

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ FLUTAMIDU  
NA STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a LC 06035)  
a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 6107/2007/B-Ch/PrF)

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Jitka Radová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 – 2008, pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc. A prohlašuji, 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 15. května 2008

.....  
podpis

**Předmětová hesla:** analytická chemie,  
voltametrie, amalgámová elektroda,  
ultrafialová spektroskopie, stanovení lékové formy,  
protinádorové léčivo

**Klíčová slova:** flutamid, APO-Flutamid,  
DC voltametrie, diferenční pulsní voltametrie,  
rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová  
elektroda

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli panu prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych chtěla poděkovat RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. a Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi za vřelý přístup, ochotu a čas, který mi věnovali po celou dobu mé práce.

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

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>7</b>
1.1. Cíl práce .....	7
1.2. Studovaná látka .....	7
1.3. Biologické vlastnosti flutamidu .....	8
1.4. Analytické metody stanovení flutamidu.....	10
1.4.1. Analytické metody stanovení flutamidu dle Českého lékopisu.....	11
<b>2. Experimentální část</b> .....	<b>12</b>
2.1. Reagencie .....	12
2.2. Aparatura.....	13
2.3. Použitá pracovní elektroda – meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda.....	14
2.4. Pracovní postupy.....	15
2.4.1. Předúprava m-AgSmAE.....	15
2.4.2. DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie .....	15
2.4.3. Voltametrické stanovení flutamidu v tableť léčiva APO-Flutamid.....	16
2.4.4. Spektrofotometrické stanovení flutamidu v tableť léčiva APO-Flutamid dle Českého lékopisu .....	17
2.4.5. Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat .....	17
2.5. Stálost zásobního roztoku flutamidu .....	19
<b>3. Voltametrické stanovení flutamidu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě</b> .....	<b>21</b>
3.1. DC voltametrie flutamidu .....	21
3.1.1. Vliv pH prostředí na DC voltametrii flutamidu.....	21
3.1.2. Koncentrační závislost .....	24
3.1.3. Opakovatelnost.....	27
3.2. Diferenční pulzní voltametrie flutamidu .....	28
3.2.1. Vliv pH prostředí na diferenční pulzní voltametrii flutamidu .....	28
3.2.2. Koncentrační závislost .....	31
3.2.3. Opakovatelnost.....	34
<b>4. Stanovení flutamidu v tableť léčiva APO-Flutamid</b> .....	<b>35</b>
4.1. Voltametrické stanovení flutamidu .....	35
4.2. Spektrofotometrické stanovení flutamidu dle Českého lékopisu .....	37
<b>5. Závěr</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Literatura</b> .....	<b>40</b>

## Seznam použitých zkratek

$A$	absorbance [absorbanční jednotka AU]
BR pufr	Brittonův-Robinsonův tlumivý roztok
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
C. A. S.	Chemical Abstract Service
CNS	centrální nervová soustava
DCV	DC voltametrie (direct current voltametry)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E_{fin}$	konečný (negativnější) potenciál regenerace m-AgSAE
$E_{in}$	počáteční (pozitivnější) potenciál regenerace m-AgSAE
$E_{neg}$	negativní okraj potenciálového okna, při kterém dosáhne proud hodnoty $1 \mu\text{A}$
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_{poz}$	pozitivní okraj potenciálového okna, při kterém dosáhne proud hodnoty $1 \mu\text{A}$
FLD	flutamid
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
$I_p$	proud píku [nA]
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
$L_Q$	mez stanovitelnosti
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
$m_{FLD, tab}$	hmotnost flutamidu v tabletě dle stanovení
$m_{FLD, vz}$	hmotnost flutamidu v navážce vzorku
$m_{tab}$	hmotnost tablety léčiva APO-Flutamid
$m_{uved}$	hmotnost flutamidu v tabletě léčiva APO-Flutamid uvedené výrobcem
$m_{vz}$	hmotnost navážky vzorku
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
$\text{pH}^f$	výsledné pH směsi vodná fáze – methanol (9:1)
$s$	směrodatná odchylka mediánu
$s_r$	relativní směrodatná odchylka mediánu
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\rho$	hustota [ $\text{g cm}^{-3}$ ]
$\tilde{x}$	medián

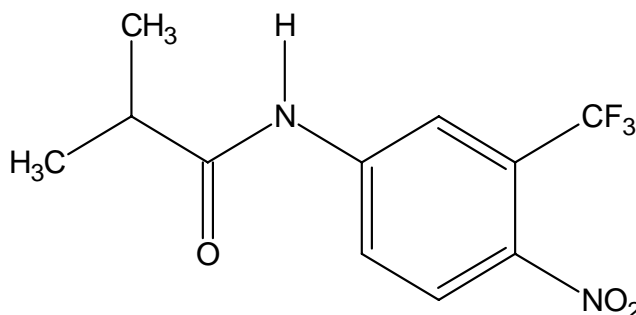
# 1. Úvod

## 1.1. Cíl práce

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování protinádorového léčiva flutamidu (FLD, 4-nitro-3-tifluoromethyl-isobutylanilid). Cílem práce je nalézt alternativní metody stanovení FLD k již používaným metodám elektrochemickým, optickým a separačním a definovat optimální podmínky pro voltametrické stanovení FLD na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Pro stanovení FLD byly použity moderní voltametrické techniky – DC voltametrie (DCV) na m-AgSAE a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na m-AgSAE.

## 1.2. Studovaná látka

Flutamid je nažloutlá, jemně krystalická látka bez zápachu. Strukturální vzorec je uveden na **obr. 1**. Snadno se rozpouští v methanolu či jiných polárních organických rozpouštědlech (např. aceton, ethanol)<sup>1</sup>. Ve vodě je rozpustný jen při velmi nízkých koncentracích, fyzikálně-chemické vlastnosti FLD jsou uvedeny v **tab. 1**.



**Obr. 1** Strukturální vzorec flutamidu.

**Tab. 1** Fyzikálně-chemické vlastnosti flutamidu (hodnoty v tabulce jsou uváděny za atmosferického tlaku a standardních laboratorních podmínek)<sup>2</sup>.

C. A. S. Name	Flutamid
C. A. S. Registry number	13311-84-7
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molekulová hmotnost	276,214 g mol <sup>-1</sup>
Rozpustnost ve vodě	7,2·10 <sup>-3</sup> g dm <sup>-3</sup>
Teplota tání	112°C
Teplota vznícení	195,9 ± 28,7°C

### 1.3. Biologické vlastnosti flutamidu

Flutamid je léčivo patřící do skupiny nesteroidních antiandrogenů. Jsou to látky, které blokují cestou kompetitivní inhibice vazbu testosteronu na androgenní receptor přímo v cílové tkáni, tj. v prostatě<sup>3</sup>.

Je obsažen jako účinná látka v léčivu APO-Flutamide (Chanelle Medical, Nizozemí), které se vyrábí ve formě potahovaných tablet. Léčivo bývá indikováno k paliativní léčbě při pokročilých stádiích karcinomu prostaty. Terapie může být dlouhodobá, v klinických studiích se přípravek podával déle než 4,5 roku<sup>3</sup>.

Analýza krevní plazmy, moči a stolice prokázala, že po perorální aplikaci je FLD rychle a kompletně absorbován. Je vylučován přes 72 hodin a to především močí, pouze 4,2 % je vyloučeno stolicí. Analýzou krevní plazmy se prokázalo, že FLD je rychle a **extenzivně** metabolizován. Hodinu po podání bylo v krevní plazmě identifikováno alespoň 6 jeho metabolitů. Plazmatický poločas metabolického rozkladu je přibližně 6 hodin<sup>3</sup>.

U samců potkanů byla **vrcholová** koncentrace ve tkáních dosažena 6 hodin po aplikaci FLD. Koncentrace byla nejvyšší v gastrointestinálním traktu, játrech a ledvinách. FLD ani jeho hlavní metabolity se nekumulovaly v pohlavních ani jiných orgánech<sup>3</sup>. Toxické účinky FLD jsou shrnuty v **tab. 2 a tab. 3**.



**Tab. 2** Chronická expozice flutamidu – karcinogen, mutagen, teratogen a riziko pro reprodukci<sup>4</sup>.

Laboratorní zvíře	Dávka / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Způsob podání	Doba expozice / den	Účinky
<b>Chronická expozice - karcinogen</b>				
krysa	-	orální	365	tumor varlat
<b>Chronická expozice - mutagen</b>				
krysa (játra)	50	orální	-	inhibice DNA
<b>Chronická expozice - teratogen</b>				
krysa	1050	orální	14 – 20	urogenitální systém
	525	subkutánní	14 – 20	urogenitální systém
	275	subkutánní	11 – 21	CNS
	400	subkutánní	16 – 19	endokrinní systém
myš	300	subkutánní	14 – 16	urogenitální systém
vepř	1225	orální	42 – 112	embryo, plod
<b>Chronická expozice - riziko pro reprodukci</b>				
krysa	150	orální	30	varlata, vývod spermatu, semenný váček, Cowperova žláza <sup>b</sup> , epididymitida <sup>c</sup>
	280	intrapritoneální	7	prostata, semenný váček, Cowperova žláza <sup>b</sup> přidatné žlázy
	70	subkutánní	7	spermatogeneze
	350	parenterální	7	varlata, vývod spermatu, semenný váček, Cowperova žláza <sup>b</sup> , epididymitida <sup>c</sup>
krysa – samice	65	intramuskulární	10 – 22 <sup>a</sup>	opožděné následky u novorozenců
	200	parenterální	16 – 17 <sup>a</sup>	endokrinní systém
myš	80	subkutánní	10	ovlivnění spermatogeneze

<sup>a</sup> – expozice v uvedených dnech gravidity

<sup>b</sup> – žláza produkující těsně před ejakulací zásaditý sekret, který neutralizuje zbytky moči v močové trubici, čímž prodlužuje životnost spermií<sup>5</sup>

<sup>c</sup> – zánět nadvarlat<sup>6</sup>

**Tab. 3** Akutní toxicita flutamidu<sup>4</sup>.

Laboratorní zvíře	LD50 <sup>a</sup> /mg kg <sup>-1</sup>	Způsob podání	Účinky
krysa	787	orální	snížení tělesné teploty, hematurie <sup>b</sup>
	298	intrapritoneální	snížení tělesné teploty, změna doby spánku, cyanóza <sup>c</sup>
pes	> 2000	orální	nevolnost nebo zvracení

<sup>a</sup> – poloviční smrtelná dávka (dosis letalis), dávka při níž zahyne 50 % jedinců ze studovaného souboru<sup>7</sup>

<sup>b</sup> – příměs krve v moči<sup>5</sup>

<sup>c</sup> – modré zbarvení sliznice a kůže, příčinou je zvýšený obsah redukovaného hemoglobinu<sup>8</sup>

#### 1.4. Analytické metody stanovení flutamidu

Ke stanovení FLD již bylo použito různých metod. Asi k nejvíce zkoumaným metodám patří metody elektrochemické.

Koncem 80. let minulého století provedl Snycerski polarografické stanovení FLD na klasické kapající rtuťové elektrodě. Redukce FLD byly studovány metodami DC polarografie, AC polarografie, normální pulsní polarografie a diferenční pulsní polarografie v prostředí fosfátového pufru obsahujícího 5 % ethanolu (95%). Polarografické redukce byly označeny jako základní metoda pro stanovení FLD jako čisté složky v tabletě<sup>9</sup>.

V roce 1998 byl FLD a jeho metabolity stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci 0,05 mol dm<sup>-3</sup> a pH 3, k detekci byl použit UV detektor. V posledních několika letech se výzkum stanovení FLD vrací opět k voltametrickým metodám, tentokrát v prostředí 0,04 mol dm<sup>-3</sup> BR pufru, za použití rtuťové kapkové elektrody. Poslední zkoumanou metodou stanovení FLD bylo spektrofotometrické stanovení na UV-Vis spektrofotometru, kdy se roztok FLD umisťoval do 1 cm dlouhých křemenných kyvet. Při aplikaci těchto studovaných metod na stanovení FLD v tabletě léčiva bylo nejpřesnějších výsledků dosaženo při použití HPLC s UV detektorem<sup>10</sup>. **chybí citace – proč?**

V roce 2004 bylo v literatuře popsáno použití dalších voltametrických metod ke stanovení FLD za použití visící rtuťové kapkové elektrody v prostředí acetátového pufru o pH 5. Bylo využito následujících voltametrických metod: adsorpční katodická rozpouštěcí voltametrie, diferenční pulsní voltametrie a SW voltametrie<sup>11</sup>.

Současně s touto prací probíhalo měření pro stanovení FLD na rtuťové kapkové elektrodě v prostředí hydroxidu sodného o pH 12, výsledky tohoto měření jsou v bakalářské práci Markéty Průchové<sup>12</sup>.

#### **1.4.1. Analytické metody stanovení flutamidu dle Českého lékopisu**

V Českém lékopise jsou popsány metody na identifikace, stanovení čistoty a obsahu v tabletě léčiva APO-Flutamid<sup>1</sup>.

Zkoušky na stanovení totožnosti jsou prováděny pomocí absorpční spektrofotometrie v infračervené oblasti od  $650\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Při testování čistoty látek se provádí zkoušky na příbuzné látky, které se stanovují pomocí HPLC se spektrofotometrickým detektorem. Mezi nečistoty, které by mohl obsahovat znečištěný vzorek, patří např. *N*-[4-nitro-3-(trifluormethyl)fenyl]propanamid, 4-nitro-3-(trifluormethyl)anilin, *N*-[4-nitro-3-(trifluormethyl)fenyl]acetamid, 3-(trifluormethyl)-anilin. Dále se provádí zkouška na těžké kovy, na ztrátu sušením a zkouška na síranový popel.

## 2. Experimentální část

### 2.1. Reagencie

Studovaná látka: flutamid (čistota není uvedena, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztok FLD byl připraven o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  rozpuštěním 0,02762 g FLD ve 100 ml methanolu (99,8%, Lachema, Praha, ČR). Roztoky FLD o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě a v lednici ve skleněných nádobách.

Analyzované léčivo: APO-Flutamid (Chanelle Medical, Nizozemí) s deklarovaným obsahem 250 mg FLD v 1 tabletě.

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

Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky (BR pufry) o příslušném pH byly připraveny smísením  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  hydroxidu sodného s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou kyselinu, každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  **tab. 4**

**Tab. 4** Složení Brittonova-Robinsonova tlumivého roztoku.

Složka A (na 1 litr roztoku)	Složka B (na 2 litry roztoku)
8 g NaOH	5,488 g $\text{H}_3\text{BO}_3$ 5,39 ml $\text{H}_3\text{PO}_4$ 85%, $\rho = 1,71 \text{ g cm}^{-3}$ 4,54 ml $\text{CH}_3\text{COOH}$ 99,8%, $\rho = 1,05 \text{ g cm}^{-3}$

## 2.2. Aparatura

Při všech voltametrických stanoveních byla použita osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 2.0 (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows 3.11.

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení, kdy byla použita jako referentní elektroda argentchloridová elektroda ( $1\text{ mol dm}^{-3}$  KCl) typu RAE 113 (Monokrystaly Turnov, ČR), jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda a jako pracovní elektroda byla použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda (výrobní číslo 20611, průměr menisku 0,52 mm, EcoTrend Plus, Praha, ČR).

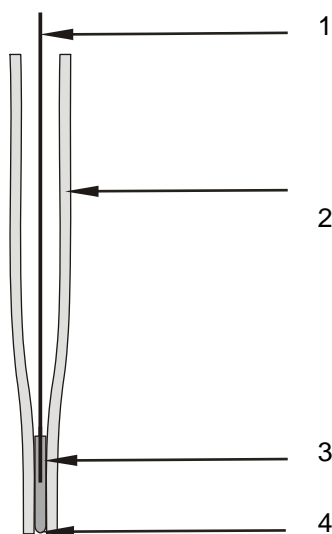
Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer (Hewlett-Packard, Nizozemí) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

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

### 2.3. Použitá pracovní elektroda – meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda

Pevné amalgámové elektrody jsou tvořeny kovy nebo jejich slitinami (např. Ag, Cu, Au, Ir, BiAg aj.), které se mohou smáčet rtutí a tvořit s ní pevné amalgámy. Tento typ elektrod vykazuje vysoké přepětí vodíku a umožňuje pohodlnou práci jako s pevnými elektrodami. Regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Mezi další výhody takových elektrod patří např. široký rozsah pracovních potenciálů, nižší zbytkový proud a šum, použitelnost v širším spektru rozpouštědel a základních elektrolytů, prakticky neomezená životnost elektrod a fakt, že elektrody vyrobené z pevných amalgámů jsou netoxické.<sup>13</sup>

Pro studium voltametričkého chování flutamidu byla použita komerčně dodávaná m-AgSAE č. 20611 o průměru menisku 0,52 mm (EcoTrend Plus, Praha, ČR), schéma m-AgSAE je vyobrazeno na **obr. 2**.



**Obr. 2** Schématický náčrt m-AgSAE (1 – kontakt, 2 – skleněná kapilára, 3 – stříbrný amalgám, 4 – rtuťový meniskus)

## 2.4. Pracovní postupy

### 2.4.1. Předúprava m-AgSAE

Při delším přerušení práce se prováděla amalgamace. Ponořením elektrody do kapalné rtuti asi na 10 až 15 sekund byl vytvořen nový elektrodový meniskus. Amalgamace byla prováděna pravidelně každý týden, dále pak v případě odkápnutí menisku a v případě, že měření vykazovalo chybné výsledky.

Na začátku každého bloku měření byla prováděna elektrochemická aktivace. Elektroda byla aktivována v roztoku KCl o koncentraci  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , vložení potenciálu  $-2200 \text{ mV}$  za současného míchání po dobu 5 min. Aktivace byla prováděna vždy po amalgamací, při delším přerušení práce a před měřením v roztoku o rozdílném pH.

### 2.4.2. DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie

Při voltametričtém měření bylo postupováno, pokud není uvedeno jinak, následujícím způsobem: při studování vlivu pH na voltametričtější chování flutamidu (viz kapitoly 3.1.1 a 3.2.1) byl do odměrné baňky o objemu 10 ml odpipetován 1 ml zásobního roztoku flutamidu v methanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  a doplněn po rysku BR pufrém o příslušném pH. Při dalším studiu byla odměrná baňka doplňována vždy roztokem BR pufru o pH 7. Takto připravené roztoky byly po promíchání převedeny do polarografické nádoby. Probubláváním dusíkem po dobu 5 minut byl roztok zbaven přítomného kyslíku. Poté byl proveden záznam voltametričtější křivky. Stejným způsobem byly naměřeny křivky pro kalibrační závislost FLD a měření opakovatelnosti. Velikost potenciálového okna a regenerační potenciály jsou uvedeny v **tab. 5.** V textu není zmíněná regenerace, tabulka až do výsledků?

**Tab. 5** Velikosti potenciálového okna a regeneračních potenciálů m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o různém pH při DPV.

pH	pH <sup>f</sup>	$E_{in}$ / mV	$E_{fin}$ / mV	$E_{poz}$ / mV	$E_{neg}$ / mV
2,0	2,1	200	-1100	200	-1100
3,0	3,2	150	-1150	230	-1200
4,0	4,2	150	-1200	230	-1280
5,0	5,1	100	-1250	250	-1320
6,0	6,2	100	-1250	250	-1400
7,0	7,2	150	-1300	215	-1520
8,0	8,3	100	-1300	200	-1580
9,0	9,3	50	-1400	160	-1600
10,0	10,1	50	-1500	100	-1680
11,0	11,1	-100	-1550	50	-1770
12,0	12,0	-150	-1600	-100	-1860

#### 2.4.3. Voltametrické stanovení flutamidu v tabletě léčiva APO-Flutamid

Roztok k analýze byl připraven přesným navážením asi 25 mg rozdrčené tablety léčiva APO-Flutamid. Navážka byla rozpuštěna ve 25 ml methanolu. Další ředění bylo provedeno odebráním 4 ml tohoto roztoku a zředěním na 100 ml methanolem. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml a zředěn do 10ml baňky BR pufr o pH 7. S takto připraveným roztokem byla provedena následná analýza.



#### 2.4.4. Spektrofotometrické stanovení flutamidu v tabletě léčiva APO-Flutamid dle Českého lékopisu

Stanovení obsahu se provádí spektrofotometrickým měřením absorbance v absorpčním maximu při  $\lambda = 295$  nm. Bylo provedeno ověření tohoto stanovení obsahu.

Při stanovení bylo postupováno následujícím způsobem: roztok k analýze byl připraven rozpuštěním 25 mg rozdrčené tablety léčiva APO-Flutamid ve 25 ml methanolu. Bylo provedeno další ředění odebráním 2 ml a doplněním do 100 ml methanolem. Takto připravený roztok byl použitý k měření absorbance. Hmotnost jedné tablety a hodnoty obsahu FLD, které udává výrobce, jsou uvedeny v **tab. 6**. Výsledky tohoto měření jsou shrnuty v **tab. 16** a **tab. 17**.

**Tab. 6** Hmotnost tablety a obsah flutamidu v jedné tabletě dle výrobce.

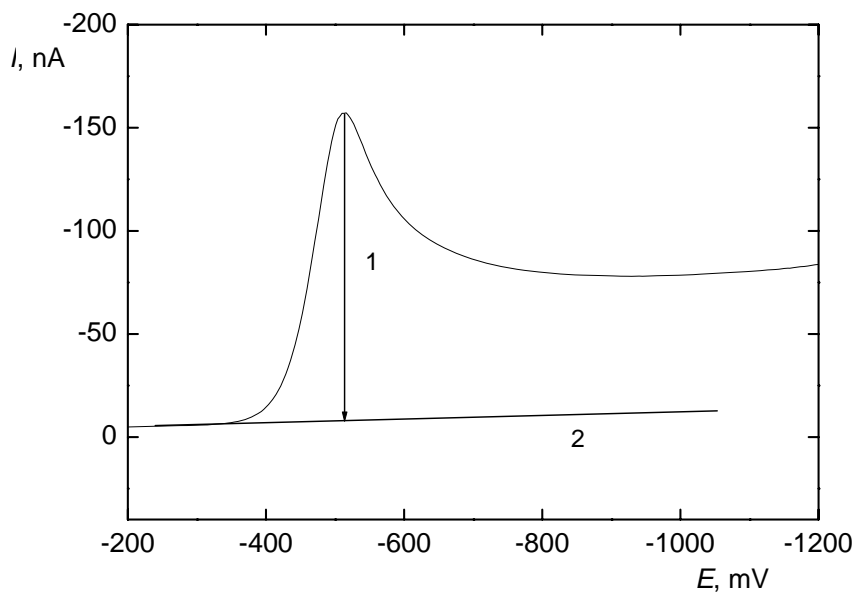
Hmotnost tablety / g	0,6784 ± 0,0049 (0,62%)
Obsah FLD v tabletě / mg	250 ± 12,5
Obsah FLD v tabletě / %	36,85

#### 2.4.5. Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

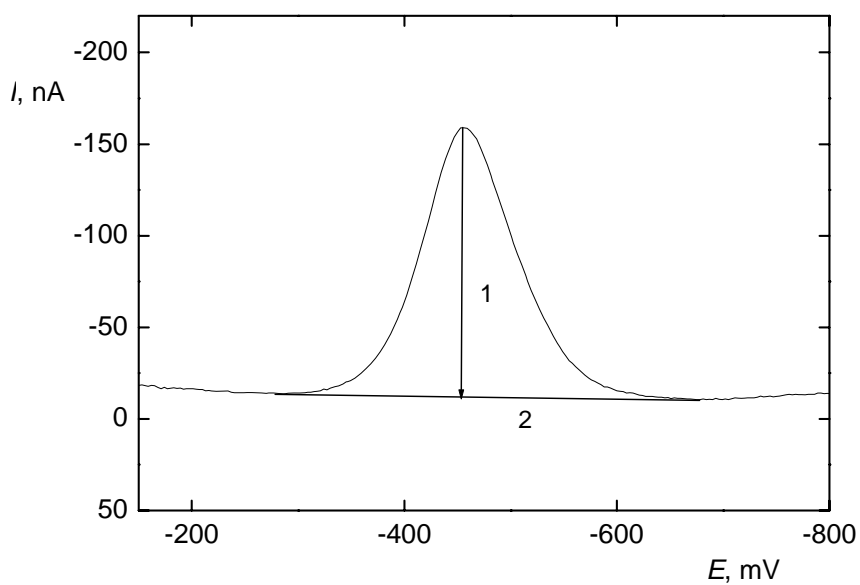
K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programui Origin Pro 6.1 (OriginLab Corporation, USA). Způsob vyhodnocení DCV a DPV voltamogramů je ukázán na **obr. 3** a **obr. 4**.

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrických měření na m-AgSAE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat<sup>14</sup>. Konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05)<sup>15</sup> u kalibračních přímek byly vyhodnoceny a sestrojeny pomocí programu Origin Pro 6.1 (OriginLab Corporation, USA).

Mez stanovitelnosti ( $L_D$ ) byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky<sup>14</sup>.



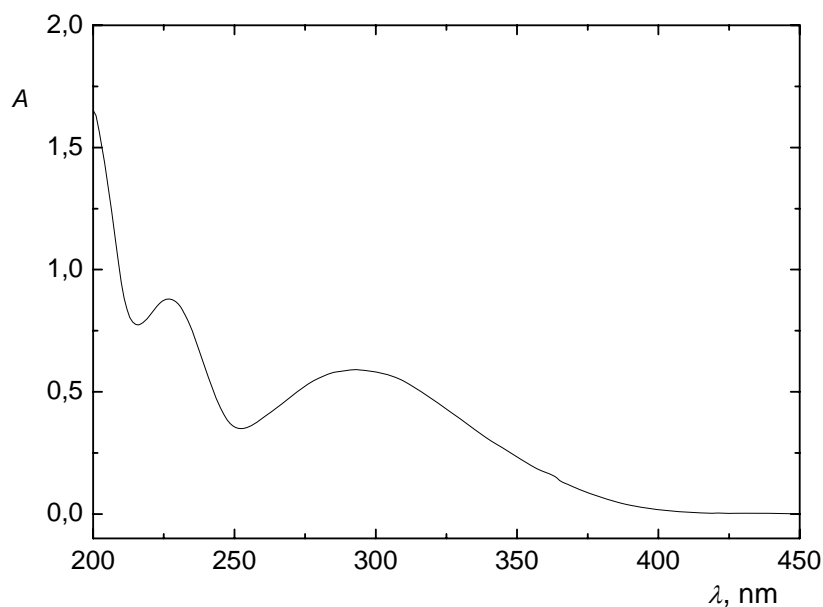
**Obr. 3** Způsob vyhodnocování DCV voltamogramů při měření opakovatelnosti v roztoku FLD o koncentraci ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 7. 1 – hodnota  $I_p$ , 2 – základní linie.



**Obr. 4** Způsob vyhodnocování DPV voltamogramů při měření opakovatelnosti v roztoku FLD o koncentraci ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí BR pufr a methanol (9:1) o pH 7. 1 – hodnota  $I_p$ , 2 – základní linie.

## 2.5. Stálost zásobního roztoku flutamidu

Stálost zásobního roztoku FLD o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  v methanolu byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm. Referenční kyveta byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce absorpčních lokálních extrémů studované látky  $\lambda = 227 \text{ nm}$  a  $\lambda = 294 \text{ nm}$ . Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na **obr. 5**. Výsledky naměřené stálosti zásobního roztoku jsou zaznamenány v **tab. 7**. Z výsledků vyplývá, že během 45 dnů nedošlo k výraznému poklesu koncentrace studované látky. Zásobní roztok, který je uchováván ve tmě a v lednici, můžeme tedy považovat za dostatečně stálý.



**Obr. 5** Absorpční spektrum roztoku flutamidu ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v methanolu, měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

**Tab. 7** Naměřené hodnoty absorbance zásobního roztoku flutamidu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  v methanolu při vlnových délkách  $\lambda = 227$  a  $294 \text{ nm}$ . Číselné hodnoty odpovídají relativní hodnotě koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku, měřeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce  $1 \text{ mm}$ .

Stálost pro vlnovou délku $\lambda = 227 \text{ nm}$						
dny	0	2	4	8	18	45
Absorbance	1,162	1,162	1,127	1,123	1,168	1,145
%	100,0	100,0	97,0	96,6	100,5	98,6
Stálost pro vlnovou délku $\lambda = 294 \text{ nm}$						
dny	0	2	4	8	18	45
Absorbance	0,811	0,806	0,784	0,776	0,803	0,794
%	100,0	99,3	96,6	95,7	99,0	97,8

### 3. Voltametrické stanovení flutamidu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě

#### 3.1. DC voltametrie flutamidu

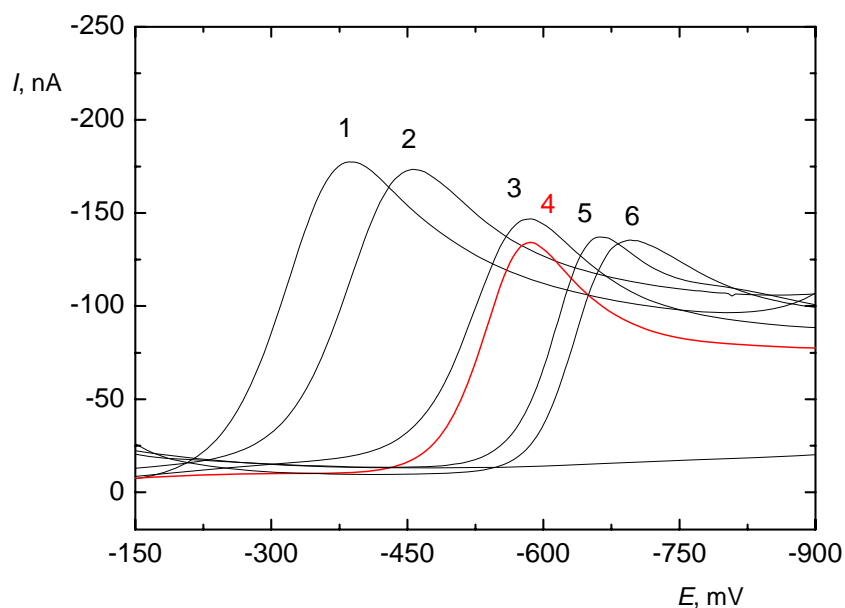
Při DCV je potenciál vkládaný na pracovní elektrodu lineárně měněn s časem (roste nebo klesá). Proudová odezva neboli závislost měřeného proudu procházejícího pracovní elektrodou na vkládaném potenciálu se na polarizační křivce projeví jako voltametrická vlna či pík. Poloha vlny/píku odpovídá kvalitě látky a výška vlny/píku je přímo úměrná koncentraci studované látky<sup>13</sup>.

##### 3.1.1. Vliv pH prostředí na DC voltametrii flutamidu

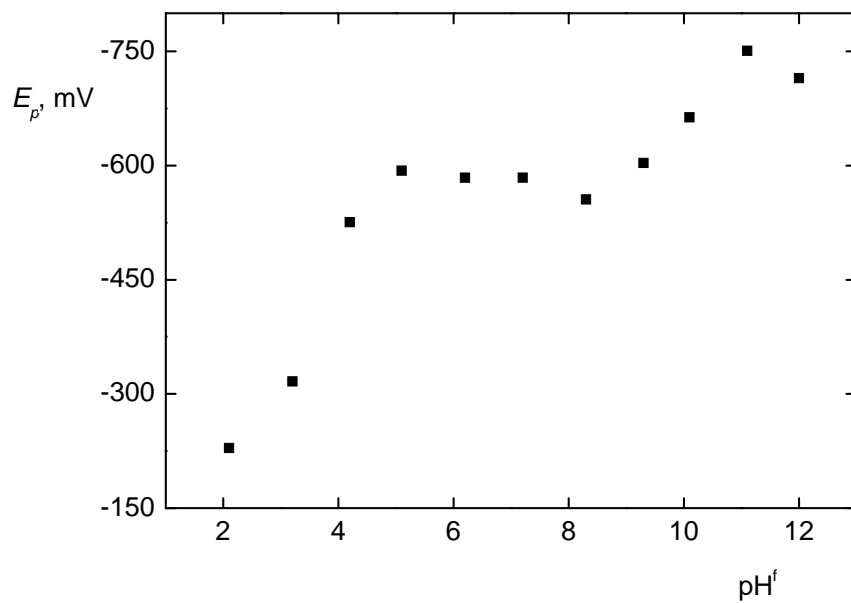
Vliv pH na chování FLD v měřeném roztoku metodou DCV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru - methanolu (9:1). BR pufrы byly připraveny o příslušném pH v rozmezí 2 – 12. Koncentrace FLD byla  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Vybrané zaznamenané křivky jsou ukázány na **obr. 6**. Na naměřených voltamogramech lze pozorovat jeden dobře vyvinutý pík v celém rozsahu měřených pH. Potenciál všech píků  $E_p$  se s rostoucím  $\text{pH}^f$  posouvá k zápornějším hodnotám. Zjištěné hodnoty  $E_p$  a  $I_p$  v závislosti na  $\text{pH}^f$  jsou zaznamenány v **tab. 8**. Graficky je závislost  $E_p$  na  $\text{pH}^f$  znázorněna na **obr. 7**. Proč bylo vybráno zrovna pH 7?

**Tab. 8** Zjištěné závislosti hodnot  $E_p$  a  $I_p$  na  $\text{pH}^f$  měřené technikou DCV na m-AgSAE v roztoku FLD o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  v prostředí BR pufru - methanolu (9:1).

pH	$\text{pH}^f$	$E_p / \text{mV}$	$I_p / \mu\text{A}$
2,0	2,1	-384,3	-165,7
3,0	3,2	-455,3	-153,1
4,0	4,2	-525,8	-108,4
5,0	5,1	-593,3	-106,4
6,0	6,2	-584,0	-121,3
7,0	7,2	-584,0	-120,1
8,0	8,3	-555,3	-148,3
9,0	9,3	-603,3	-129,6
10,0	10,1	-663,3	-116,9
11,0	11,1	-751,0	-120,0
12,0	12,0	-715,0	-105,5



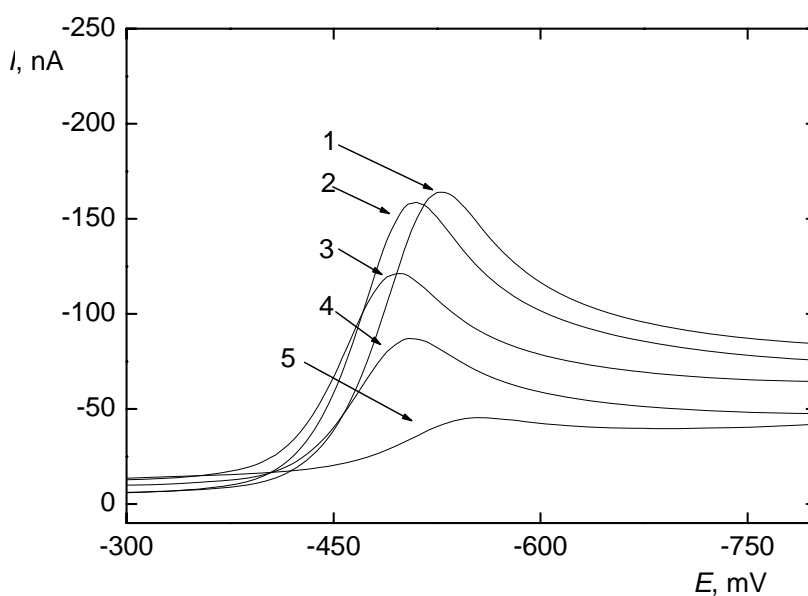
**Obr. 6** Voltamogramy FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru - methanolu (9:1) o  $\text{pH}^f$  2,1 (1), 3,2 (2), 6,2 (3), 7,2 (4), 10,1 (5), 12 (6).



**Obr. 7** Závislost potenciálu  $E_p$  FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^f$  měřená metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr - methanol (9:1)

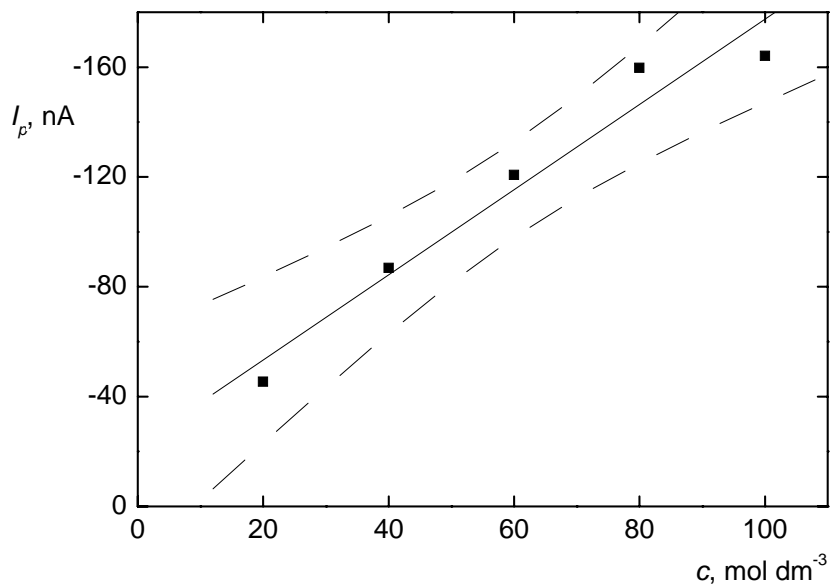
### 3.1.2. Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o pH<sup>f</sup> 7,2. Na **obr. 7** a **obr. 9** jsou zobrazeny voltamogramy proměřené metodou DCV na m-AgSAE. Na **obr. 8** a **obr. 10** je znázorněna závislost  $I_p$  na koncentraci FLD.

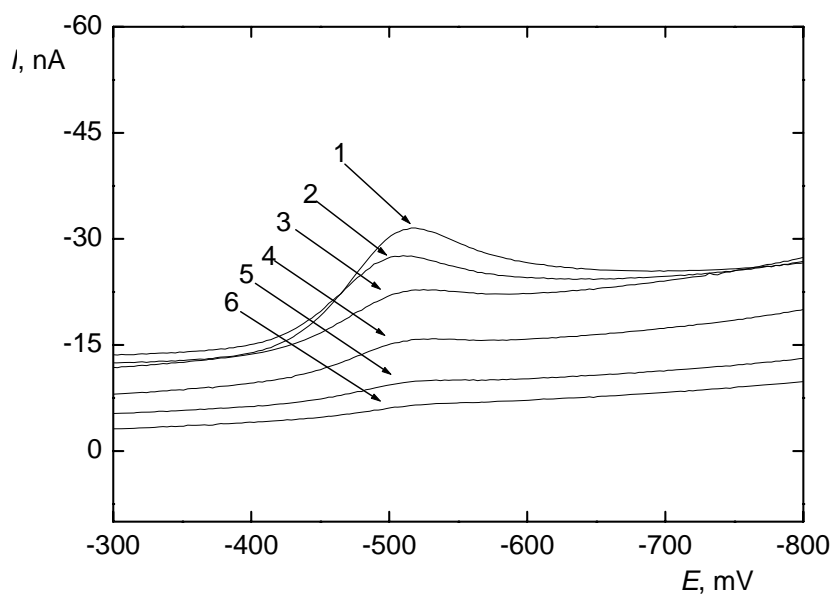


**Obr. 7** Voltamogramy roztoků FLD měřené metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o pH<sup>f</sup> 7,2 o koncentracích  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> (1),  $8 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (2),  $6 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (4),  $2 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (5)

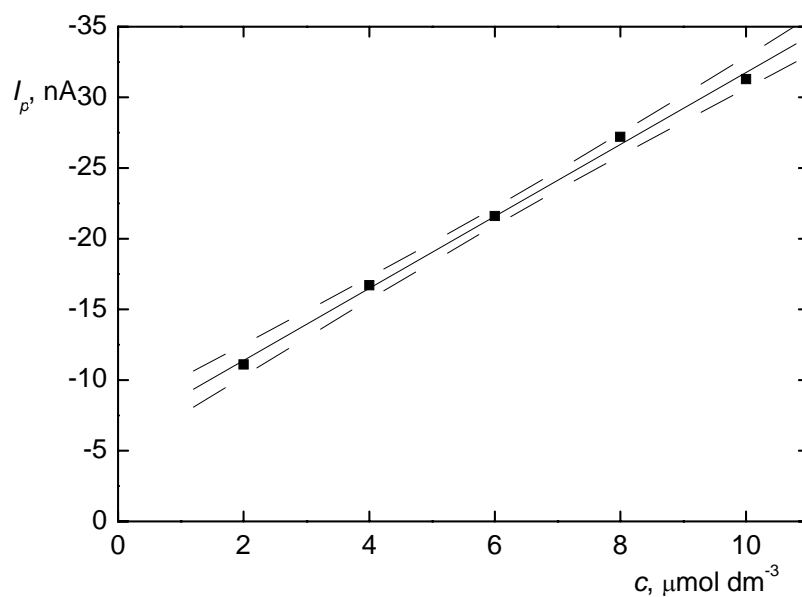




**Obr. 8** Závislost proudu  $I_p$  na koncentraci FLD v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> až  $2 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> měřená technikou DCV v prostředí methanol - BR pufr (1:9) pH<sup>f</sup> 7,2.



**Obr. 9** Voltamogramy roztoků FLD měřené metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o pH<sup>f</sup> 7,2 o koncentracích  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (1),  $8 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (3),  $4 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (4),  $2 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (5),  $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (6).



**Obr. 10** Závislost proudu  $I_p$  na koncentraci FLD v rozmezí  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  až  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  měřená technikou DCV v prostředí methanol - BR pufr (1:9)  $\text{pH}^f$  7,2.

**Tab. 9** Parametry kalibračních přímek pro stanovení FLD metodou DCV v prostředí methanol - BR pufr (1:9) o  $\text{pH}^f$  7,2.

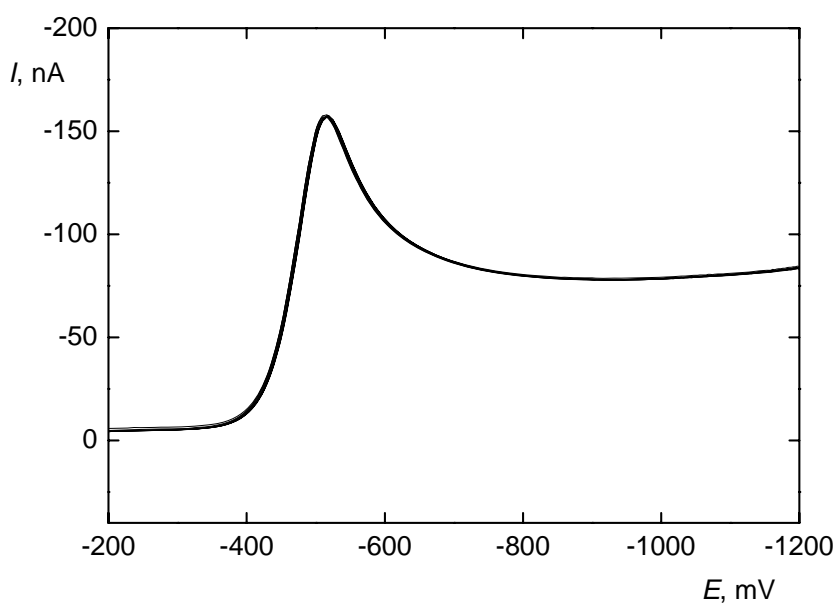
$c / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Směrnice / $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	Úsek / nA	Korelační koeficient	$L_Q /$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-1,55	-22,29	-0,977	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-2,55	-6,31	-0,999	$4,72 \cdot 10^{-6}$

### 3.1.3. Opakovatelnost

Pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci byla měřena opakovatelnost z deseti po sobě jdoucích měření. Výsledky jsou shrnuty v **tab. 10** a na **obr. 11** je voltamogram deseti měření při nejvyšší měřené koncentraci FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

**Tab. 10** Statistické vyhodnocení opakovatelnosti pro deset měření metodou DCV na m-AgSAE v roztoku FLD o nejvyšší a nejnižší koncentraci v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o  $\text{pH}^f$  7,2.

$c / \text{mol dm}^{-3}$	$\tilde{x} / \text{nA}$	$L_{1,2} / \mu\text{A}$	$s / \mu\text{A}$	$s_r / \%$
$1 \cdot 10^{-4}$	-149,7	27,6	39	0,26
$2 \cdot 10^{-6}$	-10,83	1,11	0,75	6,91



**Obr. 11** Voltamogram FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) při měření opakovatelnosti metodou DCV na m-AgSAE – záznam deseti měření. **A proč tu není  $2 \cdot 10^{-6}$**

## 3.2. Diferenční pulsní voltametrie flutamidu

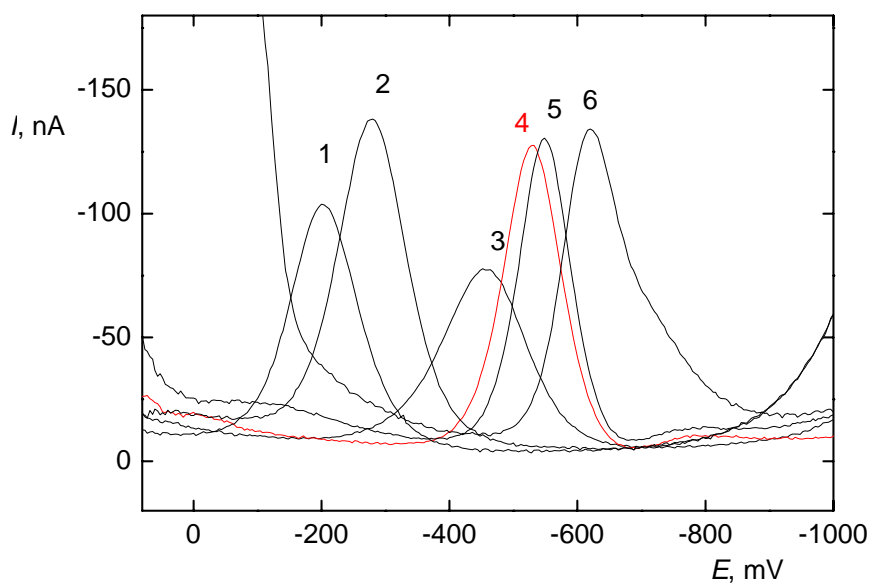
Při DPV se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládá napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek milisekund. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem a má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu, jeho výška závisí na koncentraci.<sup>13</sup>

### 3.2.1. Vliv pH prostředí na diferenční pulsní voltametrii flutamidu

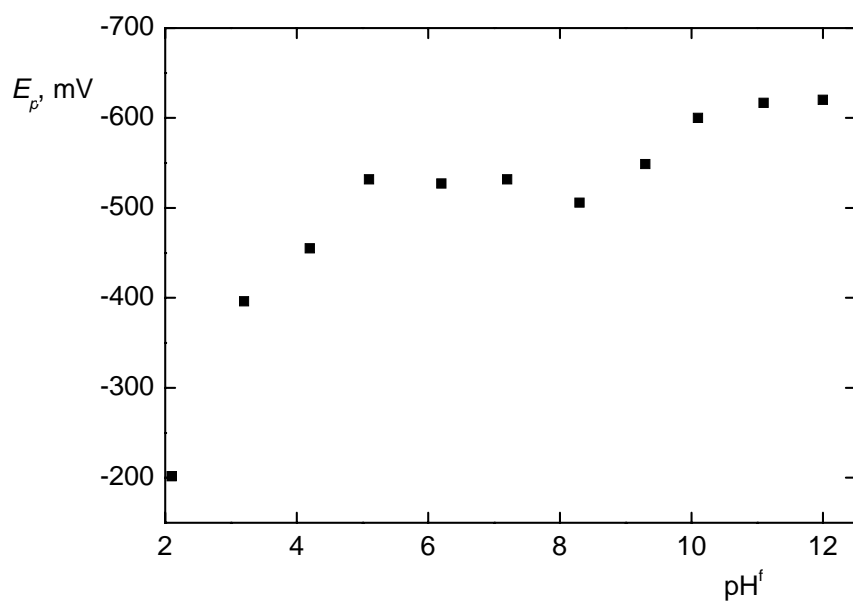
Vliv pH na chování FLD v měřeném roztoku metodou DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufr - methanol (9:1). BR pufrы byly připraveny o příslušném pH v rozmezí 2 – 12. Koncentrace FLD byla  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Vybrané zaznamenané křivky jsou ukázány na **obr. 12**. Z naměřených voltamogramů lze pozorovat jeden dobře vyvinutý pík v celém rozsahu měřených pH. Potenciál všech píků  $E_p$  se s rostoucím pH<sup>f</sup> posouvá k zápornějším hodnotám. Zjištěné hodnoty  $E_p$  a  $I_p$  v závislosti na pH<sup>f</sup> jsou zaznamenány v **tab. 11**. Grafická závislost  $E_p$  na pH<sup>f</sup> je znázorněna na **obr. 13**.

**Tab. 11** Zjištěné závislosti hodnot  $E_p$  a  $I_p$  na  $\text{pH}^f$  měřené DPV na m-AgSAE v roztoku FLD o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  v prostředí BR pufr - methanol (9:1).

pH	$\text{pH}^f$	$E_p / \text{mV}$	$I_p / \mu\text{A}$
2,0	2,1	-201,8	97,5
3,0	3,2	-396,3	-101,3
4,0	4,2	-455,3	-70,6
5,0	5,1	-531,6	-80,8
6,0	6,2	-527,0	-108,9
7,0	7,2	-531,8	-121,1
8,0	8,3	-505,7	-131,7
9,0	9,3	-548,7	-121,5
10,0	10,1	-600,0	-137,0
11,0	11,1	-617,0	-136,9
12,0	12,0	-620,0	103,8



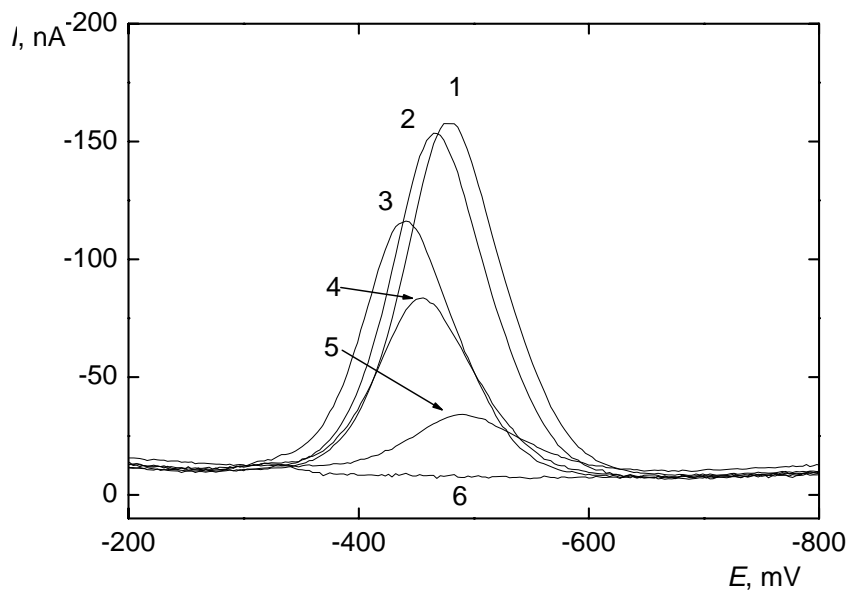
**Obr. 12** Voltamogramy FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o  $\text{pH}^f$  2,1 (1), 3,2 (2), 4,2 (3), 7,2 (4), 9,3 (5), 12 (6).



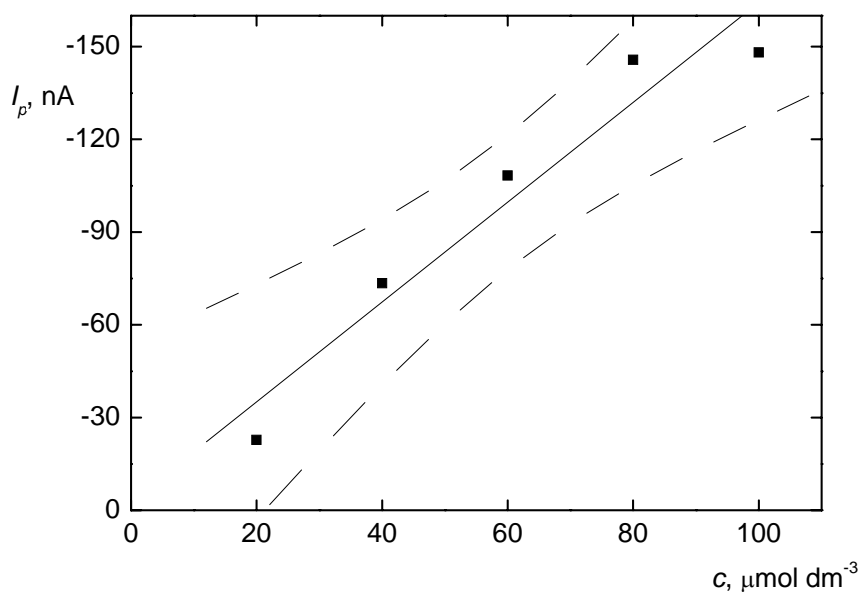
**Obr. 13** Závislost potenciálu  $E_p$  FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^f$  měřená metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr - methanol (9:1)

### 3.2.2. Koncentrační závislost

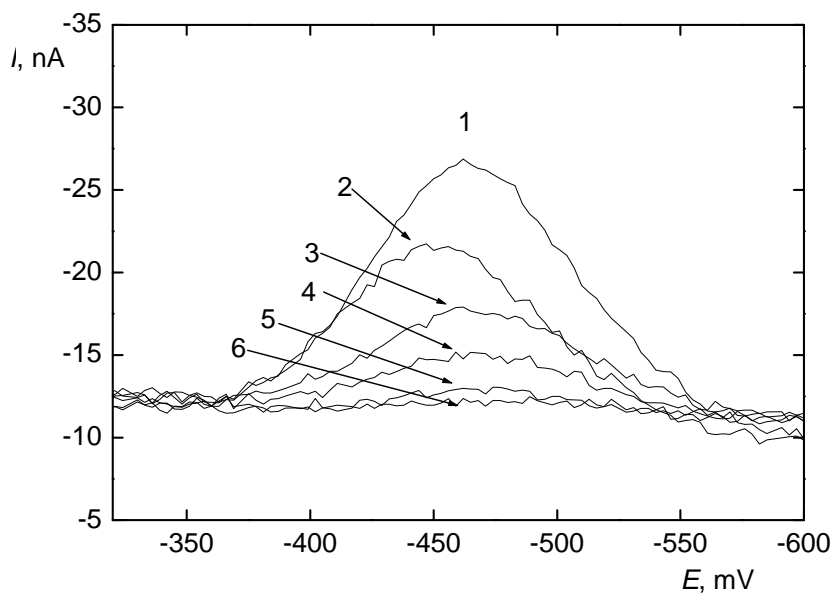
Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o  $\text{pH}^f$  7,2. Na **obr. 14** a **obr. 16** jsou zobrazeny voltamogramy proměřené metodou DPV na m-AgSAE. Závislost  $I_p$  na koncentraci FLD je znázorněna na **obr. 15** a **obr. 17**.



**Obr. 14** Voltamogramy roztoků FLD měřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o  $\text{pH}^f$  7,2 o koncentracích  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (1),  $8 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (2),  $6 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (3),  $4 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (4),  $2 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (5) a základního elektrolytu (6).

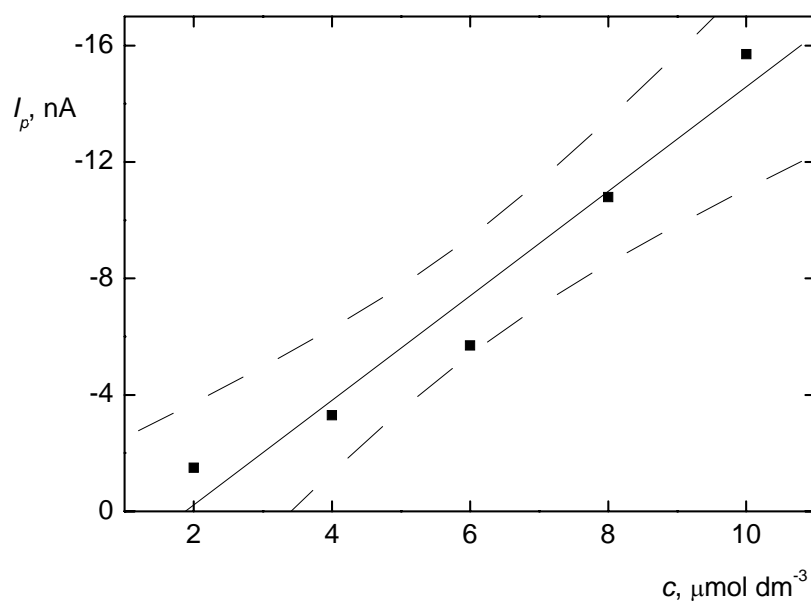


**Obr. 15** Závislost proudu  $I_p$  na koncentraci FLD v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  až  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  měřená technikou DPV v prostředí methanol - BR pufr (1:9)  $\text{pH}^f$  7,2.



**Obr. 16** Voltamogramy roztoků FLD měřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr - methanol (9:1) o  $\text{pH}^f$  7,2 o koncentracích  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (1),  $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (3),  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (4),  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (5),  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (6).





**Obr. 17** Závislost proudu  $I_p$  na koncentraci FLD v rozmezí  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  až  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  měřená technikou DPV v prostředí methanol – BR pufr (1:9)  $\text{pH}^f 7,2$ .

**Tab. 12** Parametry kalibračních přímek pro stanovení FLD metodou DPV v prostředí methanol - BR pufr (1:9) o  $\text{pH}^f 7,2$ .

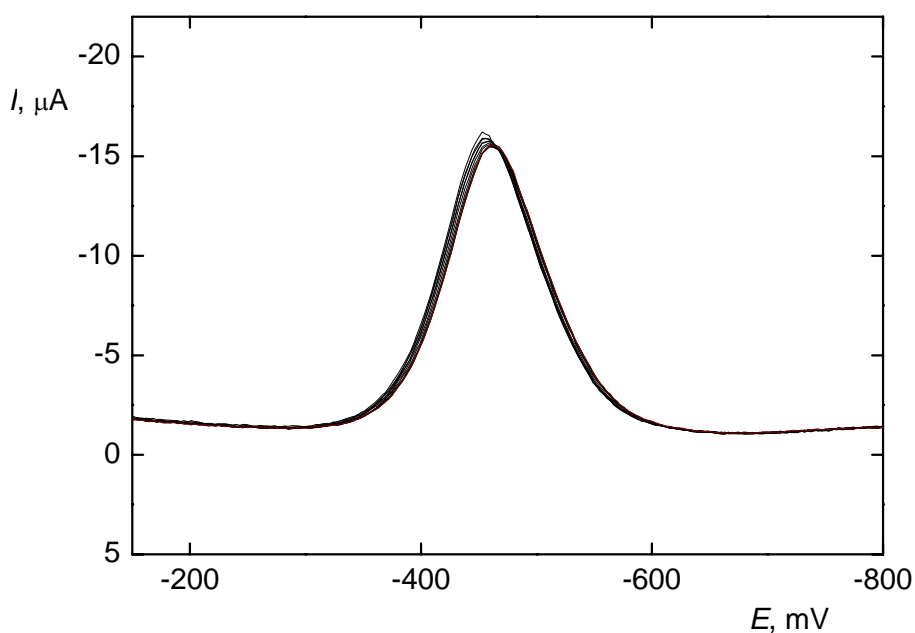
$c / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Směrnice / $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	Úsek / nA	Korelační koeficient	$L_Q /$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-1,61	-2,79	-0,968	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-1,80	3,37	-0,977	$2,98 \cdot 10^{-6}$

### 3.2.3. Opakovatelnost

Stejně jako u DPV byla pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci měřena opakovatelnost z deseti po sobě jdoucích měření. Výsledky jsou shrnuty v **tab. 13** a na **obr. 18** je voltamogram deseti měření při nejvyšší měřené koncentraci FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

**Tab. 13** Statistické vyhodnocení opakovatelnosti pro deset měření metodou DPV na m-AgSAE v roztoku FLD o nejvyšší a nejnižší koncentraci v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o  $\text{pH}^f$  7,2.

$c / \text{mol dm}^{-3}$	$\tilde{x} / \text{nA}$	$L_{1,2} / \mu\text{A}$	$s / \mu\text{A}$	$s_r / \%$
$1 \cdot 10^{-4}$	-144,0	96,6	136,5	0,95
$2 \cdot 10^{-6}$	-1,45	0,079	0,053	3,66



**Obr. 18** Voltamogram FLD ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) při měření opakovatelnost metodou DPV na m-AgSAE – záznam deseti měření.

## 4. Stanovení flutamidu v tabletě léčiva APO-Flutamid

### 4.1. Voltametrické stanovení flutamidu

Cílem této práce tedy bylo, vyvinout alternativní metodu stanovení FLD k již používaným metodám. A současně optimalizovat podmínky pro toto stanovení na m-AgSAE tak, aby bylo dosaženo co nejnižší meze stanovitelnosti.

Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení FLD v léčivu APO-Flutamid. Ke stanovení byla použita jedna tableta tohoto léčiva s obsahem 250 mg FLD. Tableta k analýze byla zpracována podle postupu v kapitole 2.4.3. Dále byl k analýze použit přírůstek standardního roztoku FLD o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Analyzovaný roztok připravený z navážky  $m_{vz}$ , odvážené z rozdrcené tablety léčiva APO-Flutamid, byl měřen metodou DCV a DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7.

Hmotnost jedné tablety léčiva APO-Flutamid  $m_{tab}$ . Hmotnost jedné tablety byla stanovena dvěma způsoby se shodným výsledkem. Bylo zváženo deset tablet po sobě a vypočítán průměr z naměřených hodnot. Poté bylo zváženo deset tablet dohromady a ze získaných hodnot byla vypočtena hmotnost jedné tablety.

Měření bylo prováděno za stejných podmínek po přidavku 1 ml standardního roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Naměřené hodnoty a výsledky měření pro obě použité metody jsou shrnuty v **tab. 14**, **tab.15** a **tab. 16**.

**Tab. 14** Naměřené hodnoty  $I_p$  v roztoku bez přídavku a s přídavkem 1 ml standardního roztoku FLD o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Metoda	$I_p$ bez přídavku	$I_p$ s přídavkem
DCV	-599,8	-1190,0
	-732,0	-1533,8
	-862,0	-1761,5
	-844,2	-2010,3
DPV	-526,1	-1409,8
	-545,8	-1466,0
	-684,9	-1674,3

**Tab. 15** Vypočtené hodnoty obsahu FLD v jedné tabletě léčiva APO-Flutamid ( $m_{tab}$  - hmotnost jedné tablety,  $m_{vz}$  - navážka z rozdrčené tablety,  $\%_{FLD, vz}$  - obsah FLD v navážce,  $m_{FLD, tab}$  - hmotnost FLD v tabletě dle stanovení).

Metoda	Vz.	$m_{tab} / \text{g}$	$m_{vz} / \text{g}$	$m_{FLD, vz} / \text{g}$	$\%_{FLD, vz} / \text{g}$	$m_{FLD, tab} / \text{mg}$
DCV	1		0,02569	0,0146	56,8	385
	2		0,02528	0,0132	52,3	355
	3		0,02531	0,0138	54,7	371
	4	0,6784	0,02546	0,0107	41,9	284
DPV	1		0,02528	0,0089	35,2	239
	2		0,02531	0,0088	34,8	236
	3		0,02546	0,0101	39,8	270

**Tab. 16** Statistické zpracování výsledků stanovení léčiva APO-Fludamid vyvinutou metodou.

Metoda	$\tilde{x}$ / mg	$L_{1,2}$ / mg	$s$ / mg	$s_r$ / %	chyba / %
DCV	363 ma byt 250	72,72	49,09	13,52	45,2
DPV	239	44,2	20,1	8,4	4,4

## 4.2. Spektrofotometrické stanovení flutamidu dle Českého lékopisu

**Tab. 17** Naměřené a vypočtené hodnoty stanovení obsahu flutamidu podle Českého lékopisu (stanovení bylo prováděno ve čtyřech paralelních vzorcích). A co takhle nějaký text by nebyl?

Vzorek	1	2	3	4
$m_{vz}$ / mg	25,29	25,20	25,28	25,11
Absorbance <sup>a</sup>	0,2193	0,2227	0,2302	0,2129
% <sub>FLD, vz</sub>	36,74	37,45	38,58	35,93
$m_{FLD, tab}$ / mg	249,24	254,06	261,72	243,75

<sup>a</sup> – aritmetický průměr tří měření absorbance

**Tab. 18** Statistické vyhodnocení výsledků.

Průměr naměřené hodnoty	$L_{1,2}$	$s$	$s_r$
37,18 %	1,908	1,288	3,46 %
252,19 mg	12,94	8,733	3,46 %

Proč je tady průměr, když elektrochemie je vyhodnocovaná mediánem?

Český lékopis udává obsah 97 % až 103 % sloučeniny flutamidu.

## 5. Závěr

- 1) Bylo prostudováno chování FLD při DC voltametii na m-AgSAE. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení FLD v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Optimálním prostředím je směs methanol - BR pufr o pH 7 (1:9), kde FLD poskytuje nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný pík. Dále byla určena mez stanovitelnosti pro FLD metodu DCV na m-AgSAE v prostředí methanol - BR pufr o pH 7 (1:9), která činí  $4,7 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.
- 2) Bylo prostudováno chování FLD při DPV na m-AgSAE. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení FLD v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Optimálním prostředím je směs methanol - BR pufr o pH 7 (1:9), kde FLD poskytuje nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný pík. Dále byla určena mez stanovitelnosti pro FLD metodu DPV na m-AgSAE v prostředí methanol - BR pufr o pH 7 (1:9), která činí  $3,0 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.
- 3) Bylo provedeno stanovení FLD v tabletě léčiva APO-Flutamid metodami DCV a DPV na m-AgSAE. Výsledky jsou shrnuty v **tab. 19**. Jako vhodnější a citlivější metoda se ukázala DPV, která s relativní chybou 4,40 % oproti deklarované hodnotě obsahu výrobcem může být použita jako alternativní metoda ke spektrofotometrickému stanovení obsahu FLD v tabletě léčiva APO-Flutamid dle Českého lékopisu. Srovnání obou metod je uvedeno v **tab. 20**.
- 4) Bylo provedeno stanovení FLD v tabletě léčiva APO-Flutamid dle Českého lékopisu za pomoci spektrofotometrického stanovení, čímž byla ověřena přesnost tohoto stanovení, které bylo vyhodnoceno s výsledkem  $252,19 \pm 12,94$  mg oproti hodnotě udávané výrobcem léčiva APO-Flutamid udávající množství FLD  $250 \pm 12,5$  mg v 1 tabletě, tj. s relativní chybou 3,46 %. Srovnání obou metod je uvedeno v **tab. 20**.

**Tab. 19** Srovnání výsledků stanovení FLD v tabletě léčiva APO-Flutamid za použití DCV a DPV metody na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 7.

Technika / elektroda	$m_{uved}$ / mg	$m_{stan}$ / mg	chyba / %
DCV / m-AgSAE	250 ± 12,5	363 ± 72,72	45,2
DPV / m-AgSAE		239 ± 44,20	4,40

$m_{uved}$  – hmotnost FLD uvedená výrobcem,  $m_{stan}$  – stanovená hmotnost FLD použitou metodou

**Tab. 20** Srovnání výsledků stanovení FLD v tabletě léčiva APO-Flutamid za použití DPV metody a spektrofotometrického stanovení dle Českého lékopisu.

Technika / elektroda	$m_{stan}$ / mg
DPV / m-AgSAE	239 ± 44,20
Stanovení dle lékopisu	252 ± 12,94

Hodilo by se to dát ještě do textu a okomentovat

## 6. Literatura

1. Český lékopis 2005 – Doplněk 2006. Grada Publishing (2006), vydáno na CD.
2. URL: <https://www.sigmaaldrich.cz>, staženo 11.10.2007.
3. URL: <https://www.avicena.cz/moduly>, staženo 18.12.2007.
4. Bezpečnostní list flutamidu, datum revize 11.2.2006.
5. Vokurka M., Hugo J.: *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf, Praha 2008.
6. Bednář B. a kolektiv: *Učebnice patologické anatomie*, Avicenum, Praha 1975.
7. Tichý M.: *Toxikologie pro chemiky*, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 2004.
8. Paleček F.: *Patofyziologie dýchání*, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 2001.
9. Snyckerski A.: J. Pharm. Biomed. Anal. 7, 1513 (1989).
10. Álvarez-Lueje A., Peña C., Núñez-Vergara L. J., Squella J. A.: *Electroanalysis* 10, 1043 (1998).
11. Hammam E., El-Desoky H. S., El-Baradie K. Y., Beltagi A. M.: *Can. J. Chem.* 82, 1386 (2004).
12. Průchová M.: *Bakalařská práce*, Univerzita Karlova, Praha (2007).
13. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha 2005.
14. Harvey, D., v knize: *Modern Analytical Chemistry*, kap. 4. McGraw-Hill, Boston 2000.
15. Matthias O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, str. 194. Wiley-VCH, druhé vydání, Weinheim 2007.