

# Spektrofotometrijsko određivanje lijekova koji sadrže fenolnu skupinu - pregledni rad

---

**Rašić, Andreja**

**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:167:197997>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-19**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE LIJEKOVA KOJI SADRŽE**  
**FENOLNU SKUPINU-PREGLEDNI RAD**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDREJA RAŠIĆ**

**Matični broj: 394**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**KEMIJA**

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE LIJEKOVA KOJI SADRŽE**  
**FENOLNU SKUPINU-PREGLEDNI RAD**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANDREJA RAŠIĆ**

**Matični broj: 394**

**Split, rujan 2020.**

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

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF DRUGS WHICH CONTAIN A  
PHENOLIC GROUP-REVIEW**

**BACHELOR THESIS**

**ANDREJA RAŠIĆ**

**Parent number: 394**

**Split, September, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij kemija

**Znanstveno područje:** Prirodna znanost

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 32. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** prof.dr.sc. Marija Bralić

### **SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE LIJEKOVA KOJI SADRŽE FENOLNU SKUPINU- PREGLEDNI RAD**

Andreja Rašić, 394

#### **Sažetak:**

Fenoli su aromatski spojevi koji imaju hidroksilnu skupinu vezanu na benzene. Danas je poznato nekoliko tisuća fenolnih spojeva. Fenolni spojevi imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, zbog čega su prisutni su u mnogim lijekovima. Oni imaju protuupalna, antimikrobna, antipiretička, analgetska, antioksidacijska i brojna druga svojstva. Često korišteni lijekovi koji imaju fenolnu skupinu su paracetamol, amoksicilin, salbutamol, piridoksin, izoksuprin itd. Lijekovi su kemijski spojevi koji poboljšavaju kvalitetu života. Provjera njihove kvalitete bitan je dio farmaceutske industrije. Spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih tehnika koja se koristi za određivanje lijekova. Kvalitativna analiza se zasniva na Beerovom zakonu. Beerov zakon nam omogućuje određivanje koncentracije analita mjerenjem apsorbancije. U ovom radu dat je pregled spektrofotometrijskih metoda koje se koriste za određivanje fenolnih lijekova.

**Ključne riječi:** fenoli, spektrofotometrija, lijekovi

**Rad sadrži:** 36 stranica, 21 slika, 3 tablica, 0 priloga, 35 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### **Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof.dr.sc. Josipa Giljanović – predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Ante Prkić - član
3. prof.dr.sc. Marija Bralić - član-mentor

**Datum obrane:** (01. listopada 2015.)

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

## 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 Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 32.

**Mentor:** Full professor PhD Marija Bralić

### **SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF DRUGS WHICH CONTAIN A PHENOLIC GROUP-REVIEW**

Andreja Rašić, 394

#### **Abstract:**

Phenols are aromatic compounds that have a hydroxyl group attached to benzenes. Today, several thousand phenolic compounds are known. Phenolic compounds have a positive effect on human health, which is why they are present in many drugs. They have anti-inflammatory, antimicrobial, antipyretic, analgesic, antioxidant and many other properties. Commonly used drugs that have a phenolic group are paracetamol, amoxicillin, salbutamol, pyridoxine, isoxuprine, etc. Drugs are chemical compounds that improve quality of life. Checking their quality is an essential part of the pharmaceutical industry. Spectrophotometry is one of the most commonly used techniques to determine drugs. Qualitative analysis is based on Beer's law. Beer's law allows us to determine the concentration of analytes by measuring the absorbance. This paper provides an overview of the spectrophotometric methods used to determine phenolic drugs

**Keywords:** phenols, spectrophotometry, drugs

**Thesis contains:** 36 pages, 21 figures, 3 tables, 0 supplements, 35 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

1. Full prof. PhD Josipa Giljanović - chair person
2. Associate prof. PhD Ante Prkić – member
3. Full prof. PhD Marija Bralić - supervisor

**Defence date:** ( October 01 2015.)

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).





*Završni rad je izrađen u Zavodu za kemiju okoliša, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Bralić, u razdoblju od srpnja do rujna 2020. godine.*

*Iskreno se zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Mariji Bralić na stručnim savjetima te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade završnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji na razumijevanju i potpori koju su mi pružili tijekom cijelog školovanja.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA:**

Pregled literature o spektrofotometrijskom određivanju lijekova s fenolnom skupinom

## **SAŽETAK:**

Fenoli su aromatski spojevi koji imaju hidroksilnu skupinu vezanu na benzene. Danas je poznato nekoliko tisuća fenolnih spojeva. Fenolni spojevi imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, zbog čega su prisutni su u mnogim lijekovima. Oni imaju protuupalna, antimikrobna, antipiretička, analgetska, antioksidacijska i brojna druga svojstva. Često korišteni lijekovi koji imaju fenolnu skupinu su paracetamol, amoksicilin, salbutamol, piridoksin, izoksuprin itd. Lijekovi su kemijski spojevi koji poboljšavaju kvalitetu života. Provjera njihove kvalitete bitan je dio farmaceutske industrije. Spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih tehnika koja se koristi za određivanje lijekova. Kvalitativna analiza se zasniva na Beerovom zakonu. Beerov zakon nam omogućuje određivanje koncentracije analita mjerenjem apsorbancije. U ovom radu dat je pregled spektrofotometrijskih metoda koje se koriste za određivanje fenolnih lijekova.

**Ključne riječi:** fenoli, spektrofotometrija, lijekovi

## **SUMMARY**

Phenols are aromatic compounds that have a hydroxyl group attached to benzenes. Today, several thousand phenolic compounds are known. Phenolic compounds have a positive effect on human health, which is why they are present in many drugs. They have anti-inflammatory, antimicrobial, antipyretic, analgesic, antioxidant and many other properties. Commonly used drugs that have a phenolic group are paracetamol, amoxicillin, salbutamol, pyridoxine, isoxuprine, etc. Drugs are chemical compounds that improves quality of life. Checking their quality is an essential part of the pharmaceutical industry. Spectrophotometry is one of the most commonly used techniques to determine drugs. Qualitative analysis is based on Beer's law. Beer's law allows us to determine the concentration of analytes by measuring the absorbance. This paper provides an overview of the spectrophotometric methods used to determine phenolic drugs.

**Keywords:** phenols, spectrophotometry, drugs

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	<b>2</b>
1.1. Spektrofotometrija.....	2
1.1.1. Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (UV-VIS).....	3
1.1.1.1. Prijelaz elektrona.....	4
1.1.1.2. UV-VIS spektrofotometar .....	6
1.1.1.3. Beer-Lambertov zakon.....	8
1.2. Lijekovi.....	10
1.2.1. Farmakologija .....	11
1.2.1.1. Farmakodinamika.....	11
1.2.1.2. Farmakokinetika.....	12
1.3. Fenoli.....	15
1.3.1. Klasifikacija fenolnih spojeva .....	16
1.3.2. Fenoli kao antioksidansi .....	16
1.3.3. Lijekovi koji sadrže fenolnu skupinu.....	17
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>19</b>
<b>3. RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>32</b>
<b>5. LITERATURA</b> .....	<b>33</b>

## UVOD

Fenolni spojevi sadrže aromatski prsten na koji je vezana najmanje jedna hidroksilna skupina. Fenolne skupine su strukturno vrlo raznolike, uključuju jednostavne fenole do vrlo kompleksnih, visoko polimeriziranih spojeva. Fenolni se uglavnom dijele na jednostavne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, lignane i stilbene. Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu te je identificirano nekoliko tisuća ovih spojeva. Fenolni spojevi imaju brojna pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje. Oni imaju antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna, antivirusna i protuupalna svojstva. Zbog navedenih svojstava fenoli su široko primjenjuju u farmaceutskoj industriji. U posljednje vrijeme sve je veća potražnja za osjetljivim i selektivnim analitičkim metodama za određivanje fenolnih spojeva.<sup>1</sup>

Tehnika koja ima vrlo veliku primjenu u analizi lijekova je spektrofotometrija. Spektrofotometrija se temelji na interakciji materije i elektromagnetskog zračenja, a primjenjuje se za kvalitativnu i kvantitativnu analitu.<sup>2</sup> Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija koristi ultraljubičasti i vidljivi dio elektromagnetskog spektra, koji kada stupi u interakciju s analitom uzrokuje prijelaz elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Najčešće se primjenjuje za kvantitativnu analizu koja se zasniva na Lambert-Beerovom zakonu.<sup>3</sup> Ovaj zakon kaže da postoji linearan odnos između apsorbancije i koncentracije analita, te omogućuje određivanje koncentracije analita.<sup>4</sup> Analiza se provodi pomoću spektrofotometra koji mjeri količinu svjetlosti koju uzorak apsorbira.<sup>5</sup> Kako bi se osigurala selektivnost, osjetljivost i ponovljivost najčešće se koristi kemijska predobrada analita. Reakcije koje se koriste u predobradi uzorka su redoks reakcije, reakcije kompleksiranja s ionom metala, stvaranje azo bojila, formiranja Schiffove baze i druge.<sup>6</sup> Ono što čini ovu tehniku značajnom u analizi lijekova je ekonomičnost, selektivnost, točnost, preciznost, jednostavan instrument i rukovanje istim.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je jedna od spektroskopskih metoda koja se zasniva na interakciji materije i svjetla, odnosno elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je dualne prirode, ima svojstva i čestice i vala. Čestica se naziva fotonom i posjeduje količinu energije koja se naziva kvant energije. Raspon energije fotona i odgovarajućih valnih duljina naziva se elektromagnetskih spektrom (EM).<sup>2</sup>

EM spektar je definiran s tri osnovne veličine frekvencijom, valnom duljinom i energijom fotona. Valna duljina,  $\lambda$ , [nm] predstavlja udaljenost dviju najbližih točki vala koje titraju u istoj fazi. Frekvencija,  $\nu$ , [Hz] je broj oscilacija u sekundi, odnosno potpuni broj titraja koji val čini svake sekunde. Relacija između frekvencije i valne duljine dana je izrazom:

$$\nu \times \lambda = c$$

Gdje  $c$  predstavlja brzinu svjetlosti u vakuumu. Ako gledamo s energetske strane, povoljnije je promatrati svjetlost kao skup čestica, fotona. Fotoni su nosioci energije  $E$ , [J] koja je jednaka umnošku frekvencije i Planckove konstante  $h$ , koja ima vrijednost od  $6,626 \times 10^{-34}$  Js

$$E = \nu h$$

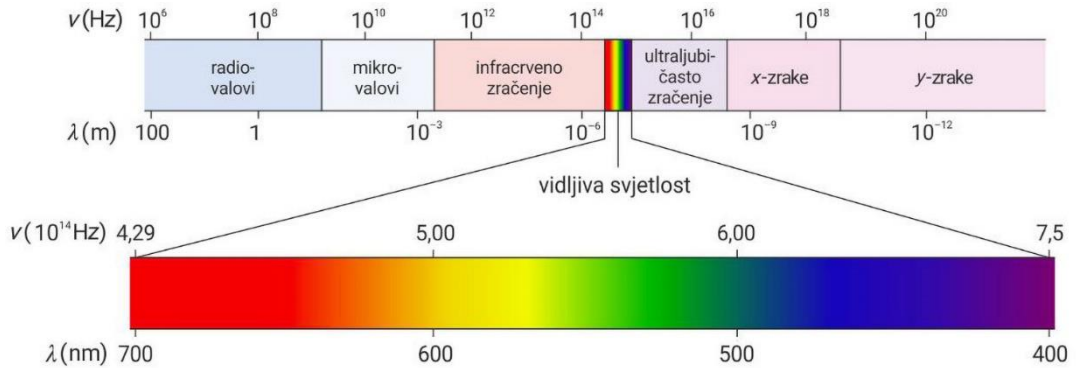
Kombinirajući izraza 1 i 2 dobivamo izraz:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$$

Iz ovog izraza može se zaključiti da je energija proporcionalna valnom broju  $\tilde{\nu}$ , a obrnuto proporcionalna valnoj duljini.<sup>2</sup>

Spektar se uobičajeno dijeli prema rasponu energije fotona i pripadajućim valnim duljinama. Prema rastućoj vrijednosti energije zračenje, počinje s radiovalovima nakon kojih dolaze mikrovalovi pa infracrveno zračenje te vidljivi dio spektra i ultraljubičasto zračenje, dok u zračenje viših energija ubrajamo rendgenske zrake i gama zrake kao što je prikazano na slici 1.<sup>2</sup>





Slika 1. Spektar elektromagnetskog zračenja <sup>7</sup>

Elektromagnetsko zračenje se koristi u različitim tipovima spektroskopskih tehnika. Kada zračenje stupi u interakciju s nekom tvari može se koristiti za kvantitativnu i kvalitativnu analizu različitih tvari, stoga ima veliku primjenu u kemiji za određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava brojnih tvari. Različiti tipovi interakcije se koriste u proučavanju materijala korištenjem spektroskopskih tehnika. <sup>2</sup>

Spektrofotometrijske metode se temelje na apsorpciji svjetlosti, pri čemu dolazi do prijelaza iz osnovnog stanja u pobuđeno. Da bi došlo do apsorpcije, energija fotona mora biti jednaka razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja. Jedna od najčešće korištenih spektrofotometrijskih tehnika je UV-VIS spektrofotometrija

### 1.1.1. Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (UV-VIS)

Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija je tehnika koja se bazira na apsorpcijskoj spektroskopiji u ultraljubičastom (200-380 nm) i vidljivom (380-780 nm) dijelu spektra. Apsorbirana energija uzrokuje prijelaz elektrona iz nižeg, osnovnog stanja u više odnosno pobuđeno stanje. Drugim riječima vidljivo i ultraljubičasto zračenje pomiče elektrone u više orbitale. Apsorpcija UV odnosno vidljivog zračenja ovisi o energiji fotona i elektronskoj konfiguraciji molekula, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. <sup>3</sup>

Spektrofotometrijom se može izvoditi i kvalitativna i kvantitativna analiza. Kvalitativna analiza se zasniva na apsorpcijskom spektru uzorka, a ovisi o njegovom sastavu i strukturi. Kvantitativna analiza se zasniva na Lambert-Beerovom zakonu. UV/VIS spektrofotometrija se koristi za analizu organskih molekula koje u svojoj strukturi imaju  $\pi$  elektrone i nevezni elektronski par. Skupine atoma koje su odgovorne za apsorpciju nazivaju se kromofori. Primjeri kromofora su: karbonilna skupina ( $-C=O$ ), nitrozo-skupina ( $-N=O$ ), nitro skupina ( $-NO_2$ ) i konjugirana dvostruka veza između dva ugljika ( $-C=C-$ ). Analiza se provodi pomoću spektrofotometra, a zapis koji dobijemo naziva se apsorpcijski spektar.<sup>3</sup>

#### 1.1.1.1. Prijelaz elektrona

S obzirom na to da kod UV-VIS spektrofotometrije govorimo o elektronskim prijelazima potrebno je ustanoviti energije molekularnih orbitala između kojih dolazi do prijelaza elektrona. Molekulske orbitale možemo poredati prema rastućim energijama, odnosno prema manjoj stabilnosti na sljedeći način  $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $n$ ,  $\pi^*$ ,  $\sigma^*$  (simbol \* označava antiveznu orbitalu).<sup>3</sup>



Slika 2. Molekulske orbitale prema rastućim energijama<sup>3</sup>

Kako bismo dobili ukupnu energiju molekule, pored elektronske energije, u obzir moramo uzeti energije rotacije i vibracije.<sup>3</sup>

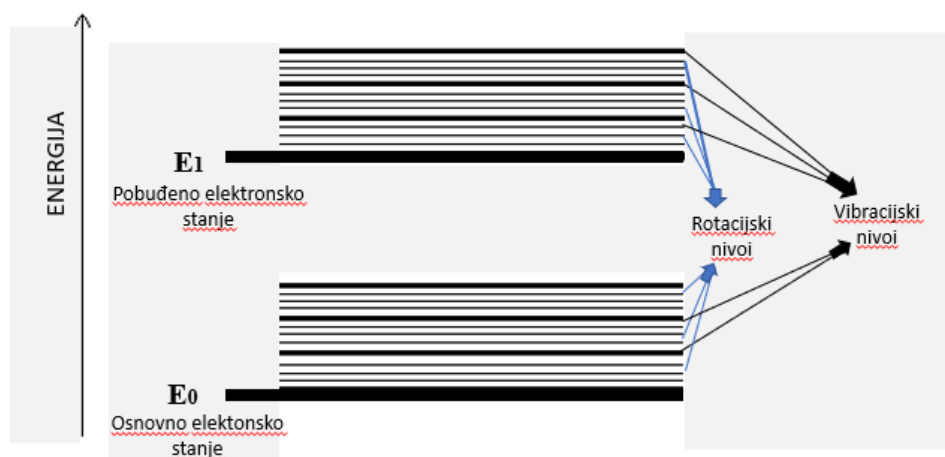
$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$$

Gdje je:  $E_{el}$ - energija prijelaza elektrona,

$E_{rot}$ - energija rotacije-odnosi se na molekulske rotacije oko centra gravitacije,

$E_{vib}$ - energija vibracije-odnosi se gibanje jezgri koje uzrokuju promjene u duljini kemijske veze i kutu između njih.

Opisana energetska stanja prikazana su na slici 3.

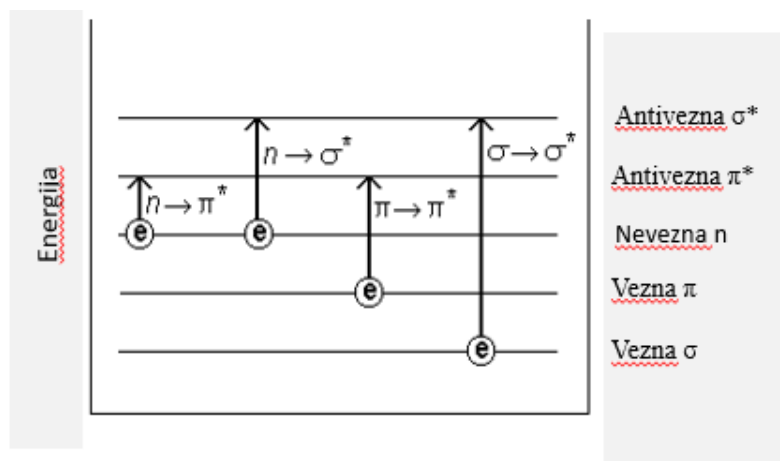


Slika 3. Energetska stanja molekule <sup>8</sup>

Međutim, kada promatramo prijelaz elektrona možemo zanemariti rotacijsku energiju jer je prijelaz elektrona vrlo brz tako da ne može doći do promjena u položaju jezgre. Svako elektronsko stanje sadrži niz vibracijskih razina. Uobičajeno se većina molekula nalazi u najnižoj vibracijskoj razini osnovnog elektronskog stanja. <sup>3</sup>

Apsorpcija zračenja će dovesti do porasta energije molekule koja rezultira prijelazom elektrona, odnosno njihovim pobuđivanjem, iz veznih u antivezne orbitale. Pobuđivanje elektrona je moguće samo njihovim prijelazom iz HOMO orbitale (energetski najviše popunjene orbitale) u LUMO orbitalu (energetski najniže nepopunjene orbitala). Apsorpcija zračenja moguća je samo ako je energija fotona jednaka energetskej razlici,  $\Delta E$ , između HOMO i LUMO orbitale. Dakle kada energija fotona odgovara  $\Delta E$  dolazi do apsorpcije fotona i prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. <sup>3</sup>

Elektronski prijelazi se mogu klasificirati prema orbitalama između kojih se događa prijelaz (Slika 4)



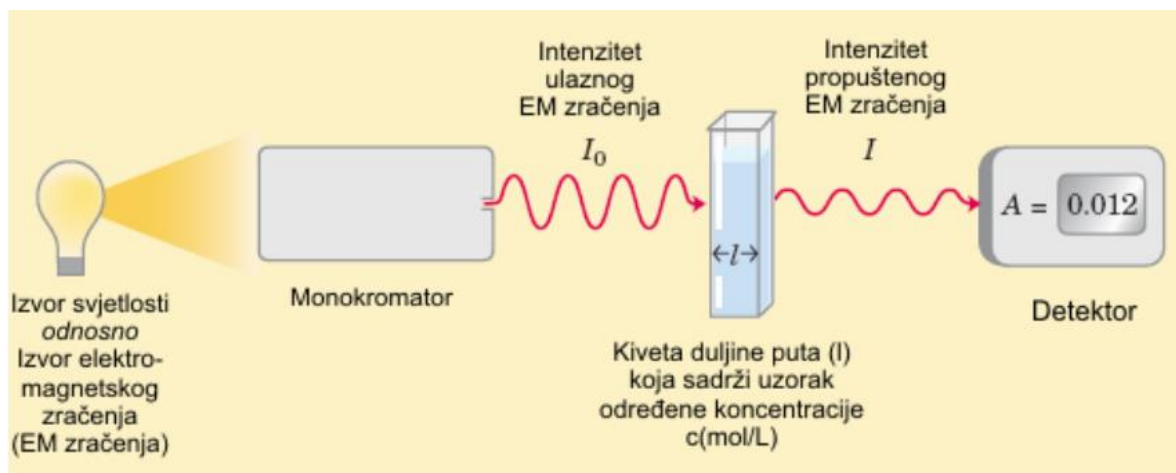
Slika 4. Prijelaz elektrona između molekularskih orbitala <sup>8</sup>

Mogući su sljedeći prijelazi:

- Prijelaz  $\sigma$  u  $\sigma^*$ : elektroni se iz vezne s orbitale pobuđuju u odgovarajuću antiveznu orbitalu. Za pobudu je potrebna velika energija koja nije dio UV-VIS spektra.
- Prijelaz  $n$  u  $\sigma^*$ : potrebna je manja energija koja je dio promatrajućeg dijela spektra, ali ovaj prijelaz je moguć samo kada atomi imaju slobodan elektronski par.
- Prijelaz  $n$  u  $\pi^*$  i  $\pi$  u  $\pi^*$ : najčešći prijelaz u organskim molekulama, za prijelaz je potrebna nezasićena skupina u molekuli s  $\pi$  elektronima. Energija koja je potrebna za ove prijelaze odgovara UV-VIS dijelu spektra. Iz slike također vidimo da je za prijelaz iz  $n$  u  $\pi^*$  potrebna manja energija. Općenito vrijedi ako je vrijednost  $\Delta E$  mala, za pobuđivanje elektrona potrebne su niže frekvencije i dulje valne duljine. <sup>8</sup>

#### 1.1.1.2. UV-VIS spektrofotometar

Instrument kojim se provodi analiza naziva se spektrofotometar i njime se mjeri količina svjetlosti koju uzorak apsorbira (slika 5). Spektrofotometar se sastoji od sljedećih komponenti: izvor zračenja, selektor valnih duljina (filteri, monokromatori), držač uzorka, detektor, sustav za obradu i prikaz podataka. <sup>5</sup>



Slika 5. Spektrofotometar<sup>9</sup>

Kao izvor svjetlosti se koriste žarulje koje sadrže plin poput ksenona ili kombinacija dvaju različitih žarulja poput volframa/deuterija. Deuterijska žarulja se koristi za rad u UV dijelu spektra dok se volframove koriste za VIS područje spektra. Izvor svjetlosti emitira svjetlosnu zraku konstantne energije. Kolimator usmjerava snop svjetlosti do monokromatora. Monokromator služi kao disperzni element koji selektira jednu valnu duljinu svjetlosti te samo nju propušta. Nadalje, imamo držač uzorka u koji se stavlja kiveta. Tekući uzorci se stavljaju u kivete koje mogu biti izrađene od kvarca, borosilikatnog stakla ili akrilne plastike. Borosilikatno staklo i akrilna plastika se koriste samo za snimanje u području VIS spektra zato što ne prenose UV zračenje. Nakon što zraka prođe kroz uzorak, prikladan detektor mjeri propuštenu svjetlost. Detektori koriste fotoosjetljivi poluvodički materijal koji pretvara svjetlost u elektronički signal. Kao detektor se najčešće koriste silikonske fotodiode.<sup>5</sup>

Spektrofotometri se dijele na jednozračne i dvozračne, Osnovna razlika jest ta da jednozračni spektrofotometri koriste jedan put svjetlosti, dok dvozračni koriste dva puta. Jednozračnim spektrofotometrom se može mjeriti samo jedan uzorak, zbog čega se referentni uzorak mora snimiti posebno, a dobiveni spektri naknadno obraditi. Dvozračni mogu istovremeno primiti dva uzorka, pri čemu je jedan referentni. Spektri se automatski oduzimaju jedan od drugog i nije potrebna naknadna obrada spektra.<sup>5</sup>

### 1.1.1.3. Beer-Lambertov zakon

Prolaskom svjetla kroz otopinu analita dio svjetlosti se apsorbira, a dio koji se propusti mjeri se pomoću spektrofotometra. Intenzitet upadnog zračenja se smanjuje nakon prolaska kroz kivetu s analitom. Omjer intenziteta zračenja koje je prošlo kroz analit ( $I$ ) i intenziteta upadnog zračenja ( $I_0$ ) naziva se transmitacija ( $T$ ).<sup>4</sup>

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

Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog i propuštenog zračenja.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

Apsorbancija se češće izražava pomoću Beer-Lambertovog zakona

$$A = \epsilon bc$$

gdje je:  $A$  apsorbancija na danoj valnoj duljini,

$\epsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent izražen u  $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,

$c$  je molarna koncentracija otopine izražena u  $\text{mol dm}^{-3}$ ,

$l$  je duljina uzorka kroz koju prolazi svjetlost izražena u cm (širina kivete)

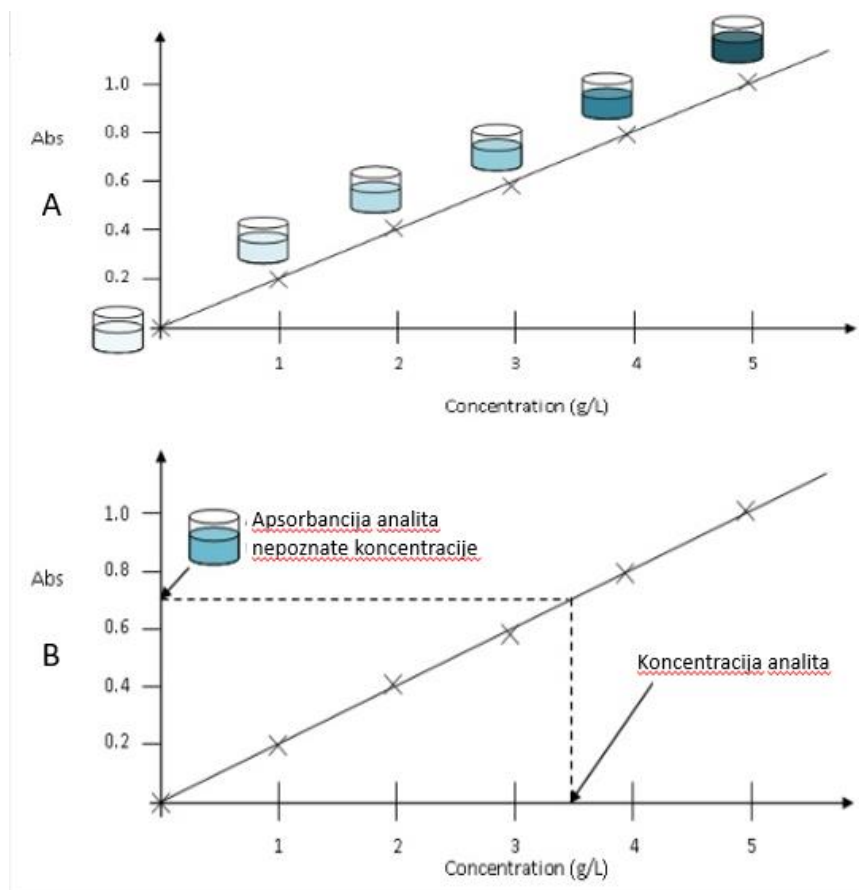
Beer-Lambertov zakon kaže kako postoji linearni odnos apsorbancije i koncentracije uzorka, odnosno da je količina svjetlosti određene valne duljine koju apsorbira tvar proporcionalna koncentraciji apsorberajuće vrste i duljini puta. Dakle apsorpcija će biti veća ako je veći broj molekula koje apsorberaju.

Molarni apsorpcijski koeficijent je konstanta koja varira za svaku molekulu, a govori o tome kolika je vjerojatnost apsorpcije na određenoj valnoj duljini. Graf koji prikazuje ovisnost  $\epsilon$  o valnoj duljini zove se apsorpcijski spektar. Iz snimljenog spektra može se očitati na kojoj valnoj duljini ispitivana molekula najbolje apsorbira. Vrijednosti koeficijenta se kreću između 0 i  $10^6$ , pri čemu vrijednosti iznad  $10^4$  ukazuju na visoku molarnu apsorptivnost molekule, dok vrijednosti ispod  $10^3$  ukazuju na nizak intenzitet apsorpcije.<sup>3</sup>

Lambert-Beer zakon omogućava određivanje koncentracije uzorka iz izmjerene vrijednosti apsorbancije. Ako su molarni apsorpcijski koeficijent i širina kivete poznati, tada se koncentracija  $c$  može izračunati iz slijedećeg izraza:

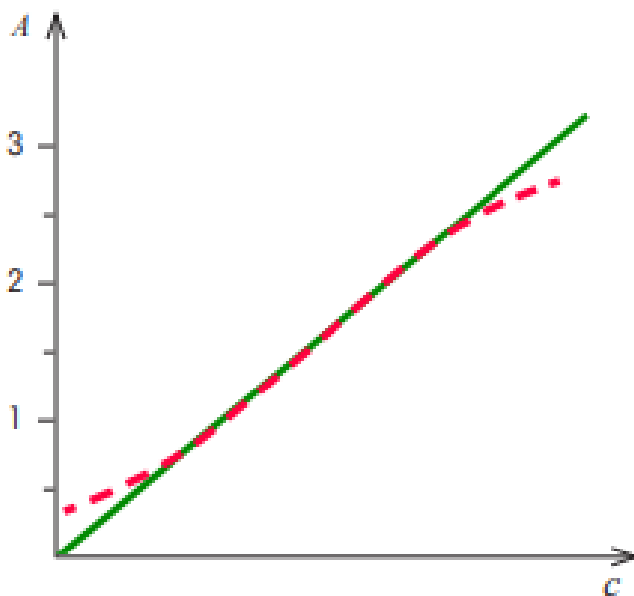
$$c = \frac{A}{\epsilon l}$$

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije analita u otopini možemo podijeliti u 2 osnovna koraka. U prvom koraku se mjeri apsorbancija serije otopina poznatih koncentracija te se crta baždarni pravac. Baždarni pravac prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji analita pri maksimalnoj valnoj duljini, odnosno linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji analita. U drugom koraku se mjeri apsorbancija analita nepoznate koncentracije te mu se određuje koncentracija pomoću baždarnog pravca.<sup>10</sup>



Slika 6: Određivanje nepoznate koncentracije analita pomoću baždarnog pravca. (A) crtanje baždarnog pravca mjerenjem apsorbancije standardnih otopina; (B) određivanje koncentracije analita pomoću baždarnog pravca.<sup>10</sup>

Kako bi se postigli optimalni rezultati mjerenja apsorbancija i koncentracija moraju biti u linearnom odnosu. Raspon apsorbancije u kojem je apsorbancija izravno proporcionalna koncentraciji je 0,3 do 2,5. Vrijednosti niže, odnosno veće, od navedenih rezultiraju odstupanjem od linearnosti kalibracijske krivulje. <sup>4</sup>



Slika 7. Teorijska linearna ovisnost apsorbancije o koncentracije (zelena boja) i odstupanje od teorijske ovisnosti (crvena boja) <sup>4</sup>

## 1.2. Lijekovi

Lijek je kemijski spoj koji utječe na organizam i njegove procese, njegova namjena je prevencija, smanjenje simptoma ili suzbijanje neke bolesti. Zakonski se lijekovi dijele u dvije skupine, lijekove na recept i lijekove bez recepta. Svaki lijek ima najmanje tri imena: kemijsko, generičko (nevlasničko) i zaštićeno (vlasničko). <sup>11</sup>

Lijek se obično sastoji od ljekovite tvari pomiješane s drugim, pomoćnim tvarima koji imaju razne uloge poput stabilizacije, olakšavanja razgradnje, podmazivanja površine lijeka i slično. Neki lijekovi, poput kapsula obložene polimerom, se formiraju tako da usporeno otpuštaju aktivne sastojke kroz 12 ili više sati, dok se neki lijekovi oblažu zaštitnim slojem kako bi se otapali u određenom mediju, odnosno kako se ne bi otopili u kiselom mediju



želudca. Lijekovi se pakiraju u obliku tablete, kapsule, čepića, transdermalnog naljepka ili otopine.

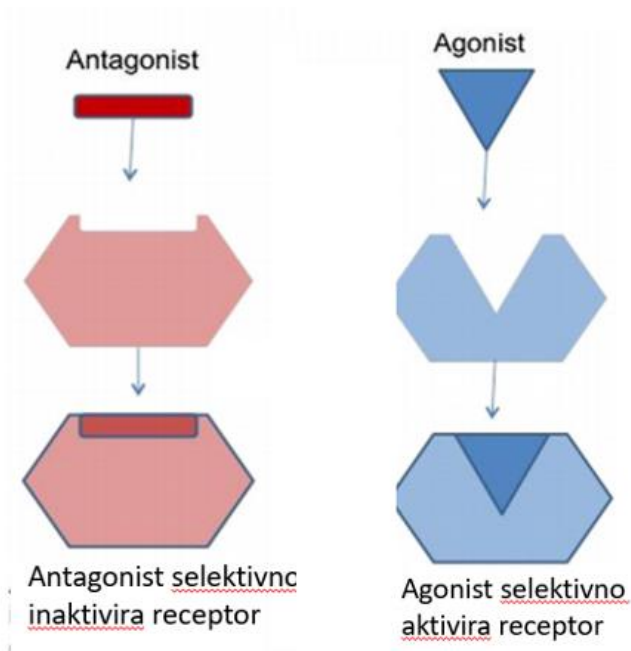
Farmakoterapija se sastoji od uvođenja lijeka u organizam, odnosno primjene, apsorpcije, distribucije i u konačnici izlučivanja.<sup>12</sup> Mnogi čimbenici utječu na apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje i konačni učinak lijekova, što rezultira različitom reakcijom ljudi na isti lijek. Neki od razloga su genetika, interakcija s drugim lijekovima ili hranom, te bolesti. Genetika utječe na kinetiku lijekova zbog čega neki ljudi usporeno, dok drugi ubrzano, metaboliziraju lijekove. Kod usporenog metabolizma dolazi do nakupljanja i trovanja, dok se kod ubrzanog metabolizma ne može postići terapijska koncentracija u krvi. Lijek može promijeniti svoj učinak zbog interakcije s drugim lijekom ili hranom. Učinak lijeka se može promijeniti na više načina. Može doći do pojačanja učinka kad se primjenjuju lijekovi sličnog djelovanja ili lijekovi koji imaju isti aktivni spoj. U drugu ruku dva lijeka mogu imati suprotan učinak, odnosno jedan lijek može smanjiti učinkovitost drugog. Drugi lijekovi ili hrana mogu također utjecati na apsorpciju lijeka, njegov metabolizam i promjenu u izlučivanju. Ove vrste interakcija su uglavnom neželjene i štetne te povećavaju nuspojave. Lijek je uglavnom usmjeren na određeni organ ili tkivo, ali se on distribuira i po ostalim organima, Tako primjerice lijek koji se primjenjuje za neku plućnu bolest može utjecati na srce.<sup>13</sup>

### 1.2.1. Farmakologija

Znanost koja proučava djelovanje lijekova na živi organizam naziva se farmakologija. Farmakologija obuhvaća farmakodinamiku i farmakokinetiku.

#### 1.2.1.1. Farmakodinamika

Farmakodinamika proučava ono što lijek čini organizmu. Makromolekule koje komuniciraju s lijekom zovu se receptori. Receptori su makromolekule koje sudjeluju u procesima signalizacije unutar same stanice i među stanicama. Molekule koje se vežu na receptor zovemo ligandima. Oni mogu aktivirati ili inaktivirati receptor. Aktivirani receptori sudjeluju u nadzoru biokemijskih procesa u stanicama. Ligandi mogu djelovati kao agonisti ili antagonisti. Antagonisti ometaju aktivnost receptora, dok agonisti potiču receptore na izazivanje željenog odgovora.<sup>14</sup>



Slika 8: Djelovanje agonista i antagonista<sup>14</sup>

#### 1.2.1.2. Farmakokinetika

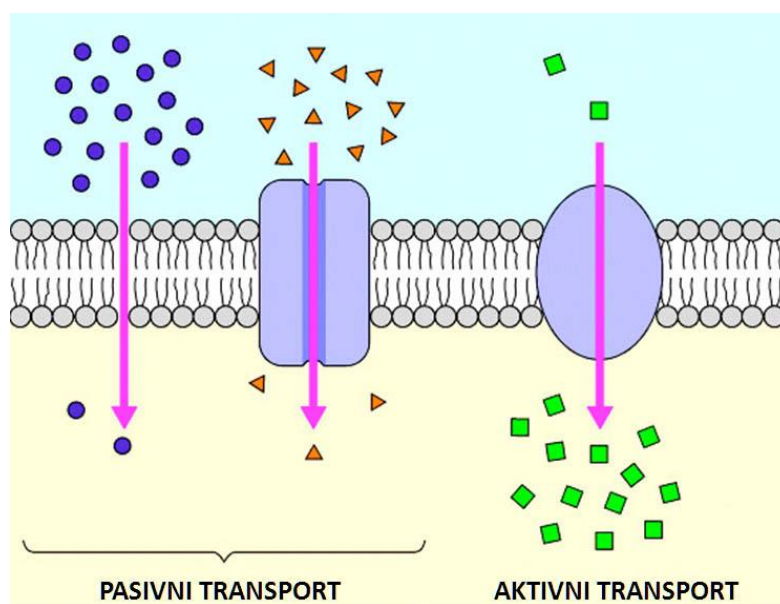
Farmakokinetika proučava što organizam čini s lijekom, odnosno proučava njegovo kretanje u, kroz i iz organizma. Farmakokinetika lijekova je najjednostavnije opisana kao proučavanje puta lijeka kroz organizam, od njegovog unošenja, preko apsorpcije, distribucije odnosno raspodjele, metabolizma do krajnjeg izlučivanja iz organizma.<sup>14</sup>

- Apsorpcija

Apsorpcija lijekova je prvi korak pri dolasku lijeka u organizam. Apsorpcija predstavlja oslobodjenje lijeka iz ljekovite formulacije. Ovaj korak je često i ključan jer je samo oslobođeni i apsorbirani lijek dostupan organizmu i može istaknuti svoju učinkovitost. Vrhunac apsorpcije je dolazak primijenjenog lijeka na ciljano mjesto gdje može izvršiti svoju terapijsku svrhu. Bioraspoloživost ukazuje na udio lijeka koji nakon primjene prelazi u sustavnu cirkulaciju. Intravenska primjena osigurava 100% bioraspoloživost, dok oralno progutani lijek gastrointestinalni trakt može u potpunosti apsorbirati prije nego što dođe u sustav cirkulacije. Bioraspoloživost ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući fizikalno-

kemijska svojstva i formulaciju lijeka, polarnosti, lipofilnosti, stupnja ionizacije, mehanizam transporta, primijenjena koncentracija itd.<sup>14</sup>

Glavna barijera za slobodan prolaz lijekova su stanične membrane. Stanične membrane su dinamički sustavi u kojima proteini plivaju u moru lipida. Lipidne komponente čine barijeru, koja je nepropusna za ione i polarne molekule. Lipofilne molekule mogu jednostavnom difuzijom proći kroz staničnu membranu. Ovakav transport je neselektivan, a svaka molekula koja je dovoljno mala i topljiva u lipidima prolazi kroz membranu. Propusnost ovisi samo o koncentracijskom gradijentu. Proteinske komponente djeluju kao transportni sustavi koje selektivno povećavaju permeabilnost za određene molekule i ione. Transport može biti pasivan ili aktivan. Pasivan transport ili olakšana difuzija zbiva se kad se ioni i polarne molekule kreću niz svoj koncentracijski gradijent, odnosno molekule se prenose s mjesta više na mjesto niže koncentracije, bez utroška energije. Aktivni transport se zbiva kada se molekule kreću suprotno od koncentracijskog gradijenta i u tom slučaju je potreban vanjski izvor energije. Lijekovi koji se prenose aktivnim transportom moraju biti strukturno slični endogenim supstratima.<sup>15</sup>



Slika 8 : Aktivni i pasivni transport kroz staničnu membranu<sup>16</sup>

Lijekovi su uglavnom slabe organske baze ili kiseline, koje se u vodenoj sredini nalaze u djelomično ioniziranom stanju. Neionizirani oblici su lipofilni i dobro prolaze stanične membrane. Ionizirani su oblici lipofobni i teško prolaze kroz membranu. Udio

neioniziranog lijeka i njegova sposobnost prolaska kroz membranu ovisi o  $pK_a$  lijeka i pH otopine. Vrijednost  $pK_a$  nam pokazuje pri kojem pH su koncentracije ionizirane i neionizirane frakcije jednake. Ako je pH niži od  $pK_a$  prevladava neionizirani oblik slabe kiseline, odnosno ionizirani oblik slabe baze. Primjerice lijek koji je slaba kiselina u želudcu je neioniziran, zbog niske vrijednosti pH želudačnog soka, što olakšava difuziju kroz želudačnu sluznicu. Lijek koji je slaba baza ima suprotan učinak, on je u želudcu ioniziran što otežava difuziju. Većina apsorpcije se odvija u tankom crijevu zbog velike apsorpcijske površine i povećane permeabilnosti membrane.<sup>17</sup>

- Distribucija lijekova

Nakon apsorpcije lijeka slijedi distribucija lijeka u organizmu. Lijek se nakon ulaska u krvotok raspoređuje po organima i tkivima. Lijek koji je apsorbiran mora doći na ciljano mjesto djelovanja da bi bio učinkovit. Potrebno je poznavati ponašanje lijeka unutar organizma te njegovu mogućnost migriranja iz gastrointestinalnog sustava u krv te u željeno tkivo.

Proteini ljudske plazme služe kao transportno sredstvo u krvotoku, na koje se reverzibilno vežu molekule lijeka. Plazma sadrži više stotina različitih proteina koji obavljaju različite fiziološke funkcije. Navedeni proteini se mogu podijeliti u tri osnovne skupine: albumin, globuline i fibrinogene. Za distribuciju lijekova ključan je albumin, alfa-1-kiseli glikoprotein te razni lipoproteini. Uobičajeno se neutralni i kiseli lijekovi vežu na albumin, bazični na alfa-1-kiseli glikoprotein ili lipoprotein. Lijekovi koji imaju strukturu sličnu strukturi masnih kiselina vežu se na lipoproteine, koji su prirodni transporter masnih kiselina. Udio apsorbiranog lijeka koji je dostupan za djelovanje u tkivu je dio koji se otpusti s proteina plazme. Neki lijekovi se čvrsto vežu na plazmatske proteine te teško napuštaju krvotok, dok se drugi slabije vežu zbog čega lakše napuštaju krvotok i odlaze u ciljana tkiva.<sup>14</sup>

- Metabolizam lijekova

Pod pojmom metabolizam lijekova podrazumijevamo kemijske promjene primijenjenog lijeka. Primarna svrha metabolizma lijekova u organizmu je njihova eliminacija odnosno olakšanje njegovog izlučivanja. Pojedini lijekovi se aktiviraju tek nakon

kemijske promjene, u tom slučaju govorimo o prolijekovima u kojima je metabolit lijeka farmakološki aktivniji od ishodnog lijeka. Metabolizam lijekova se u najvećoj mjeri odvija u jetri reakcijama oksidacije, redukcije, hidrolize, hidratacije, konjugacije, kondenzacije ili izomerizacije. Navedene reakcije kataliziraju enzimi koji se nalaze u svim tkivima, a najzastupljeniji su u jetri. Reakcije metabolizma lijeka klasificiraju se ili u fazu I ili u fazu II. Reakcije prve faze se odnose na cijepanje ili modificiranje molekule lijeka, dok se reakcije druge faze odnose na interakciju molekule lijeka s endogenim molekulama.<sup>14</sup>

- Eliminacija lijekova

Eliminacija lijekova iz organizma je važna kako ne bi došlo do akumulacije lijeka u tkivima što može rezultirati raznim patološkim stanjima. Dva su glavna mehanizma eliminacije lijekova, metabolizam jetre i izlučivanje putem bubrega. Drugi putovi eliminacije uključuju izlučivanje preko znoja, sline, suza i slično.<sup>14</sup>

### 1.3. Fenoli

Fenoli su aromatski spojevi koji imaju hidroksilnu skupinu vezanu na benzen. Fenoli su difunkcionalni spojevi, imaju hidroksilnu skupinu i aromatski prsten koji su međusobno u jakoj interakciji. Veza između kisika i ugljika ima djelomično karakter dvostruke veze. Prsten fenola je bogat elektronima.<sup>18</sup>

Na fizikalna svojstva fenola najveći utjecaj ima hidroksilna skupina, koja sudjeluje u stvaranju vodikovih veza s drugim molekulama fenola i molekulom vode zbog čega fenoli imaju viša talište i vrelište od ugljikovodika slične molekulske mase. Velika tendencija fenola da stvaraju vodikove veze povećava njihovu topljivost u vodi. Neki fenoli sa supstituentima u orto-položaju, imaju niža vrelišta od onih u meta- i para- položajima, a to se događa zbog intramolekulskih vodikovih veza koje se stvaraju između hidroksilne skupine i supstituenta. Jedno od najvažnijih svojstava fenola je njegov kiseli karakter, otapanjem u jakim lužinama stvaraju soli fenolate. Fenoli su jače kiseline od alkohola a slabije kiseline od karboksilnih kiselina.  $pK_a$  za većinu fenola iznosi otprilike 10.<sup>18</sup>

Fenoli su vrlo reaktivni spojevi, u većini reakcija se ponašaju kao nukleofili. Kao nukleofili se mogu ponašati ili hidroksilna skupina ili aromatski prsten. Reakcije koje se događaju na prstenu su reakcije elektrofilne aromatske supstitucije.<sup>18</sup>

### 1.3.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

Fenoli su iznimno heterogena skupina spojeva. Na osnovnu strukturnu jezgru može biti vezan veći broj hidroksilnih skupina kao i druge funkcijske skupine. Fenoli se također javljaju u polimeriziranom stanju gdje je prisutan veći broj aromatskih prstenova.<sup>1</sup>

Danas je poznato nekoliko tisuća fenolnih spojeva koji se najjednostavnije mogu klasificirati kao jednostavni fenoli i polifenoli. Jednostavni fenoli imaju jednu fenolnu podjedinicu, dok polifenoli imaju najmanje dvije. Nadalje polifenole s obzirom na kemijsku strukturu možemo podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi imaju petnaest ugljikovih atoma koji su raspoređeni u dva aromatska prstena međusobno povezana piranskim prstenom. Ne-flavonoidi imaju jednostavniju strukturu i uključuju fenolne kiseline, stilbene i lignane.<sup>1</sup>

### 1.3.2. Fenoli kao antioksidansi

Jedno od najvažnijih svojstava fenolnih spojeva je njegova velika antioksidacijska moć, zbog čega oni imaju veliku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.<sup>19</sup>

Uloga antioksidansa je inaktivacija slobodnih radikala. Slobodni radikal možemo definirati kao svaki spoj koji ima ne spareni elektron a može samostalno postojati. Oni mogu djelovati kao oksidansi i reducensi, odnosno mogu prihvatiti ili donirati elektron. U organizmu se javljaju u obliku reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. U organizmu mora postojati ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa za normalno funkcioniranje organizma. Ako je navedena ravnoteža pomaknuta, te je slobodni radikali zastupljeniji dolazi do tzv. oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres kao posljedicu ima brojna patološka stanja te se povezuje s nastankom kardiovaskularnih bolesti i karcinoma. Oksidacijski stres nastaje zbog nepovoljnih reakcija slobodnih radikala s lipidima, DNA, ugljikohidratima i proteinima. Zbog današnjeg načina života preporučuje se dodatno unošenje antioksidansa u

organizam. Dobar egzogeni izvor antioksidansa su biljne namjernice koje sadrže fenolne skupine.<sup>20</sup>

Fenolni spojevi su zastupljeni u mnogim biljkama. Zastupljeni su jednostavni fenoli sve do vrlo kompleksnih, visoko polimeriziranih spojeva. Fenoli se u biljkama uglavnom javljaju kao konjugati sa šećerima, karboksilnim kiselinama i organskim kiselinama, aminima, lipidima itd. Polifenoli su najmoćniji biljni antioksidansi te su sveprisutni u biljnoj hrani (voće, povrće, žitarice, orasi itd.) i pićima (vino, pivo, čaj itd.)<sup>21</sup>

Učinkovitost fenola kao antioksidativnih spojeva uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Sam fenol je neaktivan kao antioksidans, ali orto- i para-difenoli imaju antioksidacijsku sposobnost.

Fenolni antioksidansi ometaju oksidaciju lipida i drugih molekula, mehanizmom brzog dodavanja vodikovog atoma endogenim radikalima, pri čemu nastaje fenolni radikal koji je relativno stabilan pa ne izaziva nove lančane reakcije.<sup>21</sup>

### 1.3.3. Lijekovi koji sadrže fenolnu skupinu

Veliki broj fenolnih skupina i njihova interakcija s brojnim molekulama razlog su velikog broja lijekova koji sadrže fenolnu skupinu. Ovi spojevi odlikuju se brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Oni pokazuju protuupalno, antimikrobno, antikancerogeno, spazmolitičko, analgetsko, antimutageno, antipiretičko i brojna druga djelovanja.<sup>19</sup>

Različite vrste polifenola (fenolna kiselina i flavonoidi) djeluju antikancerogeno, oni štite DNA od oksidativnog oštećenja inaktivirajući kancerogene, inhibiraju ekspresiju mutiranih gena i aktivnost enzima koji sudjeluju u aktivaciji prokarcinogena.<sup>21</sup>

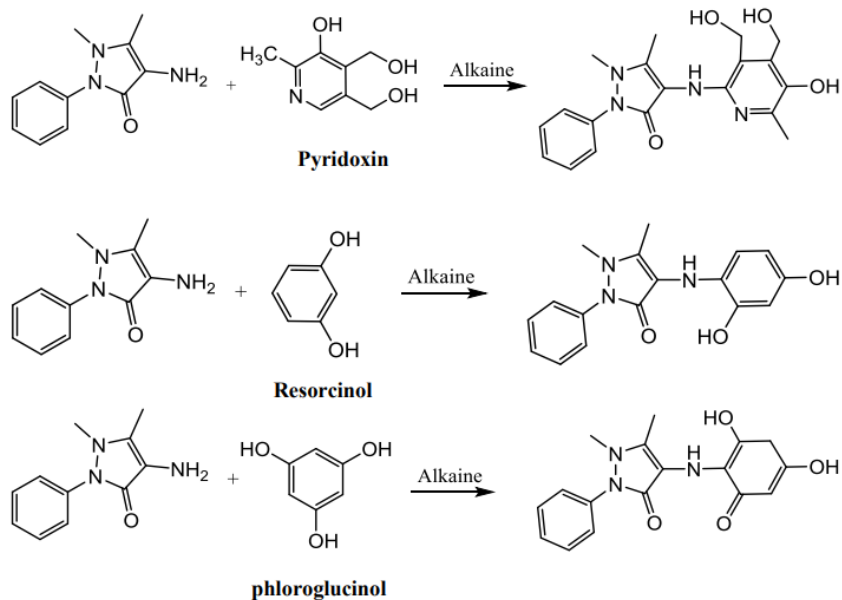
Fenol i fenolni spojevi male molekulske mase važni su sastojci brojnih proizvoda koji djeluju kao antiseptik. Oni su sastojci paste za zube, sapuna i brojnih drugih detergenata koji se koriste u kućanstvima.<sup>19</sup> Rezorcinol je primjer lijeka koji djeluje kao antiseptik. Među najvažnije jednostavne fenole ubrajamo salicilnu kiselinu koja ima antibakterijska, antiseptička i protuupalna svojstva. Najpoznatiji lijekovi koji djeluju kao analgetik su paracetamol i morfin, koji je opioidni analgetik. Paracetamol ima i antipiretsko djelovanje, te se obično koristi za ublažavanje boli i vrućice. Amoksicilin je primjer antibiotika koji

sadrži fenolnu skupinu. Koristi se za tretman velikog broja bakterijskih infekcija, poput upale grla, upale pluća, infekcije kože itd. Brojni fenolni lijekovi djeluju kao agonisti beta2-adrenergičkih receptora, primjer su salbutamol sulfat, ritodrine hidroklorid i izoksuprin hidroklorid. Oni oponašaju rad prirodnih kateholamina poput epinefrina i dopamina. Mogu djelovati izravno ili neizravno, Kod izravnog djelovanja oni stupaju u interakciju s adrenergičkim receptorima, dok kod neizravnog djelovanja potiču otpuštanje endogenih kateholamina.



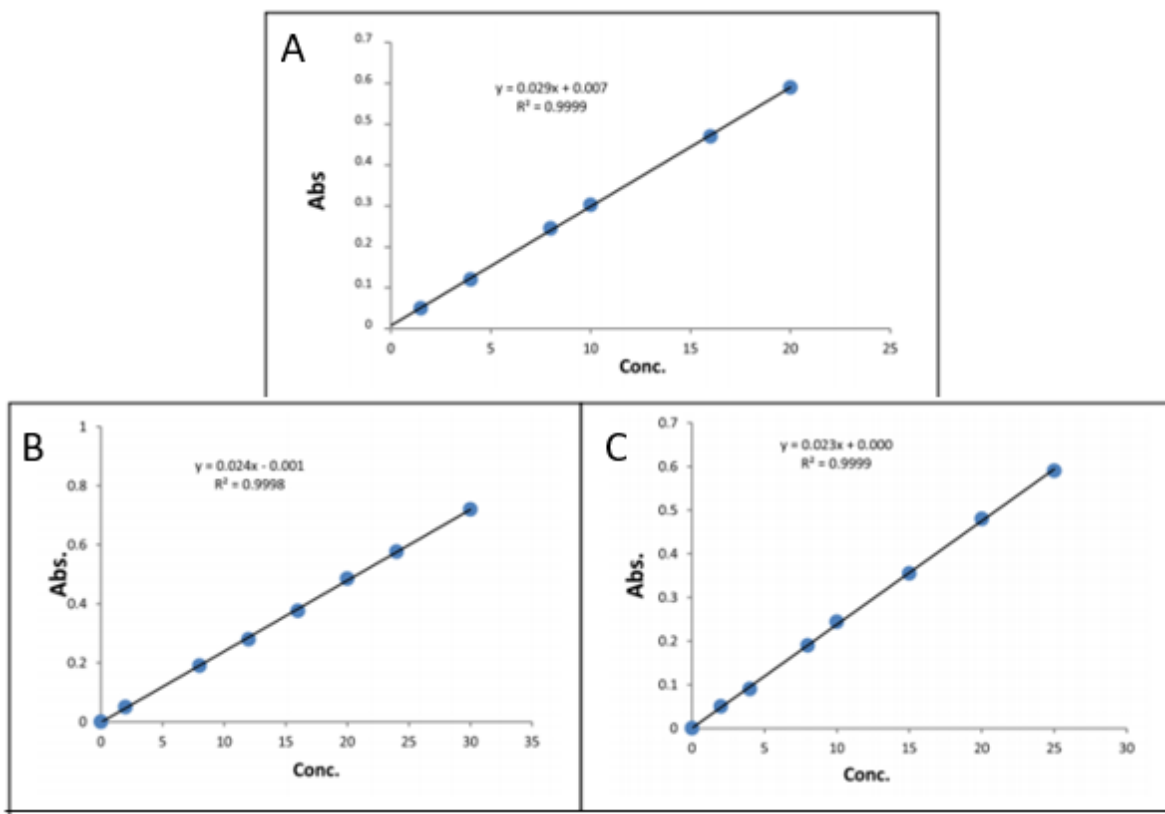
## 2. PREGLED LITERATURE

Tri važna jednostavna fenola su rezorcinol, piridoksin i floroglucinol. Oni se povezuju sa smanjenjem oksidacijskog stresa koje je uzrokovano starenjem. Rezorcinol se koristi kao antiseptik i dezinficijens te se koristi u liječenju kroničnih bolesti kože. Piridoksin se koristi u liječenju ili prevenciji nedostatka vitamina B6 te u liječenju određene vrste anemije. Floroglucinol ima spazmolitička svojstva, ali se prvenstveno koristi kao analitički reagens. K.S. Abd-Alrassol i E. Q. Jasim su predložili novu spektrofotometrijsku metodu za određivanje navedenih lijekova. Metode se temelji na reakciji lijekova s 4-aminofenazonom a potom s bakrom ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kako bi se dobio obojeni produkt.



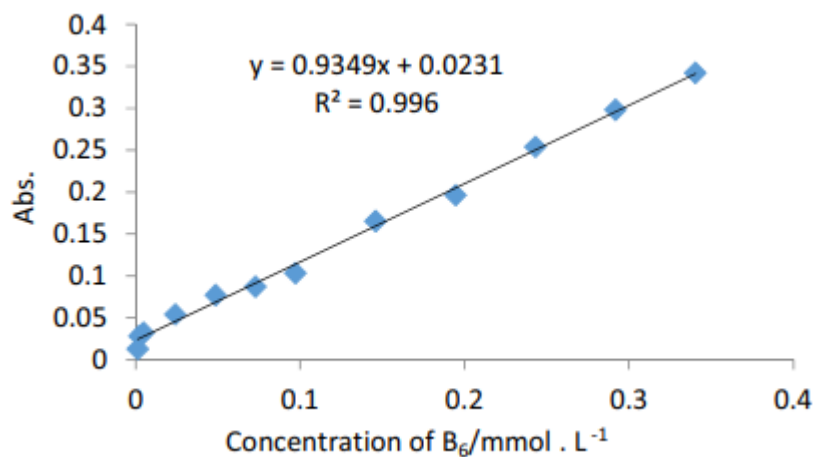
Slika 10: predloženi mehanizam reakcije lijekova s 4-aminofenazonom<sup>22</sup>

Linearni odnos između apsorbancije i koncentracije lijekova je 1.5-20 , 2.5-30 , 2.0-25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Granica detekcije i granica određivanja su redom 0.48, 0.15, 0.01  $\mu\text{g} / \text{mL}$  i 1.45, 0.46 i 0.04 za piridoksin, rezorcinol i floroglucinol.<sup>22</sup>



Slika 11: Kalibracijska krivulja (A) piridoksin; (B) rezorcinol; (C) floroglucinol <sup>22</sup>

Pored navedene metode postoje brojne druge spektrofotometrijske metode za određivanje piridoksina. Metoda koju su predložili A. F. Khudhair, S. I. Saeed, A.A. Marhoon i H. F. Alesary temelji se na formiranju micela. U navedenoj metodi piridoksin se najprije kompleksira s ionima bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ), nakon čega se dodaje reagens, klorazol crna otopina (Chlorazol black), kako bi se dobila zelena otopina koja ima širok pik na UV-VIS spektru. Potom se dodaje SDS kako bi se formirale micelle zelene boje. Parametri koji su dali optimalne reakcijske uvjete, kao što su koncentracije reagensa, SDS-a, pH, temperatura, vrijeme i drugi proučavani su kako bi se dobila linearna kalibracijska krivulja u kojoj je utvrđeno da raspon linearnosti leži između  $1,22 \times 10^{-3}$  -  $34 \times 10^{-2}$  mM. Granica detekcije iznosi  $2,56 \times 10^{-4}$  mM.<sup>23</sup>



Slika 12: Kalibracijska krivulja za piridoksin<sup>23</sup>

Razvijene su dvije nove metode, spektrofotometrijska i fluorescentna spektroskopija, za analizu lijekova koje sadrže fenolu skupinu. Analizirani su sljedeći lijekovi: terbutalin sulfat, fenoterol hidrobromid, etilefrin hidroklorid, izoksuprin hidroklorida, etamsilat i doksiciklin hidrolata. Obje metode se temelje na oksidaciji navedenih lijekova s cerijem(IV) u kiselom mediju. Spektrofotometrijska metoda se temelji na mjerenju razlike apsorbancije koja predstavlja višak cerija(IV), dok se kod fluorescentne spektroskopije mjeri fluorescencija nastalog cerija (III).

Terbutalin sulfat, fenoterol hidrobromid i izoksuprin hidroklorid su agonisti beta2-adrenergičkih receptora, koriste se u liječenju bronhijalne astme dok se izoksuprin koristi za inhibiranje kontrakcije maternice u slučaju preranog porođaja. Etilefrin je agonist alfa1 adrenergičkih receptor, te uzrokuje izrazitu arterijsku vazokonstrikciju. Doksiciklin-hidrolat je bakteriostatski antibiotik s djelovanjem na širok spektar aerobnih i anaerobnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Etamsilat djeluje hemostatski; povećava stvaranje fibrina i tromboplastina te ubrzava proces zgrušavanja krvi.<sup>24</sup>

Tablica 1: Tablica Kvantitativni analitički parametri za reakciju ispitivanih lijekova s cerijem (IV) nakon mjerenja razlike u apsorbanciji na 317 nm

Lijek	Linearni rang ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Granica detekcije ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Granica određivanja ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
terbutalin sulfat	2.0-14.0	0.496	1.654
fenoterol hidrobromid	2.0-12.0	0.190	0.634
izoksuprin hidroklorid	3.0-24.0	0.574	1.914
Etilefrin hidroklorid	2.0-16.0	0.242	0.808
Etamsilat	3.0-18.0	0.787	2.624
Doksiciklin-hidrolat	2.0-12.0	0.313	1.043

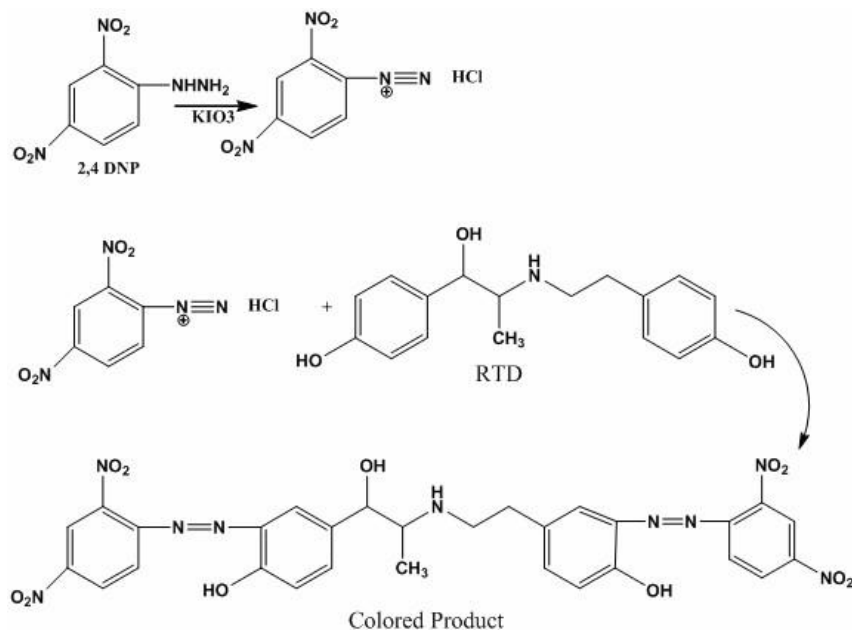
Tablica 2: Kvantitativni analitički parametri za reakciju ispitivanih lijekova s cerijem (IV) mjerenjem relativnog intenziteta fluorescencija pri  $\lambda_{\text{ex/em}} = 255/354$  nm.

Lijek	Linearni rang ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Granica detekcije ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Granica određivanja ( $\text{ng mL}^{-1}$ )
terbutalin sulfat	20.0-160.0	5.51	18.30
fenoterol hidrobromid	20.0-160.0	5.37	17.91
Etilefrin hidroklorid	20.0-200.0	5.73	19.10
Etamsilat	40.0-240.0	9.52	31.74
Doksiciklin-hidrolat	20.0-160.0	4.77	15.91

Usporedbom ovih dvaju metoda možemo zaključiti da je fluorescentna spektroskopija pogodnija zbog niže vrijednosti granice detekcije i granice određivanja, dok spektrofotometrijska metoda ima veći linearni raspon koncentracije.<sup>24</sup>

Mnoge metode određivanja fenolnih lijekova se temelje na reakcijama kondenzacije s diazonijevom soli u kojima nastaju azo-spoj intenzivne boje koji se potom određuju spektrofotometrijski.

P.Nagaraja i A.K. Shrestha su proveli spektrofotometrijsko određivanje sljedećih lijekova: salbutamol sulfat (SLB), ritodrine hidroklorid (RTD), izoksuprin hidroklorid (IXP) i amoksicilin trihidrat (AMOX). Metoda se temelji na oksidaciji 2, 4-dinitrofenilhidrazina (2,4 DNP) s  $\text{KIO}_3$  ili  $\text{KIO}_4$ , čime se dobiva diazonijev kation koji reagira s lijekovima elektrofilnom supstitucijom dajući crveno obojeni produkt.

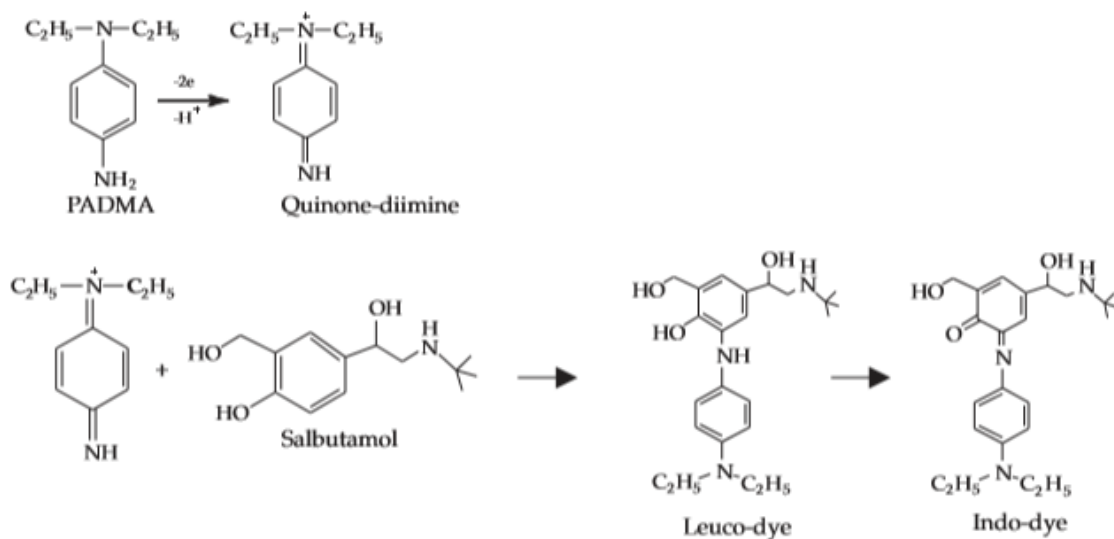


Slika 13: Predloženi mehanizam reakcije 2,4 DNP sa RTD<sup>25</sup>

Salbutamol i ritodrin su agonisti beta-2 receptora. Salbutamol se koristi u liječenju astme. Ritodrin je lijek za opuštanje maternice koji se koristi za kontrolu prijevremenog porođaja, odnosno za smanjenje kontrakcije maternice. Amoksicilin je antibiotik širokog spektra djelovanja na gram pozitivne i gram negativne bakterije. Izoksuprin je derivat adrenalina, antagonist je alfa receptora i agonist beta receptora, koji se koristi za opuštanje maternice kod prijevremenog porođaja te uzrokuje širenje arterija zbog čega se koristi u liječenju perifernih krvnih žila.

Linearni odnos između apsorbancije i koncentracije lijekova je za SLB 2.5-17, RTD 2-29, IXP 5-30 i AMOX 4-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Granica dokazivanja je u rasponu od 0.09-0.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , te granica određivanja 0.30-2.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>25</sup>

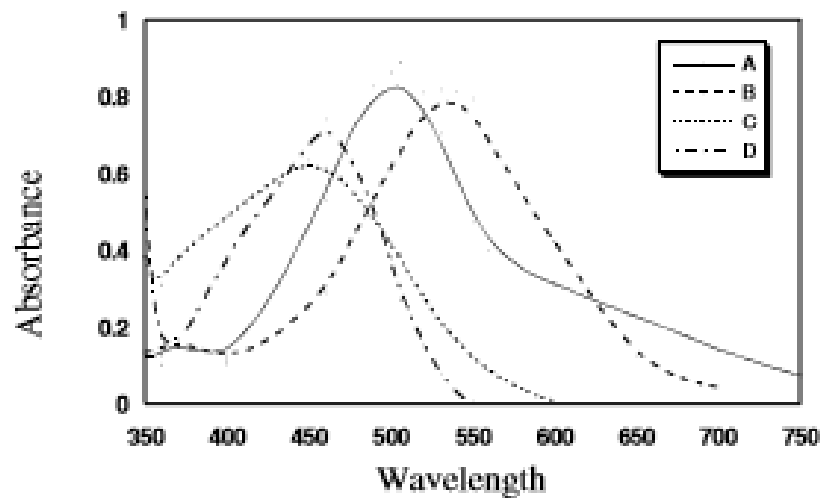
Navedeni lijekovi, izuzev amoksicilina, analizirani su korištenjem N,N-dietil-p-fenilenamin sulfata (PADMA). PADMA se najprije oksidira s KIO<sub>4</sub> kako bi nastao diazonijev kation koji potom reagira s navedenim lijekovima.



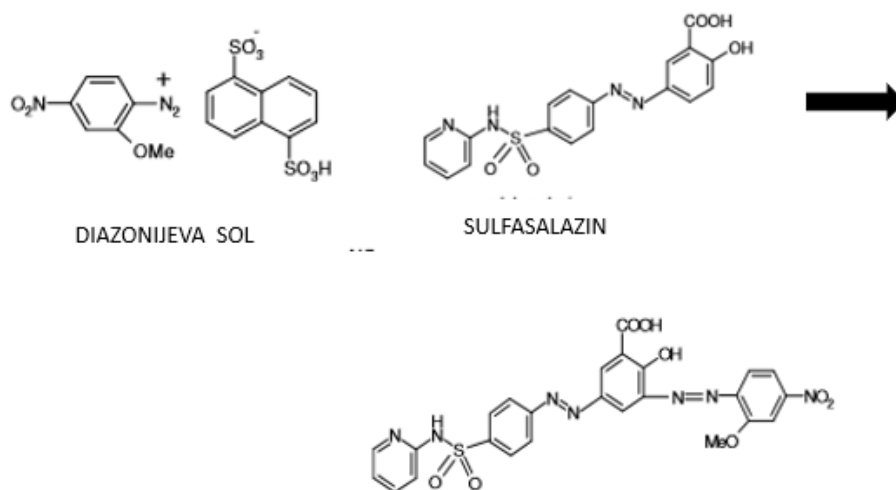
Slika 14: Predloženi mehanizam reakcije PADMA sa salbutamolom

Linearni odnos između apsorbancije i koncentracije lijeka je za SLB, RTD i IXP 1-7, 2-22 i 1-17  $\mu\text{g/mL}$ . Granica dokazivanja je u rasponu od 0.14-0.51  $\mu\text{g/mL}$ , a granica određivanja 0.48-1.45  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>26</sup>

Određivanje pomoću diazonijevog kationa može se primijeniti i za određivanje lijekova koji sadrže nitro skupinu. A. A. Khier, M. M. Elhenawee i M. S. Elmasry proveli spektrofotometrijsko određivanje lijekova koji sadrže fenolnu i nitro skupinu. Lijekovi koji su analizirani su senidazol i niklozamid (lijekovi koji su primarni aromatski amini), te nifuroksazid i sulfasalazin (fenolni lijekovi). Metoda se temelji na stvaranju azo-boje kondenzacijom lijekova s diazonijevom soli (brza crvena B sol). Lijekovi koji imaju nitro skupina se prije reakcije kondenzacije reducira s cinkovom u prahu. Predložena metoda je osjetljiva, precizna, točka i jednostavna te se može koristiti za određivanje navedenih lijekova u čistom obliku i farmaceutskom pripravku.<sup>27</sup>

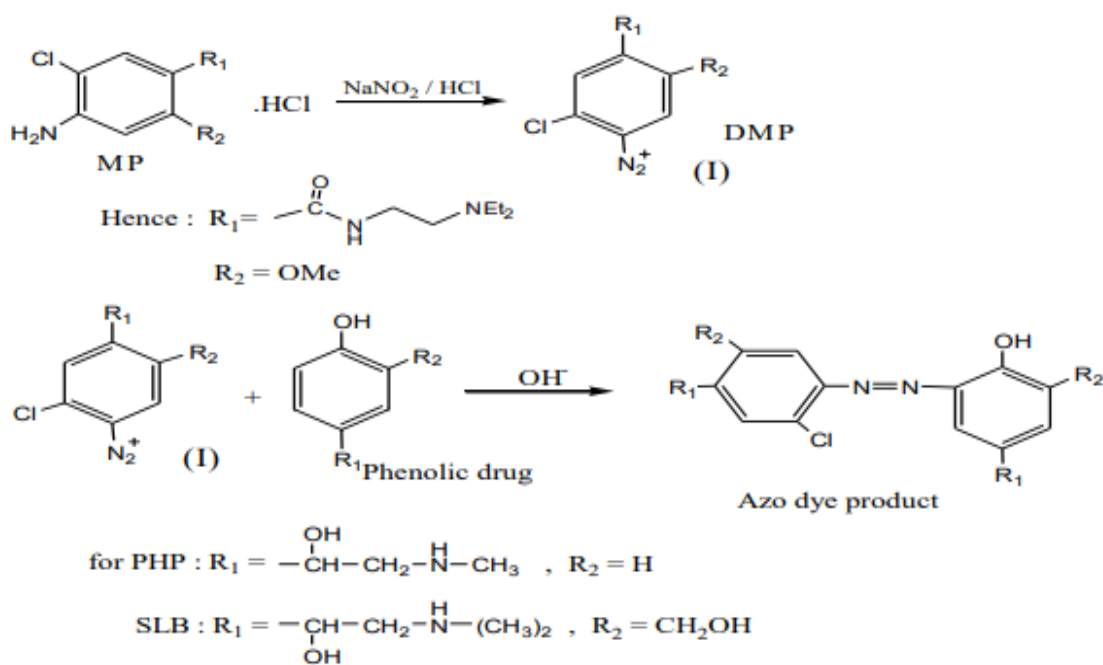


Slika 15: ApSORPCIJSKI SPEKTAR REAKCIJE IZMEĐU DIAZONIJEVE SOLI I (A) SENIDAZOLOM, (B) NIKLOZAMIDOM, (C) NIFUROKSAZIDOM I (D) SULFASALAZINOM.<sup>27</sup>



Slika 16: Predloženi mehanizam reakcije kondenzacije diazonijeve soli s sulfasalazinom<sup>27</sup>

M. Q. Al-Abachi i S. S. Abed su proveli spektrofotometrijsko određivanje dvaju lijekova SLB i fenilfrin hidroklorida (PHP). Metoda se temelji na reakciji kondenzacije diazotiranog reagensa, metoklopramida hidroklorida (MP), s navedenim lijekovima pri čemu nastaje narančasto obojeni produkt s maksimumom apsorpcije na 470nm.

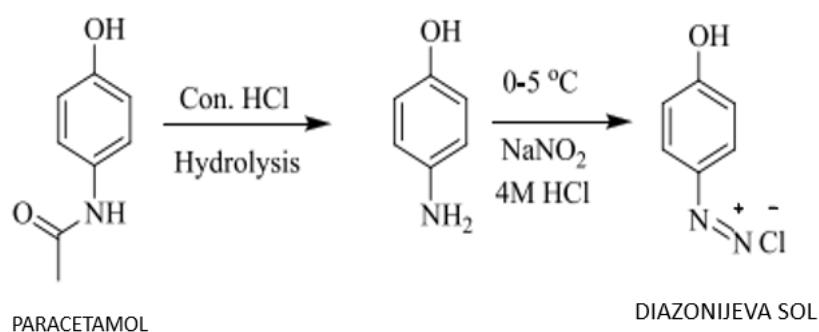


Slika 17: Predloženi mehanizam reakcije<sup>28</sup>

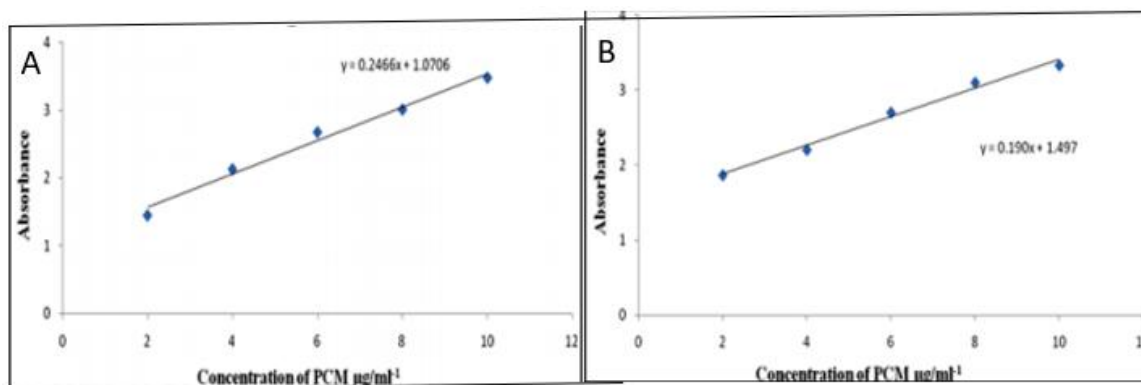
Pri optimalnim uvjetima, Beer-ov se zakon poštivao u rasponu koncentracija od 1-32, odnosno 1-14 μg mL<sup>-1</sup> za PHP, odnosno SLB. Granica detekcije i granica određivanja za PHP i SLB iznosile su 0.60, 0.52 μg mL<sup>-1</sup> i 2.02, 1.72 μg mL<sup>-1</sup>.<sup>28</sup>



Paracetamol se također može odrediti stvaranjem azo-bojila. Metoda se temelji na hidrolizi paracetamola nakon čega slijedi diazotacija paracetamola te kondenzacija s 8-hidroksikinolinom kako bi se dobila azo-boja s maksimumom apsorpcije na 470nm. Sandellova osjetljivost je  $7.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  a molarna apsorptivnost  $1.9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Beerov zakon se poštivao u rasponu koncentracija od 2-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Paralelno je provedeno i mjerenje pomoću 2-naftola, koji je manje stabilan. Sandellova osjetljivost je  $5.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  a molarna apsorptivnost  $2.46 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>29</sup>



Slika 18. Hidroliza i diazotacija paracetamola<sup>29</sup>



Slika 19. kalibracijske krivulje produkta kondenzacije paracetamola s (A)8-hidroksikinolinom (B) 2-naftolom<sup>29</sup>

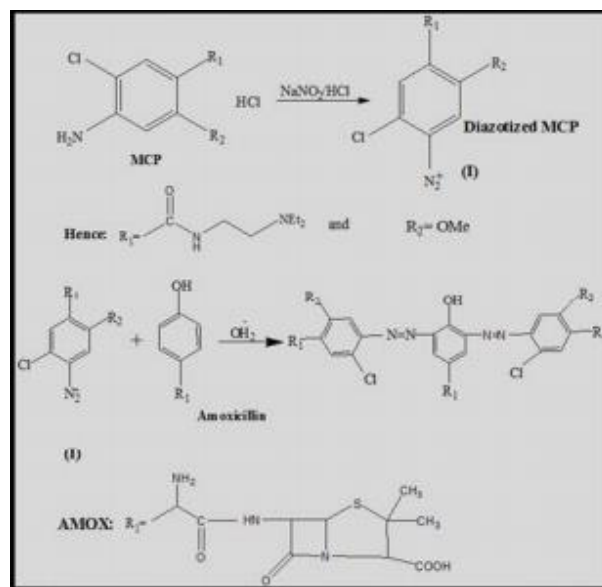
Paracetamol se koristi kao analgetik i antipiretik. Može se dobiti u različitim farmaceutskim formulacijama. Široko se koristi kao alternativa za pacijente osjetljive na acetilsalicilnu kiselinu (aspirin) u liječenju boli i vrućice. Predoziranje paracetamolom moglo bi uzrokovati smrtnu hepatotoksičnost. Zbog njegove česte upotrebe razvijen je veliki broj metoda njegovog određivanja. Jedna od tih metoda se zasniva na mjerenju razlike u apsorpciji uzoraka paracetamola koji su pripremljeni u različitim pH područjima. Apsorpcijski spektar se snima na 268 nm, a otopine paracetamola su pripremljene na sljedeći način: otapanjem u HCl-u (pH=1), otapanjem u fosfatnom puferu (pH=7) te otapanjem u NaOH (pH=13). Ova metoda je vrlo jednostavna i ne zahtijeva stroge uvijete niti specifične reagense. Linearni odnos između apsorpcije i koncentraciji je u rasponu od 2.5 do 40  $\mu\text{g/mL}$ , a granica detekcije je 0.59  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>30</sup>

Brojne su metode koje se temelje na oksidaciji paracetamola. gdje se kao oksidans može koristiti amonijev molibden, jodil benzoat i cerijev(IV) sulfat. Metoda u kojoj je oksidans amonijev molibdat provodi se u kiselom mediju te se dobiva plavi produkt s maksimumom apsorpcije na 670 nm. Beerov zakon se poštivao u rasponu koncentracije od 0,5-6  $\mu\text{g/mL}$ . Granica detekcije iznosi 0,10  $\mu\text{g/mL}$ , a Sandellova osjetljivost je 0,0059  $\mu\text{g/cm}^2$ .<sup>31</sup> Metoda u kojoj je oksidans jodil benzoat pokazuje maksimum na 444 nm. Sandellova osjetljivost ima vrijednost od 0.232  $\mu\text{g/cm}^2$  a Beerov zakon se poštiva u rasponu koncentracija 0-300  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>32</sup> Metoda koja se temelji na oksidaciji paracetamola s cerijevim(IV) sulfatom poštiva Beerov zakon u rasponu koncentracija 30-160  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>33</sup>

Još jedna od predloženih metoda određivanja paracetamola u lijekoma je UV-VIS spektrofotometrija nakon mikroekstakcije koja se temelji na DES-u. DES (duboko eutektičko otapalo) je ekološki prihvatljivo i ekonomično ekstrakcijsko otapalo. Dobiva se kompleksiranjem netoksične amonijeve soli (najčešće kolin klorid ili betaina) i prirodnog, nenabijenog donora vodikove veze (poput alkohola, fenola, karboksila kiselina itd.) predložena metoda ima dobru linearnost (50–800  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Granica određivanja je 14,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>34</sup>

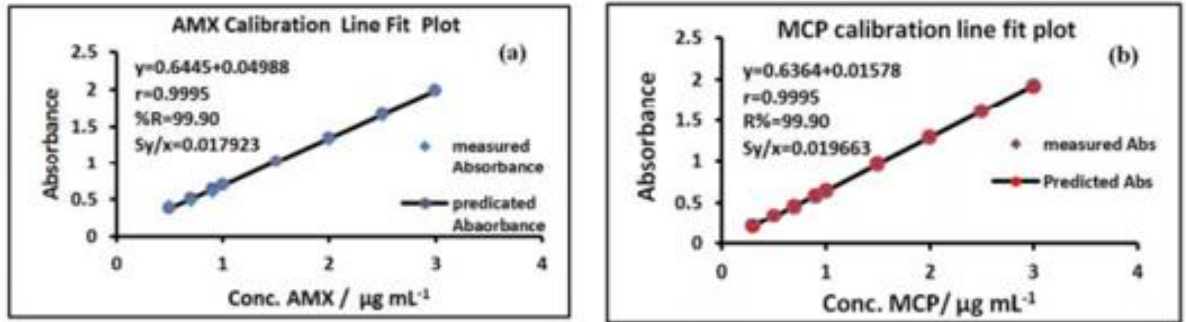
Z.A-A. Khammas i H.M. Abdulkareem predložile su novu spektrofotometrijsku metodu za međusobno određivanje amoksicilina (AMX) i metoklopramidklorid hidrata(MCP. HCl) u farmaceutskim proizvodima nakon CPE (*Cloud point extraction*).

Metode se temelji na reakciji diazotiranog MCP s amoksicilinom u alkalnom mediju kako bi se dobio narančasti produkt koji se može lako ekstrahirati te istovremeno spektrofotometrijski određivati. Općenito CPE-spektrofotometrija se temelji na pretvaranju ljekovitog spoja u kelat ili obojeni derivat koji se može ekstrahirati ekstrakcijom točke zamućenja, a zatim izmjeriti kolorimetrijski.



Slika 20: Predloženi mehanizam reakcije<sup>35</sup>

Maksimum apsorpcije narančastog produkta (AMZ-MCP) je na 479 nm, dok je za pojedinačne čiste otopine 274, odnosno 272nm za AMX i MCP. U optimiziranim uvjetima, Beerov se zakon poštivao u rasponu koncentracija od 0,3-3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za AMX i MCP. Granica detekcije i granica određivanja su 0,083, odnosno 0,29  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za AMX te 0,098, odnosno 0,31  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za MCP.



Slika 21: Kalibracijske krivulje za (a) AMX; (b) MCP<sup>35</sup>

Analiza ovih lijekova privukla je veliku pozornost zbog njihove česte primjene. Amoksisilin se obično koristi kao antibakterijski lijek u liječenju infekcija uzrokovanih gram-pozitivnim te gram-negativnim bakterijama. Metoklopramid hidroklorid se široko koristi u prevenciji i ublažavanju mučnine i povraćanja te se primjenjuje u kombinaciji s kemoterapijom.<sup>35</sup>

### 3. RASPRAVA

Mnogobrojne su analitičke tehnike koje se koriste za analizu lijekova. Neke od tih tehnika su kromatografija, titrimetrija, spektroskopija, elektroforeza itd. Veliki broj kemičara istražuje nove metode koje su jeftinije, jednostavnije, brže i ekološki prihvatljive. Spektrofotometrija se upravo odlikuje tim pozitivnim karakteristikama. Najveća prednost spektrofotometrijskih metoda je velika dostupnost instrumenta, koji gotovo sveprisutan u analitičkim laboratorijima. Osnovni zadatak spektrofotometrijskih metoda za analizu lijekova je pronalazak selektivnog reagensa koji nakon reakcije s analitom pokazuje jasan maksimum apsorbancije. Reagensu također ne bi trebali smetati aditivi u farmaceutskim pripravcima, odnosno prisutne interferencije trebaju biti minimalne. Osnovni zahtjev svih metoda, pa tako i spektrofotometrije, je selektivnost, preciznost, točnost i ponovljivost.

Postoji više spektrofotometrijskih metoda za analizu istoga lijeka, primjerice salbutamola. U tablici 3 dani su kvantitativni analitički parametri za određivanje salbutamola s tri različite spektrofotometrijske metode, odnosno tri različita reagensa.

Tablica 3: Kvantitativni analitički parametri za određivanje salbutamola s različitim reagensima

<b>Reagens</b>	<b>Linearno dinamičko područje <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>Granica dokazivanja <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>Granica određivanja <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>Referenca</b>
<b>2,4 DNP</b>	2,5-17	0,2	0,66	25
<b>PADMA</b>	1-7	0,14	0,48	26
<b>metoklopramid hidroklorid</b>	1-14	0,52	1,72	28

Iako je PADMA metoda najpogodnija zbog najniže vrijednosti granice detekcije i određivanja sve navedene metode su točne i precizne te se mogu koristiti za rutinsku kontrolu salbutamola.

#### 4. ZAKLJUČAK

Razvoj farmaceutske industrije i lijekova donio je revoluciju u kvaliteti života. Lijek može poslužiti svojoj svrsi samo ako se daje u odgovarajućoj dozi i ako nisu prisutna onečišćenja. Kako bi se procijenila kvaliteta lijeka razvile su se mnogobrojne analitičke metode i tehnike.

Spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih tehnika za određivanje koncentracije analita. Ona se odlikuje brojnim prednostima. Jedna od najistaknutijih prednosti je prilično jednostavan instrument koji je lako dostupan i nije skup te je prilično lako rukovati njime.

Osnovni nedostatak spektrofotometara su niska osjetljivost i selektivnost te se primjenjuju samo za tekuće uzorke. Problem selektivnosti i osjetljivosti se rješavaju pronalaskom optimalnih reakcijskih uvjeta, kao što su pH, temperatura, koncentracija, izbor reagensa i sl.

Provode se brojna istraživanja koja za cilj imaju razviti jednostavnu, brzu, preciznu, točnu i ekološki prihvatljivu metodu.

Najčešće vrste kemijskih reakcija koje se koriste u spektrofotometrijskom određivanju fenolnih lijekova su reakcije stvaranja azo-bojila i oksidacijsko-redukcijske reakcije

## 5. LITERATURA

1. *L. Ge, S-Ping Li, G. Lisak*, Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **179** (2020), 3-5 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112913>
2. *A. Manickavasagan, H. Jayasuriya* (ur.), *Imaging with Electromagnetic Spectrum: Applications in Food and Agriculture*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, str. 1-2.
3. *I. Škorić*, Molekulska spektroskopija, interna skripta Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020., str. 27-29
4. *C.A. De Caro, C. Haller*, *UV/VIS Spectrophotometry: Fundamentals and Applications*, Mettler-Toledo Publication, 2015, str. 7-10.
5. *S. Gorog*, *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*, CRC Press, 1995. str. 7-20 str.
6. *P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole*, *Encyclopedia of Analytical Science: Reference Work*, 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier, 2005 str. 373-383
7. URL: [https://www.google.com/search?q=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja&sxsrf=ALeKk00St\\_QDBP-RIR5yq5CZyisSRU1uBQ:1599300272899&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiIvp714dHrAhUN2KQKHTmiAIQQ\\_AUoAXoECBEQAw&biw=1600&bih=718#imgrc=wPYio5Ese4wJ9M](https://www.google.com/search?q=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja&sxsrf=ALeKk00St_QDBP-RIR5yq5CZyisSRU1uBQ:1599300272899&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiIvp714dHrAhUN2KQKHTmiAIQQ_AUoAXoECBEQAw&biw=1600&bih=718#imgrc=wPYio5Ese4wJ9M) (10.08.2020.)
8. URL: <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm> (10.08.2020.)
9. URL: [https://www.google.com/search?q=spektrofotometar+shema&tbm=isch&ved=2ahUKEwiE4\\_n4NHrAhUCz6QKHcczB3EQ2-cCegQIABAA&oq=spektrofotometar+shema&gs\\_lcp=CgNpbWcQAzoECCMQJzoECAAQGFD5EFjdHGDbHWgAcAB4AIABsQGIAfAFkgEDMC4ImAEAoAEBqgELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&scient=img&ei=qmFTX4TmDoKekwXH55yIBw&bih=718&biw=1600#imgrc=A9L6OL6FILnS1M](https://www.google.com/search?q=spektrofotometar+shema&tbm=isch&ved=2ahUKEwiE4_n4NHrAhUCz6QKHcczB3EQ2-cCegQIABAA&oq=spektrofotometar+shema&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECCMQJzoECAAQGFD5EFjdHGDbHWgAcAB4AIABsQGIAfAFkgEDMC4ImAEAoAEBqgELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&scient=img&ei=qmFTX4TmDoKekwXH55yIBw&bih=718&biw=1600#imgrc=A9L6OL6FILnS1M) (10.08.2020.)

10. URL: <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/sparq-ed-services/spectrophotometry> (10.08.2020.)
11. URL: <http://www.zzjzpgz.hr/nzl/101/patnja.htm> (15.08.2020.)
12. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/lijekovi/primjena-raspodjela-i-izlucivanje-lijekova> (15.08.2020.)
13. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/lijekovi/cimbenici-odgovora-na-lijek> (15.08.2020.)
14. S. Padmanabhan, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine, 1<sup>st</sup> Ed. Academic Press, 2014. str. 341-367
15. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školsko knjiga, 2013. Str. 351-376.
16. URL: [https://www.google.com/search?q=aktivni+i+pasivni+transport+&tbm=isch&ved=2ahUKEwix7onTxdLrAhXUIMUKHUAzDn0Q2-cCegQIABAA&oq=aktivni+i+pasivni+transport+&gs\\_lcp=CgNpbWcQAzIECCMQJzIECCMQJzIECAAQGFCBEVjzH2DhJGgAcAB4AIABmQGIAdEMkgEE MC4xMpgBAKABAaoBC2d3cy13aXotaW1nwAEB&sclient=img&ei=ZstTX7GjFdTBlAbA5rjoBw&bih=718&biw=1600&hl=hr#imgsrc=nP4Z67IXDCwxbM](https://www.google.com/search?q=aktivni+i+pasivni+transport+&tbm=isch&ved=2ahUKEwix7onTxdLrAhXUIMUKHUAzDn0Q2-cCegQIABAA&oq=aktivni+i+pasivni+transport+&gs_lcp=CgNpbWcQAzIECCMQJzIECCMQJzIECAAQGFCBEVjzH2DhJGgAcAB4AIABmQGIAdEMkgEE MC4xMpgBAKABAaoBC2d3cy13aXotaW1nwAEB&sclient=img&ei=ZstTX7GjFdTBlAbA5rjoBw&bih=718&biw=1600&hl=hr#imgsrc=nP4Z67IXDCwxbM) (17.08.2020.)
17. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika/apsorpcija> (17.08.2020.)
18. F. A. Carey, Organic Chemistry, 4<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill College, 2000. Str. 939-971.
19. L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. **56** (1998) 317-333. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
20. V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, Pharmacogn Rev. **4** (2010) 118-126. doi: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
21. F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. J Functional Foods, **18** (2015) 820–897. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018



22. *S. Khawla, J.E. Qanber*, Spectrophotometric Determination of Some Phenolic Compounds by Formation of Copper(II) Complexes, IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng., **571** (2019), 012097 doi:10.1088/1757-899X/571/1/012097
23. *A. F. Khudhair et al*, A New Spectrophotometric Method to Determine Vitamin B6 in Pharmaceutical Formation Samples Using a Micelle Form, J. Phys.: Conf. Ser. **1234** (2019), 012097, doi:10.1088/1742-6596/1234/1/012087
24. *M.A. Omar et al*, Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of certain biologically active phenolic drugs in their bulk powders and different pharmaceutical formulations, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc, **192** (2018) 108–116, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.10.065>
25. *P. Nagaraja, A.K. Shrestha*, Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of certain biologically active phenolic drugs in their bulk powders and different pharmaceutical formulations, E-Journal of Chemistry, **7** (2010), 395-402, doi:10.1155/2010/328061
26. *P. Nagaraja, A. Shrestha, A. Shivakumar, A. Gowda*, Use of N, N-diethyl-p-phenylenediamine sulphate for the spectrophotometric determination of some phenolic and amine drugs, Acta Pharm. **60** (2010) 217–227, doi:10.2478/v10007-010-0015-x
27. *A. Abul Khier, M. M. Elhenawee, M. S. Elmasry*, (2008). Spectrophotometric Method for the Determination of Some Drugs Using Fast Red B Salt. E-Journal of Chemistry, **5** (2008) 1087-1097, doi:10.1155/2008/945140
28. *M. Q. Al-Abachi, S.A. Sadeem*, Spectrophotometric determination of Phenylephrine hydrochloride and Salbutamol sulphate drugs in pharmaceutical preparations using diazotized Metoclopramide hydrochloride, Baghdad Sci. J. **12** (2015), 167-177, <https://doi.org/10.21123/bsj.2015.12.1.167-177>
29. *R.B. Dixit, J.A. Patel*, Spectrophotometric determination of paracetamol drug using 8-hydroxyquinoline, IJPSR, **5** (2014), 2393-2397, DOI: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(6\).2393-97](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(6).2393-97)
30. *N. H. S. Ahmida, M. S. Abu-Naja, Y. S.A. Doghman*, Determination of Paracetamol in Tablet by Difference Spectrophotometric Method, Asian J. Chem **21** (2009), 2233-2240

31. *B. Morelli*, Spectrophotometric determination of paracetamol in pure form and in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **7** (1989) 577–584. doi:10.1016/0731-7085(89)80223-7
32. *K. K. Verma, A. K. Gulati, S. Palod, P. Tyagi*, Spectrophotometric determination of paracetamol in drug formulations with 2-iodylbenzoate, *Analyst*, **109** (1984), 735. doi:10.1039/an9840900735
33. *S. M. Sultan, I. Z. Alzamil, A. M. A. Alrahman, S. A. Altamrah, Y. Asha*, Use of cerium(IV) sulphate in the spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical preparations. *The Analyst*, **111** (1986), 919-921, doi:10.1039/an9861100919
34. *B. Doğan, A. Elik, N. Altunay*, Determination of paracetamol in synthetic urea and pharmaceutical samples by shaker-assisted deep eutectic solvent microextraction and spectrophotometry, *Microchemical Journal*, **154** (2020) 104645, doi:10.1016/j.microc.2020.104645
35. *Z. A-A. Khammas, M.A. Hawraa*, A New Visible Spectrophotometric Approach for Mutual Determination of Amoxicillin and Metoclopramide Hydrochloride in Pharmaceuticals After Cloud Point Extraction, *Science Journal of Analytical Chemistry*. **4** (2016), 66-76. doi: 10.11648/j.sjac.20160405.12