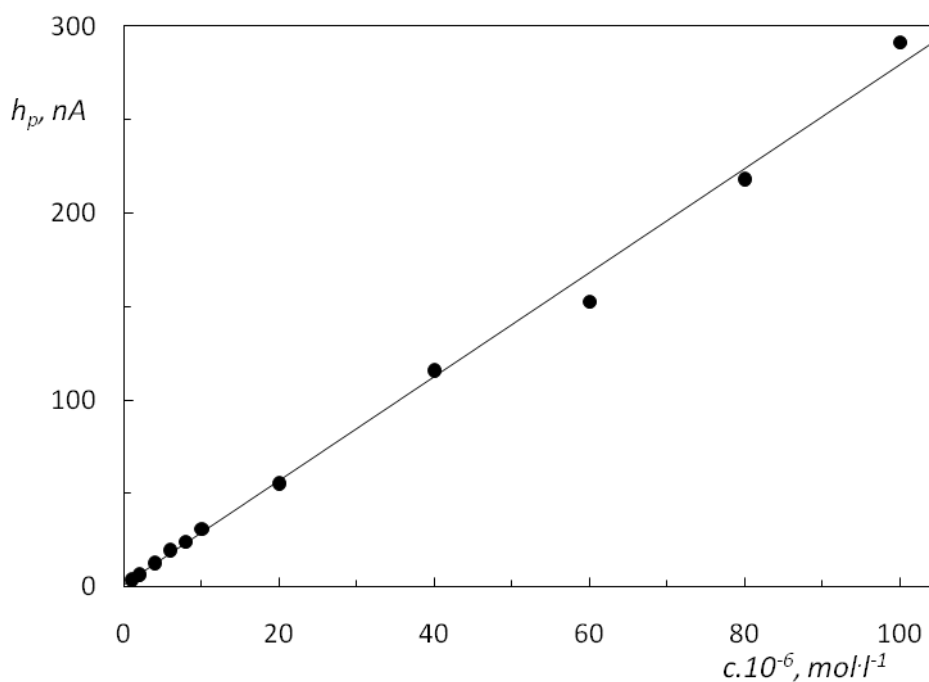
c [mol l ⁻¹]	směrnice [mA·mol l ⁻¹]	úsek [nA]	R
2·10 ⁻⁵ - 1·10 ⁻⁴	2,9	-5,9	0,9841
1·10 ⁻⁶ - 1·10 ⁻⁵	3,0	0,8	0,9991
1·10 ⁻⁶ - 1·10 ⁻⁴	2,8	0,8	0,9977
Závisl. log h _p na log c	0,94	6,1	0,9993



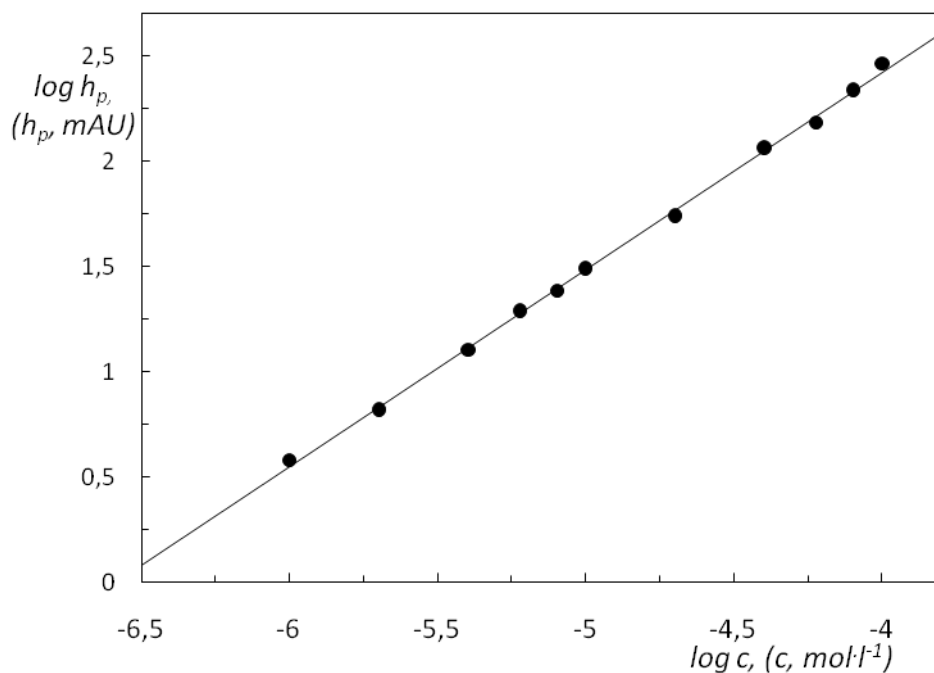
Obr. 3.22 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí 1·10⁻⁶ - 1·10⁻⁴ mol l⁻¹ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-TCP +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost 1 ml·min⁻¹.



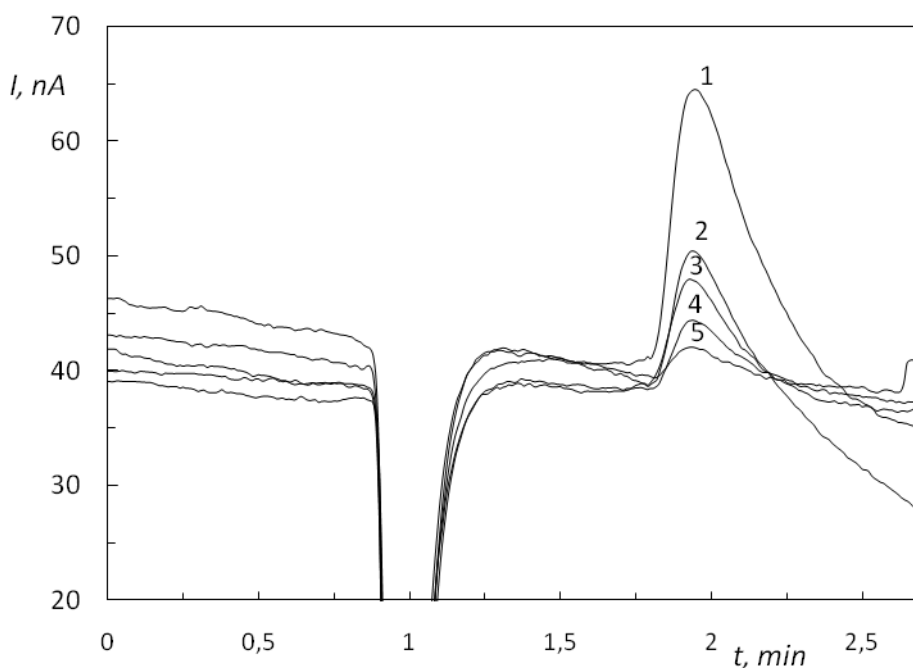
Obr. 3.23 Kalibrační závislost AGT vynesena v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $1\cdot 10^{-6}$ - $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyhodnocena z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-TCP +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, c ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), A_p ($\text{mAU}\cdot\text{s}$).



Obr. 3.24 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $1\cdot 10^{-6}$ - $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vyhodnocena z výšek píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-TCP +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 3.25 Kalibrační závislost AGT vynesena v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-TCP +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), h_p (mAU).



Obr. 3.26 Chromatogram AGT pro koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, HPLC s ED při potenciálu na CPE-TCP +1,1 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.3 CPE OBSAHUJÍCÍ SILIKONOVÝ OLEJ

3.3.1 STÁLOST CPE

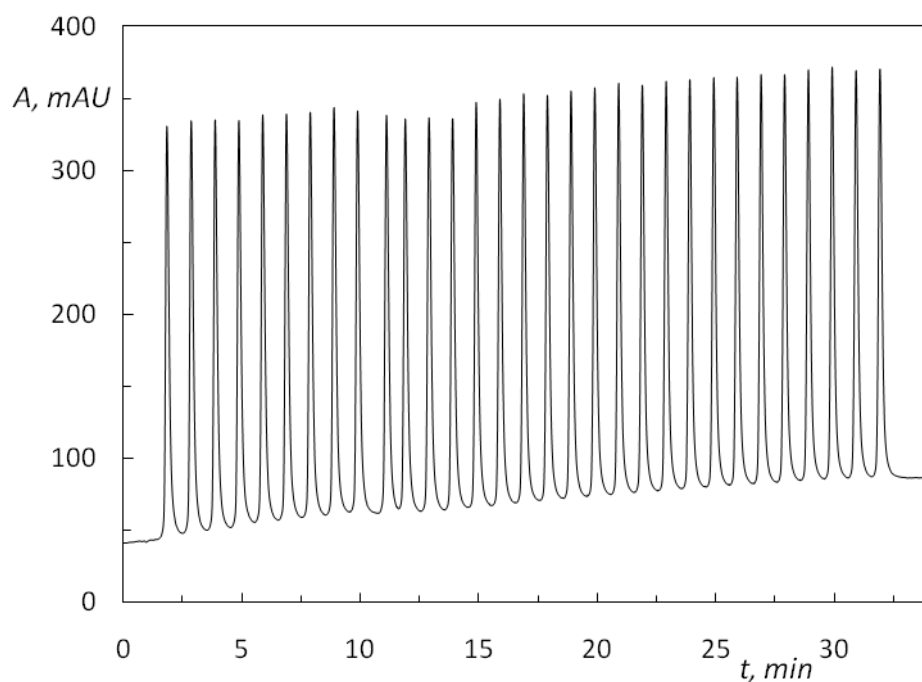
Stálost uhlíkové pastové elektrody připravené z uhlíkových mikrokuliček a silikonového oleje (CPE-SO) byla zjištěna opakovaným dávkováním 20 μl vzorku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ve směsi voda:metanol v poměru 50:50 (v/v) v 60 sekundových intervalech celkem třicetkrát. Měření probíhalo za optimálních podmínek stanovených pro CPE-MO.

HPLC záznamy získané spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí jsou znázorněny na obr. 3.27 a 3.28, statisticky zpracované naměřené hodnoty ploch a výšek píků spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí jsou zaznamenány v tab. 3.11. Pro UV detektor jsou hodnoty relativní směrodatné odchylky 2,3 % pro plochy a 1,3 % pro výšky píků, u elektrochemického detektoru to je 17,2 % pro plochy píků a 17,5 % pro jejich výšky.

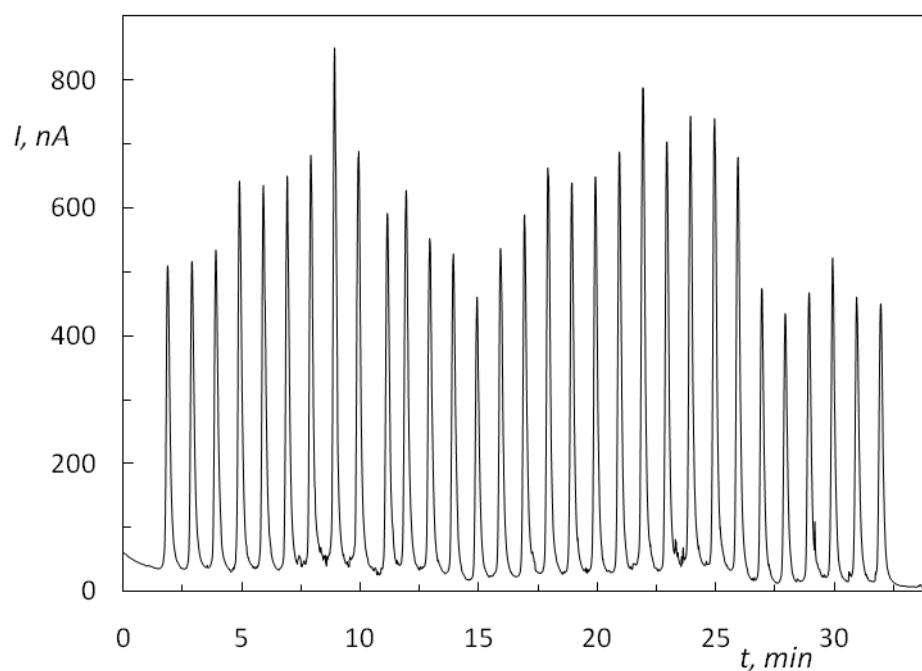
Naměřené hodnoty pro plochy i výšky píků jsou téměř dvakrát větší než hodnoty získané u zbylých dvou past, vysoké hodnoty relativních směrodatných odchylek však ukazují na nestálost pasty. Další měření s touto pastou již nebyla provedena, protože opakovatelnost měření s CPE-SO byla nevyhovující, získané výsledky by byly nespolehlivé.

Tab. 3.11 Vyhodnocení stálosti odezvy pro měření s ED a UV detekcí AGT na CPE-SO, UV spektrofotometrické detekce AGT při 242 nm a amperometrické detekce na CPE při potenciálu +1,3 V

	<i>HPLC-UV</i>		<i>HPLC-ED</i>	
	A_p [mAUs]	h_p [mAUs]	A_p [nAs]	h_p [nA]
průměr	3531,5	287,9	6681,8	576,2
s	81,6	3,8	1150,6	100,8
s_r	2,3 %	1,3 %	17,2 %	17,5 %



Obr. 3.27 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.28 Chromatogram 30 opakovaných nástřiků AGT, HPLC s ED při potenciálu na CPE-SO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.4 STANOVENÍ V MODELOVÝCH VZORCÍCH MOČI

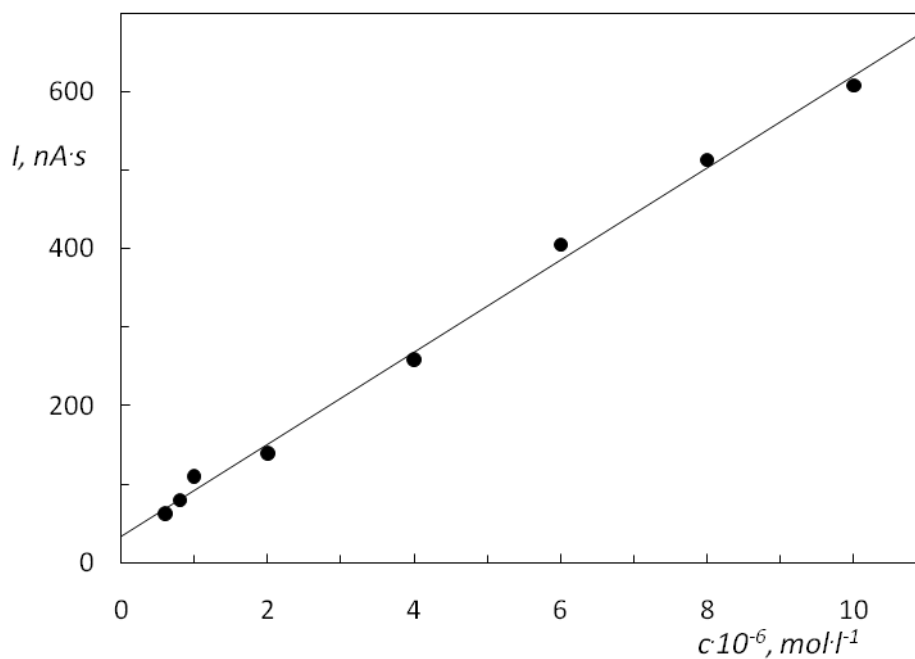
Pro měření v modelových vzorcích byla použita CPE-MO, protože s ní bylo dosaženo nejnižší meze detekce. Měření probíhalo za optimálních podmínek nalezených pro tuto pastu.

Kalibrační závislost byla naměřena v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. UV spektrofotometrická detekce probíhala při 242 nm, elektrochemická detekce na CPE-MO při potenciálu +1,3 V. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků získané elektrochemickou detekcí a zpracovány metodou lineární regrese. UV detekcí nebylo možné AGT stanovit, protože pík byl zcela překryt interferujícími píky látek eluujících ve stejném čase jako AGT. Získané parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch a výšek píků jsou uvedeny v tab. 3.12. Kalibrační závislost vyhodnocená z ploch píků je znázorněna na Obr. 3.29, z výšek píků na Obr. 3.30. Chromatogram získaný spektrofotometrickou detekcí je znázorněn na Obr. 3.31, chromatogramy naměřené elektrochemickým detektorem jsou znázorněny na Obr. 3.32 a 3.33.

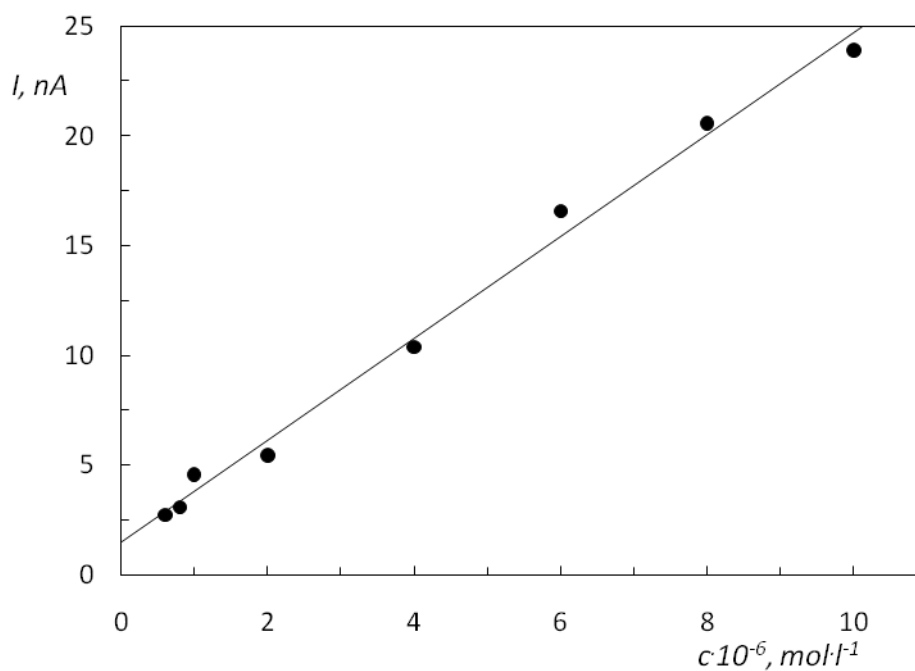
Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Její hodnota je $5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Korelační koeficient se pohybuje v rozmezí 0,9964 - 0,9981, kalibrační závislosti jsou tedy lineární v celém rozsahu měření.

Tab. 3.12 Parametry kalibračních závislostí AGT pro HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V vyhodnocené z ploch a výšek píků.

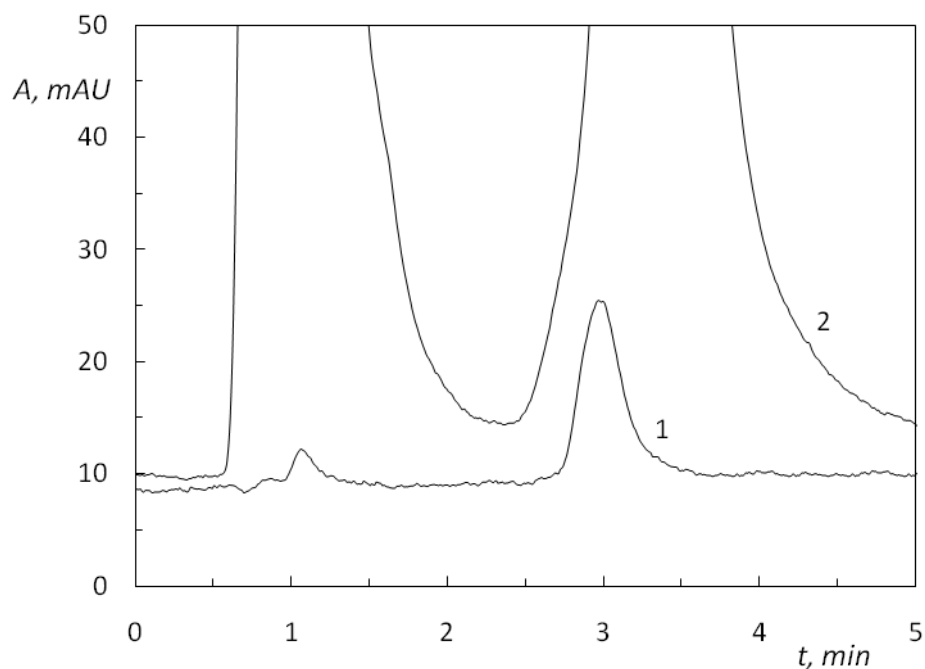
	<i>c</i> [<i>mol l⁻¹</i>]	<i>směrnice</i> [<i>mA·s mol l⁻¹</i>]	<i>úsek</i> [<i>nA·s</i>]	<i>R</i>
plocha	$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	58,65	34,51	0,9981
výška	$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	2,32	1,51	0,9964



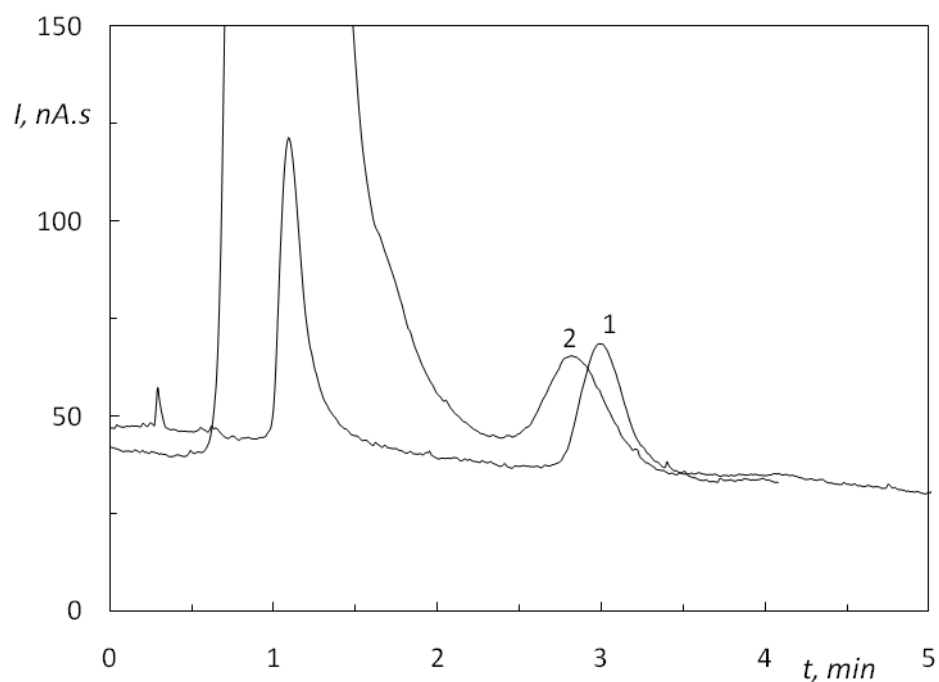
Obr. 3.29 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyhodnocená z ploch píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi pufr o pH 4:MeOH:vzorek v poměru 40:50:10 (v/v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



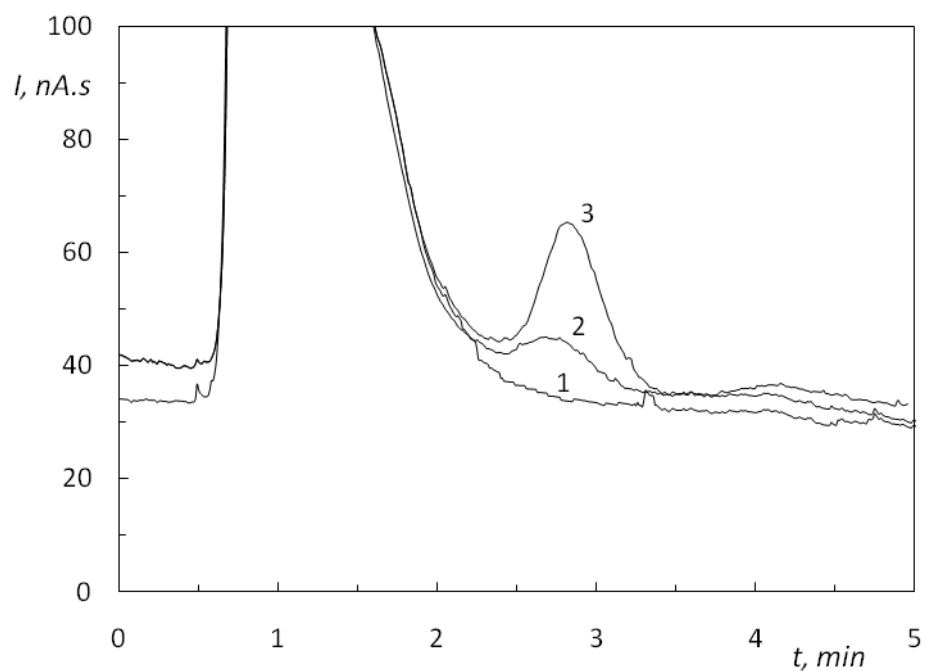
Obr. 3.30 Kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyhodnocená z výšek píků, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi pufr o pH 4:MeOH:vzorek v poměru 40:50:10 (v/v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.31 Chromatogram AGT pro koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kontrolní vzorek AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v) (1), modelový vzorek ve směsi fosfátový pufr o pH 4:MeOH:moč v poměru 40:50:10 (v/v/v) (2), HPLC s UV detekcí při 242 nm, dávkováno 20 μl roztoku AGT, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.32 Chromatogram AGT pro koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kontrolní vzorek AGT ve směsi voda:MeOH v poměru 50:50 (v/v) (1), modelový vzorek ve směsi fosfátový pufr o pH 4:MeOH:moč v poměru 40:50:10 (v/v/v) (2), HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.33 Chromatogram AGT v modelových vzorcích moči pro koncentrace 0 (1), $1 \cdot 10^{-6}$ (2), $1 \cdot 10^{-5}$ (3) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, HPLC s ED při potenciálu na CPE-MO +1,3 V, dávkováno 20 μl roztoku AGT ve směsi fosfátový pufr o pH 4:MeOH:moč v poměru 40:50:10 (v/v/v), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:MeOH 50:50 (v/v), průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4 ZÁVĚR

Při vývoji nové metody stanovení AGT na uhlíkových pastách byly porovnány vlastnosti uhlíkové pastové elektrody připravené z uhlíkových mikrokuliček a minerálního oleje - CPE-MO s trikresylfosfátem - CPE-TCP a silikonovým olejem - CPE-SO.

Byla ověřena stálost CPE-MO a CPE-TCP. S CPE-SO bylo dosaženo téměř dvojnásobně vyšších hodnot, avšak opakovatelnost měření s touto pastou byla nedostatečná pro další měření.

Z hydrodynamických voltamogramů byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení AGT na uhlíkové pastové elektrodě. Nejvyšších hodnot pro CPE-MO bylo dosaženo při pH mobilní fáze 4, křivka měla maximum při potenciálu pracovní elektrody +1,3 V. U CPE-TCP nebyl vliv pH tolik patrný, při všech pH mobilní fáze bylo dosaženo podobných výsledků. Jako optimální bylo zvoleno pH mobilní fáze 4, pro lepší možnost srovnání obou past. Pro potenciál pracovní elektrody byla zvolena hodnota +1,1 V.

Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce AGT. Spektrofotometrickou detekcí byla dosažena mez detekce $3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, s CPE-MO bylo dosaženo hodnoty meze detekce $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a pro CPE-TCP hodnota $9,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ AGT. Pro stanovení AGT byla jako nejcitlivější metoda vyhodnocena HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE-MO.

S touto pastou byla naměřena kalibrační závislost modelových vzorků simulujících reálné vzorky moči pacientů užívajících nebo sportovců zneužívajících AGT. Byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. UV detekce nebyla možná z důvodu překrytí píky AGT interferujícími píky látek eluujícími ve stejném čase. Při měření s elektrochemickou detekcí bylo dosaženo meze detekce $5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED na CPE-MO je vhodnou metodou pro stanovení AGT v modelových vzorcích moči.

LITERATURA

1. Engelhardt, D; Weber, M.M.; Therapy of Cushing's Syndrome with Steroid Biosynthesis Inhibitors, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **49**, 261 – 267 (1994).
2. Mitwally, M.F.; Casper, R.F.; Inhibitory aromatázy a prevence karcinomu prsu, *Gynekologie po promoci*, Březen/Duben (2004).
3. Ragaz, J.; Status of aromatase inhibitors in relation to other breast cancer treatment modalities, *Endocrine-Related Cancer*, **6**, 277 – 291 (1999).
4. Brueggemeier, R. W.; Hackett, J. C.; Diaz-Cruz, E. S.; Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer, *Endocrine Reviews*, **26**:3, 331 – 345 (2005).
5. Harris, A. L.; Powles, T. J.; Smith, I. E.; Aminoglutethimide in the Treatment of Advanced Postmenopausal Breast Cancer, *Cancer Research*, **42**, 3405 - 3408, (1982).
6. Hodek, P.; Fidlerová, J.; Stiborová, M.; Aromatáza jako cíl v antihormonální léčbě, *Klinická farmakologie a farmacie*, **19**, 211 – 214 (2005).
7. Salhanick, H. A.; Basic Studies on Aminoglutethimide, *Cancer Research*, **42**, 3315 – 3321 (1982).
8. Aboul-Enein, H. Y.; El-Awady, M. I.; Heard, Ch. M.; Enantiomeric Separation of Aminoglutethimide, Acetyl Aminoglutethimide And Dansyl Aminoglutethimide by TLC with β -cyclodextrin and Derivatives as Mobile Phase Additives, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **23**:17, 2715 – 2726 (2000).
9. Aboul-Enein, H. Y.; Islam, M. R.; Direct Chromatographic Resolution of Racemic Aminoglutethimide and its Acetylated Metabolite Using Different Cellulose Based Chiral Stationary Phases, *Chromatographia*, **30**, 223 – 227, (1990).
10. Aboul-Enein, H. Y.; Islam, M. R.; Direct Enantiomeric High Performance Liquid Chromatographic Separation of Aminoglutethimide and its Major Metabolite on a Series of Chiralcel OD and Chiralcel OJ Columns and its Application to Biological Fluids, *Biomedical Chromatography*, **5**, 74 – 77, (1991).
11. Elbashira, A. A.; Sulimanb, F. E. O.; Saada, B.; Aboul-Enein, H. Y.; Determination of aminoglutethimide enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using methylated- β -cyclodextrin as a chiral selector and computational calculation for their respective inclusion complexes, *Talanta*, **77**, 1388 – 1393, (2009).

12. Cesur, N.; Apak, T. I.; Aboul-Enein, H. Y.; Özkırımlı, S.; LC determination of aminoglutethimide enantiomers as dansyl and fluorescamine derivatives in tablet formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **28**, 487 – 492 (2002).
13. Schanche, J.S.; Lønning, P.E.; Ueland, P.M.; Kvinnsland, S.; Determination of Aminoglutethimide and N-acetylamino-glutethimide in Human Plasma by Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring* **6**, 221 – 226 (1984).
14. Robinson, B.A.; Cornell, F.N.; Liquid-chromatographic Determination of Aminoglutethimide in Plasma, *Clinical Chemistry* **29**, 1104 – 1108 (1983).
15. Menge, G.; Dubois, J.P.; Determination of Aminoglutethimide and N-acetylamino-glutethimide in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography* **310**, 431 – 437 (1984).
16. Kamblawi, M.O.; Stevens, R.G.; Nicholls, P.J.; High-Performance Liquid Chromatography Assay for Aminoglutethimide and Its Acetylated Metabolite in Urine, *Journal of Chromatography* **309**, 431 – 435 (1984).
17. Cesur, N.; Apak, T.I.; Aboul-Enein, H.Y.; Özkırımlı, S.; LC Determination of Aminoglutethimide Enantiomers as Dansyl and Fluorescamine Derivatives in Tablet Formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**, 487–492 (2002).
18. Adam, A.M.; Rogers, H.J.; Gas-Liquid Chromatographic Assay of Aminoglutethimide and a High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Its Acetyl Metabolite in Biological Fluids, *Journal of Chromatography* **307**, 129 – 135 (1984).
19. Abdel-Khalek, M.M.; Mahrous, M.S.; Daabees, H.G.; Beltagy, Y.A.; Spectrophotometric Determination of Aminoglutethimide by Diazotization and Subsequent Coupling, *Analytical Letters* **26**, 1109 – 1123 (1993).
20. Mareck, U.; Sigmund, G.; Opfermann, G.; Geyer, H.; Schänzer, W.; Identification of the Aromatase Inhibitor Aminoglutethimide in urine by Gas-Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**, 2209 – 2214 (2002).
21. Kang, M.-J.; Hwang, Y. H.; Lee W.; Kim, D.-H.; Validation and application of a screening method for β 2-agonists, anti-estrogenic substances and mesocarb in human urine using liquid chromatography/tandem mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 252 – 264 (2007).

22. Van Thuyne, W.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F.T.; Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatisation, *Journal of Chromatography B*, **857**, 259 – 265 (2007).
23. Mazzarino, M.; de la Torre, X.; Botrè, F.; A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**, 681–698 (2008).
24. Badouda, F.; Grata, E.; Perrenoud, L.; Avois L.; Saugy, M.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry I. Screening analysis, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 4423 – 4433, (2009).
25. Adams, R. N.; Carbon Paste Electrodes, *Analytical Chemistry* **30**, 1576-1576 (1958).
26. Vytřas, K.; Švancara I.; Metelka, R.; Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **74**:10, 1021 – 1033 (2009).
27. Švancara, I.; Schachl, K.; Testing of Unmodified Carbon Paste Electrodes, *Chemické Listy* **93**, 490 – 499 (1999).
28. Švancara, I.; Vytřas, K.; Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod, *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
29. *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, Skriptum kurzu, Švancara, I.; 49 – 58, Česká společnost chemická, Praha (2006).
30. Vlachová, K.; Stanovení aminoglutethimidu pomocí uhlíkových pastových elektrod, *Bakalářská práce*, UK, Praha (2008).
31. *Český lékopis 2002, 2. díl-Léčivé a pomocné látky*. Grada Publishing, Praha (2003).
32. Elchisak M. A.; Carlson J. H.; Assay of Free and Conjugated Catecholamines by High Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection, *Journal of Chromatography*, **233**, 79 – 88, (1982).