

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Adéla Baptistová

PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA PROKAINU A  
SULFAMETHOXAZOLU SE SPEKTROFOTOMETRICKOU  
DETEKČÍ

The Flow Injection Analysis of Procaine and  
Sulfamethoxazole with Spectrophotometric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2016

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 12. května 2016.

## Poděkování

Děkuji mému školiteli, RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za odborné vedení, za čas, který mi věnoval, za všechny podněty i připomínky a obecně za jeho práci. Též děkuji svým blízkým za podporu při studiu.

## Abstrakt

Pro stanovení dvou analytů (prokain hydrochlorid, sulfamethoxazol) obsahujících v molekule aminovou skupinu byla využita derivatizační reakce, poskytující po převedení analytu na diazoniovou sůl a následné kopulační reakci s činidlem (1-aminonafalen nebo NEDA) barevný, spektrofotometricky detegovatelný produkt. Pro oba analyty byly studovány podmínky statického spektrofotometrického stanovení, při čemž se ukázalo, že toto stanovení lze použít pouze k analýze prokain hydrochloridu, neboť sulfamethoxazol poskytuje časově málo stabilní barevný produkt. Dále byla navržena aparatura pro FIA stanovení a optimalizovány vlivy vybraných parametrů pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Pro oba analyty a obě činidla byly proměřeny příslušné kalibrační závislosti, které byly využity pro stanovení obsahu analytů ve vzorcích léčivých přípravků.

**Klíčová slova:** diazotace, prokain, průtoková injekční analýza, spektrofotometrie, sulfamethoxazol

## Abstract

A derivatization reaction, based on a copulation reaction of diazonium salt of an analyte with a reagent (1-aminonaphthalene or NEDA) producing colour, spectrophotometrically detectable product, has been used for determination of two analytes (procain hydrochloride, sulfamethoxazole) containing amino group in the molecule. The conditions of batch spectrophotometric determination were studied. It was found, that the batch determination is applicable only for procain hydrochloride analysis, because sulfamethoxazole gives time-unstable colour product. FIA arrangement was proposed and effects of selected parameters were optimized using two levels factorial design. The calibration dependences were measured for both analysis with both reagents, and subsequently were applied on determination of analytes in medical forms.

**Key words:** diazotization, flow injection analysis, procaine, spectrophotometry, sulfamethoxazole

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Analyzované látky .....	8
2.1.1	Prokain, charakteristika a metody stanovení .....	8
2.1.2	Sulfamethoxazol, charakteristika a metody stanovení .....	11
2.1.3	Trimethoprim, charakteristika .....	13
2.2	Derivatizační reakce .....	13
2.2.1	Obecný mechanismus derivatizační reakce .....	14
2.2.2	Reakce s 1-aminonaftalenem .....	15
2.2.3	Reakce s <i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiaminem .....	16
2.3	Průtoková injekční analýza, návrh aparatury .....	17
3	Experimentální část .....	19
3.1	Analyzované lékové formy, standardy .....	19
3.2	Použité chemikálie .....	19
3.3	Příprava roztoků .....	20
3.4	Instrumentace .....	21
3.5	Zpracování naměřených dat .....	21
4	Výsledky a diskuse .....	23
4.1	Stanovení prokain hydrochloridu .....	23
4.1.1	Statická spektrofotometrická stanovení .....	23
4.1.2	FIA stanovení .....	26
4.2	Stanovení sulfamethoxazolu .....	32
4.2.1	Statická spektrofotometrická stanovení .....	32
4.2.2	FIA stanovení.....	35
4.3	Diskuse .....	41
5	Závěr .....	43
	Literatura .....	44

## Seznam použitých zkratk

<i>A</i>	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
<i>c</i>	molární koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
<i>C</i>	hmotnostní koncentrace [ $\text{g dm}^{-3}$ ]
<i>LOD</i>	detekční limit [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]
<i>F</i>	průtoková rychlost [ $\text{ml min}^{-1}$ ]
FIA	průtoková injekční analýza (angl. flow injection analysis)
<i>l<sub>RC</sub></i>	délka reakční cívky [cm]
<i>LDR</i>	lineární dynamický rozsah [ $\mu\text{g ml}^{-3}$ ]
<i>m</i>	hmotnost [g]
NEDA	<i>N</i> -(1-naftyl)ethylendiamin
<i>r</i>	korelační koeficient lineární regrese
<i>S</i>	plocha FIA píku [s]
<i>s<sub>r</sub></i>	relativní směrodatná odchylka mediánu [%]
SIA	sekvenční injekční analýza (angl. sequential injection analysis)
<i>t</i>	čas [min]
<i>V</i>	dávkový objem [ $\mu\text{l}$ ]
<i>w<sub>i</sub></i>	faktor <i>i</i> -tého parametru pro faktorovou analýzu
<i>x</i>	nalezený procentuální obsah [%]
$\epsilon_{\lambda}$	molární absorpční koeficient při dané vlnové délce [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
$\lambda$	vlnová délka [nm]

# 1 Úvod

Cílem této diplomové práce je navrhnout reakce pro statická spektrofotometrická stanovení dvou vybraných analytů (prokain a sulfamethoxazol) obsahujících aminoskupinu pomocí vhodné derivatizační reakce.

Následně si práce dává za cíl tato stanovení aplikovat na reálné vzorky léčivých přípravků (injekční roztok prokain hydrochloridu a Biseptol tablety), převést je do provedení průtokové injekční analýzy, optimalizovat je a výsledky těchto stanovení porovnat.

## 2 Teoretická část

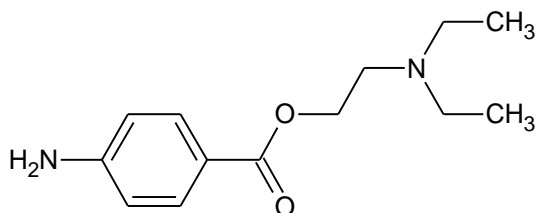
### 2.1 Analyzované látky

Předkládaná diplomová práce se věnuje stanovení dvou vybraných analytů. Jedná se o prokain hydrochlorid a o sulfamethoxazol. Tyto látky mají ve své chemické struktuře aminovou skupinu vázanou na benzenovém jádře, a proto jsou vhodnými reaktanty pro diazotační reakci, jejíž barevný produkt lze stanovit spektrofotometricky.

#### 2.1.1 Prokain, charakteristika a metody stanovení

Prokain je lokální anestetikum [1–3], které patří do skupiny anestetik esterového typu. Prvně byl syntetizován Němcem A. Einhornem roku 1905, jako náhrada kokainu. Používá se ve formě injekčních roztoků s obsahem prokain hydrochloridu, nejčastěji o hmotnostních koncentracích 0,2–2,0 % (cit. [4, 5]). V první polovině 20. století se stalo převládajícím léčivem takového typu. Začátkem 21. století se prokain využívá převážně při aplikaci nitrosvalových injekcí penicilinu. Již od syntéz dalších lokálních anestetik je prokain využíván jako referenční standard pro porovnání jejich účinků a toxicity.

*Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti.* Prokain hydrochlorid (CAS [51-05-8]) je systematicky hydrochlorid 2-diethylaminoethyl-4-aminobenzoové kyseliny. Jak je patrné ze strukturního vzorce na obr. 2.1, molekula zahrnuje lipofilní část (benzenamin), střední řetězec (ethylester) a hydrofilní část (diethylamin).



Obr. 2.1 Strukturní vzorec prokainu



Sumární vzorec prokain hydrochloridu je  $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$ , čemuž odpovídá molární hmotnost  $272,77 \text{ g mol}^{-1}$ . Jde o téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé jemné krystaly. Je úplně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v 96% ethanolu a nerozpustný v etheru. Jeho teplota tání je  $154\text{--}158 \text{ }^\circ\text{C}$ , hodnota  $pK_a$  prokainu je 9,0 při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

*Metody stanovení prokainu.* V literatuře je popsána škála metod pro stanovení prokain hydrochloridu [6, 7]. Mezi běžně užívané metody patří spektrofotometrie. V oblasti UV má prokain hydrochlorid v kyselém prostředí dvě absorpční maxima, a to při vlnových délkách 222 nm a při 294 nm. Vlivem toho, že většina dalších účinných látek též absorbuje v UV oblasti, se pro stanovení využívá spíše oblast viditelného spektra. Prokain hydrochlorid může reagovat například s 1,2-naftochinon-4-sulfonovou kyselinou za vzniku lososově růžového produktu, jenž má absorpční maximum při vlnové délce 484 nm [8]. Jiným činidlem vhodným pro stanovení prokain hydrochloridu je 3-methylbenzothiazolin-2-on, kdy vzniká stabilní modrý produkt, jenž má absorpční maximum při 575 nm [9]. Dalším příkladem může být reakce prokain hydrochloridu s *p*-dimethylaminobenzaldehydem, kdy se vzniklá žlutá Schiffova báze měří při vlnové délce 455 nm [10].

Dalšími využívanými metodami jsou stanovení elektroanalytická, jejichž příkladem je cyklická voltametrie za použití modifikovaných elektrod (borem dopovaná diamantová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku) [11–13] nebo diferenční pulsní adsorpční voltametrie (modifikovaná uhlíková elektroda, metoda screen-printed) [14].

Pro stanovení prokainu pomocí průtokové injekční analýzy byla navržena aparatura s amperometrickou detekcí [15] nebo sekvenční injekční analýza s chemiluminiscenční detekcí [16].

Často, zvláště pro stanovení prokain hydrochloridu v tělních tekutinách nebo pro rutinní analýzu léčiv, je používána vysokoúčinná kapalinová či plynová chromatografie [6, 17].

V tabulce 2.1 jsou shrnuty analytické charakteristiky vybraných metod pro stanovení prokainu.

Tabulka 2.1 Vybrané analytické metody pro stanovení prokain hydrochloridu, podmínky jednotlivých stanovení, detekční limit a lineární dynamický rozsah.

metoda	podmínky stanovení	LOD [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	LDR [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	Ref.
VIS spektrofotometrie	reakce s 1,2-naftochinonsulfonovou kyselinou v acetátovém pufu o pH = 3,6, $t_{\text{reakce}} = 10$ min, $\lambda_{\text{max}} = 484$ nm ( $\epsilon_{484} = 5,22 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	0,28	0,30–100	[8]
	reakce s 3-methylbenzothiazolin-2-onem v přítomnosti síranu železito-amonného v kyselém prostředí, $t_{\text{reakce}} = 30$ min, měřeno v ethanolu, $\lambda_{\text{max}} = 575$ nm ( $\epsilon_{575} = 1,1 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	40,0	50–400	[9]
	reakce s <i>p</i> -dimethylaminobenzaldehydem v prostředí ledové octové kyseliny, $t_{\text{reakce}} = 30$ min, $\lambda_{\text{max}} = 455$ nm ( $\epsilon_{455} = 3,46 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	0,10	0,20–15,0	[10]
HPLC	kolona Radial Pak C <sub>18</sub> (velikost částic 10 $\mu\text{m}$ ), acetonitril– –0,0165M triethylamin (85:15) pH = 3, $v_{\text{toku}} = 2 \text{ ml min}^{-1}$ , UV detekce $\lambda_{\text{max}} = 288$ nm	0,001 (plasma) 0,01 (moč)	neudáno	[17]
elektrochemické metody	cyklická voltametrie na borem dopované elektrodě v 0,1M hydroxidu sodném	0,136	1,36–54,6	[11]
	cyklická voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku potažené filmem multi-wall carbon nanotubes	0,047	neudáno	[12]
	diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě modifikované pemzou	0,01	neudáno	[13]
	diferenční pulsní adsorpční voltametrie za použití nafion- modifikované elektrody ze skelného uhlíku	0,002	0,02–1,64	[14]
FIA	amperometrická detekce pomocí screen-printed uhlíkové elektrody, oxidace při $E = 0,8$ V v roztoku octanu sodného, pH = 6,0	1,4	2,13–23,6	[15]
SIA	chemiluminiscenční detekce při $\lambda \geq 390$ nm, emise záření oxidací 0,5mM manganistanem draselným v 2,3M kyselině sírové za přítomnosti 0,37M mravenčí kyseliny, dvojitý zpětný tok, $F = 100 \mu\text{l s}^{-1}$	0,3	0,50–50	[16]
AAS	tvorba iontového páru s kobaltnatými ionty při pH = 8–9, $\lambda = 241$ nm, plamen: vzduch-acetylen	0,10	neudáno	[7]

*Lékopisné metody.* Podle Českého lékopisu 2009 se prokain hydrochlorid stanovuje titrací primárních aromatických aminů odměrným roztokem dusitanu sodného s elektrochemickou indikací konce titrace [18]. Diazotační reakce obecně probíhá kvantitativně a rychle pouze v kyselém prostředí a příslušná diazoniová sůl je stabilní při

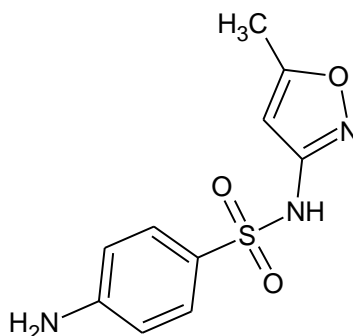
nízké teplotě (0–5 °C). Takové podmínky jsou zajištěny přidavkem kyseliny sírové nebo chlorovodíkové k analytu a chlazením analytu ledem. Bod ekvivalence je určen potenciometricky pomocí měrné platinové a srovnávací argentschloridové elektrody. Podle Lékopisu Spojených států amerických se prokain hydrochlorid stanovuje extrakcí rozpouštědlem se spektrofotometrickou detekcí při 280 nm [19].

### 2.1.2 Sulfamethoxazol, charakteristika a metody stanovení

Sulfamethoxazol se řadí mezi antibakteriální širokospektrá chemoterapeutika ze skupiny sulfonamidů [1, 3, 20]. Ty byly zavedeny v Německu firmou Bayer ve druhé polovině 30. let 20. století. Sulfamethoxazol byl pak vyvinut později, a to roku 1961 ve Spojených státech amerických a pro své účinky se stal nejpoužívanější ze sulfonamidů.

Sulfamethoxazol se používá výlučně ve fixní kombinaci s trimethoprimem (viz kapitola 2.1.3), a to v poměru 5:1. Tato kombinace účinných látek se nazývá co-trimoxazol (také kotrimazol nebo TMP-SMX) a má synergický antimikrobiální účinek na řadu gram-pozitivních a gramnegativních bakterií. Účinkuje na základě toho, že inhibuje tvorbu listové kyseliny. Co-trimoxazol se upřednostňuje též proto, že snižuje riziko vzniku rezistentních kmenů bakterií. Využívá se převážně k léčbě infekcí močového ústrojí a horních dýchacích cest, dále k léčbě bronchitidy, střevní infekce způsobené salmonelami a v neposlední řadě také k léčbě malárie. Běžně jsou vyráběny tablety s obsahem 400 mg sulfamethoxazolu a 80 mg trimethoprimu, případně dávky dvojnásobné (800 mg a 160 mg) [21] nebo naopak nižší (100 mg a 20 mg) [22]. Dále existují suspenze k orálnímu podání a injekční roztoky.

*Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti.* Sulfamethoxazol (CAS [723-46-6]) je systematicky 4-amino-*N*-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzensulfonamid [3, 6]. Strukturální vzorec je uveden na obrázku 2.2.



Obr. 2.2 Strukturální vzorec sulfamethoxazolu

Sumární vzorec sulfamethoxazolu je  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ , čemuž odpovídá molární hmotnost  $253,28 \text{ g mol}^{-1}$ . Jedná se o bílý či téměř bílý krystalický prášek, jenž se velmi těžce rozpouští ve vodě. Je rozpustný v organických rozpouštědlech a ve zředěných roztocích hydroxidu sodného. Jeho teplota tání je  $169\text{--}172 \text{ }^\circ\text{C}$ , hodnota  $pK_a$  sulfamethoxazolu je 5,6 při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

*Metody stanovení sulfamethoxazolu* [6, 23]. Jako nejběžněji užívanou metodu lze uvést přímé spektrometrické stanovení v UV oblasti, a to v 0,1M hydroxidu sodném nebo ve fosfátovém pufru o  $\text{pH} = 7,5$ , kde má sulfamethoxazol absorpční maximum při vlnové délce 256 nm ( $\epsilon_{256} = 1,72 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), lineární dynamický rozsah stanovení je  $0,26\text{--}26 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  (tj.  $1 \times 10^{-6}\text{--}1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Pro stanovení obsahu sulfamethoxazolu v krvi od koncentrací  $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  se používá jak fluorimetrie přímá (absorpční maximum při 314 nm a emisní maximum při 338 nm), či fluorimetrie za využití derivatizačních reakcí.

Z chemických metod analýzy lze zmínit volumetrické stanovení. Jedná se o titraci lithium methoxidem v dimethylformamidu za použití thymolové modři jako indikátoru [23].

Z instrumentálních metod se užívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s následnou spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti při 254 nm za použití obrácených fází (mobilní fáze: 0,05% vodný roztok mravenčí kyseliny o  $\text{pH} = 4,5$ :acetonitril:tetrahydrofuran (50:49:1), stacionární fáze: An Appolo LC18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5,0 \text{ } \mu\text{m}$ ), průtoková rychlost  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ). Metoda má lineární rozsah  $1\text{--}110 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  a detekční limit  $0,20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  [24]. Dále je popsána metoda pro stanovení co-trimoxazolu v odpadních vodách pomocí kapalinové chromatografie v tandemu s hmotnostní detekcí s limitem detekce  $0,25 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  a lineárním rozsahem  $0,8\text{--}100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  [25]. Metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí jsou oproti detekci UV rychlejší a šestkrát citlivější [26]. Jsou využívány též pro stanovení sulfamethoxazolu či co-trimoxazolu v potravinách, ekologických materiálech a tělních tekutinách [6, 26].

Velmi drahou alternativou pro stanovení sulfamethoxazolu bez jakékoli potřebné separace nebo předchozí úpravy vzorku co-trimoxazolu je protonová nukleární magnetická rezonance. Vzorek je rozpuštěn v  $\text{DMSO-}d_6$  a jako vnitřní standard se užívá maleinová kyselina [27] nebo 1,4-dinitrobenzen [28]. Též je možné využít formamid s 8% mravenčí kyselinou jako rozpouštědlo a *t*-butanol jako vnitřní standard [29].

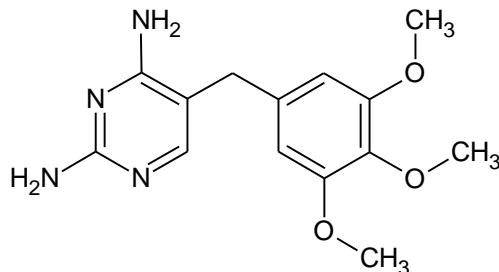
*Lékopisné metody.* Metodou podle Českého lékopisu je titrace 0,1M dusitanem sodným za nízké teploty (do  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ) v kyselém prostředí [18, 23]. To je zajištěno ledovou kyselinou octovou a kyselinou chlorovodíkovou přidanou k analytu. Konec titrace se indikuje

potenciometricky, nejčastěji za použití měrné platinové a srovnávací kalomelové elektrody.

### 2.1.3 Trimethoprim, charakteristika

Prakticky ve všech dostupných přípravcích s obsahem sulfamethoxazolu je obsažen i trimethoprim, proto je na tomto místě zmíněn jako případný interferent při stanovení [21]. Trimethoprim je chemoterapeutikum, které je citlivé jak ke gram pozitivním kokům, tak i ke gram negativním tyčinkám [1]. Znamější je právě z kombinace se sulfonamidy, než jako později zavedené léčivo určené převážně k léčbě zánětů močového ústrojí.

*Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti.* Trimethoprim (CAS [738-70-5]) systematicky 5-[(3,4,5-trimethoxyfenyl)methyl]pyrimidin-2,4-diamin [cit. 6], strukturní vzorec je uveden na obrázku 2.3. Sumární vzorec trimethoprimu je  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ , čemuž odpovídá molární hmotnost  $290,32 \text{ g mol}^{-1}$ . Jedná se o nažloutlý prášek či drobné krystaly, které jsou velmi těžce rozpustné ve vodě a rozpustné v organických rozpouštědlech, mimo etheru. Teplota tání trimethoprimu je  $199\text{--}203 \text{ }^\circ\text{C}$ , jeho  $pK_a$  má hodnotu 7,2 při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Obr. 2.3 Strukturní vzorec trimethoprimu

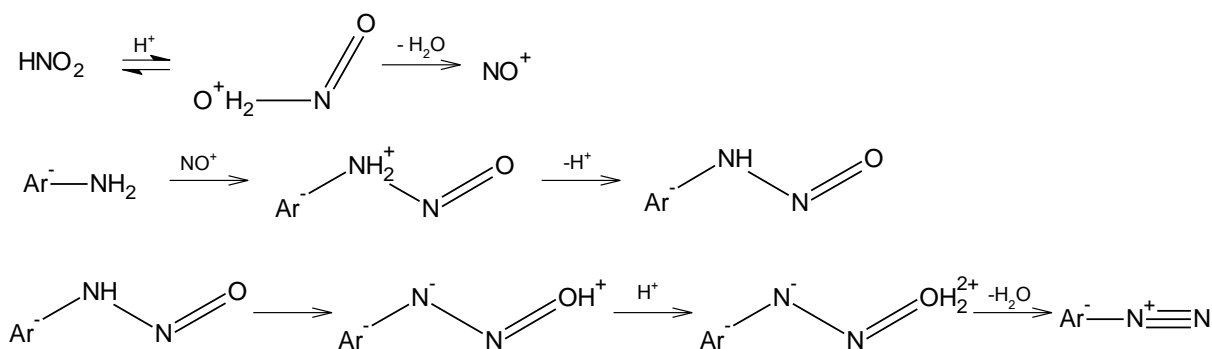
## 2.2 Derivatizační reakce

Předkládaná diplomová práce se zabývá derivatizační reakcí pro spektrofotometrické stanovení organických aminů ve VIS oblasti, které jsou častým řešením problémů s interferencemi při stanovení těchto látek v UV oblasti [30]. Věnuje se reakcím dvou analytů (prokainu a sulfamethoxazolu) se dvěma činidly: 1-aminonafalenem a *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem (dále NEDA). Principem stanovení je skutečnost, že diazoniová sůl prokainu, nebo sulfamethoxazolu, tvoří s těmito činidly barevný produkt. Absorpční maximum vzniklé sloučeniny je pak možno měřit pomocí spektrofotometrie

ve VIS oblasti a tím analyt stanovit. Protože vybrané analyty jsou primárními aminy, je tedy navrženou derivatizační reakcí diazotace s následnou kopulací.

### 2.2.1 Obecný mechanismus derivatizační reakce

Reakcí primárních aminů s kyselinou dusitou v kyselém prostředí vznikají diazoniové soli [31, 32]. Takové reakci podléhají jak alkylaminy, tak arylaminy. Aromatické aminy bývají ve vodných roztocích stabilní za nízké teploty. Mechanismus diazotační reakce je znázorněn na obr. 2.4. Elektrofílní nitrosionový kationt reaguje s nukleofilním dusíkem aminů. Tato reakce se uskutečňuje v krocích, kdy produktem je příslušná diazoniová sůl a voda.

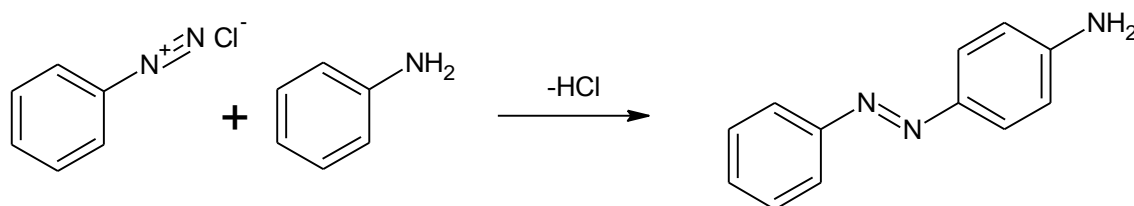


Obr. 2.4 Mechanismus diazotační reakce (upraveno podle [32])

Zdrojem nitrosylového kationtu je obvykle sůl kyseliny dusité, která je pomalu přidávána k roztoku či suspenzi primárního aminu v přebytku minerální kyseliny (obvykle 2,5–3,0 molů kyseliny na 1 mol aminu) za chlazení do 5 °C. Tímto způsobem lze diazotovat prakticky všechny deriváty aminů. Jsou případy analytu, které mají na benzenovém jádře substituované silně elektronegativní substituenty. Takové látky je třeba diazotovat v prostředí octové kyseliny se silnou minerální kyselinou, která je donorem protonů.

Diazoniové soli mohou následně podléhat tzv. kopulační reakci, jež má mechanismus elektrofílní aromatické substituce [31]. Benzendiazoniová sůl je elektrofílní sloučenina, která reaguje s elektronově bohatou částicí, jakou může být například fenol nebo primární arylamin. Kopulace je znázorněna na obr. 2.5. Substituce probíhá vždy do *para* polohy,

ale jestliže je para poloha blokována nějakou jinou skupinou, pak substituce proběhne do polohy *ortho*.

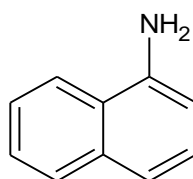


Obr. 2.5 Kopulační reakce benzendiazoniové soli s anilinem

Produkty kopulační reakce jsou široce využívány pro přípravu barviv. Vzniklé molekuly obsahují konjugovaný systém  $\pi$  elektronů, jejichž vlivem absorbují světlo ve viditelné oblasti elektromagnetického záření a jsou tak vhodnými sloučeninami pro VIS spektrofotometrická stanovení.

### 2.2.2 Reakce s 1-aminonaftalenem

1-aminonaftalen či  $\alpha$ -naftylamin (CAS [134-32-7]) je aromatický amin odvozený od naftalenu [33]. Strukturální vzorec je uveden na obrázku 2.4. Jedná se o růžový až hnědorůžový prášek, který vzhledem k teplotě tání  $49,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  na vzduchu sublimuje, což způsobuje intenzivní nepříjemný zápach. Sumárnímu vzorci  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}$  odpovídá molární hmotnost  $143,19\text{ g mol}^{-1}$ .

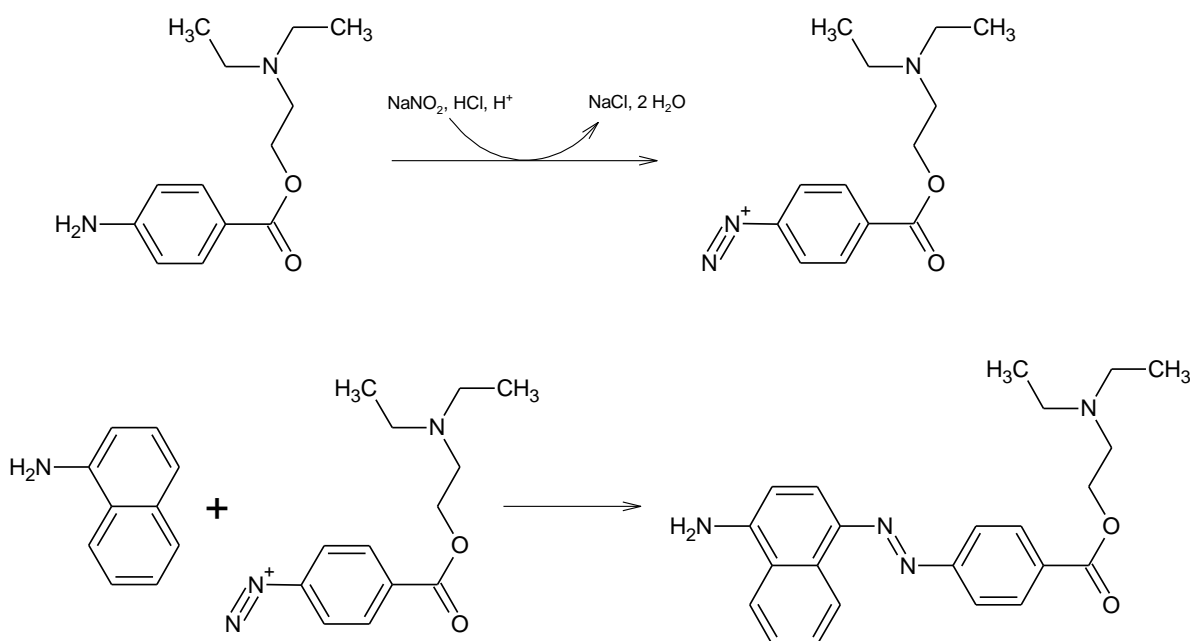


Obr. 2.6 Strukturální vzorec 1-aminonaftalenu

V literatuře je 1-aminonaftalen znám jako Griessovo či Lungovo činidlo [34]. Je častým meziproduktem při průmyslových syntézách azobarviv, herbicidů, některých léčiv a dalších chemických látek využívaných například v zemědělství. V analytické chemii byl využíván jako jedno z prvních činidel již ve 2. polovině 19. století [35–37]. Využíval se převážně pro kvantitativní analýzu dusitanů a dusičnanů v pitné vodě. Griessovy reakce je stále využíváno, často v různých obměnách [38, 39]. Při použití tohoto činidla je stanovovaný primární amin nejprve diazoniován a činidlo je pak přidáváno až ve druhém

kroku jako reaktant pro kopulační reakci [35]. Příkladem je stanovení dusíkatých látek (často alkaloidů) v léčivých nebo jedovatých rostlinách [40, 41]. Tyto reakce poskytují sytě růžovočervené produkty, které mají absorpční maxima při vlnových délkách 515–530 nm.

Reakce vybraných analytů s 1-aminonaftalenem vychází z literatury [42]. Jedná se o reakci aminové skupiny na benzenovém jádře analytu s dusitanem sodným v kyselém prostředí. Vzniklá diazoniová sůl reaguje s 1-aminonaftalenem za vzniku barevného produktu. Reakční schéma pro prokain znázorňuje obr. 2.7.

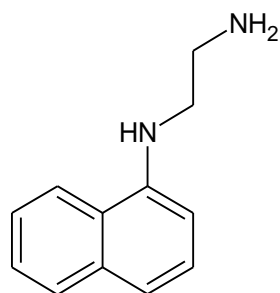


Obr. 2.7 Schéma diazotační reakce prokainu a jeho následné kopulace s 1-aminonaftalenem

### 2.2.3 Reakce s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem

Činidlo *N*-(1-naftyl)ethylendiamin (CAS [551-09-7]), zkratkou NEDA, je též aromatický amin odvozený od naftalenu, strukturní vzorec je uveden na obrázku 2.8. Jedná se o čistě bílý krystalický prášek bez zápachu. Sumárním vzorcem C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> odpovídá molární hmotnost 186,25 g mol<sup>-1</sup>.





Obr. 2.8 Strukturální vzorec *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu

V literatuře je NEDA nejčastěji popsána jako Brattonovo-Marshallovo [35] nebo též Griessovo činidlo [43, 44]. Koncem 19. století se začala NEDA hojně používat v kvantitativní analýze pro stanovení dusíkatých látek [44]; příkladem může být stanovení nitroglycerinu ve vzduchu [43]. Na přelomu 19. a 20. století se NEDA začala využívat ke klinickému stanovení kyseliny dusičné v biologických materiálech a v krvi, a to i post-mortem [45]. Dále lze pomocí NEDA stanovit dusitany a dusičnany při studiu sulfonamidů v léčivých přípravcích [46]. Pro své lepší fyzikální a chemické vlastnosti NEDA nahrazuje 1-aminonaftalen i v průmyslových odvětvích, kde též působí jako meziproduct mnoha syntéz.

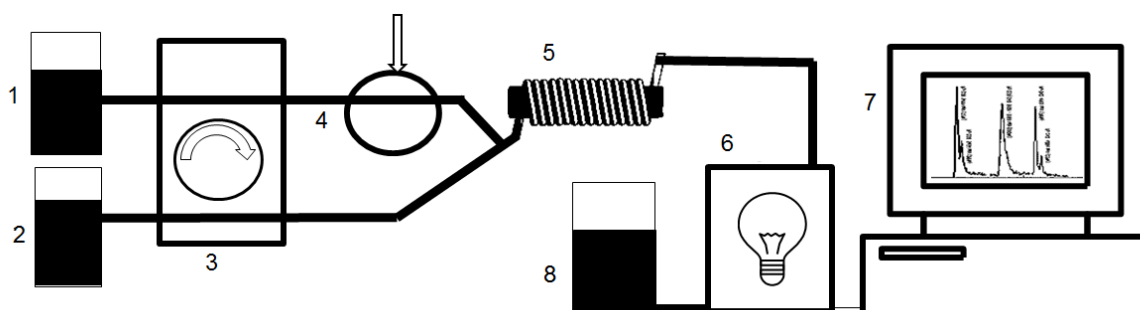
Stanovení vybraných analytů reakcí s NEDA vychází z literatury [46], jedná se o reakci analogickou s reakcí na obr. 2.7. Opět je jejím výsledkem sytě růžovočervený produkt, jež vykazuje maximální absorpenci při 540 nm.

### 2.3 Průtoková injekční analýza, návrh aparatury

Průtoková injekční analýza (angl. flow injection analysis, FIA) je instrumentální analytická metoda, která byla navržena roku 1975 J. Ružičkou a E. Hansenem [47]. Je založená na vstříkovaní přesně definovaného objemu vzorku do přímého konstantního proudu nosné kapaliny, kterou je činidlo nebo pufr. Přístroj je zpravidla složen z peristaltické pumpy zajišťující kontinuální tok všech proudů, vícecestného ventilu s dávkovací smyčkou, reakční cívky (či cívek) a vhodného detektoru [48]. Tím je nejčastěji detektor spektrofotometrický či spektrofluorometrický, ale může být využito i plamenové fotometrie, hmotnostního detektoru či detekce elektrochemické. Odezva analýz v podobě za sebou jdoucích píků (ze záznamu signál vs. čas) se vyhodnocuje nejčastěji z plochy nebo případně z výšky těchto píků, jenž jsou přímo úměrné koncentraci analytu. Vzhledem ke značné variabilitě různých parametrů může docházet k rozmytí zóny vzorku. Na toto

rozmytí v reakční cívce má vliv především objemová průtoková rychlost nosného proudu, délka reakční cívky a dávkovaný objem vzorku, které je nutné pro praktické použití metody optimalizovat.

Pro použití zvolené derivatizační reakce ke stanovení vybraných analytů (prokain hydrochlorid a sulfamethoxazol) byla pro tuto práci navržena aparatura znázorněná na obr. 2.9. Nejprve je do nosného proudu tvořeného roztokem dusitanu sodného v kyselém prostředí nadávkován vzorek, čímž dojde ke vzniku diazoniové soli, která následně reaguje s roztokem kopulačního činidla (1-aminonaftalen nebo NEDA) přiváděného jako další proud. K prodloužení reakčního času slouží reakční cívka různé délky. Výsledný barevný produkt je detegován spektrofotometricky.



Obr. 2.9 Schéma navržené aparatury pro FIA stanovení prokain hydrochloridu nebo sulfamethoxazolu: (1) nosný proud s dusitanem sodným v kyselém prostředí, (2) kopulační činidlo (1-aminonaftalen nebo NEDA), (3) peristaltická pumpa, (4) dávkovací ventil, (5) reakční cívka, (6) spektrofotometr, (7) počítač, (8) odpad.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Analyzované léčivé formy, standardy

Analyzovanou léčivou formou prokain hydrochloridu byl 0,5 % injekční roztok této látky, vyrobený firmou Ardeapharma, číslo šarže 0103030913. Jako standard byl použit prokain hydrochlorid čistoty PhEur. (Sigma-Aldrich).

Analyzovanou léčivou formou sulfamethoxazolu byly tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 s deklarovaným obsahem sulfamethoxazolu 400 mg a trimethoprimu 80 mg, vyrobené firmou Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A. (Polsko), číslo šarže 41533850. Jako standardy byly použity: sulfamethoxazol, analytical standard (Sigma-Aldrich) a trimethoprim  $\geq 99,0$  % (Sigma-Aldrich).

### 3.2 Použité chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly analytické čistoty (pokud není uvedeno jinak): dusitan sodný (Lachema), hydroxid sodný, (Penta), kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner), 1-aminonaftalen (Loba), *N*-(1-naftyl)ethylendiamin 98% (Sigma-Aldrich), octová kyselina 99% (Penta).

### 3.3 Příprava roztoků

Veškeré roztoky byly připravovány čerstvé a uchovávány v uzavřených odměrných baňkách v chladu. Deionizovaná voda použitá k přípravě roztoků byla připravena zařízením MilliQ (Millipore):

- roztok dusitanu sodného o koncentraci  $8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  v prostředí kyseliny chlorovodíkové a octové.

Na analytických vahách bylo naváženo 0,3000 g dusitanu sodného, kvantitativně převedeno do 500 ml odměrné baňky a rozpuštěno asi v 50 ml deionizované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 22,50 ml 1M kyseliny chlorovodíkové a 7,50 ml 5M octové kyseliny. Bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku.

- roztok činidla 1-aminonaftalenu o koncentraci  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$

Na analytických vahách bylo naváženo 0,8950 g 1-aminonaftalenu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 500 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku. Pro úplné rozpuštění byl roztok umístěn v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

- roztok činidla NEDA o koncentraci  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$

Na analytických vahách bylo naváženo 1,29585 g *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu. Bylo kvantitativně převedeno do 500 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku. Pro úplné rozpuštění byl roztok umístěn v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

- standardní roztok prokain hydrochloridu o koncentraci  $2,00 \text{ g dm}^{-3}$

Na analytických vahách bylo naváženo 0,2000 g prokain hydrochloridu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku.

- standardní roztok sulfamethoxazolu o koncentraci  $2,00 \text{ g dm}^{-3}$

Na analytických vahách bylo naváženo 0,2000 g sulfamethoxazolu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku.

- standardní roztok trimethoprimu o koncentraci  $2,00 \text{ g dm}^{-3}$

Na analytických vahách bylo naváženo 0,2000 g trimethoprimu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku.

- vzorek injekčního roztoku prokain hydrochloridu ředěný  $100 \times$

Z 0,5% injekčního roztoku prokain hydrochloridu byl do 100 ml odměrné baňky skleněnou dělenou pipetou odpipetován 1,00 ml tohoto roztoku a bylo doplněno po rysku deionizovanou vodou.

- roztok tablety Biseptolu

Tableta Biseptolu<sup>®</sup> 480 byla zvážena na analytických vahách ( $m = 0,66660 \text{ g}$ ) a byla kvantitativně převedena do 1000 ml odměrné baňky. Bylo doplněno po rysku deionizovanou vodou a vzniklá suspenze byla umístěna do ultrazvukové lázně na 30 minut. Poté bylo z přefiltrovaného roztoku skleněnou dělenou pipetou odpipetováno 12,50 ml do 100 ml odměrné baňky a bylo doplněno po rysku deionizovanou vodou.

### 3.4 Instrumentace

Spektrofotometrická měření byla realizována na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett-Packard 8453 s diodovým polem v křemenných kyvetách optické dráhy 1 cm. Pro průtoková měření byla použita průtoková kyveta s vnitřním objemem 130  $\mu\text{l}$ .

Průtoková injekční analýza byla měřena v zapojení znázorněném na obr. 2.9. Byla použita peristaltická pumpa Masterflex L/S (Cole-Palmer) s hadičkami Tygon R-3603 (Cole-Palmer). Reakční cívky o délkách 20, 40, 80 a 100 cm byly vytvořeny z teflonových kapilár. K nástřiku vzorků byl použit teflonový středotlaký šesticestný ventil V-450 (Upchurch Scientific) s dávkovacími cívkami délky 30, 50, 80 a 100  $\mu\text{l}$ . Jednotlivé části aparatury byly spojeny tygonovými hadičkami; vlivem toho, že použitá organická činidla působí na hadičky Tygon, bylo nutno je po znehodnocení měnit. Nosným proudem byl roztok dusitanu sodného o koncentraci  $8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , do nějž byl dávkován vzorek a následně činidlo (1-aminonaftalen nebo NEDA). Analytickým signálem byla plocha FIA píku, která byla vyhodnocována pomocí programu OriginPro 8.0 (Microcal).

### 3.5 Zpracování naměřených dat

Všechna stanovení byla provedena ve třech opakováních, pokud není uvedeno jinak. Data byla zpracována podle běžných statistických postupů [49]. Byl proveden Deanův-Dixonův test na odlehlost výsledků. Výsledky jsou uvedeny jako mediány s příslušnými intervaly spolehlivosti.

Určení parametrů průtokového systému mající vliv na odezvu detektoru bylo provedeno pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Jedná se o statistickou metodu pracující s více proměnnými, které jsou ve vzájemném vztahu. Použitím metody lze zjistit velikost vlivu těchto proměnných na výsledky měření, tím počet proměnných výrazně snížit a dále se zaměřit pouze na ty, které mají na dané měření vliv. Při dvouúrovňové analýze se vyskytuje každá proměnná pouze ve dvou stavech, jimž je přiřazeno znaménko plus nebo mínus. Je tedy nutno, aby byly všechny proměnné binární. Pokud je některá z proměnných spojitá, pak volíme pouze dva extrémní stavy. Dále jsou měřeny všechny kombinace proměnných (tedy vždy  $2^n$  výsledků) a vyhodnoceny, např. pomocí lineární regrese.

Veškeré statistické zpracování bylo provedeno v prostředí programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA), grafy byly zpracovány v prostředí programů OriginPro 8.0 (Microcal).

## 4 Výsledky a diskuse

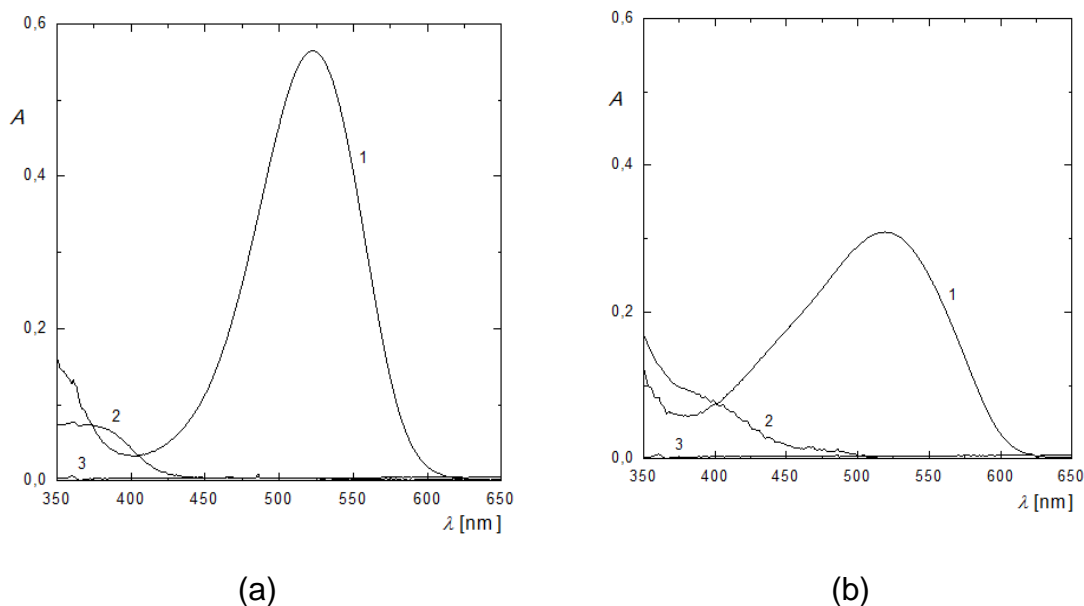
Stanovení prokain hydrochloridu, resp. sulfamethoxazolu, bylo založeno na vzniku barevného produktu diazotační a následné kopulační reakce s příslušným činidlem (1-aminonaftalen nebo NEDA). Absorbance vzniklé barevné sloučeniny je pak přímo úměrná koncentraci analytu.

Nejprve byla pro příslušný analyt provedena statická spektrofotometrická stanovení, která byla následně převedena do průtokového uspořádání a optimalizována pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy.

### 4.1 Stanovení prokain hydrochloridu

#### 4.1.1 Statická spektrofotometrická stanovení

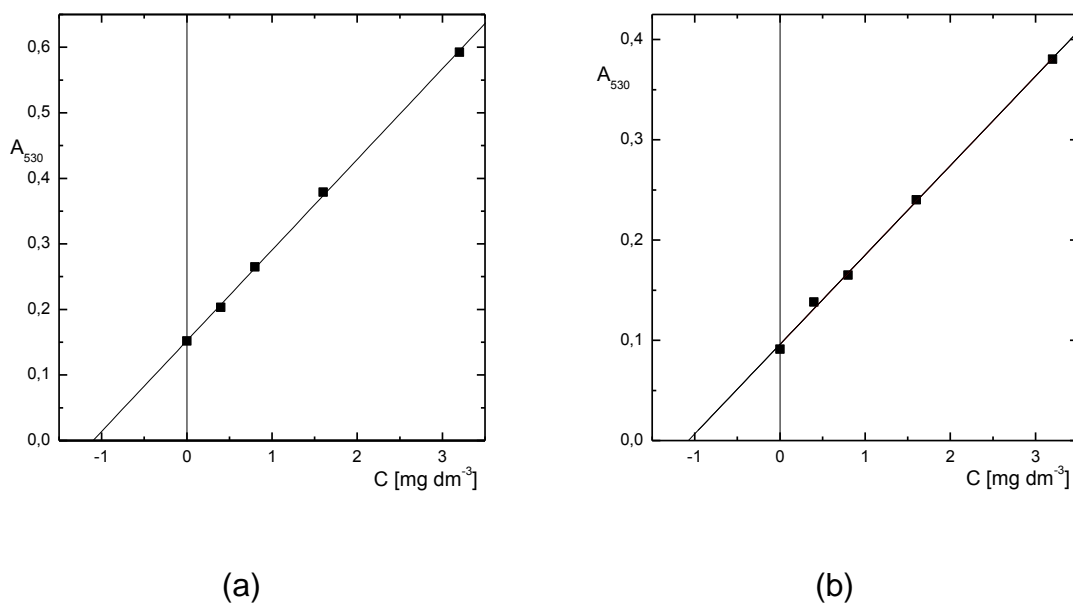
Ve statickém uspořádání byla nejprve nalezena optimální vlnová délka pro měření absorbance produktu reakce standardu prokain hydrochloridu s 1-aminonaftalenem, resp. s NEDA. Jak je patrné z obr. 4.1, pro obě použitá činidla je absorpční maximum vzniklého produktu 530 nm. Z velikosti absorbance, resp. molárního absorpčního koeficientu, absorpčního maxima je patrné, že stanovení s 1-aminonaftalenem je citlivější než stanovení s použitím NEDA.



Obr. 4.1 Absorpční spektra produktů reakce standardu prokain hydrochloridu o koncentraci  $3,20 \text{ mg dm}^{-3}$  s činidlem (a) 1-aminonaftalen, (b) NEDA. Křivky: (1) absorpční spektrum produktu reakce, (2) absorpční spektrum roztoku činidla, (3) absorpční spektrum roztoku dusitanu sodného. Podmínky:  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.

Prokain hydrochlorid ve vzorku 0,5% injekčního roztoku byl poté stanoven ve statickém uspořádání při nalezené optimální vlnové délce metodou standardního přídávku. Při pipetování roztoků do 25 ml odměrných baněk bylo vždy zachováno pořadí reaktantů: vzorek prokain hydrochloridu, standardní roztok prokain hydrochloridu, roztok dusitanu sodného v kyselém prostředí a roztok činidla (1-aminonaftalen nebo NEDA). Byla připravena sada pěti roztoků o výsledné hmotnostní koncentraci  $0,00\text{--}3,20 \text{ mg dm}^{-3}$  přidaného prokain hydrochloridu. Vždy bylo skleněnou dělenou pipetou pipetováno 0,50 ml vzorku injekčního roztoku prokain hydrochloridu ředěného 100×, dále příslušný objem standardního roztoku prokain hydrochloridu, 0,30 ml roztoku dusitanu sodného a tentýž objem roztoku činidla. Po doplnění destilovanou vodou po rysku byly roztoky ponechány reagovat po dobu 10 minut a následně byla naměřena absorbance jednotlivých roztoků. Získané závislosti jsou znázorněny na obr. 4.2, ze kterého je patrné, že stanovení s 1-aminoaftalenem je citlivější (větší směrnice závislosti). Výsledky stanovení uvádí tab. 4.1, ze které je patrná dobrá shoda mezi nalezeným a deklarovaným obsahem prokain hydrochloridu pro obě činidla.





Obr. 4.2 Závislost absorbance na hmotnostní koncentraci standardního přídávku prokain hydrochloridu při stanovení obsahu prokain hydrochloridu v 0,5% injekčním roztoku prokain hydrochloridu činidlem (a) 1-aminonaftalen, (b) NEDA. Podmínky:  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.

Tabulka 4.1 Výsledky statického stanovení prokain hydrochloridu v injekčním roztoku prokain hydrochloridu pomocí diazotační reakce: nalezený obsah prokain hydrochloridu s intervalem spolehlivosti, deklarovaný obsah prokain hydrochloridu v přípravku s intervalem povoleným lékopisem a procentuální podíl nalezeného prokain hydrochloridu k deklarovanému obsahu.

činidlo	nalezený obsah [g dm <sup>-3</sup> ]	deklarovaný obsah [g dm <sup>-3</sup> ]	$x$ [%]
1-aminonaftalen	$5,50 \pm 0,10$	$5,00 \pm 0,25$	110
NEDA	$5,40 \pm 0,20$	$5,00 \pm 0,25$	108

#### 4.1.2 FIA stanovení

*Faktorová analýza.* Stanovení prokainu ve FIA uspořádání bylo realizováno v aparatuře navržené v kap. 2.3. Nejprve byla provedena studie vlivu parametrů průtokového systému na odezvu detektoru (resp. plochu FIA píku) pomocí faktorové analýzy. Jako faktory byly zvoleny: průtoková rychlost nosného proudu (faktor A), dávkovaný objemu vzorku (faktor B) a délka reakční cívky (faktor C). Všechny tyto parametry byly optimalizovány pro obě dvě použitá činidla (1-aminonaftalen a NEDA) pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Byly zvoleny nejvyšší a nejnižší mezní hodnoty (úrovně) proměnných, zvolené úrovně uvádí tabulka 4.2. Koncentrace standardu prokain hydrochloridu byla při optimalizaci konstantní, a to  $2,00 \text{ g dm}^{-3}$ . Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.2 Sledované parametry při pro optimalizaci spektrofotometrického FIA stanovení prokain hydrochloridu a jejich zvolené úrovně.

faktor	parametr	hladina	úroveň
A	průtoková rychlost	-	$1,25 \text{ ml min}^{-1}$
		+	$3,75 \text{ ml min}^{-1}$
B	dávkovaný objem vzorku	-	30 $\mu\text{l}$
		+	100 $\mu\text{l}$
C	délka reakční cívky	-	20 cm
		+	100 cm

Tabulka 4.3 Plochy FIA píků produktu reakce prokain hydrochloridu a 1-aminonaftalenu (resp. NEDA) v závislosti na hladinách sledovaných faktorů. Podmínky:  $C(\text{prokain hydrochlorid}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

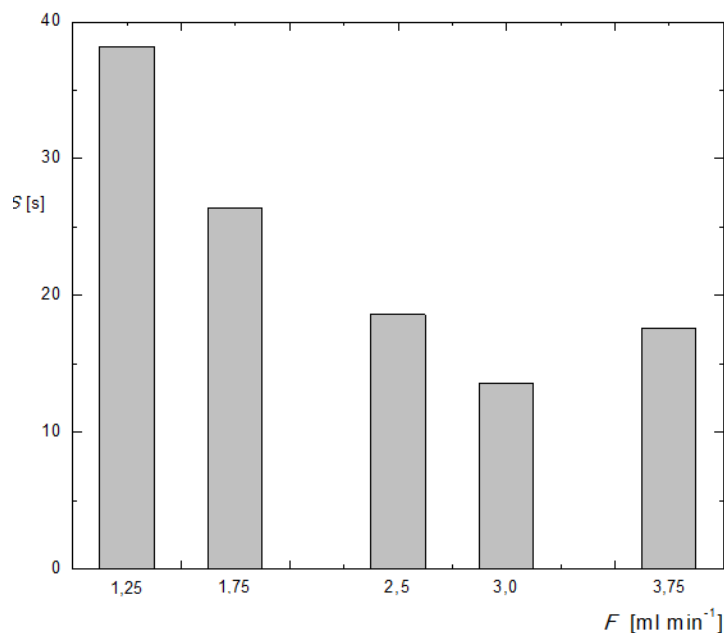
úrovně hladin			S [s]	
A	B	C	1-aminonaftalen	NEDA
-	-	-	42,86	55,67
+	-	-	9,31	46,73
-	+	-	43,12	61,56
-	-	+	39,02	18,05
+	+	-	7,27	20,66
+	-	+	12,08	19,33
-	+	+	86,06	17,54
+	+	+	14,47	55,44

Významnost vlivu úrovní studovaných parametrů i jejich vzájemných kombinací byla zhodnocena výpočtem váhy faktoru  $w_i$  na hladině pravděpodobnosti 0,05. Jak plyne z hodnot faktorů, uvedených v tabulce 4.4, je pro činidlo 1-aminonaftalen nejvýznamnějším faktorem průtoková rychlost nosného proudu (tj. faktor A), při stanovení s činidlem NEDA se pak nejvýrazněji projevuje kombinace průtokové rychlosti a délky reakční cívky (tj. faktor AC). Pro další měření byly tedy tyto faktory dále optimalizovány.

Tabulka 4.4 Váhy faktorů  $w_i$  pro jednotlivé studované faktory a kombinace těchto faktorů při spektrofotometrickém FIA stanovení prokainu reakcí s činidly 1-aminonaftalem nebo NEDA. Podmínky:  $C(\text{prokain hydrochlorid}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

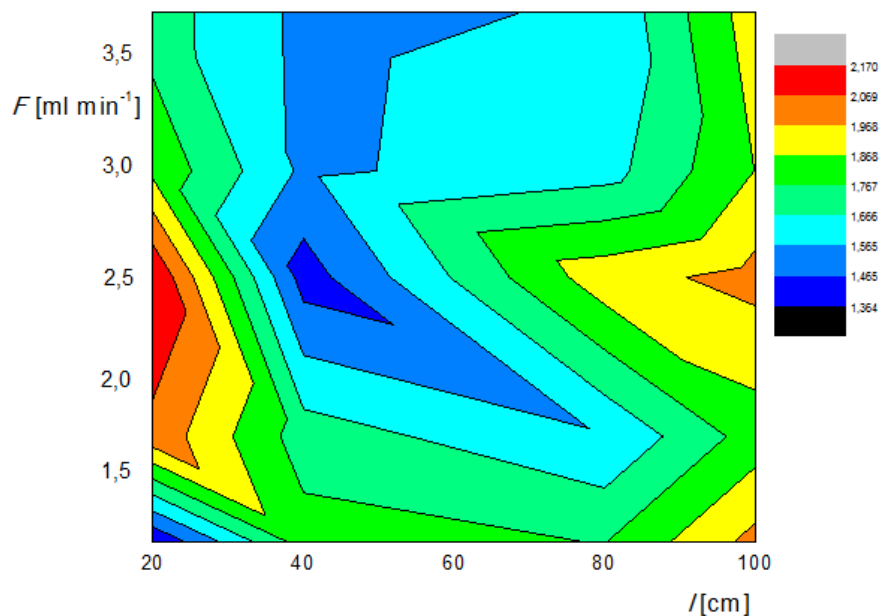
faktor / kombinace	$w_i$	
	1-aminonaftalen	NEDA
A	-41,98	-2,67
B	11,91	3,86
C	12,27	-18,57
AB	-11,74	1,16
AC	-7,28	-22,25
BC	12,80	13,94
ABC	-10,58	17,15

Jak plyne z výsledku faktorového pokusu, má na velikost signálu při FIA stanovení prokain hydrochloridu založeného na reakci s 1-aminonaftalem vliv průtoková rychlost nosného proudu, proto byl vliv průtoku studován v rozmezí od 1,25 do 3,75 ml min<sup>-1</sup>. Bylo měřeno celkem pět rychlostí, a to 1,25; 1,75; 2,50; 3,00 a 3,75 ml min<sup>-1</sup>. Další dvě proměnné (tj. faktor B a C) byly nastaveny na nejvyšší hodnotu. Dávkovaný objem vzorku byl 100  $\mu\text{l}$  a délka reakční cívky byla 100 cm. Na obrázku 4.3 je znázorněna velikost plochy FIA píku v závislosti na průtoku nosného proudu. Z této závislosti plyne, že nejvhodnější hodnotou průtoku nosného proudu je 1,25 ml min<sup>-1</sup>. Tato hodnota faktoru A byla použita pro změření kalibrační závislosti pro FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s 1-aminonaftalem.



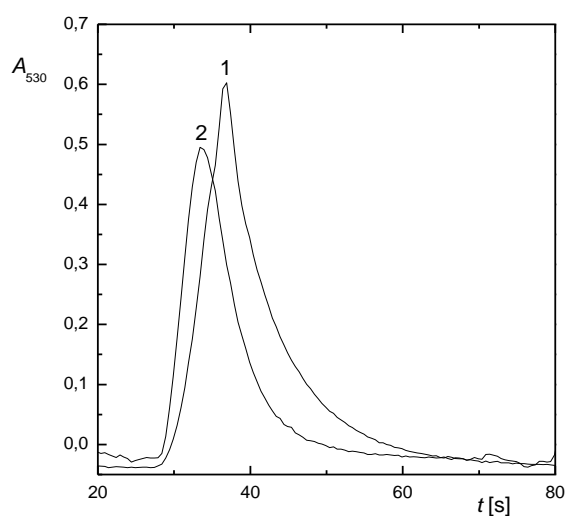
Obr. 4.3 Vliv rychlosti průtoku nosného proudu na velikost odezvy při optimalizaci parametrů FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s 1-aminonaftalenem. Podmínky:  $C(\text{prokain hydrochlorid}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(1\text{-aminonaftalen}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{vzorek}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $l_{\text{RC}} = 100 \text{ cm}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

Pro FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s NEDA bylo na základě faktorového pokusu nutné optimalizovat kombinaci průtokové rychlosti nosného proudu a délky reakční cívky. Průtok byl sledován v rozmezí  $1,25\text{--}3,75 \text{ ml min}^{-1}$ , bylo měřeno celkem pět rychlostí, a to  $1,25$ ;  $1,75$ ;  $2,5$ ;  $3,0$  a  $3,75 \text{ ml min}^{-1}$ . Délka reakční cívky byla sledována v rozmezí  $20\text{--}100 \text{ cm}$ , konkrétně byly změřeny čtyři délky  $20$ ,  $40$ ,  $80$  a  $100 \text{ cm}$ . Faktor B, tedy dávkovaný objem vzorku, byl nastaven na nejvyšší hodnotu  $100 \text{ }\mu\text{l}$ . Vliv obou sledovaných parametrů na velikost odezvy detektoru je uveden na obr. 4.4, ze kterého plyne, že největší plochy píku byly dosaženy při průtoku nosného proudu  $2,5 \text{ ml min}^{-1}$  a při délce reakční cívky  $20 \text{ cm}$ . Tyto hodnoty byly zvoleny za optimální pro změření kalibrační závislosti pro FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s NEDA.



Obr. 4.4 Vliv rychlosti průtoku nosného proudu a délky reakční cívky na velikost odezvy při optimalizaci parametrů FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s NEDA. Podmínky:  $C(\text{prokain hydrochlorid}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{vzorek}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

*Kalibrační závislosti.* Stanovení prokain hydrochloridu ve vzorku 0,5% injekčního roztoku prokain hydrochloridu ve FIA uspořádání bylo realizováno metodou kalibrační závislosti. Pro každé z činidel (1-aminonaftalen, NEDA) byly použity výše optimalizované parametry FIA stanovení. Pro ilustraci je na obr. 4.5 znázorněno porovnání FIA píků pro jednotlivá činidla.



Obr. 4.5 Záznam FIA píků při stanovení prokain hydrochloridu reakcí s (1) 1-aminonaftalénem a (2) NEDA. Podmínky:  $C(\text{prokain hydrochlorid}) = 125 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{vzorek}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

Byly proměřeny závislosti plochy píku na koncentraci standardu prokain hydrochloridu a sestrojeny kalibrační závislosti v rozsahu výsledných hmotnostních koncentrací standardu prokain hydrochloridu 10–125 mg dm<sup>-3</sup>. Kalibrační závislosti jsou uvedeny na obr. 4.6. Tyto závislosti lze popsat rovnicemi

a) pro činidlo 1-aminonaftalen

$$S = 0,042 C - 0,6 \quad (4.1)$$

$$r = 0,9976$$

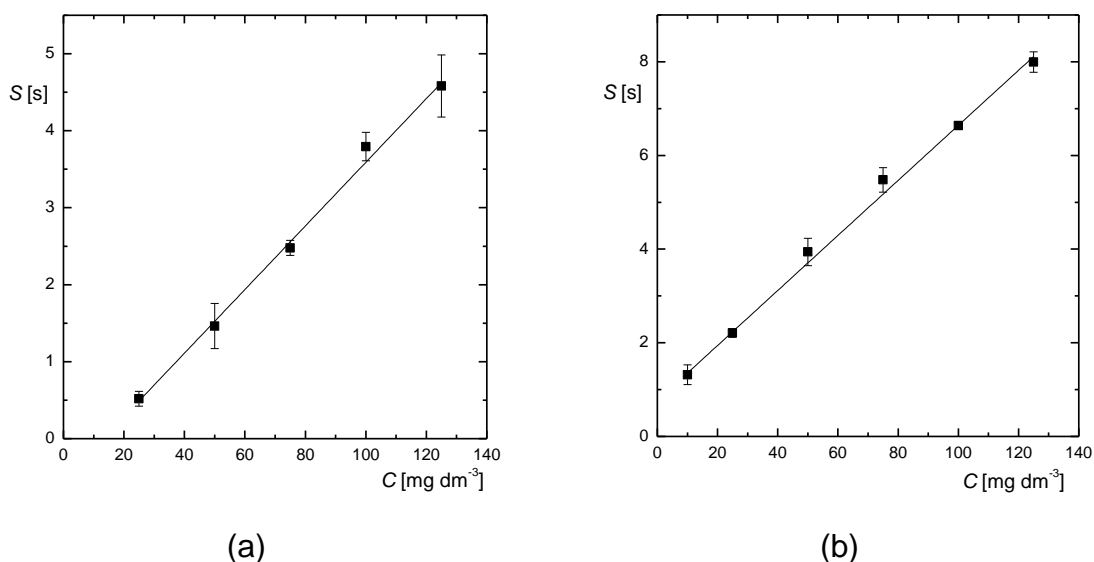
kde  $S$  je plocha FIA píku [s], a  $C$  je hmotnostní koncentrace prokain hydrochloridu [mg dm<sup>-3</sup>].

b) pro činidlo NEDA

$$S = 0,058 C + 0,9 \quad (4.2)$$

$$r = 0,9979$$

kde  $S$  je plocha FIA píku [s], a  $C$  je hmotnostní koncentrace prokain hydrochloridu [mg dm<sup>-3</sup>].



Obr. 4.6 Kalibrační závislost plochy FIA píku na hmotnostní koncentraci standardního roztoku prokain hydrochloridu při FIA stanovení prokain hydrochloridu reakcí s (1) 1-aminonaftalenem a (2) NEDA. Podmínky:  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $V(\text{vzorek}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

Následně byla proměřena plocha FIA píku pro  $100\times$  ředěný vzorek injekčního roztoku prokain hydrochloridu a odečtena hodnota jeho koncentrace. Výsledky stanovení uvádí tab. 4.5, ze které je patrná dobrá shoda mezi nalezeným a deklarovaným obsahem prokain hydrochloridu pro obě činidla. Ze směrnice a statistických parametrů kalibračních závislostí plyne, že stanovení s činidlem NEDA je citlivější a preciznější.

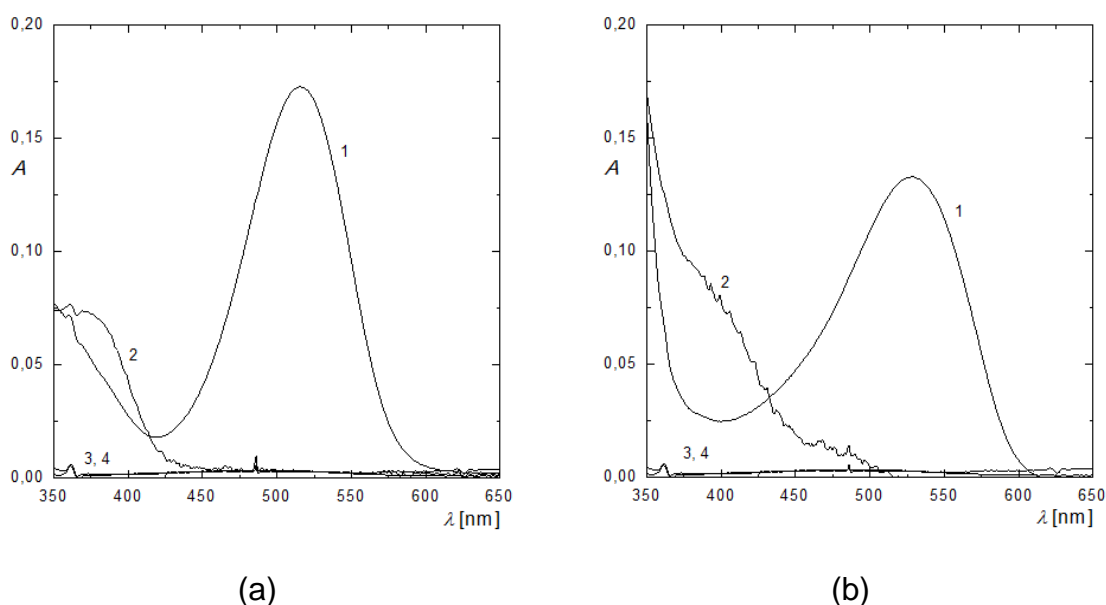
Tabulka 4.5 Výsledky FIA stanovení prokain hydrochloridu v injekčním roztoku prokain hydrochloridu: nalezený obsah prokain hydrochloridu s intervalem spolehlivosti, deklarovaný obsah prokain hydrochloridu v přípravku s intervalem povoleným lékopisem a procentuální podíl nalezeného prokain hydrochloridu k deklarovanému obsahu.

činidlo	nalezený obsah [g dm <sup>-3</sup> ]	deklarovaný obsah [g dm <sup>-3</sup> ]	x [%]
1-aminonaftalen	5,13 ± 1,36	5,00 ± 0,25	103
NEDA	5,08 ± 0,52	5,00 ± 0,25	102

## 4.2 Stanovení sulfamethoxazolu

### 4.2.1 Statická spektrofotometrická stanovení

Ve statickém uspořádání byla nejprve nalezena optimální vlnová délka pro měření absorbance produktu reakce standardu sulfamethoxazolu s 1-aminonaftalenem, resp. s NEDA. Jak je patrné z obr. 4.7, v případě použití 1-aminonaftalenu vykazuje reakční produkt absorpční maximum při 515 nm, zatímco v případě NEDA je to 540 nm. Zároveň je patrné, že přítomnost trimethoprimu nijak stanovení neovlivňuje.

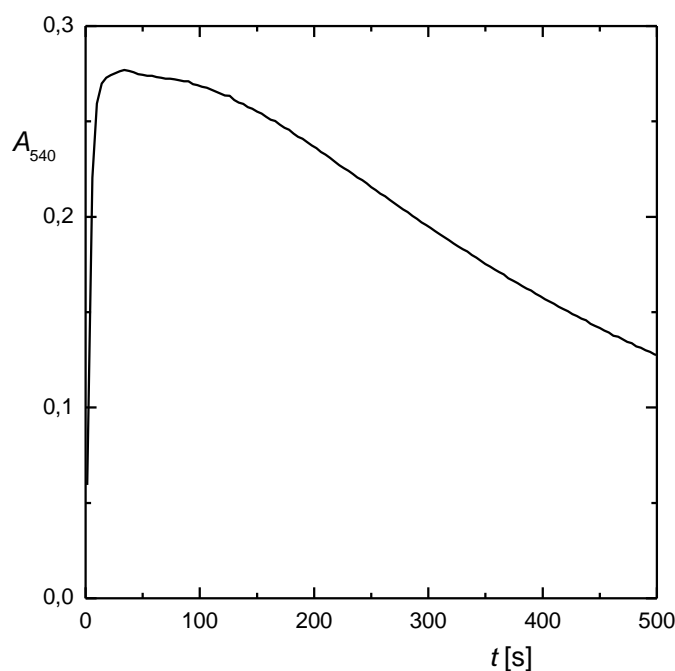


Obr. 4.7 Absorpční spektra produktů reakce standardu sulfamethoxazolu o koncentraci  $1,6 \text{ mg dm}^{-3}$  s činidlem (a) 1-aminonaftalen, (b) NEDA. Křivky: (1) absorpční spektrum produktu reakce, (2) absorpční spektrum roztoku činidla, (3) absorpční spektrum roztoku dusitanu sodného, (4) absorpční spektrum reakce standardu trimethoprimu o koncentraci  $1,6 \text{ mg dm}^{-3}$ . Podmínky:  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.

Při stanovení sulfamethoxazolu ve vzorku tablet Biseptol<sup>®</sup> 480 se ale ukázalo, že vznikající produkt derivatizační reakce je málo časově stabilní. Jak je zřejmé z kinetiky reakce sulfamethoxazolu s činidlem NEDA na obrázku 4.8, za 10 minut klesne absorbance produktu asi na polovinu. Tuto nevýhodu lze ale snadno překonat použitím FIA

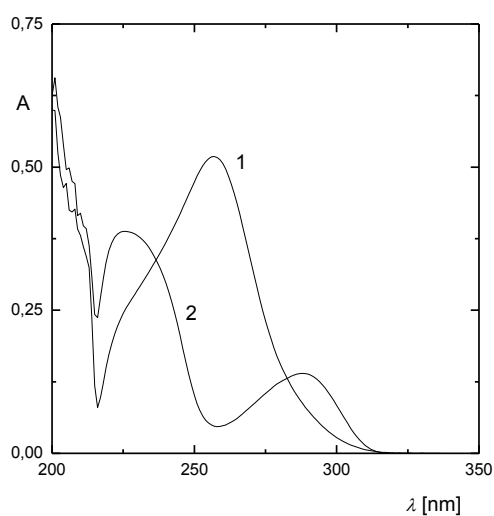


uspořádání, kde je čas od dávkování k detekci velmi přesně reprodukovatelný, takže reakce vždy dosáhne stejného stupně konverze.

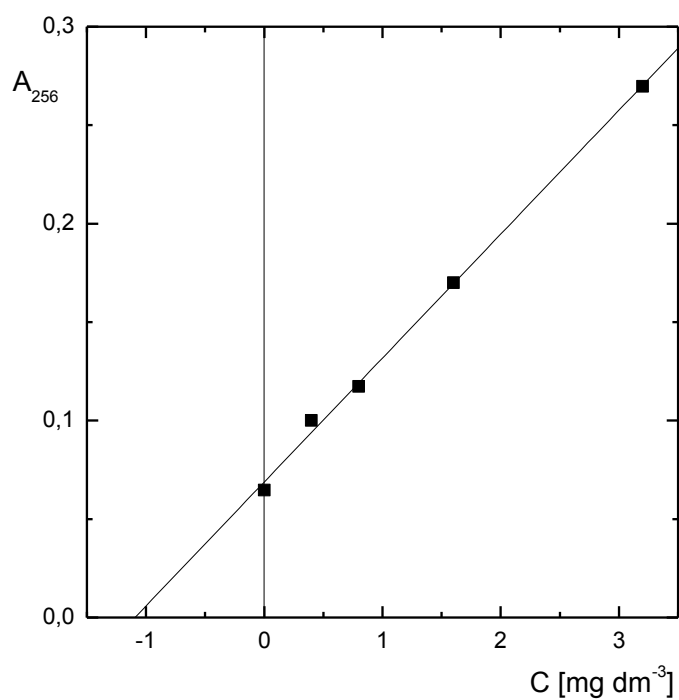


Obr. 4.8 Kinetická studie (změna absorbance s časem) reakce sulfamethoxazolu s činidlem NEDA. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 0,32 \text{ mg dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NEDA}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.

Statické spektrofotometrické stanovení sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480 bylo proto pro porovnávací účely realizováno metodou standardního přidavku v ultrafialové oblasti v prostředí 1M hydroxidu sodného při vlnové délce 256 nm podle literatury [6]. Na obr. 4.9 je znázorněno UV absorpční spektrum sulfamethoxazolu a trimethoprimu v 1M hydroxidu sodném. Do pěti 25 ml odměrných baněk bylo skleněnou pipetou pipetováno vždy 0,50 ml roztoku tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 a takový objem standardního roztoku sulfamethoxazolu, aby po doplnění destilovanou vodou po rysku vznikla řada o výsledné hmotnostní koncentraci 0,00–0,32 mg dm<sup>-3</sup> přidaného sulfamethoxazolu. Získaná závislost je znázorněna na obr. 4.10. Metodou standardního přidavku bylo v analyzovaném vzorku tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 nalezeno 437±21 mg, což je v dobré shodě s deklarovaným obsahem, který je (včetně intervalu povoleného lékopisem) 400±20 mg. Procentuální poměr nalezeného a deklarovaného obsahu sulfamethoxazolu je 108 %.



Obr. 4.9 Absorpční spektrum (1) sulfamethoxazolu a (2) trimethoprimu v prostředí 0,1M hydroxidu sodného. Podmínky:  $C(\text{látky}) = 0,64 \text{ mg dm}^{-3}$ , měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.



Obr. 4.10 Závislost absorbance na hmotnostní koncentraci standardního přídatku sulfamethoxazolu při stanovení obsahu sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480 metodou standardního přídatku v ultrafialové oblasti v prostředí 1M hydroxidu sodném při vlnové délce 256 nm, měřeno v kyvetě optické dráhy 1 cm.

#### 4.2.2 FIA stanovení

*Faktorová analýza.* Stanovení sulfamethoxazolu ve FIA uspořádání bylo realizováno v aparatuře navržené v kap. 2.3. Pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy byly, pro obě činidla, optimalizovány vlivy tří proměnných: průtoková rychlost (faktor A), dávkovaný objem vzorku (faktor B) a délka reakční cívky (faktor C). Zvolené nejvyšší a nejnižší mezní hodnoty (úrovně) studovaných faktorů uvádí tabulka 4.6. Koncentrace standardu sulfamethoxazolu byla při optimalizaci konstantní, a to  $2,00 \text{ g dm}^{-3}$ , bylo měřeno při optimální vlnové délce, tj. pro 1-aminonaftalen  $515 \text{ nm}$  a pro NEDA  $540 \text{ nm}$ . Za analytický signál byla zvolena plocha píků. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4.7.

Tabulka 4.6 Sledované parametry při pro optimalizaci spektrofotometrického FIA stanovení sulfamethoxazolu a jejich zvolené úrovně.

faktor	parametr	hladina	úroveň
A	průtoková rychlost	–	$1,25 \text{ ml min}^{-1}$
		+	$3,75 \text{ ml min}^{-1}$
B	dávkovaný objem vzorku	–	$30 \mu\text{l}$
		+	$100 \mu\text{l}$
C	délka reakční cívky	–	$20 \text{ cm}$
		+	$100 \text{ cm}$

Tabulka 4.7 Plochy FIA píků produktu reakce sulfamethoxazolu a 1-aminonaftalenu/NEDA v závislosti na hladinách sledovaných faktorů. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

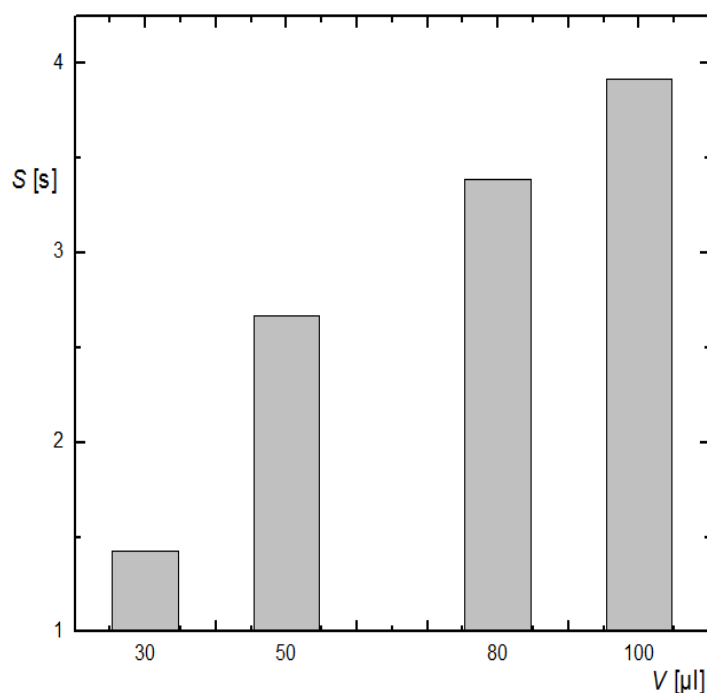
úrovně hladin			S [s]	
A	B	C	1-aminonaftalen	NEDA
–	–	–	1,38	1,78
+	–	–	0,83	0,85
–	+	–	3,52	5,50
–	–	+	0,00	2,00
+	+	–	1,20	2,40
+	–	+	0,00	1,24
–	+	+	2,99	5,65
+	+	+	0,85	2,21

Významnost jednotlivých úrovní studovaných parametrů i jejich vzájemných kombinací byla zhodnocena výpočtem váhy faktoru  $w_i$  na hladině pravděpodobnosti 0,05. Jak plyne z hodnot faktorů, uvedených v tabulce 4.8, je pro činidlo 1-aminonaftalen nejvýznamnějším faktorem dávkovaný objem vzorku (tj. faktor B), při stanovení s činidlem NEDA se pak nejvýrazněji projevuje kombinace průtokové rychlosti a dávkovaného objemu vzorku (tj. faktor AB). Pro další měření byly tedy tyto faktory dále optimalizovány.

Tabulka 4.8 Váhy faktorů  $w_i$  pro jednotlivé studované faktory a kombinace těchto faktorů při spektrofotometrickém FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s činidly 1-aminonaftalem nebo NEDA. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

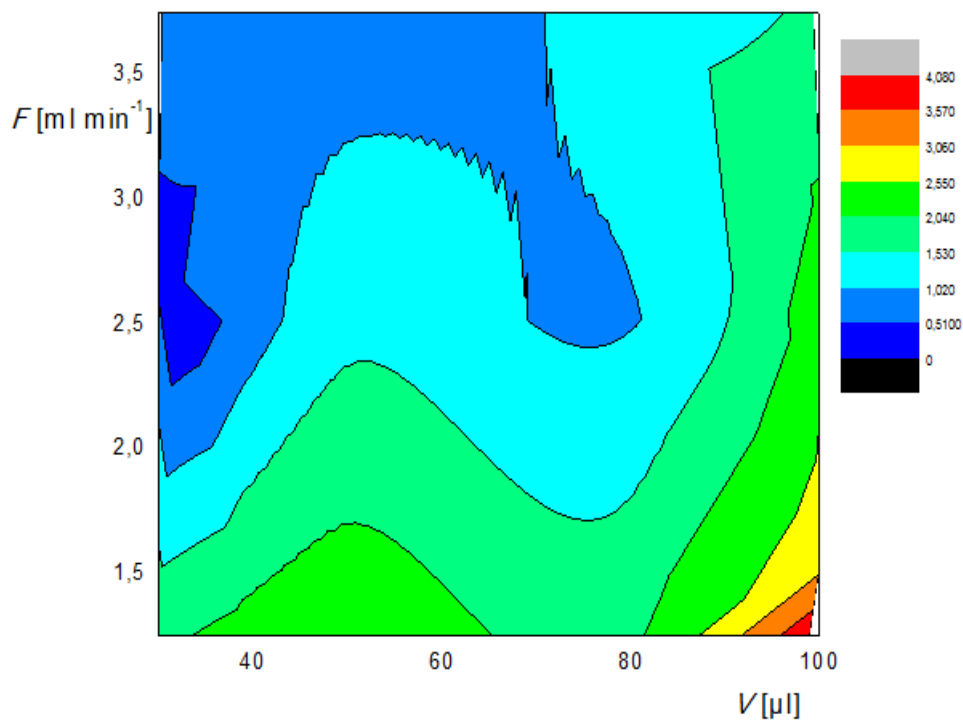
faktor / kombinace	$w_i$	
	1-aminonaftalen	NEDA
A	-1,25	-2,06
B	1,59	2,47
C	-0,77	0,14
AB	-0,97	-1,21
AC	0,19	-0,04
BC	0,33	-0,16
ABC	-0,09	-0,13

Pro FIA stanovení sulfamethoxazolu založeného na reakci s 1-aminonaftalem byl na základě faktorového pokusu optimalizován dávkovaný objem vzorku v rozmezí 30–100  $\mu\text{l}$ . Byly měřeny celkem čtyři hodnoty objemů, a to: 30, 50, 80 a 100  $\mu\text{l}$ . Faktor A, tedy průtok nosných činidel byl nastaven na hodnotu 1,25  $\text{ml min}^{-1}$  a faktor C, tj. délka reakční cívky, byl nastaven na hodnotu 20 cm. Na obrázku 4.11 je znázorněna velikost plochy FIA píku v závislosti na dávkovaném objemu vzorku. Z této závislosti plyne, že nejvhodnější hodnotou dávkovaného objemu vzorku je 100  $\mu\text{l}$ . Tato hodnota faktoru B byla použita pro změření kalibrační závislosti pro FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s 1-aminonaftalem.



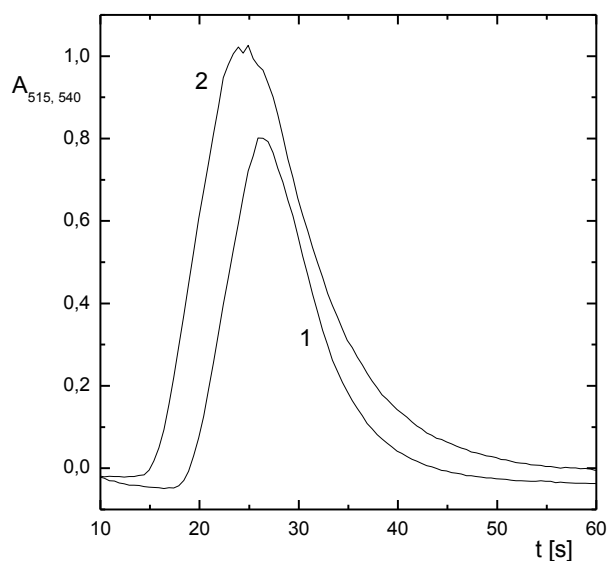
Obr. 4.11 Vliv dávkovaného objemu vzorku na velikost odezvy při optimalizaci parametrů FIA stanovení sulfamethoxazolu s 1-aminonaftalenem. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(1\text{-aminonaftalen}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F = 1,25 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $l_{\text{RC}} = 100 \text{ cm}$ ,  $\lambda = 515 \text{ nm}$ .

Pro FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s NEDA bylo na základě faktorového pokusu nutné optimalizovat kombinaci průtokové rychlosti a dávkovaného objemu vzorku. Průtok byl sledován v rozmezí  $1,25\text{--}3,75 \text{ ml min}^{-1}$ , bylo měřeno celkem pět rychlostí, a to  $1,25$ ;  $1,75$ ;  $2,5$ ;  $3,0$  a  $3,75 \text{ ml min}^{-1}$ . Dávkovaný objem vzorku byl měřen v rozmezí  $30\text{--}100 \mu\text{l}$ , konkrétně byly změřeny čtyři délky  $30$ ,  $50$ ,  $80$  a  $100 \mu\text{l}$ . Faktor C, tedy délka reakční cívky, byl nastaven na hodnotu  $40 \text{ cm}$ . Vliv obou sledovaných parametrů na velikost odezvy detektoru je uveden na obr. 4.12, ze kterého plyne, největší plochy píků byly dosaženy při průtoku nosného proudu  $1,25 \text{ ml min}^{-1}$  a při dávkovaném objemu  $100 \mu\text{l}$ . Tyto hodnoty byly zvoleny za optimální pro změření kalibrační závislosti pro FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s NEDA.



Obr. 4.12 Vliv rychlosti průtoku nosného proudu a dávkovaného objemu vzorku na velikost odezvy při optimalizaci parametrů FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s NEDA. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 2,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{čínidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l_{\text{RC}} = 40 \text{ cm}$ ,  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

*Kalibrační závislosti.* Stanovení sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480 ve FIA uspořádání bylo realizováno metodou kalibrační závislosti. Pro každé z číidel (1-amino-naftalen, NEDA) byly použity výše optimalizované parametry FIA stanovení. Pro ilustraci je na obr. 4.13 znázorněno porovnání FIA píků pro jednotlivá čínidla.



Obr. 4.13 Záznam FIA piků při stanovení sulfamethoxazolu reakcí s (1) 1-aminonaftalenem a (2) NEDA. Podmínky:  $C(\text{sulfamethoxazol}) = 1,00 \text{ g dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{činidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Za optimalizovaných podmínek byly proměřeny závislosti plochy píku na koncentraci standardu sulfamethoxazolu a sestrojeny kalibrační závislosti v rozsahu výsledných hmotnostních koncentrací standardu sulfamethoxazolu  $10\text{--}125 \text{ mg dm}^{-3}$ . Kalibrační závislosti jsou uvedeny na obr. 4.14. Tyto závislosti lze popsat rovnicemi

a) pro činidlo 1-aminonaftalen

$$S = 0,118 C + 0,6 \quad (4.3)$$

$$r = 0,9998$$

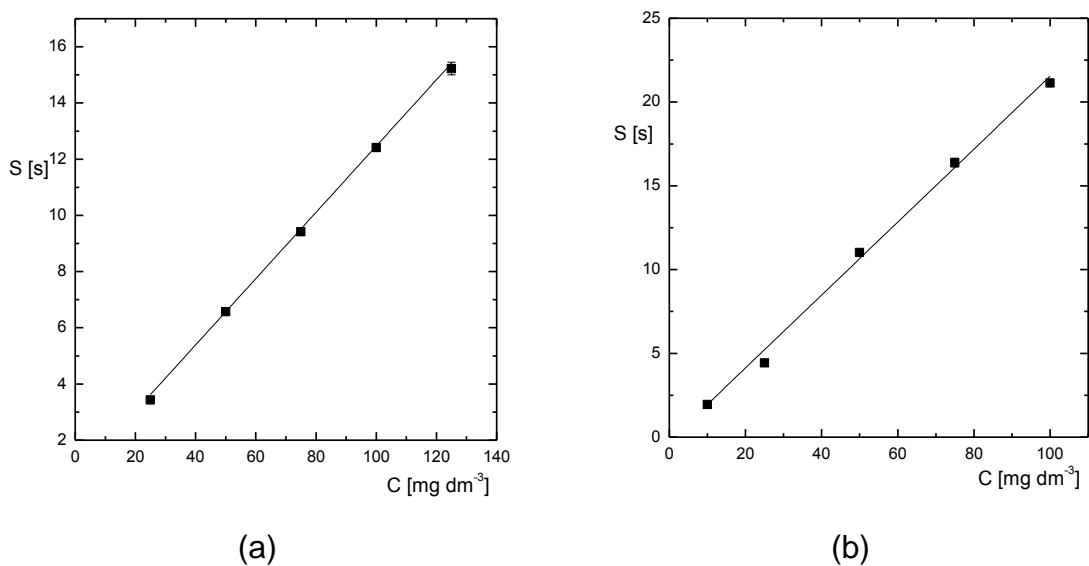
kde  $S$  je plocha FIA píku [s], a  $C$  je hmotnostní koncentrace sulfamethoxazolu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ].

b) pro činidlo NEDA

$$S = 0,219 C + 0,5 \quad (4.4)$$

$$r = 0,9982$$

kde  $S$  je plocha FIA píku [s], a  $C$  je hmotnostní koncentrace sulfamethoxazolu [ $\text{mg dm}^{-3}$ ].



Obr. 4.14 Kalibrační závislost plochy FIA píku na hmotnostní koncentraci standardního roztoku sulfamethoxazolu při FIA stanovení sulfamethoxazolu reakcí s (1) 1-aminonaftalenem a (2) NEDA. Podmínky:  $c(\text{čínidlo}) = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{NaNO}_2) = 8,70 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Následně byla proměřena plocha FIA píku pro roztok tablety Biseptol<sup>®</sup> 480 a odečtena hodnota jeho koncentrace. Výsledky stanovení uvádí tab. 4.9, ze které je patrná dobrá shoda mezi nalezeným a deklarovaným obsahem sulfamethoxazolu pro obě činidla. Ze směrnice a statistických parametrů kalibračních závislostí plyne, že stanovení s činidlem NEDA je citlivější, preciznost stanovení s oběma činidly je srovnatelná.

Tabulka 4.9 Výsledky FIA stanovení sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480: nalezený obsah sulfamethoxazolu s intervalem spolehlivosti, deklarovaný obsah sulfamethoxazolu v přípravku s intervalem povoleným lékopisem a procentuální podíl nalezeného sulfamethoxazolu k deklarovanému obsahu.

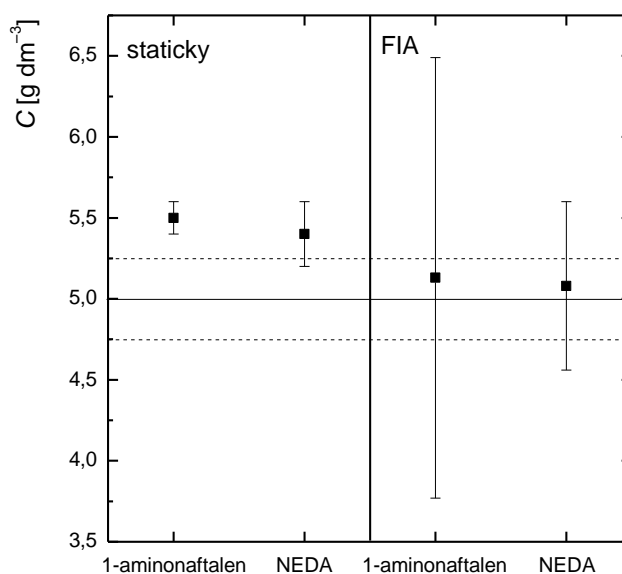
čínidlo	nalezený obsah [mg]	deklarovaný obsah [mg]	$x$ [%]
1-aminonaftalen	392±43	400±20	98,1
NEDA	414±50,4	400±20	104,0



### 4.3 Diskuse

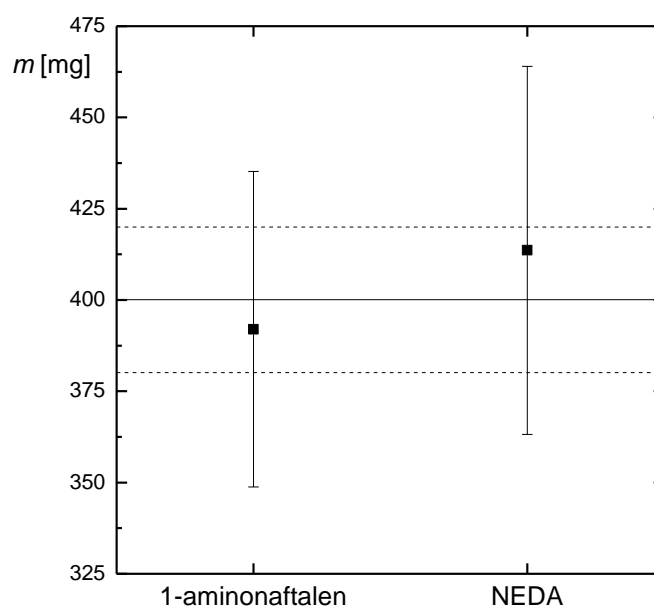
Pro stanovení prokain hydrochloridu a sulfamethoxazolu byla vybrána dvě činidla (1-aminonaftalen a NEDA), se kterými tyto analyty tvoří, po své přeměně na diazoniovou sůl, barevný produkt na základě kopulační reakce. Z hlediska praktického využití je činidlo NEDA výhodnější, lépe se s ním manipuluje a odpadá i problém s nepříjemným zápachem oproti práci s 1-aminonaftalenum. Ze zdravotního hlediska jsou obě činidla zdraví škodlivá, ale nebyla u nich zatím prokázána karcinogenita dle IACR [50].

*Prokain.* Vypracovaná, jak statická tak FIA, stanovení se po optimalizaci ukázala jako použitelná pro stanovení prokain hydrochloridu v jeho 0,5% injekčním roztoku. Ve statickém uspořádání bylo citlivější stanovení s použitím 1-aminonaftalenu, zatímco ve FIA módu se jako citlivější ukázala reakce s NEDA. Statická stanovení měla užší interval spolehlivosti než FIA stanovení. Na obr. 4.15 je graficky znázorněna preciznost a pravdivost jednotlivých stanovení.



Obr. 4.15 Grafické porovnání výsledků vypracovaných analytických metod pro stanovení prokain hydrochloridu v 0,5% injekčním roztoku. Výsledky jsou vyjádřeny jako mediány s intervalem spolehlivosti. Silná čára vyjadřuje deklarovaný obsah prokain hydrochloridu, šrafovaná pak dolní a horní mez povoleného obsahu prokain hydrochloridu podle Českého lékopisu.

*Sulfamethoxazol.* Při studiu statického uspořádání stanovení sulfamethoxazolu se ukázalo, že vznikající produkt derivatizační reakce je málo časově stabilní, proto nebylo možné toto stanovení aplikovat na stanovení sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480. Tento problém se podařilo eliminovat převedením do FIA módu, kde je zajištěna reprodukovatelnost času od dávkování k detekci. FIA stanovení se ukázalo jako citlivější s činidlem NEDA, preciznost stanovení je pro obě činidla srovnatelná. Na obr. 4.16 je graficky znázorněna preciznost a pravdivost jednotlivých stanovení.



Obr. 4.16 Grafické porovnání výsledků vypracovaných FIA stanovení pro stanovení sulfamethoxazolu v tabletách Biseptol<sup>®</sup> 480. Výsledky jsou vyjádřeny jako mediány s intervalem spolehlivosti. Silná čára vyjadřuje deklarovaný obsah sulfamethoxazolu, šrafovaná pak dolní a horní mez povoleného obsahu sulfamethoxazolu podle Českého lékopisu.

## 5 Závěr

V diplomové práci byla využita diazotační reakce pro stanovení dvou vybraných analytů, obsahujících v molekule aminovou skupinu (prokain hydrochlorid a sulfamethoxazol). Principem stanovení je převedení analytu na diazoniovou sůl a následná kopulační reakce s činidlem (1-aminonaftalen nebo NEDA) za vzniku spektrofotometricky detegovatelného barevného produktu.

Pro oba studované analyty byly nejprve nalezeny podmínky statického spektrofotometrického stanovení, při nichž se ukázalo, že je lze použít pouze k analýze prokain hydrochloridu, neboť sulfamethoxazol poskytuje časově málo stabilní barevný produkt. Na druhé straně se ukázalo, že přítomnost trimethoprimu (látky, vyskytující se spolu se sulfamethoxazolem v léčivých přípravcích) nemá na stanovení žádný vliv.

Následně byla navržena aparatura pro FIA stanovení, studovány vlivy vybraných parametrů a tyto optimalizovány pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Za optimalizovaných podmínek byly pro oba analyty a obě činidla proměřeny příslušné kalibrační závislosti. Ty byly využity pro stanovení obsahu analytů ve vzorcích léčivých přípravků.

## Literatura

- [1] Lincová, D.; Farghali, H. a ko.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2007.
- [2] Ščigel, V.: *Lokální anestezie v praxi zubního lékaře*. Praha, Quintessenz bibliothek 2004.
- [3] Hampl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2002.
- [4] <http://www.ardeapharma.cz/index.php?navi=4&Prod=23> (cit. 14.4 2016)
- [5] [http://www.lavoisier.com/en/products/drugs/injectable-solutions/procaine-hydrochloride-am-poule\\_66\\_13-4-1.html](http://www.lavoisier.com/en/products/drugs/injectable-solutions/procaine-hydrochloride-am-poule_66_13-4-1.html) (cit. 14.4 2016)
- [6] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortern Material*. 4th Ed. A.C. Moffat; M.D. Osselton; B. Widdop (eds.). London, Pharmaceutical Press 2011.
- [7] *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Vol. 26*. H.G. Brittain (ed.). Academic Press 1999, p. 395–458.
- [8] Xu, L. X.; Shen, Y. X.; Wang, H. Y.; Jiang, J. G.; Xiao, Y.: Spectrometric determination of procaine hydrochloride in pharmaceutical products using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as the chromogenic reagent. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 3103–3110 (2003).
- [9] El-Kommos, M. E.; Emara, K. M.: Spectrophotometric determination of certain local anaesthetics using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone. *Analyst* **112**, 1253–1256 (1987).
- [10] Liu, L. D.; Liu, Y.; Wang, H. Y.; Sun, Y.; Ma, L.; Tang, B.: Use of *p*-dimethylaminobenzaldehyde as a colored reagent for determination of procaine hydrochloride by spectrophotometry. *Talanta* **52**, 991–999 (2000).
- [11] Wei, M.; Zhou, Y.; Zhi, J.; Fu, Y.; Einaga, Y.; Fujishima, A.; Wang, X.; Gu, Z.: Comparison of boron-doped diamond and glassy carbon electrodes for determination of procaine hydrochloride. *Electroanalysis* **20**, 137–143 (2008).
- [12] Wu, K.; Wang, H.; Chen, F.; Hu, S.: Electrochemistry and voltammetry of procaine using a carbon nanotube film coated electrode. *Bioelectrochemistry* **68**, 144–149 (2006).
- [13] Wang, Ch. Y.; Hu, X. Y.; Jin, G. D.; Leng, Z. Z.: Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30**, 131–139 (2002)
- [14] Li, N.; Duan, J.; Chen, G.: Determination of trace procaine hydrochloride by differential pulse adsorptive stripping voltammetry with a nafion modified glassy carbon electrode. *Analytical Sciences* **19**, 1587–1592 (2003).

- [15] Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoini, M. V. B.: Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**, 315–319 (2007).
- [16] Pasekova, H.; Polasek, M.: Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection. *Talanta* **52**, 67–75 (2000).
- [17] Stevenson, A. J.; Weber, M. P.; Todi, F.; Mendonca, M.; Fenwick, J. D.; Young, L.; Kwong, E.; Chen, F.; Beaumier, P.; Timmings, S.; Woodard, D.; Kacew, S.: Determination of procaine in equine plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Toxicology* **16**, 93–96 (1992).
- [18] *Český lékopis 2009*. Praha, Grada 2009.
- [19] *The United States Pharmacopoeia 30. National Formulary 25*. Rockville, United States Pharmacopoeial Convention 2007.
- [20] Slíva, J.; Votava M.: *Farmakologie*. Praha, Triton 2010.
- [21] <http://www.drugs.com/ppa/trimethoprim-sulfamethoxazole-co-trimoxazole.html> (cit. 14.4 2016)
- [22] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0011029> (cit. 14.4 2016)
- [23] *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Vol. 4*. K. Florey (ed.). Academic Press 1975, p. 467–486.
- [24] Amin, A.; El, S.; Mohammed, F.; Edeen, R. E.; Meshref, Mohammed A.: Comparison of ion-pairing and reversed phase liquid chromatography in determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Analytical Letters* **41**, 1878–1894 (2008).
- [25] Brenner, C. G. B.; Mallmann, C. A.; Arsand, C. A.; Mayer, D. R.; Martins, A. F.: Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim and their metabolites in hospital effluent. *CLEAN – Soil, Air, Water* **39** (1), 27–34 (2011).
- [26] Bedor, D.C.G.; Goncalves, T.M.; Ferreira, M.L.L.; de Sousa, C.E.M.; Menezes, A.L.; Oliveira, E.J.; de Santana, D.P.: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis. Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B* **863**, 46–54 (2008).
- [27] Salema, A.A.; Mossab, H.A.; Barsoumb, B.N.: Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 654–661 (2006).
- [28] Rodriguez, M. R.; Pizzorno, M. T.; Albonico, S. M.: NMR determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in tablets and powders. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **66**, 121–123 (1977).
- [29] Turczan, J. W.: Nuclear magnetic resonance analysis of pharmaceuticals : Part XV. Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in combination in tablets. *Analytical Chimica Acta* **92**, 123–128 (1977).
- [30] Gasparič, J.: Analytická derivatizace organických sloučenin. *Chemické listy* **91**, 691–697 (1997).
- [31] McMurry, J.: *Organic Chemistry*. 5th Ed. Pacific Grove, Brooks/Cole 2000.
- [32] Svoboda, J.: *Organická syntéza I*. Praha, VŠCHT 2000.

- [33] [http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.properties&cas\\_number=134-32-7#3](http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.properties&cas_number=134-32-7#3) (cit. 14.4 2016)
- [34] Burns, D. T.; Müller R. K.; Salzer, R.; Werner, G.: *Important Figures of Analytical Chemistry From Germany in Brief Biographies. From the Middle Ages to the Twentieth Century* Springer 2014, p. 66.
- [35] Němcová, I.; Čermáková, L.; Gasparič, J.: *Spectrophotometric Reactions*. New York, Dekker 1996.
- [36] Mennicke, H.: Kritische Studien über die wichtigsten Reagentien zum Nachweis der salpetrigen Säure im Wasser. *Angewandte Chemie* **13**, 711–719 (1900). *Chem. Abstr.* **0**:210618
- [37] Cain, J. C.: *The Chemistry of the Diazo-Compounds*. London, Arnold 1908.
- [38] Irandoust, M.; Shariati-Rad, M.; Haghighi, M.: Nitrite determination in water samples based on a modified Griess reaction and central composite design. *Analytical Methods* **5**, 5977–5982 (2013).
- [39] Shariati-Rad, M.; Irandoust, M.; Mohammadi, S.: Spectrophotometric determination of nitrite in water using cafixime and central composite design. *Spectrochimica Acta Part A* **149**, 190–195 (2015).
- [40] Moon, K.; Katolkar, P.; Khadabadi, S. S.: In vitro antioxidant activity of methanolic extract of *Erythrina indica*. *Der Pharmacia Lettre* **2**, 16–20 (2010).
- [41] Ebrahimzadeh, M. A.; Nabavi, S. M.; Nabavi, S. F.; Bahramian, F.; Bakhradnia, A. R.: Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis L. var. angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 29–34 (2010).
- [42] Amer, A. Al-Hatim; Batool, B. Ibraheem: Spectrophotometric determination of 1-naphtylamine in aqueous solution by coupling with diazotized 4-aminobenzophenone. *Analytical Letters* **22**, 2091–2103 (1989).
- [43] Muradov, N. Z.: Spectrophotometric method for nitroglycerine analysis in air. *Environmental Science & Technology* **28**, 388–393 (1994).
- [44] Ohta, T.; Goto, N.; Takitani, S.: Spectrophotometric determination of *N*-nitroso compounds by flow injection analysis. *Analyst* **113**, 1333–1335 (1988).
- [45] Seyda, A.; Woy, R.: Über den Nachweis von Salpetersäure in Leichenteilen. *Zeitschrift für öffentliche Chemie* **3**, 487–493 (1897). *Chem. Abstr.* **0**:26844.
- [46] Bratton, A. C.; Marshall, E. K., Jr.; Babbitt, D.; Hendrickson, A. R.: A new coupling component for sulfanilamide determination. *Journal of Biological Chemistry* **128**, 537–550 (1939).
- [47] Růžička J., Hansen E. H.: Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **78**, 145–157 (1975).
- [48] Stewart K. K.: Flow-injection analysis. A review of its early history. *Talanta* **28**, 789–797 (1981).
- [49] Miller, J. N.; Miller, J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th Ed. Pearson Education 2010.
- [50] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do> (cit. 14.4 2016)