

# Usporedba spektrofotometrijskog i potenciometrijskog određivanja biološki aktivnih tvari u farmaceuticima - pregledni rad

---

**Habazin, Antonia**

**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:167:310497>

*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**

**USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKOG I POTENCIJOMETRIJSKOG  
ODREĐIVANJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI U FARMACEUTICIMA –  
PREGLEDNI RAD**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIA HABAZIN**

**Matični broj: 407**

**Split, rujan 2020.**



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

**USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKOG I POTENCIOMETRIJSKOG  
ODREĐIVANJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI U FARMACEUTICIMA –  
PREGLEDNI RAD**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIA HABAZIN**

**Matični broj: 407**

**Split, rujan 2020.**

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

**COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC  
DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN  
PHARMACEUTICALS – REVIEW**

**BACHELOR THESIS**

**ANTONIA HABAZIN**

**Parent number: 407**

**Split, september 2020.**

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Kemija

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28 sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** prof.dr.sc Marija Bralić

**USPOREDBA SPEKTROFOTOMETRIJSKOG I POTENCIOMETRIJSKOG ODREĐIVANJA  
BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI U FARMACEUTICIMA – PREGLEDNI RAD**

Antonia Habazin, 407

**Sažetak:** Cilj ovog završnog rada bio je pregledati noviju literaturu spektrofotometrijskih i potenciometrijskih određivanja biološki aktivnih tvari u farmaceuticima. Isto tako, usporediti spektrofotometrijska i potenciometrijska mjerenja različitih autora. Aktivne farmaceutske tvari(API) obrađene u znanstvenim radovima su metformin, bupropion hidroklorid i difenhidramin. Ispitana je valjanost izvornih UV- i izvedenih UV-spektrofotometrijskih metoda s obzirom na preciznost, raspon linearosti, točnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije. Načinjene su krivulje pH vrijednosti u odnosu na dodani volumen titranta pri potenciometrijskim titracijama. U pregledanim radovima potenciometrijska metoda daje bolju točnost i bolju preciznost od spektrofotometrijske, ali do koncentracija reda veličine  $10^{-5}$  M. Međutim, UV-VIS spektrofotometrija omogućava određivanje nižih koncentracija opisanih tvari.

**Ključne riječi:**spektrofotometrija, potenciometrija, API, biološki aktivne tvari.

**Rad sadrži:** 29 stranica, 24 literaturne reference, 18 slika.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić
2. Prof. dr. sc. Josipa Giljanović
3. Prof. dr. sc. Marija Bralić

**Datum obrane:** 29.9.2020

## 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. 28

**Mentor:** PhD. Marija Bralić, full professor

### **COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN PHARMACEUTICALS – REVIEW**

Antonia Habazin, 407

**Abstract:** The aim of this final paper was to review the new literature on spectrophotometric and potentiometric determinations of biologically active substances in pharmaceuticals. Also, to compare spectrophotometric and potentiometric measurements of different authors. The active pharmaceutical ingredients(APIs) processed in scientific papers are metformin, bupropion hydrochloride and diphenhydramine. The validity of original UV and derived UV spectrophotometric were examined with respect to precision, linearity range, accuracy, detection limit and quantification limit. Curves of pH values in relation to the added volume of titrant were made during potentiometric titration. In these works, the potentiometric method gives the best accuracy than the spectrophotometric one. However, UV-VIS spectrophotometry can handle compounds with lower solubility and lower sample concentrations.

**Keywords:** spectrophotometry, potentiometry, API, biologically active substances.

**Thesis contains:** 29 pages, 24 references, 18 figures.

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

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

**Defence date:** 29.9.2020

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



## *ZAHVALA*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mariji Bralić koja mi je omogućila sve potrebne materijale i pomogla svojim savjetima pri izradi ovog završnog rada, i što je uvijek imala vremena za moje brojne upite.*

*Također, zahvaljujem se svojim kolegama i kolegicama, koji su uvijek bili uz mene i pružili pomoć u svakom trenutku.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima i bratu koji su mi uvijek bili velika podrška, kako u materijalnom tako i u psihološkom smislu.*

*Veliko HVALA svima!*

**ZADATAK ZAVRŠNOG RADA:**

Pregledati literaturu o određivanju biološki aktivnih tvari u farmaceuticima spektrofotometrijski i potenciometrijski.

Usporediti određivanje biološki aktivnih tvari u farmaceuticima spektrofotometrijski i potenciometrijski.

## **SAŽETAK**

Cilj ovog završnog rada bio je pregledati noviju literaturu spektrofotometrijskih i potenciometrijskih određivanja biološki aktivnih tvari u farmaceuticima. Isto tako, usporediti spektrofotometrijska i potenciometrijska mjerenja različitih autora. Aktivne farmaceutске tvari(API) obrađene u znanstvenim radovima su metformin, bupropion hidroklorid i difenhidramin. Ispitana je valjanost izvornih UV- i izvedenih UV-spektrofotometrijskih metoda s obzirom na preciznost, raspon linearnosti, točnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije. Načinjene su krivulje pH vrijednosti u odnosu na dodani volumen titranta pri potenciometrijskim titracijama. U pregledanim radovima potenciometrijska metoda daje bolju točnost i bolju preciznost od spektrofotometrijske, ali do koncentracije reda veličine  $10^{-5}$ M. Međutim, UV-VIS spektrofotometrija omogućava određivanje nižih koncentracija opisanih tvari.

**Ključne riječi:** spektrofotometrija, potenciometrija, API, biološki aktivne tvari.

## **SUMMARY**

The aim of this final paper was to review the new literature on spectrophotometric and potentiometric determinations of biologically active substances in pharmaceuticals. Also, to compare spectrophotometric and potentiometric measurements of different authors. The active pharmaceutical ingredients (APIs) processed in scientific papers are metformin, bupropion hydrochloride and diphenhydramine. The validity of original UV and derived UV spectrophotometric were examined with respect to precision, linearity range, accuracy, detection limit and quantification limit. Curves of pH values in relation to the added volume of titrant were made during potentiometric titration. In these works, the potentiometric method gives the best accuracy than the spectrophotometric one. However, UV-VIS spectrophotometry can handle compounds with lower solubility and lower sample concentrations.

**Keywords:** spectrophotometry, potentiometry, API, biologically active substances.

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1 FARMACEUTICI.....	2
1.1.1 AKTIVNI FARMACEUTSKI SASTOJAK(API) .....	2
1.1.2 ANTIDEPRESIV(BUP).....	3
1.1.3 HIPOGLIKEMIJSKA SRESTVA(METFORMIN).....	4
1.2 SPEKTROFOTOMETRIJA.....	5
1.2.1 UVOD .....	5
1.2.2 UV I VIS SPEKTROFOTOMETRIJA .....	7
1.3 POTENCIOMETRIJA .....	8
1.3.1 UVOD .....	8
1.3.2 POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA.....	10
1.3.3 FLOW INJECTION ANALIZA(FIA) .....	11
2. PREGLED NOVIJE LITERATURE .....	13
2.1. ODREĐIVANJE METFORMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJU I POTENCIJOMETRIJU .....	13
2.1.1 UVOD .....	13
2.1.2 POTENCIOMETRIJSKA MJERENJA .....	13
2.1.3 FLOW INJECTION ANALIZA(FIA) .....	15
2.1.4 POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA.....	15
2.1.5 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA.....	18
2.2 ODREĐIVANJE BUPROPION HIDROKLORIDA(BUP) U FARMACEUTSKIM TABLETAMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJSKE I POTENCIOMETRIJSKE METODE.....	19
2.2.1 UVOD .....	19
2.2.2 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA.....	19
2.2.3 POTENCIOMETRIJSKA MJERENJA .....	21
3. RASPRAVA .....	24
3.1 USPOREDBA REZULTATA SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I POTENCIOMETRIJSKIH ODREĐIVANJA .....	24
4. ZAKLJUČAK .....	27
5. LITERATURA.....	28



## UVOD

Spektrofotometrija je dobro poznata i prikladna metoda za određivanje sadržaja aktivne komponente lijeka u farmaceutskoj analizi. Ima superiornost u pogledu jednostavnosti, niskih troškova rada i smanjenog vremena analize. Pružajući prikladnu tehniku za zadovoljavanjem sve veće potražnje za kontrolnom i rutinskom analizom u mnogim poljima analitičke kemije. Spektrofotometrijska određivanja provode se pomoću uređaja koji koriste svjetlost točno određene valne duljine, a nazivaju se spektrofotometri. UV i VIS spektrofotometrija je korištena u znanstvenim radovima koji su obrađivani. To je najčešće primjenjivana metoda u kemijskim i kliničkim laboratorijima diljem svijeta. Temelji se na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari. Isto tako potenciometrijska metoda nudi mnogo prednosti, u pogledu izravne primjene suspenzija i zamućenih uzoraka i nema potrebe za dugotrajnim koracima pripreme uzoraka. Potenciometrijska mjerenja provode se uz upotrebu dviju elektroda. Jedna od njih je referentna a druga indikatorska elektroda. Također, primjena protočne potenciometrije omogućava veliku brzinu propusnosti uzorka. Ona se temelji na ubrizgavanju uzorka tekućine u pokretnu, nesegmentiranu kontinuiranu struju nosača prikladne tekućine. U radu su prikazane i potenciometrijsko titracijske krivulje koje prikazuju odnos između elektromotorne sile i volumena titranta(ili koncentracije titranta).

## 1. OPĆI DIO

### 1.1 FARMACEUTICI

Farmakologija je znanost koja proučava utjecaj lijekova na živa bića. Na grčkom riječ *farmakon* označuje i lijek i otrov, jer svaki lijek može djelovati i kao otrov, a količina najčešće određuje hoće li učinak biti ljekovit ili štetan<sup>1</sup>. SZO definira lijek kao tvar koja mijenja ili omogućuje ispitivanja fizioloških sustava ili patoloških stanja na dobrobit primaoca<sup>2</sup>. Lijek može biti inovativni(originalni novi spoj ili kombinacija) i generička kopija(napravljena po uzoru na novi lijek s kojim je terapijski ekvivalentna<sup>3</sup>). Svi se lijekovi sastoje od dvije ključne komponente: API-a, koji je primarni sastojak, i pomoćne tvari. Pomoćna tvar nije lijek, ona pomaže u dostavljanju središnjeg sastojka u organizam. Što znači da su pomoćne tvari kemijski neaktivne, poput laktoze ili mineralnog ulja u tableti<sup>4</sup>. Postupak za optimizaciju i sastavljanje ove smjese sastojaka koji se koriste u lijeku poznat je pod nazivom „formulacija“. Na primjer, ako je API čvrsta tvar a lijek mora imati kapljeviti oblik doziranja, poput sirupa protiv kašlja, tada bi pomoćne tvari bile u kapljevitom stanju<sup>3</sup>.

#### 1.1.1 AKTIVNI FARMACEUTSKI SASTOJAK(API)

Aktivni farmaceutski sastojak(API) dio je svakog lijeka koji stvara željene efekte. API, izraz je koji se koristi za označavanje biološki aktivne komponente lijeka. Ostali sastojci poznati su kao pomoćne tvari i od njih se uvijek traži da budu biološki sigurne, često čine promjenjivi udio lijeka. Neki lijekovi, poput kombinirane terapije, imaju više aktivnih sastojaka za liječenje različitih simptoma ili djeluju na različite načine<sup>4</sup>. Kriterij dizajna API molekula obično je kombinacija nekoliko čimbenika koji nadilaze predviđeni terapijski učinak. Obično u velikoj mjeri obuhvaća i farmakokinetička i farmakodinamička razmatranja. Pa iz tog razloga API molekule imaju brojne funkcionalne skupine<sup>3</sup>. Proizvodnjom API-a tradicionalno su se bavile same farmaceutske tvrtke u svojim matičnim zemljama. No, posljednjih godina mnoge su se tvrtke odlučile prebaciti proizvodnju u inozemstvo kako bi smanjile troškove. Proizvođači koriste određene standarde kako bi utvrdili koliko je API jak u svakom lijeku. Međutim, standard se može jako razlikovati od jedne do druge marke. Svaka

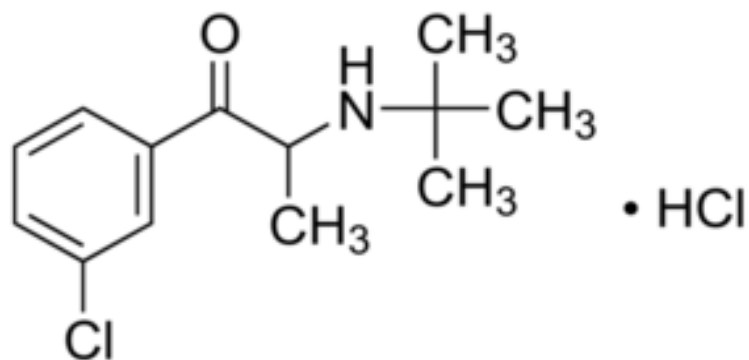


marka može koristiti različite metode ispitivanja, što može rezultirati različitim jačinama lijeka. U svim slučajevima FDA od proizvođača traži da dokažu jačinu svojih proizvoda kod stvarnih pacijenata, kao i u laboratorijskim uvjetima<sup>4</sup>.

Oblik aktivnog farmaceutskog sastojka koji se koristi u formulaciji često je termodinamički najstabilniji kristalni oblik. Kao takav, fenomen vodikove veze u kombinaciji s postojanjem mnogih funkcionalnih skupina u API-u, obično rezultira kristalnom formom u obliku hidrata. Zbog ove činjenice hidratacijsko ponašanje kristalnih API-a ima posebno veliku važnost u farmaceutskoj industriji i izučava se iz svih mogućih kutova. Stanje hidratacije izravno utječe na fizikalna svojstva API-a, što zauzvrat ima veliki utjecaj na obradivost lijeka i na to kako će lijek na kraju djelovati in vivo tj. stabilnost, topljivost i bioraspoloživost<sup>3</sup>. Isto tako, aktivna komponenta mora biti tako uklopljena u ljekoviti oblik da se nakon oslobađanja može apsorbirati u fiziološki raspoloživu obliku. Osim toga, nije dovoljno samo potpuno oslobađanje nego je važno da se lijek oslobađa određenom brzinom. Razlika u oslobađanju aktivne komponente ili njezina farmakološka aktivnost može potjecati od nekoliko činilaca: (i)polimorfni oblik upotrijebljenog lijeka(različite kristalne i amorfne modifikacije), (ii)veličina čestica lijeka, (iii)koeficijent razdiobe aktivne molekule i njezina  $pK_a$  –vrijednost, (iv)vrsta soli za slabo kisele ili alkalne supstancije, vrsta estera, stvaranje kompleksa i sl., (v)nazočnost i utjecaj pomoćnih supstancija, (vi)tehnološki parametri i fizikalna svojstva pripravka<sup>5</sup>.

### **1.1.2 ANTIDEPRESIV(BUP)**

Antidepresivi spadaju u skupinu psihofarmaci-psihotropnih lijekova. To su lijekovi koji liječe ili ublažuju psihičke poremećaje i bolesti. Depresije različitih oblika relativno su česta bolest. Danas postoji skupina antidepresivnih lijekova različitih kemijskih sruktura, kojima se poboljšava raspoloženje, smanjuje tjeskoba, strah i oživljava psihomotorika pri kočenim depresijama, a smiruje pri otkočenim<sup>1</sup>. Slika 1. prikazuje strukturu BUP-a kojeg su znanstvenici određivali spektrofotometrijskim i potenciometrijskim mjerenjima<sup>21</sup>. On je aktivni farmaceutski sastojak ovih mjerenja. BUP je druga generacija antidepresiva s neurokemijskim svojstvima različitim od uobičajenih tricikličkih antidepresiva.

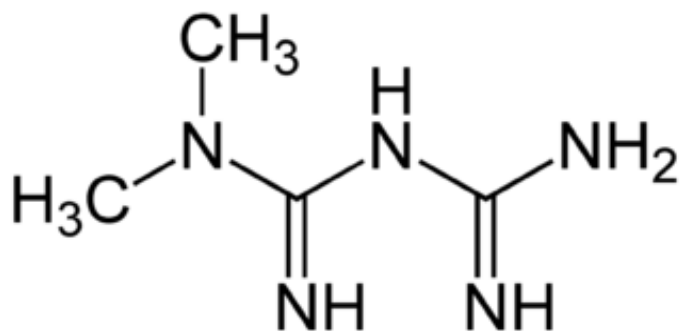


Slika 1. Kemijska struktura bupropion hidroklorida(BUP-a)

Antidepresivi druge generacije rezervirani su za liječenje pacijenata koji nisu uspjeli ozdraviti uz ostala farmakološka liječenja. Opet, profil nuspojava ovih lijekova može voditi k odabiru lijeka<sup>6</sup>. Izvješteno je da je BUP selektivni inhibitor ponovnog unosa kateholamina u neurone (noradrenalin i dopamin) s minimalnim učinkom na ponovni unos indolamina (serotonin). Bez inhibitornog učinka na monoamin oksidazu. BUP je trimetilirani monociklički fenilaminoketon, koji se strukturno razlikuje od većine antidepresiva<sup>7</sup>

### 1.1.3 HIPOGLIKEMIJSKA SRETVIA (METFORMIN)

Hipoglikemični i antidijabetični lijekovi su lijekovi koji snižavaju razinu glukoze u krvi i koriste se za liječenje dijabetesa. Uz inzulin, koji su pripravci prikladni samo za parenteralnu upotrebu, postoji niz sintetskih spojeva koji imaju hipoglikemijski učinak i učinkoviti su kada se uzimaju oralno. Ovi lijekovi imaju glavnu primjenu kod dijabetes melitusa tipa 2<sup>8</sup>. Metformin (slika 2) spada u skupinu lijekova bigvanida koji uglavnom povećavaju osjetljivost perifernih tkiva na inzulin.



Slika 2. Kemijska struktura metformina

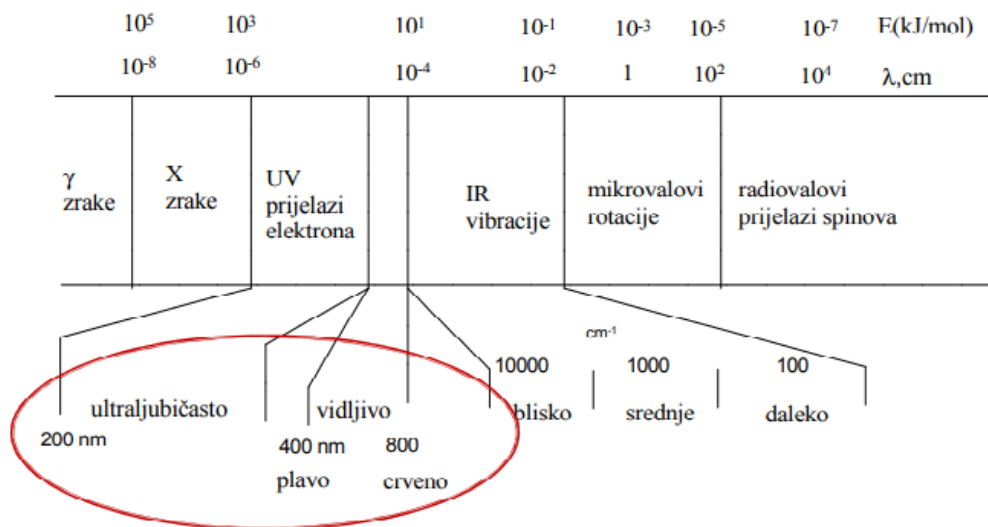
Metformin ne utječe na sintezu inzulina, i stoga će biti apsolutno neučinkovit ako se inzulin uopće ne sintetizira. Lijek postiže svoj terapijski učinak kroz povećanje iskorištenja glukoze, poboljšanje transporta kroz stanične membrane, kao i smanjenje glukoze u krvi. Djelovanje metformina je prije svega u sprječavanju glukoneogeneze u jetri<sup>9</sup>.

## 1.2 SPEKTROFOTOMETRIJA

### 1.2.1 UVOD

Spektrofotometrija je način određivanja koncentracije materijala u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao<sup>10</sup>. Spektrofotometrijska određivanja provode se pomoću uređaja koji koriste svjetlost točno određene valne duljine, a nazivaju se spektrofotometri. Zračenja točno određene valne duljine koje sam spomenula u ovom radu zaokružene su crvenim markerom na slici 3. To su ultraljubičasti i vidljivi dio zračenja (od 200 do 800nm). Što znači da su njihove određivane aktivne tvari u lijeku apsorbirale svjetlost određenog ultraljubičastog i vidljivog djela spektra, kako bi im se odredila koncentracija.

## SPEKTAR ELEKTROMAGNETNOG ZRAČENJA



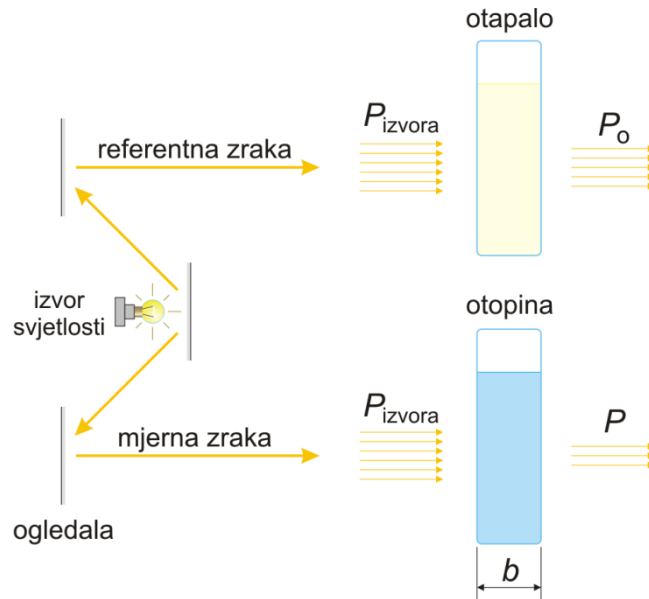
Slika 3. Spektar elektromagnetnog zračenja

Lambert-Beerov zakon (slika 4.) daje funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom ( $A$ ) i veličine koja se određuje koncentracije ( $c$ ). Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju jest smanjenje snage snopa s  $P_0$  na  $P$ .

Beerov zakon može se prikazati kao:  $A = \log(P_0/P) = \epsilon bc$

gdje je  $A$  apsorbanca na danoj valnoj duljini svjetlosti,  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), svojstven svakoj molekularnoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $b$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), a  $c$  je koncentracija tvari u otopini ( $\text{mol dm}^{-3}$ )<sup>11</sup>.

Hoće li molekula apsorbirati UV odnosno vidljivo svjetlo ovisi o energiji fotona i o elektronskoj konfiguraciji molekule, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Svaka molekula apsorbira različito svjetlo s obzirom da ima različitu orbitalnu strukturu<sup>12</sup>.

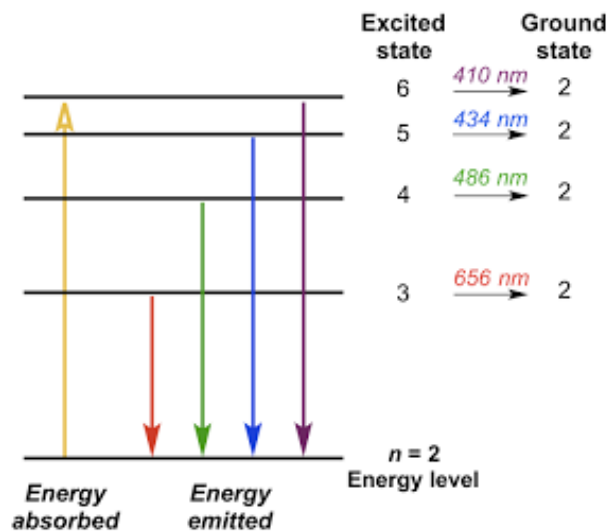


Slika 4. Lambert-Beerov zakon

Instrumenti koji električnim putem mjere apsorbanciju zovu se apsorpcijski spektrofotometri. Najvažniji dijelovi instrumenta koji se primjenjuju u apsorpcijskoj spektrofotometriji jesu: izvor svjetlosti, monokromator, kivete i držači za kivete, uređaj za mjerenje intenziteta propuštene svjetlosti. U apsorpcijskoj spektrofotometriji za vidljivi dio spektra najčešće se koristi svjetiljka s volframovom niti dok se za ultraljubičasti dio spektra koristi deuterijska svjetiljka. Monokromator je sastavni dio svakog apsorpcijskog spektrofotometra pomoću kojeg možemo iz polikromatskog svjetla dobiti monokromatsko svjetlo točno određenih valnih duljina. Za vidljivi dio spektra kivete su staklene, a za UV dio spektra (staklo ne propušta UV zračenje) koriste se kvarcne kivete<sup>13</sup>.

### 1.2.2 UV I VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

Kada atom apsorbira UV foton ili foton vidljive svjetlosti, energija tog fotona može pobuditi jedan od elektrona tog atoma na višu energijsku razinu. Ovo kretanje elektrona s niže energijske razine na višu naziva se apsorpcija. Da bi se dogodio prijelaz, energija apsorbiranog fotona mora biti veća ili jednaka razlici u energiji između dve energetske razine. Međutim, kad je elektron jednom u pobuđenoj, višoj energijskoj razini, on je u nestabilnijem položaju nego što je bio u opuštenom, osnovnom stanju. Kao takav, elektron će brzo prijeći na nižu energijsku razinu i time emitirati foton energije jednakoj razlici dviju energijskih razina(Slika 5).



Slika 5. Prikazani su različiti prijelazi elektrona za atom vodika

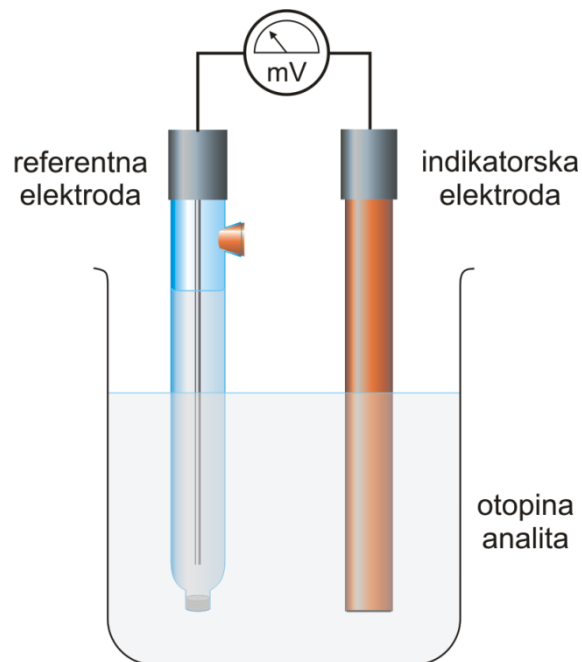
Što je veći prijelaz između energetske razine, to se više energije apsorbira odnosno emitira. Stoga su fotoni veće frekvencije povezani s većim prijelazima energije. Dakle, ispitivanjem boja svjetlosti koje emitira određeni atom, možemo identificirati taj element na temelju njegovog emisijskog spektra. Budući da je svaki emisijski spektar jedinstven za element, možemo smatrati da je svaki od tih spektara poput „otiska prsta“ svakog elementa. Bez prizme, međutim, ne vidimo te različite valne duljine svjetlosti jednu po jednu, već se sve međusobno miješaju. Ako u laboratoriju testiramo nepoznati uzorak, kako bismo utvrdili koji element sadrži, uvijek možemo upotrijebiti test plamena i izvući zaključak na temelju boje plamena koju vidimo<sup>14</sup>.

## 1.3 POTENCIOMETRIJA

### 1.3.1 UVOD

Potencijometrija je elektroanalitička metoda u kojoj se mjeri razlika potencijala između elektroda elektrokemijske ćelije uz ravnotežne uvjete. Razlika potencijala između elektroda ćelije mjeri se pomoću osjetljivih mjernih uređaja potencijometra i voltmetra s velikim ulaznim električnim otporom. A za potencijometrijsko određivanje pH vrijednosti koristi se naprava naziva pH metar. Ove mjerne naprave omogućuju mjerenje razlike potencijala uz minimalni tok struje kroz elektrokemijsku ćeliju<sup>15</sup>.

Potenciometrijska mjerenja provode se uz upotrebu dviju elektroda (slika 6). Jedna od njih je referentna a druga indikatorska elektroda. Potencijal referentne elektrode ne ovisi o koncentracijama aktivnih molekulskih vrsta u potenciometrijskoj ćeliji. Zato se potencijal referentne elektrode tijekom mjerenja ne mijenja. Potencijal indikatorske elektrode ovisi o koncentraciji jedne ili više molekulskih vrsta u ćeliji.



Slika 6. Prikazuje dvije elektrode potenciometrijskog mjerenja

Dvije su temeljne vrste indikatorskih elektroda: metalne elektrode i selektivne (membranske) elektrode. Kod metalnih elektroda razlika potencijala na dodirnoj granici elektroda-otopina posljedica je redoks-reakcije na elektrodi. Kod membranskih elektroda, potencijal elektrode proizlazi iz promjene slobodne entalpije reakcije prijelaza iona, ionskom izmjenom, adsorpcijom, ekstrakcijom ili drugim načinom, kroz međusloj membrana-ispitivana otopina<sup>16</sup>.

Potenciometrijski koeficijenti selektivnosti izraženi su prema Nicolsky- Eisenmain jednadžbi kao:

$$E = E_0 + \frac{R T}{z_A F} \ln [a_A + \sum_B K_{\text{pot A,B}} (a_B)^{z_A/z_B}]$$

gdje je  $E$  izmjereni potencijal;  $E_0$  je konstanta koja uključuje standardni potencijal elektrode;  $z_A$  i  $z_B$  brojevi naboja primarnog iona  $A$  i ometajućeg iona  $B$ ;  $a_A$  i  $a_B$  su aktiviteti primarnog iona  $A$  i ometajućeg iona  $B$ ;  $K_{\text{pot } A,B}$  je koeficijent potenciometrijske selektivnosti primarnog iona  $A$  prema ionu koji interferira,  $B$ .  $R, T$  i  $F$  imaju uobičajena značenja. Ako je  $K_{\text{pot } A,B}$  veći od 1, ion selektivna elektroda (ISE) odgovara na interferirajući ion selektivnije nego prema primarnom ionu. U većini slučajeva  $K_{\text{pot } A,B}$  je manji od 1, što znači da takvi ISE reagiraju na primarne ione selektivnije nego na ione koji interferiraju<sup>17</sup>.

### 1.3.2 POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA

Potenciometrijska titracija je elektrokemijska metoda određivanja analita kojom se završna točka titracije određuje mjerenjem razlike potencijala (napona) između dvije elektrode u ovisnosti o volumenu dodanog titranta poznate koncentracije. Te dvije elektrode su spomenute, jedna je indikatorska a druga referentna.

Za neutralizacijske reakcije najčešća elektroda koja se uzima kao referentna je kalomel elektroda ( $E^0(\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2)=0,242\text{V}$ ). Najčešća indikatorska elektroda jest staklena elektroda čiji potencijal ovisi o pH otopine. Promjena potencijala staklene elektrode može se prikazati pomoću Nernstove jednadžbe:

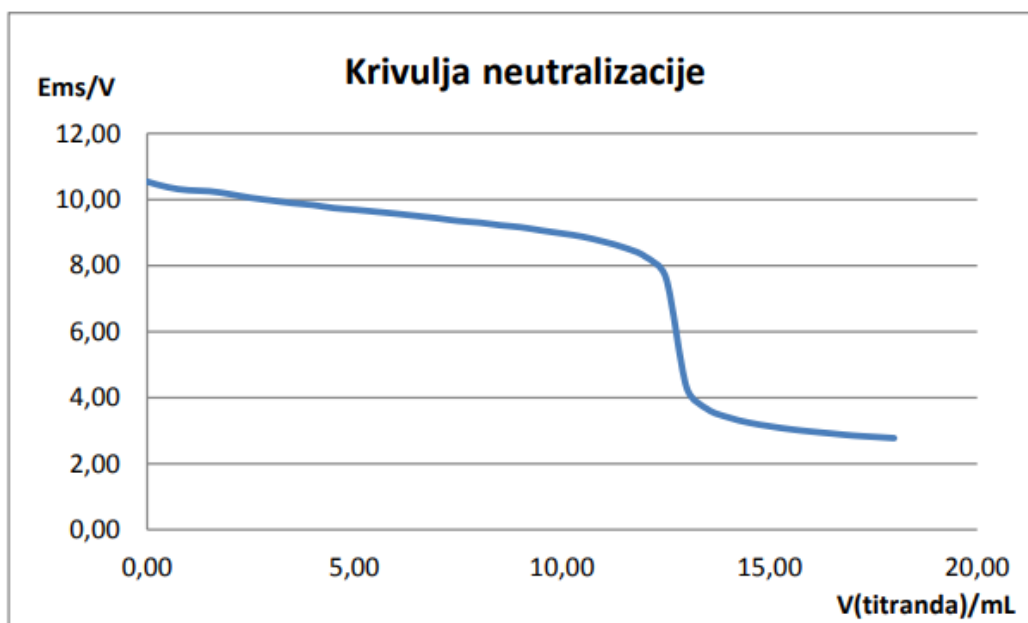
$$E = E^0 - 0.059\text{V} \cdot (\text{pH})$$

Kako se tijekom neutralizacijske titracije mijenja pH tako se mijenja i potencijal staklene elektrode. Time se mijenja i razlika potencijala (napon) između referentne kalomel i indikatorske elektrode:

$$E_{\text{ms}} = E_{\text{kalomel}} - E_{\text{staklena}}$$

Ako grafički prikažemo promjenu napona ( $E_{\text{ms}}$ ) o volumenu dodanog titranta (npr. NaOH) dobivamo krivulju kako je prikazano na slici 7.



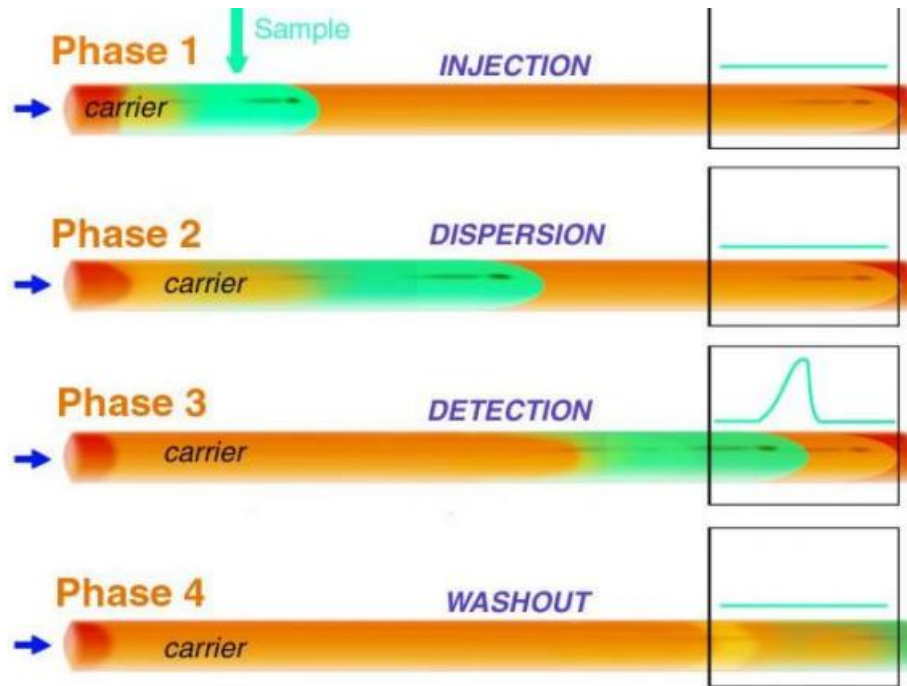


Slika 7. Krivulja neutralizacije

Velika promjena  $E_{ms}$  događa se upravo u završnoj točki titracije koju onda možemo objektivno odrediti određenim matematičkim aparatom i računalnom obradom podataka. Treba napomenuti da se dvije elektrode u suvremenim tehničkim izvedbama nalaze u zajedničkom plaštu što samo mjerenje odmah čini praktičnijim. Također, u tim novim tehničkim izvedbama može se osim promjene  $E_{ms}$  direktno očitavati i promjena pH jer je vrijednost pH direktno povezana s vrijednošću  $E_{ms}$ . Zbog toga se i ti uređaji često nazivaju pH-metri. Kod gornjeg grafičkog prikaza možemo  $E_{ms}$  na ordinatnoj osi zamjeniti sa pH<sup>18</sup>.

### 1.3.3 FLOW INJECTION ANALIZA(FIA)

Analiza ubrizgavanja protoka (FIA) temelji se na ubrizgavanju uzorka tekućine u pokretnu, nesegmentiranu kontinuiranu struju nosača prikladne tekućine. Ubrizgani uzorak tvori zonu koja se zatim transportira prema detektoru koji kontinuirano bilježi promjene apsorbancije, potencijala elektrode ili drugog fizičkog parametra, što je rezultat prolaska uzorka kroz protočnu ćeliju.



Slika 8. Četri faze flow injection analize

Dakle, FIA se temelji na kombinaciji tri principa: ubrizgavanje uzorka, kontrolirana disperzija ubrizgane zone uzorka i ponovljivo vrijeme kretanja od mjesta ubrizgavanja do detektora (slika 8). Za razliku od svih ostalih metoda instrumentalne analize, kemijske reakcije odvijaju se dok se materijal uzorka raspršuje s reagensom, odnosno dok se postupkom disperzije stvara gradijent koncentracije u zoni uzorka. Najjednostavniji analizator ubrizgavanja protoka sastoji se od pumpe koja služi za pokretanje struje nosača kroz usku cijev; otvora za ubrizgavanje, kroz koji se točno definira volumen otopine uzorka. Otopina uzorka se ubrizgava u struju nosača na ponovljiv način. Mikroreaktor u kojem se zona uzorka raspršuje i reagira s komponentama struje nosača, stvarajući vrstu koja se prepoznaje protočnim detektorom<sup>19</sup>.

## 2. PREGLED NOVIJE LITERATURE

### 2.1. ODREĐIVANJE METFORMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJU I POTENCIJOMETRIJU

#### 2.1.1 UVOD

Određivanjem metformina koristili su se spektrofotometrijskim i potenciometrijskim metodama. Potenciometrijska tehnika temelji se na pripremi PVC membranskih senzora, koji uključuju metformin-reineckeate (MF-RE) i metformin-volframosilikatne (MF-TSA) ionske parove kao elektroaktivne vrste. Te elektroaktivne vrste sadrže dioktitalat i o-nitrofenilokteter kao plastifikatore. Također se priprema i testira membrana koja se sastoji od karboksiliranog i plastificiranog (dibutylsebakatnog) PVC-a. Ovi senzori pokazuju Nernstov odziv u području koncentracija metformina od  $10^{-1}$  –  $10^{-5}$  M pri pH od 5-11. Senzor na bazi metformin-volframosilikata koristi se u protočnoj „sendvič“ ćeliji za protočno injekcijsko potencijometrijsko određivanje metformina. Grafitni senzori obloženi ili dopirani sa metformin-volframosilikat-PVC-om, Cu-dietilditiokarbamatom i Ni-dietilditiokarbamatom se također pripremaju i koriste za nadziranje titracije lijeka sa tetrafenil boratom (TPB<sup>-</sup>), Cu<sup>2+</sup> i Ni<sup>2+</sup> ionima. Spektrofotometrijska tehnika uključuje reakciju metformina sa Cu<sup>2+</sup> ionima u osnovnom mediju za dobivanje Cu-metformin kompleksa. Kompleks se otopi u cikloheksilaminu i mjeri se njegova maksimalna apsorpcija na 540nm u vidljivom djelu spektra. Beerov zakon se poštuje u rasponu metformina od 0,5 do 2mg cm<sup>-3</sup><sup>20</sup>.

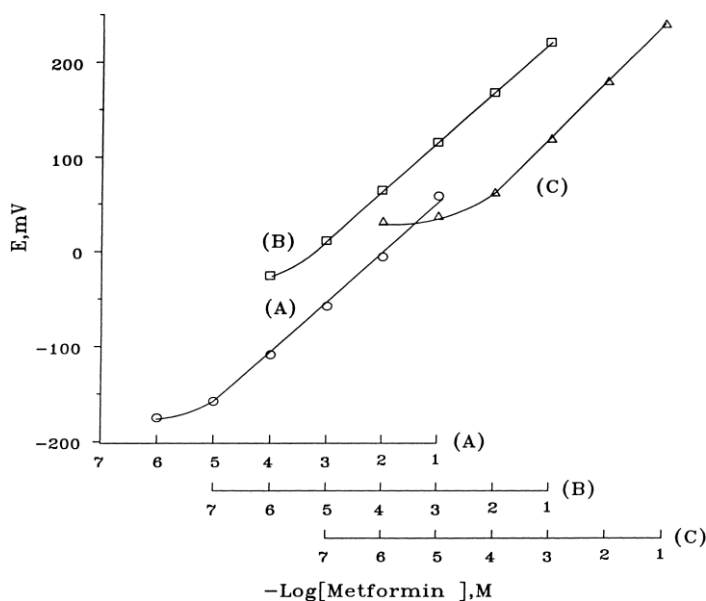
#### 2.1.2 POTENCIOMETRIJSKA MJERENJA

Tablica 1. sažima karakteristike odziva tri različita sklopa senzora za svaki sustav pri stacionarnim uvjetima. Pronađeno je (Slika 1) da senzori temeljeni na MF-RE i MF-TSA ionskim parovima su gotovo identični u pogledu kalibracijskog nagiba i granice detekcije. Ova dva senzora pokazivala su Nernstov odgovor u rasponu od  $5,5 \times 10^{-5}$  –  $10^{-1}$  M metformina sa nagibima od  $59,9 \pm 0,5$  i  $60,0 \pm 0,3$  mV i donjom granicom detekcije od  $5,2 \times 10^{-5}$  i  $5,5 \times 10^{-6}$  M. Vrijeme odziva za MF-RE i MF-TSA pri  $1 \times 10^{-2}$  M metformina bilo je 10 i 30s.

Tablica 1. Karakteristike izvedbe metformina i PVC membranskih senzora

Parametri	MF-RE	MF-TSA	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -PVC
Nagib(mV)	59,9±0,5	60,0±0,3	55,0±0,6
Koeficijent korelacije(r)(n=6)	0,996	0,997	0,996
Donja granica linearnog raspona(M)	9,5x10 <sup>-5</sup>	5,1x10 <sup>-5</sup>	8,5x10 <sup>-5</sup>
Donja granica detekcije(M)	5,2x10 <sup>-5</sup>	5,5x10 <sup>-6</sup>	6,9x10 <sup>-6</sup>
Vrijeme odziva za 1x10 <sup>-2</sup> M(s)	10	30	20
pH područje	5-11	5-11	5-11

Oba senzora imaju potencijalnu stabilnost i fluktuaciju kalibracijskog nagiba, ne prelazeći 0,6mV u periodu od četiri tjedna.



Slika 1. Potenciometrijski odziv: (A)metformin-volframosilikata(MF-TSA); (B)karboksiliranog PVC-a ; and (C)metformin-reinakata(MF-RE) polimernih membranskih senzora<sup>20</sup>.

Suprotno tome, metformin membranski senzor temeljen na karboksiliranom PVC-u izložio je nagib blizak Nernstovom od 55,0±0,6 u rasponu od 8,5x10<sup>-5</sup> -10<sup>-1</sup> M metformina. Donja granica detekcije iznosila je 6,9x10<sup>-6</sup> M metformina, i vrijeme

odziva za  $1 \times 10^{-2}$  M je 20s. Karboksilirane PVC membrane pružale su dobro rješenje problema ispiranja koje se često događa sa polimernim membranskim sensorima koji sadrže elektroaktivne parove/ione. Samoregeneracija ove membrane, nakon namakanja u otopini za ispitivanje, rezultirala je povećanjem životnog vijeka, selektivnosti i stabilnosti<sup>20</sup>.

### 2.1.3 FLOW INJECTION ANALIZA(FIA)

Potenciometrijska mjerenja metformina bila su ispitivana pomoću protoka kroz detektor ukomponirano sa MF-TSA-PVC matriks membranom.

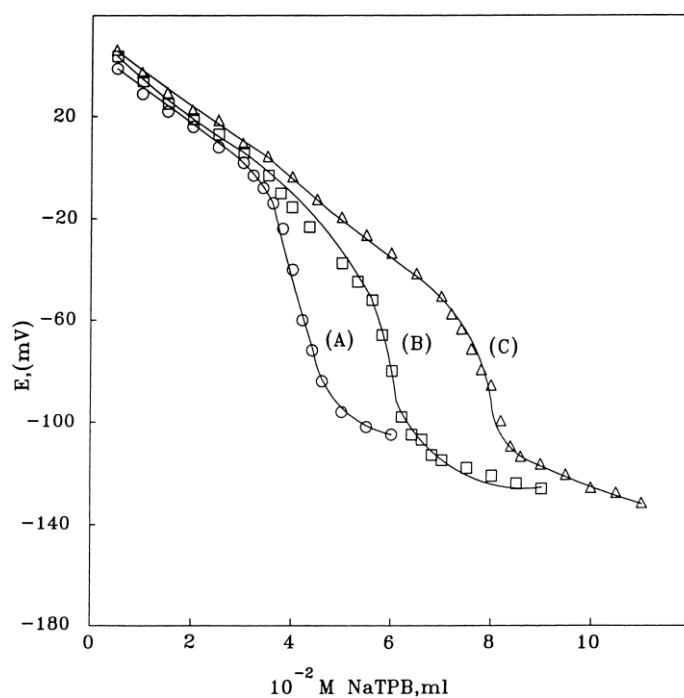
Tablica2.Potenciometrijski selektivni koeficijenti( $K^{pot.}$ ) od PVC membranskih senzora metformina.

Interferent(B)	$K^{pot.}$ (MF,B)		
	MF-RE	MF-TSA	Karboksilirani PVC
$Na^+$	$6,2 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$
$NH_4^+$	$7,1 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$
$Ca^{2+}$	$9,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-3}$
$Ba^{2+}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$
$Co^{2+}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-2}$
$Cu^{2+}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$

Različite koncentracije metformina ubrizgavane su u struju nosača koja se sastojala od  $5 \times 10^{-3}$  M natrijev acetata pri  $3,3 \text{ cm}^3$  po min. Sve mjere su uspoređene sa standardima. Ponovljivost je procjenjena iz ponovljenje injekcije od  $20 \mu\text{L}$  metformina koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M. Rezultati su pokazali širok raspon hidrodinamičkih mjerenja ( $1,6 \mu\text{g/mL}$ - $1,6 \text{ mg/mL}$ ) bez ikakvog značajnog zamaha ili promjene u vremenu odziva<sup>20</sup>.

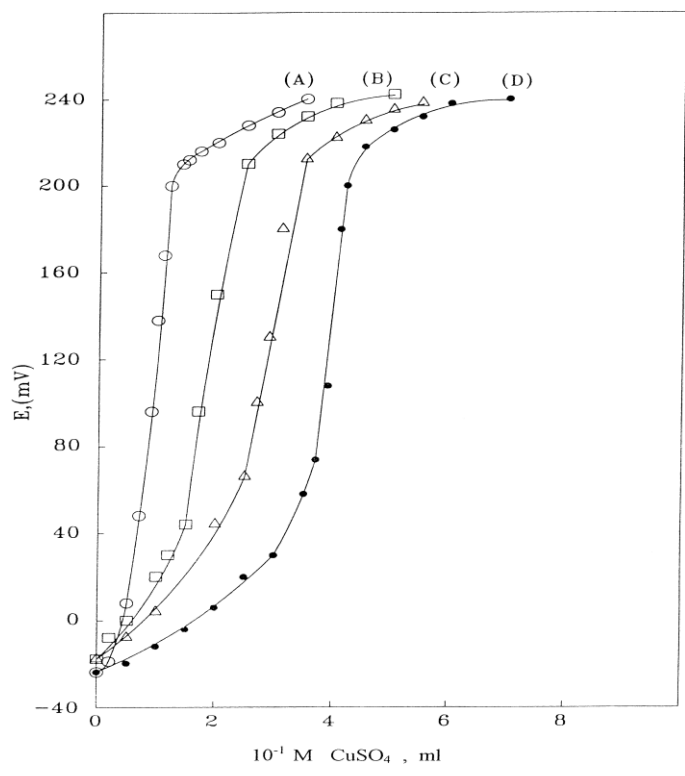
### 2.1.4 POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA

Metformin reagira sa raznim anionima(tetrafenilborat( $TPB^-$ )) i kationima( $Cu^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ ) pri čemu nastaju bijeli,crveni i narančasti precipitati,uslijed stvaranja kompleksa:  $[MFH^+ TPB^-]$ ,  $[(MF)_2Cu]$  i  $[(MF)_2Ni]$ .

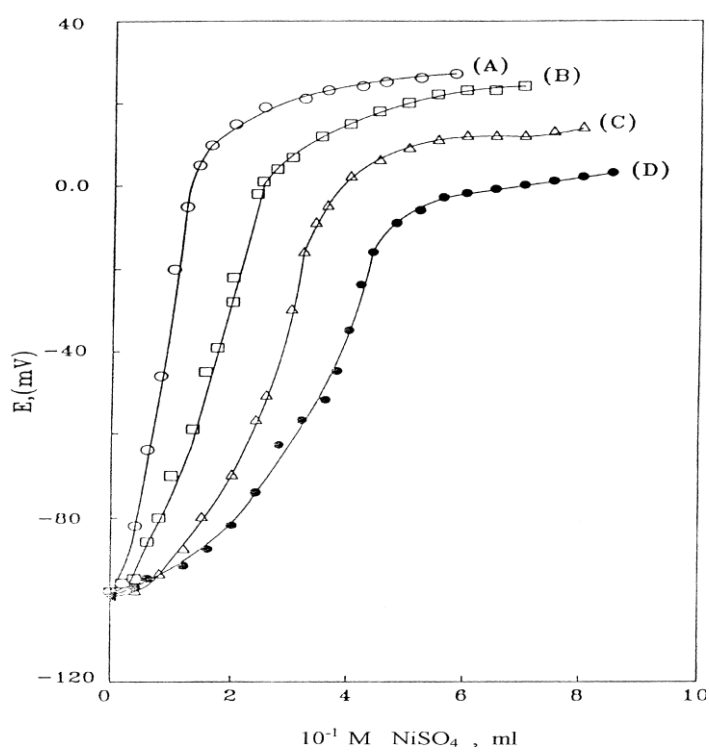


Slika 2. Krivulje potenciometrijske titracije: (A)4,0; (B)6,0; (C)8,0ml od 0,1M metformina sa standardnom otopinom od  $1 \times 10^{-2}$ M NaTPB koristeći MF-TSA PVC grafitni senzor<sup>20</sup>

Pripremljene su membrane korištene kao senzori za titraciju metformina sa  $\text{TPB}^-$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  ionima. Membrane su: grafitne šipke presvučene plastificiranim PVC-om koje sadrže metformin-volframosilikat(MF-TSA) ili zasićeni bakar-dietilditiokarbamat(Cu-DDC) i nikal-dietilditiokarbamate(Ni-DDC). Otopine titranata su  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$  i NaTPB(slike od 2 do 4). Prosječni oporavci bili su 98.3% za Cu-DDC,98.2 za Ni-DDC i 97.9% za MF-TSA, a standardne devijacije bile su 0.3,0.6 i 0.7 . Nema zabilježenih interferencija od strane pomoćnih tvari i razrjeđivača korištenih u farmaceutskim pripravcima(npr:glukoze,maltoze,laktoze..)<sup>20</sup>



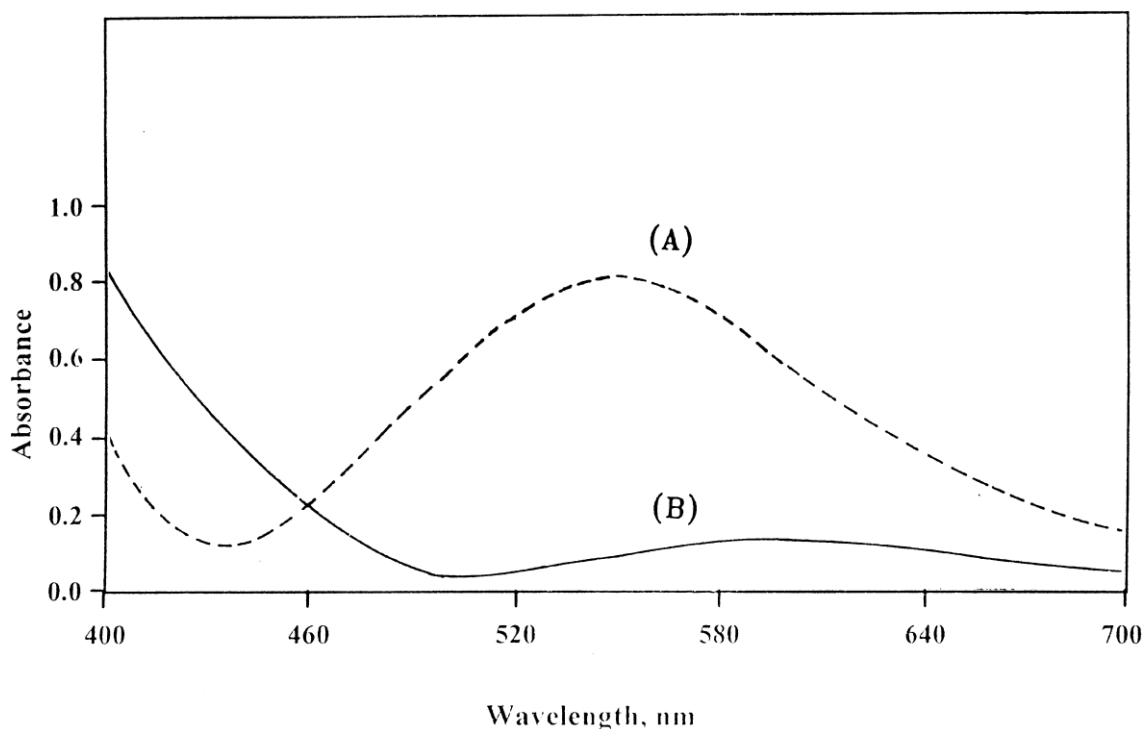
Slika 3. Krivulje potencimetrijske titracije: (A)2,0; (B)4,0; (C)6,0 i (D)8,0ml od 0,1M metformina sa standardom 0,1M  $CuSO_4$  uporabom Cu-DDC grafitnog senzora<sup>20</sup>.



Slika 4. Krivulje potenciometrijske titracije: (A)2,0; (B)4,0; (C)6,0; i (D)8,0ml od 0,1M metformina sa standardom 0,1M  $NiSO_4$  uporabom Ni-DDC grafitnog senzora<sup>20</sup>.

## 2.1.5 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA

Reakcijom  $\text{Cu}^{2+}$  sa bigvanidima nastaju kompleksi  $[\text{Cu}(\text{MF}_2\text{Big})_2]\text{X}_2$  i  $[\text{Cu}(\text{MF}_2\text{Big})]\text{X}_2$  gdje je  $\text{X}=\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{OH}^-$ . U ovom radu, metformin reagira sa  $\text{Cu}^{2+}$  ionom u jako alkalnoj smjesi kako bi se stvorio u vodi netopiv ružičasti kompleks. Nastali kompleks se istaloži zajedno sa bakrovim hidroksidom. Utvrđeno je da neki alifatski amini kao što su dietilamin, n-butilamin i cikloheksilamin mogli bi u potpunosti otopiti Cu-metformin kompleks, dajući ljubičastu otopinu. Cikloheksilamin je dao maksimalnu apsorbanciju u usporedbi sa ostalim aminima. Cikloheksilamin dovoljan je za stvaranja kompleksa bez potrebe za dodavanjem lužine. Apsorpcijski spektar otopine Cu-metformin kompleksa i cikloheksilamina pokazuje maksimum apsorbancije od  $545\pm 2$  nm, dok  $\text{Cu}^{2+}$  čista otopina u cikloheksilaminu pokazuje maksimum apsorbancije od 595nm(slika5).



Slika 5. Apsorpcijski spektar reakcijskog produkta od  $1 \times 10^{-2}$  metformina sa 0.2M  $\text{CuSO}_4$  i 40% cikloheksilamin(A), i 0.2M  $\text{CuSO}_4$  i 40% cikloheksilamin(čista otopina-blank) (B)<sup>20</sup>.

Ispitan je učinak koncentracije cikloheksilamina(10-70%, v / v) na maksimalnu apsorpciju. Dobivena je maksimalna apsorpcija pri 40% cikloheksilaminu, koja je bila stabilna najmanje 8 sati<sup>20</sup>.



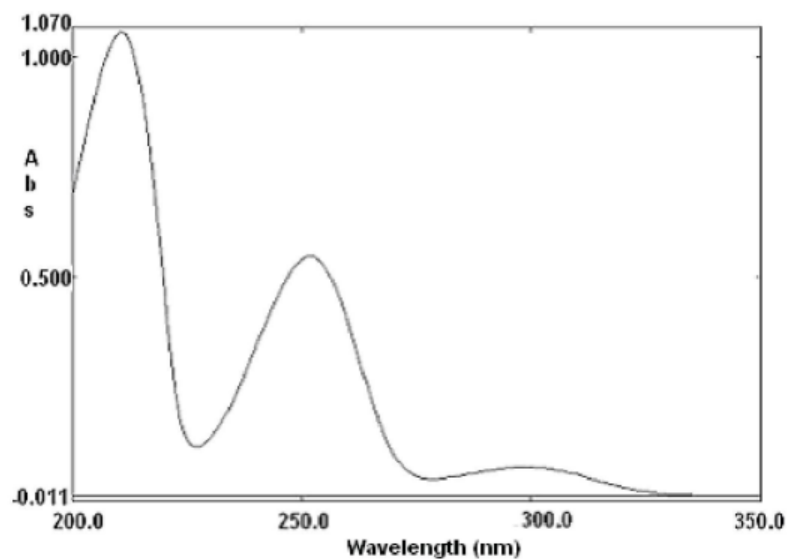
## 2.2 ODREĐIVANJE BUPROPION HIDROKLORIDA(BUP) U FARMACEUTSKIM TABLETAMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJSKE I POTENCIOMETRIJSKE METODE

### 2.2.1 UVOD

Za prvu metodu, izvornu UV-spektrofotometriju, određena je optimalna valna duljina od 252nm i kasnije korištena pri određivanju. Za drugu metodu, izvedenu UV-spektrofotometriju, apsorpcije su izmjerene 217,4 i 221,8 nm. Odobrene koncentracije ovih dviju spektrofotometrijskih metoda su od 5,72 do 20,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Granice detekcije i granice kvantitativnih vrijednosti izvorne UV-spektrofotometrije iznose 0,75 i 2,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Također, ovi parametri su određeni i za izvedenu UV-spektrofotometriju a iznose 0,23 i 0,68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Također, demonstrirana je i primjenljivost jednostavne potenciometrijske metode<sup>21</sup>.

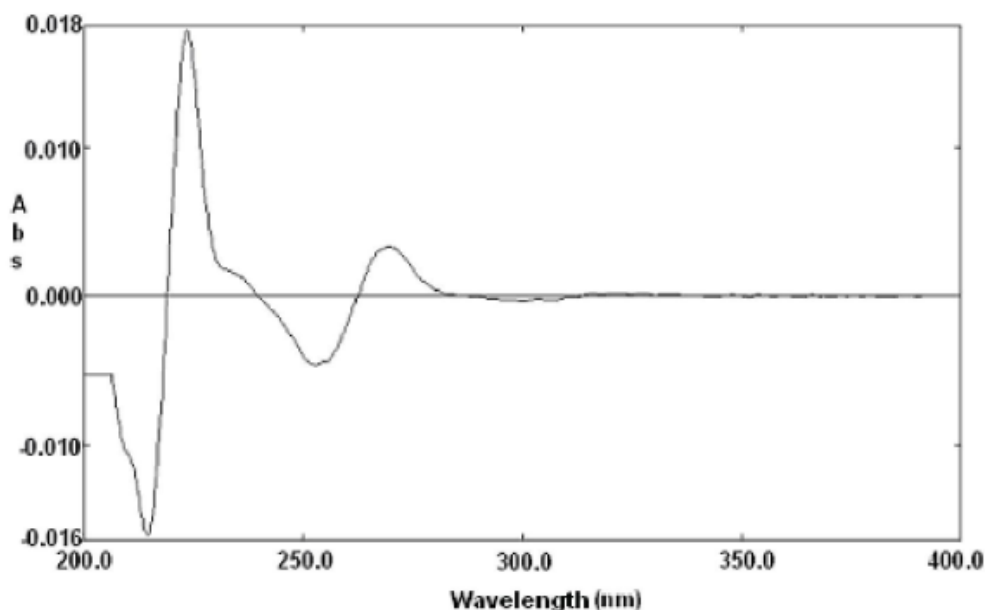
### 2.2.2 SPEKTROFOTOMETRIJSKA MJERENJA

Potvrđeno je da je BUP dobro topljiv u vodi zbog strukture hidrokloridne soli. Dakle, pri pripremi otopine korišten je sustav organskog otapala koji sadrži metanol u postotku od samo 2%. UV apsorpcijski spektar zabilježen je u rasponu od 200-350nm korištenjem 13,81 $\mu\text{g/mL}$  otopine BUP-a. Primjećeno je da se maksimum pojavio na 252nm, kao što se vidi na slici 6.



Slika 6. Originalni UV spektar BUP-a(13,81 $\mu\text{g/mL}$ , u 2% metanola)<sup>21</sup>

Također, izvedeni UV spektar zabilježen je pri istim uvjetima. Dobivena su dva maksimuma na 217,4 i 221,8nm.(slika7)



Slika7. Izvedeni UV spektar BUP-a (13,81 $\mu$ g/ml, u 2% metanola)<sup>21</sup>

Za originalnu UV-spektrofotometriju kalibracijske krivulje izrađene su crtanjem odnosa koncentracija i apsorbancija BUP-a na 252nm i prikazana je dobra linearnost u rasponu od 5.72- 20.03 $\mu$ g/mL. Osim toga, razlike vrijednosti derivata apsorbancije na 217,4 i 221,8nm su korištene za izvedenu UV-spektrofotometrijsku metodu u istom koncentracijskom rasponu.

Dobivena je dobra korelacija između vrijednosti apsorbancije i koncentracije BUP-a te visoki koeficijenti korelacije a presjeci krivulja nisu se bitno razlikovali od nule.

Tablica 3.Usporedni rezultati kalibracije BUP-a (5.72- 20.03 $\mu$ g/mL) s izvornim UV- i izvedenim UV-spektrofotometrijskim metodama.

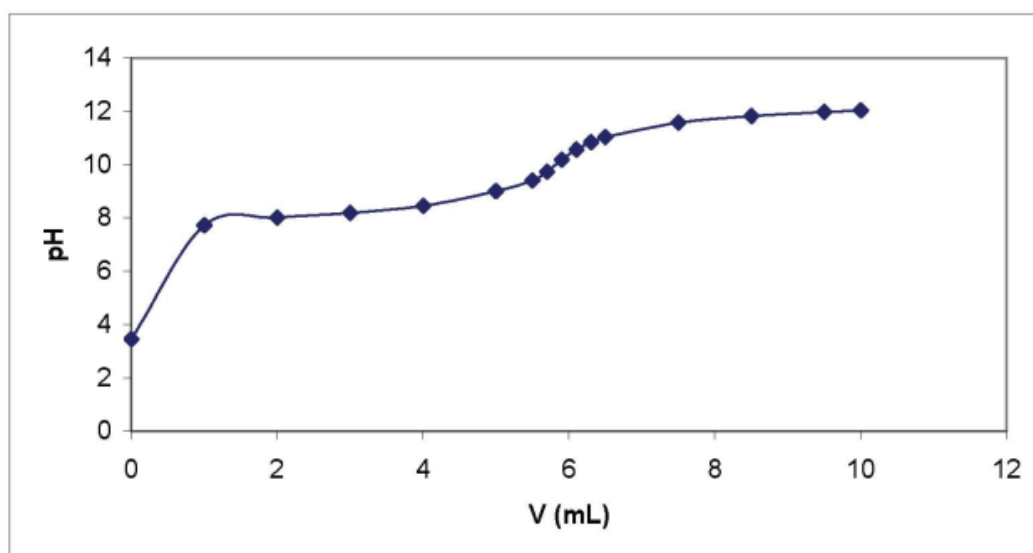
Parametri	Izvorna UV-spektrofotometrija (dan=3, n=15)	Izvedena UV-spektrofotometrija (dan=3, n=15)
Nagib	0,0399	0,0030
Presretanje	-0,047	-0,0042
Koeficijent korelacije	0,9993	0,9993

Utvrđeno je da su vrijednosti 0,75  $\mu$ g/mL za LOD(granica detekcije) i 2,28  $\mu$ g/mL za LOQ(granica kvantifikacije) za izvornu UV-spektrofotometriju. Na isti način, te su vrijednosti određene za izvedenu UV-spektrofotometriju, a iznose 0,23 $\mu$ g/mL za LOD i

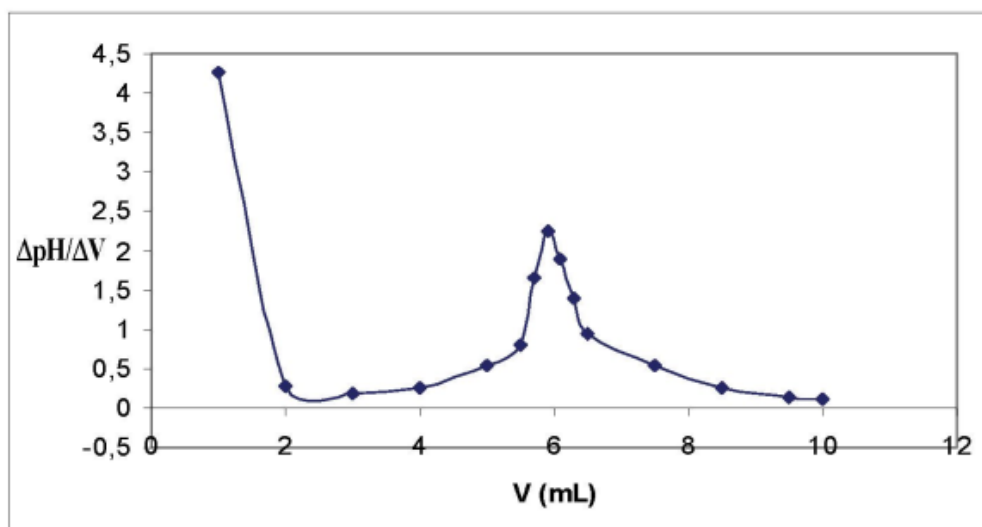
0,68 $\mu$ g/mL za LOQ. Kao što se vidi, dobivene su niže vrijednosti LOD i LOQ sa izvedenom spektrofotometrijskom metodom(tablica 3)<sup>21</sup>.

### 2.2.3 POTENCIOMETRIJSKA MJERENJA

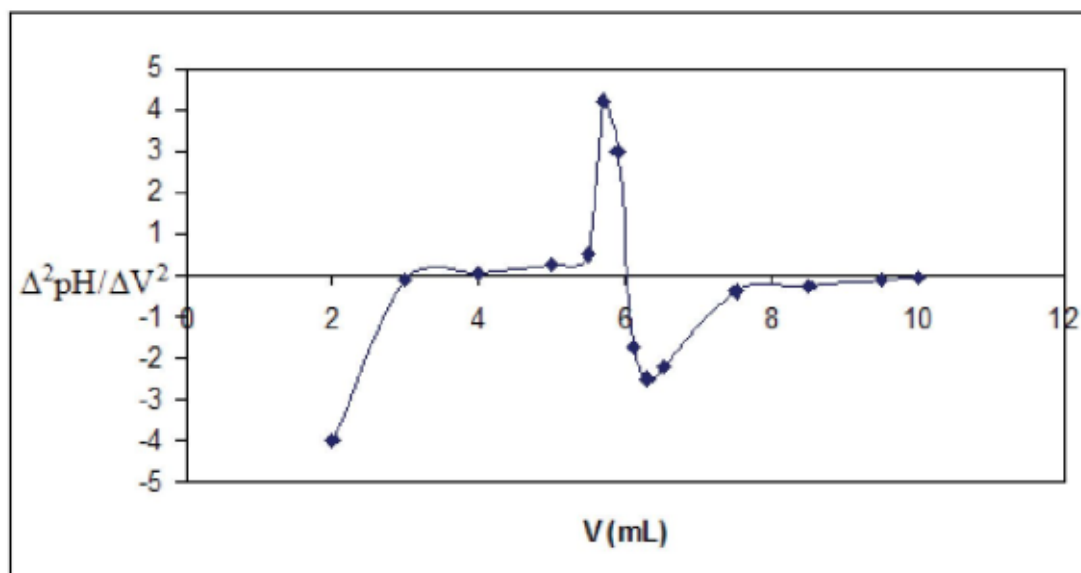
Načinjena je krivulja pH vrijednosti u odnosu na dodani volumen titranta. Mjerenjem je dobivena dobro definirana potenciometrijska krivulja oblika S kao što se vidi na slici8a. Prve i drugo derivatne vrijednosti pH izračunate su i ucrtane u odnosu na dodani volumen titranta (slika8b i 8c). Titracije su ponovljene šest puta i dobivene su vrlo bliske vrijednosti krajnje točke ( $6.00 \pm 0.07$ ). Iz tih krajnjih točaka izračunat je sadržaj tableta.



Slika8a. Krivulja potenciometrijske titracije otopine BUP-a i 0,1M NaOH<sup>21</sup>.



Slika8b. Prva derivacija potenciometrijske krivulje otopine BUP tablete sa 0,1M NaOH<sup>21</sup>.



Slika8c. Druga derivacija potenciometrijske krivulje otopine BUP tablete sa 0,1M NaOH<sup>21</sup>.

Primjena razvijenih metoda izvedena je na farmaceutskim tabletama BUP koje sadrže 150mg aktivne tvari. Spektar uzoraka tableta nosio je karakteristike standardnog BUP-a, a za obje spektrofotometrijske metode nije primijećena nikakva interferencija iz matrice. Usporedni rezultati za analizu BUP tableta dobiveni originalnom UV- i izvedenom UV spektrofotometrijom dani su u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati tabletne analize BUP-a provedene originalnom UV-spektrofotometrijom i izvedenom UV-spektrofotometrijom( patentni zahtjev je 150mg BUP-a/ tableta)

	Originalna UV-spektrofotometrija	Izvedena UV-spektrofotometrija
Srednja vrijednost ± SD(n=6)	162.4 ± 4.72	161.1 ± 3.66
% RSD	2.90	2.27
t-test (p<0,05)	0.67	2.57
F-test (p<0,05)	1.66	5.05

Tablica 4. Razultati tabletne analize BUP-a provedene potenciometrijski.(patentni zahtjev je 150mg BUP-a/ tableta)

	Potenciometrija
Srednja vrijednost ± SD (n=6)	164.9 ± 1.39
% RSD	0.84
t-test (p<0.05)	0.70
F-test (p<0.05)	4.17

Osim toga, sve su metode statistički uspoređene s ANOVA testom. Informativno je prikazati razliku srednjih vrijednosti uzoraka, dobivenih predloženim metodama, uspoređivanjem odstupanja skupina uzoraka. Dobivene su neusporedivo male razlike među metodama, na razini vjerojatnosti od 95% (  $F_{4,23}=1.90$ ,  $p<0.05$ ) (tablica 4)<sup>21</sup>.

### 3. RASPRAVA

#### 3.1 USPOREDBA REZULTATA SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I POTENCIOMETRIJSKIH ODREĐIVANJA

##### 3.1.1 . ODREĐIVANJE METFORMINA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJU I POTENCIJOMETRIJU

Predložene potenciometrijske i spektrofotometrijske metode daju usporedive rezultate. Na ove metode nisu utjecale interferencije kao npr. farmaceutski aditivi, razrjeđivači i aktivni sastojci koji se obično koriste u formulacijama lijekova. Potenciometrijska metoda opisana u ovom radu nudi mnogo više prednosti od predložene spektrofotometrijske metode u smislu niske granice otkrivanja ( $8,6\mu\text{g mL}^{-1}$ ), širok raspon ispitivanja koncentracije ( $8,6\mu\text{g mL}^{-1}$  –  $165\text{mg mL}^{-1}$ ) i široki raspon pH (5-11). Primjena protočne potenciometrije omogućava veliku brzinu propusnosti uzorka (ca. 80 uzoraka  $\text{h}^{-1}$ ) i injektiranje male količine uzorka (ca.  $20\mu\text{l}$ ). Spomenute spektrofotometrijske metode uključuju dugotrajne korake ekstrakcije. Prednosti koje nude ove metode sugeriraju njihovu upotrebu za rutinsku analizu metformina u farmaceutskim pripravcima<sup>20</sup>.

##### 3.1.2 ODREĐIVANJE BUPROPION HIDROKLORIDA (BUP) U FARMACEUTSKIM TABLETAMA KORISTEĆI SPEKTROFOTOMETRIJSKE I POTENCIOMETRIJSKE METODE

U ovom su istraživanju razvijene jednostavne spektrofotometrijske i potenciometrijske metode za određivanje BUP-a u farmaceutskim lijekovima. Kraće vrijeme analize spektrofotometrijskih metoda omogućuje brzo određivanje lijeka, što je važno za rutinsku analizu. Područje linearnosti, granice detekcije i kvantifikacije, preciznost i točnost obrađeni su kako bi se utvrdila prikladnost spektrofotometrijskih metoda, a dobiveni su i potvrđeni rezultati, pokazana je i specifičnost potenciometrijskih metoda. Iako spektrofotometrija nije selektivna metoda, ona ima prednost manje potrošnje skupih i štetnih organskih otapala. U predloženim metodama vrijeme analize prilično je kratko, a također su dobivene i veće granice detekcije i rezultata kvantifikacije izvedenom UV- spektrofotometrijskom u usporedbi s izvornom UV- spektrofotometrijskom metodom. Potenciometrijske metode titracije imaju superiornost u pogledu izravne primjene suspenzija i zamućenih uzoraka i nema potrebe za

dugotrajnim koracima pripreme uzoraka. Sve razvijene metode su jednostavne, brze, pouzdane, isplative i mogu se predložiti za rutinsku analizu i u svrhu kontrole kvalitete. Ispitana je valjanost izvornih UV- i izvedenih UV-spektrofotometrijskih metoda s obzirom na preciznost, raspon linearnosti, točnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije<sup>21</sup>.

### 3.1.3 ODREĐIVANJE pKa VRIJEDNOSTI AKTIVNIH FARMACEUTSKIH SASTOJAKA

U ovom znanstvenom radu korišteno je nekoliko naprednih analitičkih metoda određivanja konstanta disocijacije API-a. Međutim, potenciometrijska metoda daje najbolju točnost i bolju preciznost od bilo koje spomenute metode. To je uglavnom zbog činjenice da je sustav elektroda kalibriran prije svake potenciometrijske titracije. A elektroda ostaje u otopini tijekom cijele titracije, tako da su parametri kalibracije jednaki za sve rezultate u titraciji, koji odgovaraju istom eksperimentalnom radu. Međutim, njegovi nedostaci uključuju zahtjeve za upotrebu čistih spojeva(mg) i smjese vodenih pufera. Otopine koncentracije od najmanje  $10^{-4}$  M su potrebne kako bi se otkrila značajna promjena oblika titracijske krivulje. Alternativa potenciometrijskoj titraciji je UV-VIS spektrofotometrija jer može rukovati spojevima niže topljivosti i nižim koncentracijama uzoraka. Glavna prednost je veća osjetljivost ( $>10^{-6}$  M) na spojeve s povoljnim koeficijentima molarne apsorpcije. Spektrofotometrijske metode nude izvrsnu preciznost, kao u potenciometriji, ali zahtjevaju različite spektre za različite vrste, a reagensi moraju biti čisti. Glavni faktor analize je utvrđivanje vrijednosti pKa iz podataka UV apsorpcije s više valnih duljina zabilježenih pri različitim pH vrijednostima<sup>22</sup>.

### 3.1.4 DIFENHIDRAMIN-SELEKTIVNI PLASTIČNI MEMBRANSKI SENZOR I NJEGOVE FARMACEUTSKE PRIMJENE

U ovom radu, proveden je test otapanja prema USP XXII uz upotrebu USP uređaja za otapanje. Prednost tehnike elektrode za izvođenje takvog testa otapanja je da selektivna elektroda može nadzirati kontinuirano i selektivno koncentraciju lijeka u mediju za otapanje. U radu su prikazani profili otapanja Dph oslobođenog iz matrične tablete. Utvrđeno je da su ti profili otapanja dobiveni spektrofotometrijskim i potenciometrijskim metodama ispitivanja slični. Iz tih krivulja se vidi odnos postotka oslobođene količine Dph i kvadratnog korijenja vremena. Iz čega se vidi da je njihov

odnos linearan. Utvrđeno je da su koeficijenti određivanja 0,984 i 0,993 za spektrofotometrijsku odnosno potenciometrijsku metodu. Kada su uspoređivali profile otapanja dobiveni spektrofotometrijskim i potenciometrijskim metodama, pronađena je dobra korelacija ( $r=0,989$ ). Kao rezultat toga predložene metode su jednostavne, brze i jeftine. Primjećeno je da se razvijena selektivna membranska elektroda Dph može uspješno koristiti u mikrodeterminaciji Dph u farmaceutskim pripravcima i u uspostavljanju profila otapanja Dph oslobođenog iz matrične tablete<sup>23</sup>.

### 3.1.5 ODREĐIVANJE VRIJEDNOSTI $pK_a$ BENZOKSA-, BENZOTIA- I DERIVATI BENZOSELENA-ZOLINONA KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM. USPOREDBA S POTENCIOMETRIJSKOM TITRACIJOM I SPEKTROMETRIJSKIM PODACIMA

Kao što je izvijestilo nekoliko studija, CE je relativno fleksibilna tehnika u usporedbi sa spektrofotometrijskim ili potenciometrijskim tehnikama. Elektroforetske pokretljivosti ispitivanih iona su poprilično različite, što je omogućilo istodobno određivanje  $pK_a$  za dva spoja u istom uzorku, što je velika prednost CE-a nad spektrofotometrijom i potenciometrijom metodom. Uz to, visokopropusna metoda prikazivanja (istodobno određuje više od 50 spojeva u jednom uzorku) uspješno je razvijena na naprednoj CE tehnici koja koristi detekciju masene spektrofotometrije. Cilj ovog rada bio je odrediti kiselinsko-bazne disocijacijske konstante niza novih derivata benzoksa-, benzotia ili benzoselena-zolinona pomoću CE s izravnom UV detekcijom. Stoga će CE biti koristan alat u određivanju konstanti disocijacijske kiseline i baze za ove i druge spojeve, pružajući bitne fizikalno-kemijske podatke koji dopunjuju podatke o ostalim fizičko-kemijskim parametrima (lipofilni karakter, LogP), kako bi se olakšalo razumijevanje njihovog potencijala interakcije sa ostalim molekulama<sup>24</sup>.



#### 4. ZAKLJUČAK

Glavna prednost spektrofotometrije je veća osjetljivost ( $>10^{-6}$  M) na spojeve s povoljnim koeficijentima molarne apsorpcije. Isto tako, ima prednost manje potrošnje skupih i štetnih organskih otapala, iako nije selektivna metoda.

Potenciometrijskim određivanjima uglavnom se određuju analiti do koncentracije  $10^{-6}$  M, prednost potenciometrije je što omogućava određivanje u širokom koncentracijskom području ( $10^{-1}$  do  $10^{-6}$  M). Potenciometrijske metode titracije imaju superiornost u pogledu izravne primjene suspenzija i zamućenih uzoraka i nema potrebe za dugotrajnim koracima pripreme uzoraka.

Sve razvijene metode su jednostavne, brze, pouzdane, isplative i mogu se predložiti za rutinsku analizu i u svrhu kontrole kvalitete.

## 5. LITERATURA

1. Ileana Linčir i suradnice, *Farmakologija za stomatologe. Treće, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada. Zagreb, 2011.*
2. WHO 1966., *Technical Report Series N° 341:7*
3. <https://www.sciencedaily.com/releases/2014/06/140605093305.htm>
4. <https://www.verywellhealth.com/api-active-pharmaceutical-ingredient-2663020>
5. I. Jalšenjak, V. Jalšenjak, J. Filipović-Grčić, *Farmaceutika. Školska knjiga. Zagreb, 1998.*
6. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/second-generation-antidepressant>
7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512515000230>
8. <https://www.zdravobudi.hr/clanak/1146/metformin-lijek-izbora-u-lijecenju-dijabetesa-tip-2-od-samog-pocetka-i-ili-panaceja-danasnjice>
9. <https://hr.relevancetotalhealth.com/peroralnye-saharosnizhajushhie-preparaty.html>
10. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektrofotometrija>
11. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Beerov+zakon>
12. [https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Nastavni\\_tekst\\_Molekulska\\_spektroskopijska\\_kopija.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopijska_kopija.pdf)
13. <http://www.rudarska.hr/wp-content/uploads/2018/02/Vjezba-4.-UV-spektrofotometrija.pdf>
14. <https://www.khanacademy.org/science/ap-chemistry/electronic-structure-of-atoms-ap/bohr-model-hydrogen-ap/a/spectroscopy-interaction-of-light-and-matter>
15. <https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=potencijometrija>
16. <https://www.scribd.com/doc/188301787/Seminarski-Rad-Potencijometrija>
17. <http://publications.iupac.org/pac/2000/pdf/7210x1851.pdf>
18. <http://www.rudarska.hr/wp-content/uploads/2018/02/Vjezba-15.-Potencijometrijska-titracija.pdf>
19. <http://ww2.chemistry.gatech.edu/class/analyt/fia.pdf>
20. Saad S.M. Hassana, Wagiha H. Mahmouda, Mohamed A.F. Elmosallamyb, Abdel Hammeed M. Othmana, *Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV–visible spectrophotometry, received 24 February 1998; received in revised form 25 June 1998; accepted 8 July 1998.*

21. Duygu Yeniceli, Dilek Dođrukol AK\*, *The determination of bupropion hydrochloride in pharmaceutical dosage forms by original uv- and second derivative uv spectrophotometry, potentiometric and conductometric methods, Turk J. Pharm. Sci.* 7 (2), 99-110, 2010
22. S. Babic', Alka J.M. Horvat, D. Mutavdz'ic' Pavlovic', M. Kas'telan-Macan, *Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 11, 2007.*
23. Arzum Erdem, Mehmet Ozsoz, Levent Kirilmaz, Emrah Kilinc, and Tayfun Dalbast, *Diphenhydramine-Selective Plastic Membrane Sensor and Its Pharmaceutical Applications, Received: December 16, 1996*  
*Final version: April 25, 1997.*
24. C. Foulon, N. Duhal, B. Lacroix-Callens, C. Vaccher, J.P. Bonte, J.F. Goossens, *Determination of pKa values of benzoxa-, benzothia- and benzoselena-zolinone derivatives by capillary electrophoresis. Comparison with potentiometric titration and spectrometric data, european journal of pharmaceutical sciences 31 (2007) 165–171*

