

Spektrofotometrijsko određivanje bioloških aktivnih tvari u farmaceutskim pripravcima - pregledni rad

Vučetić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:973751>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH AKTIVNIH
TVARI U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA – PREGLEDNI RAD**

ZAVRŠNI RAD

MARIJA VUČETIĆ

Matični broj : 354

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH AKTIVNIH
TVARI U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA – PREGLEDNI RAD**

ZAVRŠNI RAD

MARIJA VUČETIĆ

Matični broj :354

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BIOLOGICALLY
ACTIVE SUBSTANCES IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS - REVIEW**

BACHELOR THESIS

MARIJA VUČETIĆ

Parent number :354

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Marija Bralić

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH AKTIVNIH TVARI U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA - PREGLEDNI RAD

Marija Vučetić, 354

Sažetak:

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija primjenjuje se za kvantitativnu, ali i kvalitativnu analizu. To je najčešće primjenjivana metoda u kemijskim i kliničkim laboratorijima. Temelji se na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari.

Farmaceutici su proizvodi koji se primjenjuju u korist primatelja radi istraživanja ili modifikiranja fizioloških sustava ili liječenja patoloških stanja. Primjenjuju se kako bi se spriječila ili liječila bolest ili simptomi bolesti.

U ovom radu vidljiv je pregled dostupne literature o određivanju bioloških aktivnih tvari u farmaceutskim pripravcima.

Ključne riječi: : spektrometrija, spektrofotometar i farmaceutski pripravci

Rad sadrži: 32 stranice, 12 slika, 4 tablice, 12 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu: izv. prof. dr. sc. Ante Prkić
prof. dr.sc. Josipa Giljanović
prof. dr. sc. Marija Bralić

Datum obrane: 24. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by 28 Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.

Mentor: Full profesor, PhD. Marija Bralić

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS – REVIEW

Marija Vučetić, 354

Abstract:

Ultraviolet and visible absorption spectroscopy is used for quantitative as well as qualitative analysis. It is the most commonly used method in chemical and clinical laboratories. It is based on dependence of radiation energy and chemical composition of matter.

Pharmaceutical preparations are substances used in favor of primary radiological researches, modification of physiological systems or treatment of pathological conditions. They are used to prevent or to treat diseases and its symptoms.

This bachelor thesis provides an overview of the available literature on the determination of biologically active substances in pharmaceutical preparations.

Keywords: spectrometry, spectrophotometer and pharmaceutical preparations

Thesis contains: 32 pages, 12 figures, 4 tables, 12 references

Original in: Croatian

Defence Committee:

1. associate prof. PhD Ante Prkić
2. full. prof. PhD Josipa Giljanović
3. full prof. PhD Marija Bralić supervisor

Defence date: September 24th 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za kemiju okoliša, Kemijsko – tehnološkoga fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof.dr.sc. Marije Bralić, u razdoblju od svibnja do rujna 2020. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Bralić na stručnim savjetima i pomoći pri izradi ovog Završnog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i pruženoj podršci tijekom cijelog studija koji su vjerovali u mene i onda kada ja nisam.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Pregledati literaturu razvoja spektrofotometrijskog određivanja biološki aktivnih tvari u farmaceuticima.

SAŽETAK

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija primjenjuje se za kvantitativnu, ali i kvalitativnu analizu. To je najčešće primjenjivana metoda u kemijskim i kliničkim laboratorijima. Temelji se na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari.

Farmaceutici su proizvodi koji se primjenjuju u korist primatelja radi istraživanja ili modificiranja fizioloških sustava ili liječenja patoloških stanja. Primjenjuju se kako bi se spriječila ili liječila bolest ili simptom bolesti.

U ovom radu vidljiv je pregled dostupne literature o određivanju biološki aktivnih tvari u farmaceutskim pripravcima.

Ključne riječi: spektrometrija, spektrofotometar i farmaceutski pripravci

SUMMARY

Ultraviolet and visible absorption spectroscopy is used for quantitative as well as qualitative analysis. It is the most commonly used method in chemical and clinical laboratories. It is based on dependence of radiation energy and chemical composition of matter.

Pharmaceutical preparations are substances used in favor of primary radiological researches, modification of physiological systems or treatment of pathological conditions. They are used to prevent or to treat diseases and its symptoms.

This bachelor thesis provides an overview of the available literature on the determination of biologically active substances in pharmaceutical preparations.

Keywords: spectrometry, spectrophotometer and pharmaceutical preparations

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Farmaceutici | 3 |
| 1.2. Spektrometrija | 6 |
| 1.3. Elektromagnetski spektar | 8 |
| 1.4. Apsorpcijske spektrometrije..... | 9 |
| 1.5. Osnovni princip rada spektrofotometra..... | 11 |
| 2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE NEKIH 1,4 - DIHIDROPIRIDINSKIH LIJEKOVA U NJIHOVIM FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA | 14 |
| 2.1. FARMAKOLOŠKI PRIPRAVCI KOJI SADRŽE 1,4-DIHIDROPIRIDINSKU STRUKTURU..... | 16 |
| 2.1.1. Cordipin retard 20 mg tablete s produljenim oslobađanjem..... | 16 |
| 2.1.2. Nimotop s 10 mg/50 ml otopina za infuziju | 16 |
| 2.1.3. Nimotop s 30 mg filmom obložene tablete..... | 17 |
| 3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA B6 | 21 |
| 4. RASPRAVA | 27 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 29 |
| 6. LITERATURA | 31 |

UVOD

UVOD

Još sredinom devetnaestog stoljeća, Kirchhoff i Bunsen prvi su radili rana spektroskopska istraživanja na spektrometru koji je sadržavao više od jedne prizme. Istraživanjem su dokazali da svaki element emitira karakterističan spektar zračenja koji se može opaziti, zabilježiti i mjeriti. Uspjeli su utvrditi da se svjetle linije u emisijskim spektrima elemenata točno podudaraju s tamnim linijama u Sunčevom spektru. Zaključili su da isti elementi koji emitiraju na Zemlji apsorbiraju svjetlost na Suncu. Kao posljedica toga postavljena je općenita teorija emisije i zračenja poznata kao Kirchhoffov zakon koji govori da je sposobnost tvari za emisiju svjetla ekvivalentna njezinoj sposobnosti za apsorpciju pri istoj temperaturi. Kirchhoffovim zakonima rastumačena je spektralna analiza pa danas poznajemo kontinuirani, emisijski i apsorpcijski spektar. Danas Kirchhoffa i Bunsena smatramo utemeljiteljima spektrometrije kao instrumentalne analitičke metode.

1. OPĆI DIO

1.1. Farmaceutici

Farmaceutici su proizvodi koji se primjenjuju u korist primatelja radi istraživanja ili modificiranja fizioloških sustava ili liječenja patoloških stanja. Primjenjuju se kako bi se spriječila ili liječila bolest ili simptom bolesti.

U farmakopeji kao službenoj državnoj literaturi nalaze se upute za izradu lijekova, njihovo prepoznavanje, ispitivanje kvalitete, upute za doziranje i čuvanje te popis svih službeno odobrenih ljekovitih supstanci.

S obzirom na podrijetlo, farmaceutici se dijele na prirodne koji mogu biti biljnog, životinjskog i mineralnog podrijetla te na umjetno dobivene farmaceutike.

Osnovni sastojak svakog lijeka je aktivna supstancija koja određuje vrstu farmakološke aktivnosti. Aktivna supstancija je organski spoj različite strukture koji određuje interakciju s proteinima i drugim molekulama u organizmu. Svaka aktivna supstancija dobiva se kemijskom sintezom koja se, ovisno o složenosti molekule, može sastojati od jednog do nekoliko desetaka stupnjeva. Jedna od temeljnih postavki farmakologije je da molekule lijeka moraju imati nekakav kemijski učinak na jednu ili više sastavnica stanice kako bi dovele do farmakološkog odgovora.¹

Potrebna je neravnomjerna raspodjela molekula lijeka po tijelu ili tkivima kako bi došlo do farmakološkog učinka jer molekule u organizmu svojim brojem uvelike nadmašuju broj molekula lijeka. Molekule lijeka moraju se "vezati" za odgovarajuću sastavnicu stanica ili tkiva kako bi bilo učinka. Za većinu lijekova dolazi do učinka nakon vezanja, uglavnom za molekule proteina.¹

Molekule lijeka mogu se gibati po tijelu volumskim prijenosom, tj. krvotokom ili prijenosom difuzijom. Međutim, kako bi došlo do apsorpcije, molekule moraju proći kroz stanične membrane na četiri glavna načina :

- difuzijom izravno kroz lipide
- difuzijom kroz vodene pore od posebnih proteina (akvaporini) koji presijecaju lipidni sloj
- pomoću transmembranskih proteina prijenosnika koji vežu molekule na jednoj strani membrane, nakon čega promijene konformaciju i otpuste molekulu na drugoj strani membrane
- pinocitozom (umetanje dijela stanične membrane i stvaranje u stanici malih vezikula koje su ispunjene izvanstaničnim sadržajem)

Farmakokinetika prati promjene koncentracije lijeka u različitim djelovima tijela kao funkciju vremena i to u tijeku i nakon primjene lijeka time se razlikuje od farmakodinamike. Na koncentraciju lijeka imaju utjecaj procesi apsorpcije, raspodjele, metamobilizma i izlučivanja. U mnogim lijekovima opadanje koncentracije u plazmi je eksponencijalno i određeno je poluvijekom lijeka u plazmi. Poluvijek u plazmi, u jednostavnim slučajevima je upravo proporcionalan s volumenom raspodjele.²

Mnogi klinički važni lijekovi su mješavine stereoizomera koji se razlikuju, ne samo u farmakološkoj aktivnosti, nego i u svom metabolizmu koji može ići potpuno različitim putevima. Nekoliko važnih interakcija lijekova uključuje stereospecifičnu inhibiciju metabolizma jednog lijeka drugim lijekom. U nekim slučajevima čini se kako je toksičnost lijeka uglavnom povezana s jednim stereoizomerom koji i ne mora biti farmakološki aktivan.²

Pri korištenju farmaceutskih pripravaka treba imati na umu da se učinak jednog pripravka može smanjiti ili potpuno poništiti u prisutnosti drugog, što predstavlja antagonizam. Primjerice kemijski antagonizam javlja se pri kombinaciji tvari u otopinama, a rezultat je gubitak aktivnosti lijeka.¹

Osnovni princip svih farmaceutskih pripravaka je da budu neškodljivi i djelotvorni, da imaju propisanu kvalitetu i da se zdravstvenim radnicima i javnosti daju informacije o njihovom djelovanju. Neškodljivost i djelotvornost lijekova provjerava se prvo farmakološkim ispitivanjima, a zatim kliničkim ispitivanjima na volonterima ili bolesnicima. Propisana kvaliteta lijeka se ispituje laboratorijski, određivanjem kvalitativnog i kantitativnog sastava lijeka, specifičnog i osnovnog onečišćenja, sterilnosti i apirogenosti.

Proizvođač je dužan provesti detaljna ispitivanja stabilnosti preparata jer problemi mogu biti različiti zbog ovisnosti o klimatskim promjenama (temperatura, vlažnost). Klimatski uvjeti uječu ne samo na aktivne sastojke već i na farmakološka svojstva. Također, nužna je detaljna informacija o načinu skladištenja lijeka. Sva dokumentacija mora sadržavati podatke o promjenama koje je moguće očekivati na aktivnoj supstanci. Sve analitičke metode koje se koriste za ispitivanje stabilnosti moraju biti opisane te metode moraju biti dovoljno selektivne da bi se uočile promjene.

Laboratorijska ispitivanja lijekova vrše se u zavodima za ispitivanje i kontrolu lijekova, odgovarajućim laboratorijima medicinskih, farmaceutskih i veterinarskih fakulteta i drugim znanstvenim institutima koji imaju odobrenje za takva ispitivanja.²

1.2. Spektrometrija

Spektrometrija kao grana analitičke kemije daje informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju odjeljivanja izazvanih energetske promjenama u atomskim jezgrama. Energija može biti kemijska, toplinska ili energija elektromagnetskog zračenja. Interakcija energije s uzorkom može se odvijati na razini atoma ili molekule pa govorimo o atomskoj odnosno molekularnoj spektrometriji. Spektrometrijom se mjeri intenzitet izdvojenih dijelova nekog zračenja u ovisnosti o nekom njegovom svojstvu (energiji, valnoj duljini, frekvenciji). Postoje različite vrste zračenja koje mogu stupiti u interakciju s uzorkom kao što su fotoni, elektroni, protoni, ioni i neutroni. Prema vrsti mehanizama u spektrometriji se mogu odvijati apsorpcija, inducirana apsorpcija, raspršenje, odbijanje i refleksija. U spektrometrijskoj analizi dominantne su emisijske i apsorpcijske tehnike.³

Atomska spektrometrija koja objedinjuje apsorpcijsku i emisijsku spektrometriju, temelj je određivanja kemijskih elemenata. U atomskoj emisijskoj spektrometriji položaj linije u spektru karakterističan je za atome određenog elementa, a intenzitet linije za njegovu koncentraciju. Tako se karakteristične emisijske linije alkalijskih i zemnoalkalijskih elemenata pojavljuju u vidljivom dijelu. Elementi se analiziraju i drugim spektrometrijskim tehnikama, kao što je rendgenska fluorescencijska spektrometrija. Kemijski spojevi analiziraju se uglavnom tehnikama molekularne spektrometrije. Tako se ultraljubičastom i vidljivom spektrometrijom određuju funkcijske skupine, dok infracrvena i spektrometrija nuklearne magnetske rezonancije daje podatke o strukturi molekule.⁴

Većina spektrometrijskih tehnika odvija se elektromagnetskim zračenjem koje se kroz prostor prenosi najvećom mogućom brzinom, a njegova svojstva opisana su valnom i korpuskularnom prirodom kao čestica, tj. foton.

Prvi prijedlog kvantne teorije postavio je Planck i time objašnjava svojstva zračenja koje emitira ugrijano tijelo. Postavio je kvantnu teoriju diskontinuiranosti energije što znači da užareno tijelo može emitirati ili apsorbirati samo višekratnik od određenog najmanjeg kvantuma energije zračenja, koji je za svaki broj titraja u sekundi (ν) različit i njemu proporcionalan, a to je kvant energije.

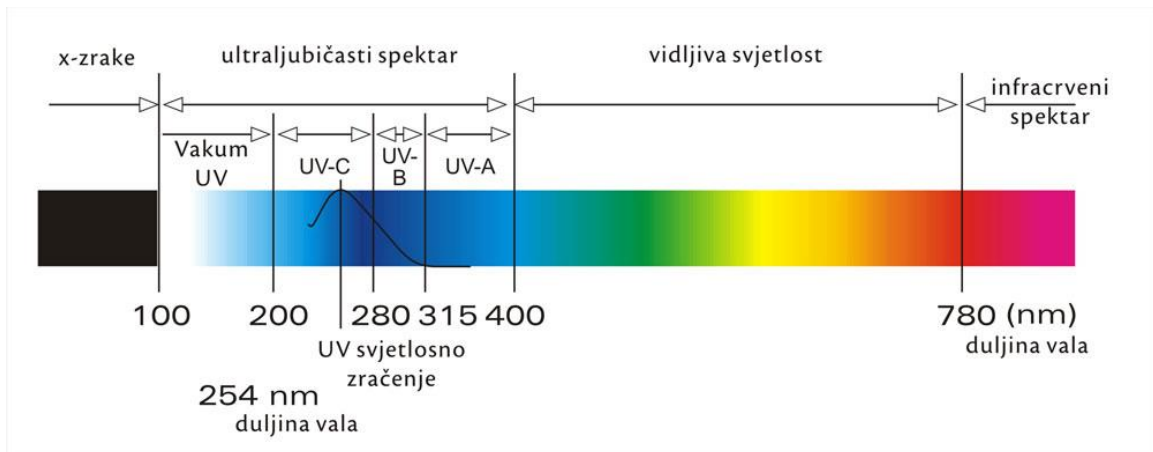
$$E = h \cdot \nu$$

$$h = 6,6 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

Elektromagnetski valovi su drugačiji od drugih valova. Putuju kao čestice određene valne duljine i imaju energiju čija snaga ovisi o frekvenciji. Dualne su prirode te se pri širenju kroz prostor ponašaju kao valovi, a pri interakciji s materijom kao čestice.⁵

1.3. Elektromagnetski spektar

Sami spektar elektromagnetskog zračenja dijeli se na više dijelova. Općenito se dijeli na gama zračenje, rendgensko zračenje, ultraljubičasto zračenje, vidljivu svjetlost, infracrveno zračenje, mikrovalno zračenje i radiovalove.⁶



Slika 1 Prikaz spektra elektromagnetnog zračenja

Sami princip se odvija tako da vidljivi dio elektromagnetskog zračenja prolazi kroz neku obojenu supstancu te se dio zračenja apsorbira. Preostali dio koji prođe kroz supstancu predstavlja komplementarnu boju apsorbiranom području valnih duljina i to je boja koju vidimo. Dok kod neprozirnih supstanci boja koju vidimo predstavlja reflektirani dio upadnog zračenja.⁶

1.4. Apsorpcijske spektrometrije

Intenzitet elektromagnetskog zračenja se smanjuje prolaskom kroz otopinu koja može apsorbirati zračenje.

Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c) koja apsorbira zračenje, debljini sloja (b), molarnom apsorpcijskom koeficijentu (ϵ) koji je specifičan za svaku određenu tvar i pritom se mijenja valnom duljinom.

Odnos intenziteta prije i poslije prolaza kroz uzorak definiran je Lambert-Beerovim zakonom koji vrijedi samo za zračenje određene valne duljine i niske koncentracije.

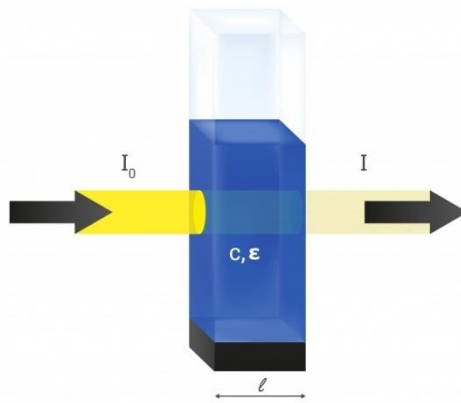
$$\log I_0/I = A = \epsilon \times b \times c$$

ϵ = molarna apsorptivnost ili molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$)

Ako je više komponenti (1, 2, ..., n) koje apsorbiraju zračenje na određenoj valnoj duljini prisutno u uzorku, tada je ukupna apsorpcija:

$$A = (\epsilon_1 \cdot b \cdot c_1) + (\epsilon_2 \cdot b \cdot c_2) + \dots$$

Eksperimentalna ispitivanja izvode se mjerenjem transmitancije (T) koja predstavlja dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu, izraženu u postocima.⁷



Slika 2 Prikaz upadne zrake svjetlosti kroz kivetu

$$T = \frac{I}{I_0}$$

I = intenzitet propuštenog zračenja kroz uzorak

I_0 = intenzitet ulaznog zračenja

Odnos apsorbancije i transmittancije :

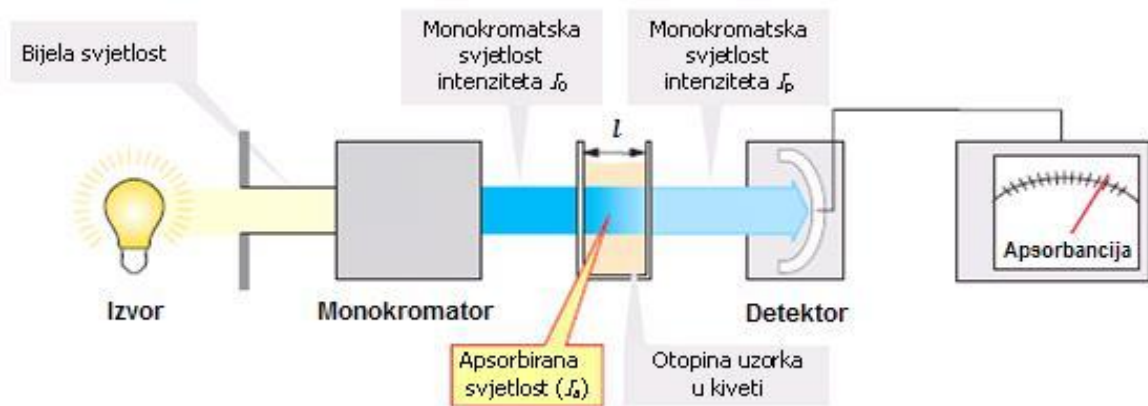
$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Ograničenja Beerova zakona

Međutim treba pripaziti da su moguća i ograničenja Beerova zakona pri relativno koncentriranim otopinama uzoraka. Pri visokim koncentracijama većim od 10^{-2} mol L^{-1} dolazi do odstupanja od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji.⁶

1.5. Osnovni princip rada spektrofotometra

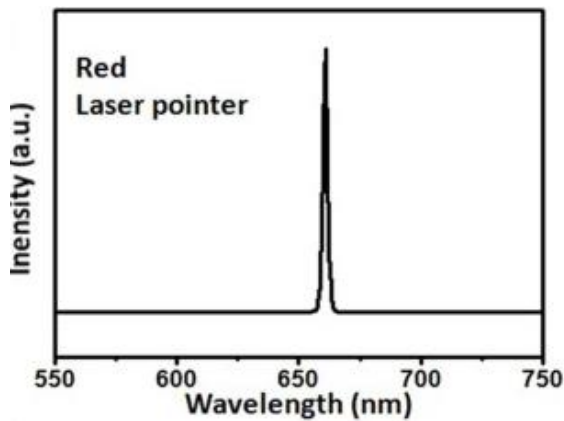
Za točno određivanje spektra elektromagnetskog zračenja koristi se spektrofotometar koji mjeri apsorbanciju. Kada svjetlo prođe kroz otopinu, dio zračenja se apsorbira, a dio prolazi kroz otopinu. Cilj spektrofotometra je izmjeriti neapsorbirano zračenje koje je prošlo kroz analizirani uzorak i usporediti ga sa intenzitetom ulazne svjetlosti. Mjerenjem apsorbancije, transmancije i određivanjem koncentracije možemo odrediti koncentraciju analita u ispitivanoj otopini pomoću Lambert–Beerovog zakona. Pripremljene otopine uzoraka uvijek se stavljaju u staklenu ili plastičnu kivetu, ako se mjerenje vrši u vidljivom dijelu spektra. Dok se kvarcne kivete koriste za mjerenje u UV dijelu spektra. UV/VIS spektrofotometar koristi svjetlost u ultraljubičastom dijelu (185 nm - 400 nm) i vidljivom dijelu (400 nm - 700 nm) spektra elektromagnetskog zračenja.⁷



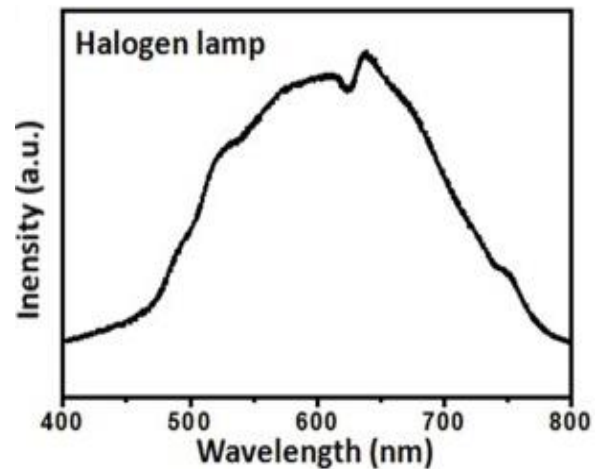
Slika 3 Osnovni dijelovi spektrofotometra

Izvor elektromagnetskog zračenja

Postoje dva osnovna tipa izvora elektromagnetskog zračenja, a to su kontinuirani i linijski izvori. Za kontinuirane izvore je karakteristično široko područje valne duljine, dok su za linijske izvore određuju pojedinačne valne duljine.⁶



Slika 4 Ispis linijskih izvora



Slika 5 Ispis kontinuiranih izvora

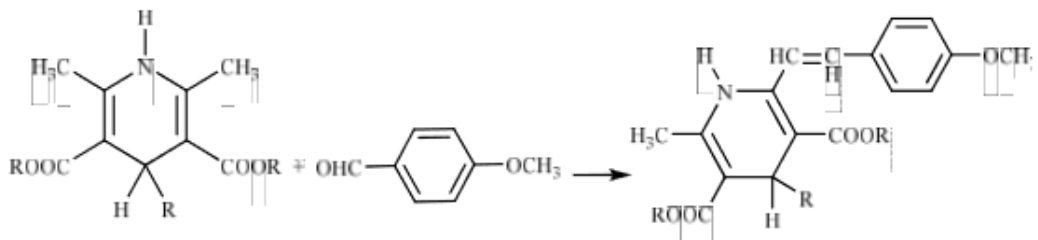
Tablica 1 Popis izvora zračenja s pripadajućim valnim duljinama

| | IZVOR ZRAČENJA | VALNO PODRUČJE, nm |
|------------------------|------------------------------|--------------------|
| KONTINUIRANI IZVORI | Ksenonova lampa | 250 - 600 |
| | Halogena i deuterijeva lampa | 160 - 380 |
| | Volfram / halogen žarulja | 240 - 2500 |
| | Nerstov štapić | 400 – 20 000 |
| LINIJSKI IZVORI | Lampa sa šupljom katodom | UV / VIS |
| | Lampa s metalnim parama | UV / VIS |
| | Laser | UV / VIS |

Selektori valnih duljina i monokromatori čine sklop za odabir uskog raspona valnih duljina. Postoje apsorpcijski filtri koji apsorbiraju veći dio spektra, a ostatak propuštaju. Za razliku od interferencijskih filtera koji propuštaju aktualni dio spektra i ostatak reflektiraju. Kao disperzni element tj. monokromator koristi se prizma ili optička rešetka.

**2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE
NEKIH 1,4 - DIHIDROPIRIDINSKIH LIJEKOVA U
NJIHOVIM FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA**

Razvijena je selektivna spektrofotometrijska metoda za određivanje 1,4 - dihidropiridina (1,4 - DHP) nifedipina, nikardipina i nimodipina u čistom obliku i farmaceutskim pripravcima. Predložena metoda temelji se na reakciji kondenzacije 1,4 - DHP s kiselim sredstvom p - anisaldehydina i mjerenju apsorpcije na 460 nm. Raspon analiziranih koncentracija je od 5 do 60 μg .⁸

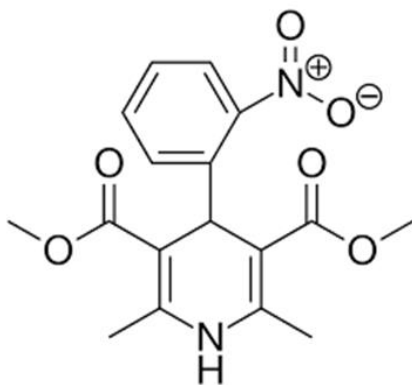


Slika 6 Mehanizam djelovanja 1,4 – DHP-a

Lijekovi 1, 4 - dihidropiridina (1,4 - DHP) koriste se za liječenje nekih kardiovaskularnih bolesti poput hipertenzije, angine i nekih oblika srčanih aritmija. Terapeutski značaj i uspješna klinička upotreba ovih lijekova potaknula je razvoj mnogih analitičkih metoda za njihovo određivanje u njihovim farmaceutskim formulacijama i u biološkim tekućinama.⁸

2.1. FARMAKOLOŠKI PRIPRAVCI KOJI SADRŽE 1,4-DIHIDROPIRIDINSKU STRUKTURU

2.1.1. Cordipin retard 20 mg tablete s produljenim oslobađanjem



Svaka tableta s produljenim oslobađanjem sadrži 20 mg nifedipina. Lijek se koristi za liječenje arterijske hipertenzije te Angine pectoris.⁹

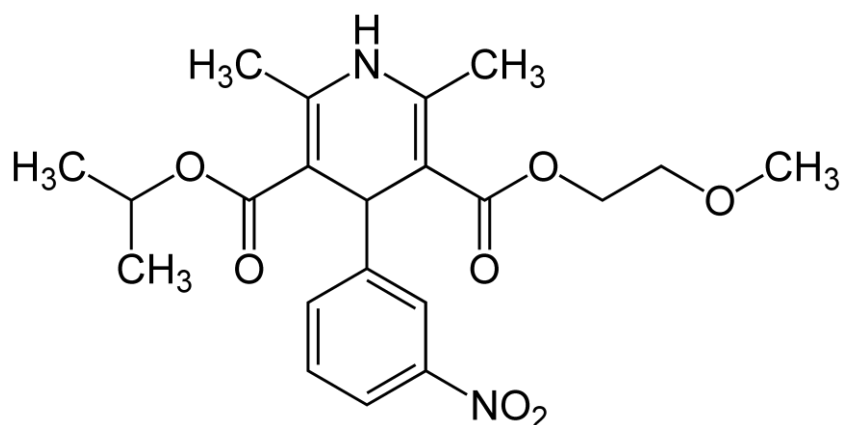
Slika 7 Struktura nifedipina

Nifedipin je antagonist kalcija 1,4 - dihidropiridinskog tipa. Antagonisti kalcija smanjuju transmembranski tok kalcijevih iona kroz spore kanale kalcija u stanicu. Kao specifičan i potentan antagonist kalcija, nifedipin djeluje osobito na stanice miokarda i glatke mišićne stanice koronarnih arterija i perifernih krvnih žila. Glavni učinak nifedipina je opuštanje glatkih mišića arterija, kako koronarne tako i periferne cirkulacije.⁸

2.1.2. Nimotop s 10 mg/50 ml otopina za infuziju

Svaka boca lijeka Nimotop S 10 mg/50 ml otopine za infuziju sadrži 10 mg nimodipina u 50 ml alkoholnog otapala.

Nimodipin je blokator kalcijevih kanala koji spada u 1,4 - dihidropiridinsku skupinu. Kontrakcija stanica glatkih mišića ovisi o kalcijevim ionima koji ulaze u te stanice tijekom depolarizacije kao sporo ionsko transmembransko strujanje. Nimodipin koči prijenos kalcijevih iona u te stanice, a tako inhibira kontrakciju glatkih mišića krvnih žila. U istraživanjima na životinjama nimodipin je bolje djelovao na moždane arterije nego na druge arterije u tijelu.⁹



Slika 8 Struktura nimodipina

2.1.3. Nimotop s 30 mg filmom obložene tablete

Koristi se kod prevencije neuroloških deficita kemijske naravi uzrokovanih cerebralnim vazospazmom nakon subarahnoidalnog krvarenja uzrokovanog puknućem aneurizme. Uporaba Nimotop s filmom obloženim tabletama indicirana je nakon primjene Nimotop S otopine za infuziju.⁹

Jednostavnost spektrofotometrijskih metoda, ekonomske prednosti i dostupnost njihovih instrumenata u većini laboratorija za kontrolu kvalitete omogućuju razvoj jednostavne i selektivne metode za određivanje ovih lijekova.

Korišteni su sljedeći analitički reagensi :

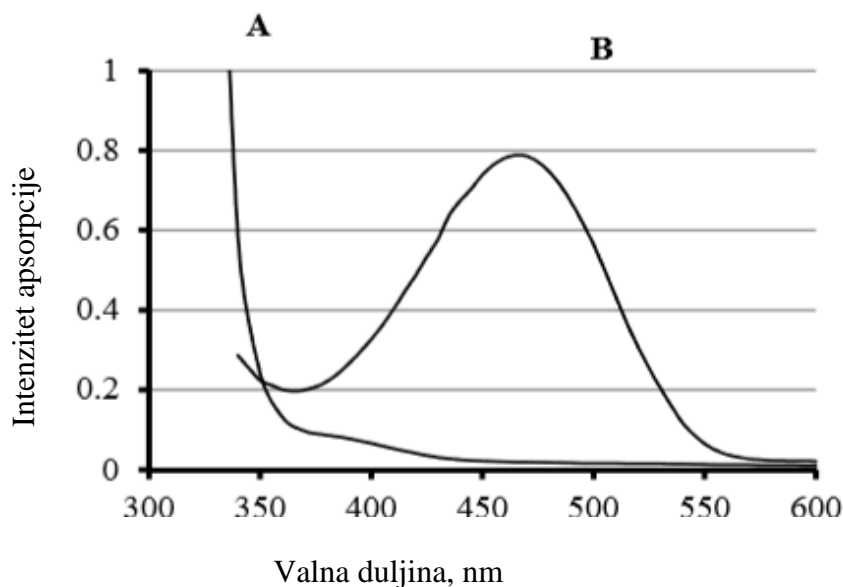
aldehidni reagens p - anisaldehyd (0, 5%), klorovodična kiselina (35, 5 %) te referentni standardi čistih lijekova koji sadrže nifedipin, nikardipin i nimodipin. Njihove standardne otopine (0, 5 mg/ mL) pripremljene su otapanjem 50 mg NIF, NIC i NIM –a u 3,0 mL metanola, a zatim je otopina razrijeđena do 100 mL klorovodičnom kiselinom. Radne standardne otopine pripremljene su daljnjim razrjeđivanjem s razrijeđenom klorovodičnom kiselinom (17,75%) kako bi se dobili rasponi koncentracija viši od 60 µg / mL.⁸

Priprema uzoraka farmaceutskog oblika

Koristi se dvadeset tableta ili kapsula te se one moraju dovesti do praškaste konzistencije te se temeljito promiješaju. Količina praha ekvivalentna je 25 mg aktivnih sastojaka lijekova otopljenih u 3 mL metanola. Takav sadržaj se vrtloži i obrađuje ultrazvukom 5 minuta, a zatim filtrira kroz filterni papir Whitman br. 42 prethodno nalažen metanolom. Prikupljeni filtrat prenesen je kvantitativno u 50 mL kalibriranu tikvicu te se nadopuni do oznake s klorovodičnom kiselinom (35,5 %) kako bi se dobila osnovna otopina od 0,5 mg /mL. Kasnije se otopina podvrgne dodatnom razrjeđivanju.⁸

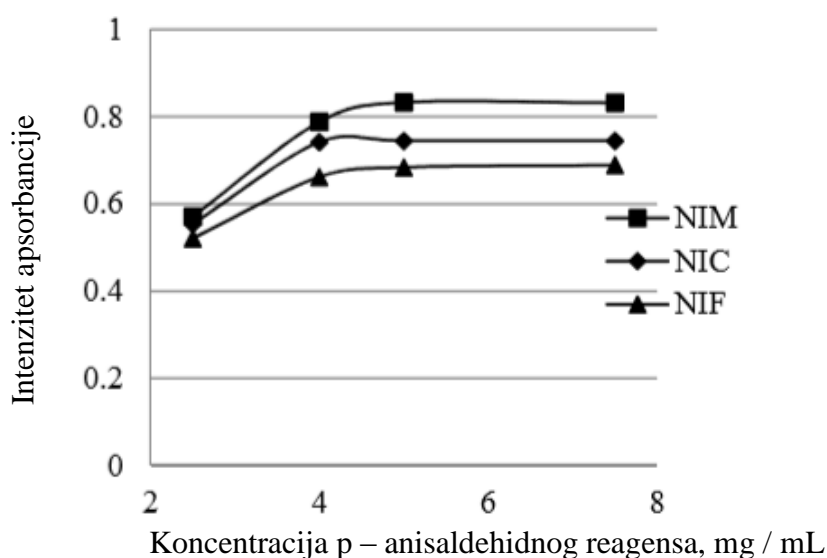
Postupak za dobivanje kalibracijske krivulje

Uzima se alikvot od 1 mL uzorka ili standardne otopine te se prenese u kalibriranu tikvicu od 10 mL. Doda se 1 mL p – anisaldehydnog reagensa i ostavi se 20 minuta u vodenoj kupelji prethodno podešenu na 80°C. Nakon završetka reakcije, apsorbancija je izmjerena na 460 nm nakon razrjeđivanja s vodenom otopinom klorovodične kiseline (17,75 %). Mjerenja apsorbancije odrađena su na Shimadzu spektrofotometru modelu 1601PC s dvije podudarne kvarcne ćelije od 1 cm.⁸



Slika 9 Grafički prikaz spektra apsorpcije p- anisaldehydnog reagensa (A) i spektri apsorpcije reakcijskog produkta između njega i NIF- a (30 $\mu\text{g/mL}$) kao reprezentativni primjer (B)

Predložena metoda obuhvaćala je istraživanje lijekova izravno s p-anisaldehydnim reagensom u prisutnosti klorovodične kiseline. Obojeni proizvodi koji su izmjereni na 460 nm za sve ispitivane lijekove nastali su nakon povišenja reakcijske temperature na 80 °C tijekom 20 minuta. Crtanjem kalibracijskih krivulja otkriveno je da je razvoj boje produkata ovisio o koncentraciji reagensa, a vrijednosti apsorpcije su povećane kako se koncentracija p- anisaldehydnog reagensa povećavala.⁸



Slika 10 Učinak koncentracije p-anisaldehyda u spektru apsorpcije NIF, NIC i NIM

U usporedbi s drugim metodama, predložena metoda ima prednosti zbog jednostavnosti, selektivnosti, ponovljivosti i zadovoljava potrebu za brzim postupkom određivanja svih članova 1,4 – dihidropiridinskih lijekova koji sadrže aktivnu metilnu skupinu koja koristi različite reagense i sadrži aldehidne skupine.

3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA B_6

Vitamini su biološki aktivni organski materijali različite kemijske prirode koji se apsorbiraju u ljudskom tijelu u maloj količini hranom imaju veliku ulogu biokatalizatora u različitim metaboličkim procesima. Svaki nedostatak ili višak vitamina može biti razlog mnogih poremećaja u čitavom organizmu. Vitamini skupine B_6 su vrste koje sadrže piridinski prsten i topivi su u vodi.¹¹

Piridoksin hidroklorid je kristalni bijeli prah koji je topljiv u vodi i malo topljiv u alkoholu. Topi se i raspada na 205 °C, a ima molekularnu strukturu $C_8H_{11}NO_3$. Djeluje kao koenzim u metabolizmu i zaštiti tjelesnih stanica. Korištene su mnoge spektrofotometrijske metode za procjenu piridoksin hidroklorida u kombinaciji s drugim lijekovima u tabletama. U mjerenju vrijednosti apsorpcije uzorka korišten je Shimadzu 160A UV-Vis spektrometar s kvarcnom kivetom duljine puta 1 cm. Kiselost je izmjerena pomoću referentnog pH metra.¹⁰

Postupak

Otopini koja sadrži 50 mg/L vitamina skupine B_6 (2 mL) dodano je 10 mL 0,216 M Cu(II), a kao rezultat dobije se bezbojan kompleks, potom se dodaje 5 mL crne otopine klorazola 3×10^{-4} M da bi se dobila otopina zelene boje koja ima širok spektar u UV Vis spektru, a kada se doda 4% SDS-a (površinska aktivna tvar i prikladan analitički reagens) dobije se izrazito zelena boja te se formiraju micelle.¹⁰

Materijali

- Osnovna otopina (7.2×10^{-3} M) Cu^{2+} pripremljena je otapanjem 9 g $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (249,6 g / mol) u 5 mL destilirane vode.
- Osnovna 4% - tna otopina natrijevog dodecil sulfata (SDS –a) pripremljena je otapanjem 1 000 g SDS – a u 25 mL destilirane vode.
- Osnovna 1,00 M otopina klorovodične kiseline.
- Osnovna 1,00 M otopina natrijevog hidroksida priprema se vaganjem 4,00 g NaOH, a zatim otapanjem destilirane vode (100 mL).¹⁰

Ovaj postupak je usvojen za komercijalno dostupne ampule koje sadrže vitamin B_6 odabirom tri vrste različitih proizvođača. Zabilježena su imena različitih dobavljača i doza vitamina. Otopine uzoraka razrijeđene su u deioniziranoj vodi, nakon čega je slijedi filtracija kako bi se uklonio svaki neotopljeni ostatak koji utječe na daljnju analizu.¹⁰

Apsorpcijski spektri dobivaju se reakcijom vitamina B_6 s Cu(II) i kloraznom crnom otopinom u prisustvu SDS-a. Bez pripadajućeg reagensa pokazuje se najveća apsorpcija na 477 nm. Dok organski reagens klorazol crna otopina s Cu(II) u postojanju SDS-a pokazuje maksimalnu apsorpciju pri maksimalno 570 nm.¹⁰

Utjecaj koncentracije otopine bakra(II)

Ispitan je učinak koncentracije bakrenih iona na apsorpciju kompleksa (radi maksimalnog intenziteta boje), koji se kretao od 0,072 do 0,720 mM, a taj raspon se prilagodio količini vitamina B_6 koja se dodaje. Maksimum je postignut pri 0,216 mM otopine bakarnih iona. Sukladno tome, u sljedećim eksperimentima korištena je otopina bakrenih iona od 0,216 mM.¹⁰

Tablica 2 Utjecaj koncentracije bakrenih iona na apsorpciju

| Koncentracija Cu(II) | Apsorbancija |
|----------------------|--------------|
| 0,072 | 0,075 |
| 0,216 | 0,082 |
| 0,360 | 0,074 |
| 0,504 | 0,067 |
| 0,720 | 0,056 |

Utjecaj koncentracije reagensa klorazol crne otopine

Istraženi su učinci koncentracije reagensa klorazol crne boje na maksimalno stvaranje obojenog kompleksa. Iz rezultata je utvrđeno da je 0,015 mM klorazol crna otopina reagensa rezultirala najvećom apsorpcijom, pa je stoga ta koncentracija odabrana za daljnje pokuse.¹⁰

Tablica 3 Utjecaj koncentracije reagensa klorazol crne otopine

| Koncentracija klorazol crne otopine (mM) | Apsorbancija |
|--|---------------|
| 0,003 | 0,0523 |
| 0,009 | 0,0747 |
| 0,015 | 0,0840 |
| 0,021 | 0,0837 |
| 0,030 | 0,0837 |

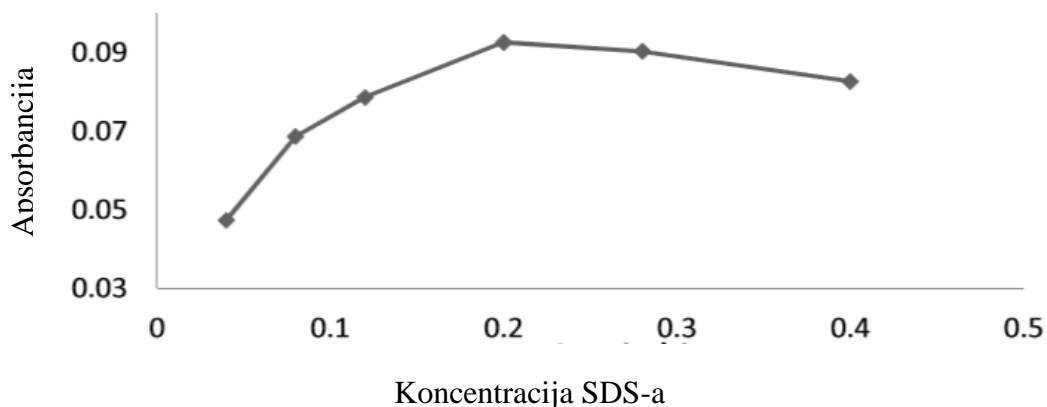
Utjecaj SDS-a

Dodatkom SDS-a kao površinski aktivnog sredstva, smanjuje se površinska napetost povećavajući time svojstva širenja i vlaženja tekućina. SDS je odabran zbog svoje dostupnosti u trgovini u homogenom obliku visoke čistoće, niske temperature točke zamućenja, male toksičnosti i niske cijene.¹⁰

Tablica 4 Utjecaj koncentracije SDS-a na apsorbanciju

| Koncentracija SDS-a | Apsorbancija |
|---------------------|---------------|
| 0,04 | 0,0473 |
| 0,08 | 0,0687 |
| 0,12 | 0,078 |
| 0,2 | 0,0927 |
| 0,28 | 0,0903 |
| 0,4 | 0,0827 |

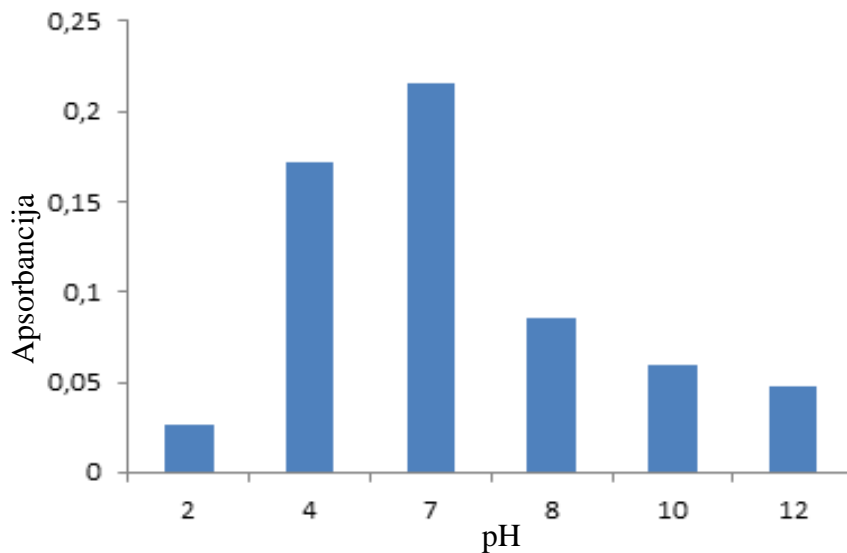
Učinak koncentracije SDS - a na apsorbanciju kompleksne otopine ispitivan je u rasponu koncentracija od 0,04 do 0,4%. Apsorbancija se povećava s porastom koncentracije površinski aktivnog sredstva, a zatim se smanjuje kada je koncentracija SDS-a bila veća od 0,2% SDS-a. Stoga se ova koncentracija koristi za postizanje najviše vrijednosti određivanja.¹⁰



Slika 11 Utjecaj koncentracije SDS na mjerenje apsorbancije

Utjecaj pH vrijednosti

U stvaranju metalnih kompleksa pH ima presudnu ulogu. Koristeći različite otopine (0,1 M HCl i 0,1 M NaOH) ispituje se pH u rasponu od 2 do 12. Apsorpcija se prvo naglo povećala s porastom pH, a pri pH 7 dostiže se maksimalna učinkovitost ekstrakcije. Vrijednosti apsorbancije postupno su se smanjivale pri višim pH zbog djelomične disocijacije kompleksa što je rezultiralo njegovim nepotpunim određivanjem. Stoga je pH 7 odabran kao optimalni pH za potpuno stvaranje kompleksa.¹⁰



Slika 12 Utjecaj pH vrijednosti na mjerenje apsorbancije

Ovo je jednostavna, brza, točna i precizna spektrofotometrijska metoda za određivanje koncentracije piridoksina (vitamin B_6 u čistim i farmaceutskim formulacijama).

4. RASPRAVA

Spektrofotometrija se zasniva na mjerenju apsorbancije odnosno transmancije temeljem čega se može odrediti koncentracija analita u ispitivanoj otopini.

Pregledavajući literaturu može se reći da su spektrofotometrijske metode široko primjenjivane metode kod određivanja kemijskog sastava. Međutim, da bi se analit mogao određivati spektrofotometrijski potrebno je da gradi obojeni kompleks ili da je sam obojen. Kako spektrofotometrija nije specifična analitička metoda postoji mogućnost interferencije različitih dodataka kao što su pomoćne tvari u farmaceutskim pripravcima. Zbog navedenog potrebno je iste ukloniti ili maskirati.

Radi bolje selektivnosti u novije vrijeme koristi se i protočna injekcijska analiza (FIA) pri kojoj se može određivati u širem koncentracijskom području. FIA-a omogućuje uvođenje vrlo točnih volumena uzoraka u nesegmentiranu struju.

Injektiranje u protok važan je način za brzo i učinkovito izvođenje automatske kemijske analize otopina. Za uspješnu analizu bitno je da se otopina uzorka injektira brzo kao hitac ili udarac tekućine. Injektiranje ne smije ometati protok struje osnovne otopine. U određenim vremenskim intervalima injektira se uzorak u osnovnu otopinu te se spajanjem sa strujom reagensa razvija kompleks, čiju apsorbanciju očitava spektrofotometar.⁶

Ova metoda se primjenjuje i za detekciju Fe^{3+} iona u vodenom mediju, a dozvoljena koncentracija u vodi za piće iznosi 88 ppb-a.¹²

5. ZAKLJUČAK

Spektrofotometrija je jednostavna metoda koja omogućava određivanje koncentracije bioloških aktivnih tvari u farmaceutskim pripravcima. Prednosti ove metode su točnost, niska cijena i kratko vrijeme analize što se može dokazati statističkim parametrima. Zajedno s upotrebom lako dostupnih kemikalija i jednostavnim instrumentima primjena je prikladna u laboratorijima za kontrolu kvalitete i u nerazvijenim zemljama, koje si ne mogu priuštiti skupe tehnike poput HPLC-a.

Svi provedeni postupci ne uključuju kritične reakcijske uvjete i zamorne korake pripreme uzorka. Dakle, ova metoda je usvojena za ispitivanje kvalitete brojnih proizvoda, ali na dobivene rezultate mogu utjecati prisutne pomoćne tvari, aditivi i druge primjese.

6. LITERATURA

- 1) *F. Plavšić, A. Stavljenić, B. Vrhovac*: Osnove kliničke farmakokinetike, Školska knjiga, (1992.)
- 2) *N. Raos, S. Raić-Malić, M. Mintas*, Lijekovi u prostoru, farmakofori i receptori, Školska knjiga, Zagreb, (2005.)
- 3) *M. Kaštelan-Macan*, Imenje i nazivlje u kemiji i kemijskom inženjerstvu, Struna, (2015.)
- 4) <https://sh.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrija> (pregledano : 15.07.2020.)
- 5) *D. Grdenić*, Povijest kemije, Novi Liber i Školska knjiga, Zagreb, (2001.)
- 6) *L. Kukoč*, Spektrometrijske metode elementne analize, interna skripta, Split, (2003.)
- 7) *D. A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler*, Osnove analitičke kemije , Školska knjiga, Zagreb, (1999.)
- 8) Spectrophotometric determination of some 1,4-dihydropyridine drugs in their pharmaceutical preparations and spiked human plasma, *Der Pharma Chemica*, (2015.), 7 (8):105-110
- 9) <https://www.halmed.hr/> (Pregledano : 06.08.2020.)
- 10) *A Khudhair*, A New Spectrophotometric Method to Determine Vitamin B6 in Pharmaceutical Formation Samples Using a Micelle Form, IOP Publishing, Karbala, (2019.), 1-5, DOI:10.1088/1742-6596/1234/1/012087
- 11) *L. Stryer*, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, (2013.)
- 12) *A. Petdum*, A new water-soluble Fe^{3+} fluorescence sensor with a large Stokes shift based on helicene derivative: Its application in flow injection analysis and biological systems, *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, (2020.), 12
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112769>