

ANALIZA LEKÓW

III rok, I stopień, Chemia, semestr letni

Ćwiczenie: Wykorzystanie metod elektrochemicznych do analizy wybranych leków

Aktualnie wiele technik analizy instrumentalnej jest wykorzystywanych do analizy leków. Do najczęściej używanych zalicza się: spektrofotometrię UV-Vis, chromatografię cieczową i chromatografię gazową. Coraz częściej w literaturze znajdują się także przykłady zastosowania w analizie leku spektrometrii mas oraz woltamperometrii.

W analizie woltamperometrycznej nie wykorzystuje się specjalistycznych i drogich rozpuszczalników, a pojedyncza analiza trwa kilka minut. Woltamperometria daje możliwość analizy kilku pierwiastków lub związków organicznych jednocześnie.

Wyżej wymienione metody charakteryzują się też różną granicą wykrywalności. Przykładowe granice wykrywalności przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela. 1. Przegląd wybranych technik instrumentalnych stosowanych w analizie leków.

Technika analityczna	Granica wykrywalności [mol/l]
Potencjometria	$5 \cdot 10^{-6}$
Polarografia zmiennoprądowa	$5 \cdot 10^{-6}$
Spektrofotometria	$5 \cdot 10^{-6}$
Absorbcyjna spektrometria atomowa	$5 \cdot 10^{-7}$
Spektrometria mas	$1 \cdot 10^{-9}$
Polarografia pulsowa i zmiennoprądowa prostokątna	$5 \cdot 10^{-8}$
Woltamperometria	$1 \cdot 10^{-9}$

Wybór techniki analitycznej zależy nie tylko od składu leku, ale również od ilości próbki jaką dysponujemy i jej trwałości. Dla każdej analizowanej substancji należy dobrać właściwą metodę analityczną. O wyborze metody analitycznej decyduje wiele czynników, na przykład zawartość oznaczanej substancji czy czas trwania analizy. Metody szybkie szczególnie cenione są w analizie leków ze względu na niską trwałość substancji leczniczych i w przypadku monitorowania stężenia leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych oraz podczas kontroli procesów syntezy substancji leczniczych w przemyśle. Ważnym kryterium

wyboru metody analitycznej jest koszt aparatury i odczynników oraz rodzaj informacji oczekiwanej po analizie (dokładność, precyzja, czułość, selektywność).

Techniki woltamperometryczne są często stosowane w analizie preparatów farmaceutycznych, zarówno w analizie ilościowej i jakościowej substancji czynnych jak również substancji pomocniczych.

Jeśli w badanym materiale analizowane są pierwiastki metaliczne, to zanieczyszczenia natury organicznej można usunąć poprzez mineralizację próbki, zaś pozostałe przeszkadzające w analizie pierwiastki metaliczne można skompleksować.

W przypadku gdy analizowane są związki organiczne (w preparatach farmaceutycznych lub w materiale środowiskowym), problem zanieczyszczeń lub obecności innych substancji organicznych jest bardziej złożony. Jeśli oznaczana substancja ulega depozycji przy potencjale różnym od pozostałych składników matrycy, problem nie istnieje, jeśli zaś potencjały substancji oznaczanej i innych substancji obecnych w próbce są zbliżone na tyle, że ich piki analityczne nakładają się na siebie, to jest możliwe lekkie ich przesunięcie poprzez dodatek roztworów buforowych czy modyfikację elektrody wskaźnikowej. Czasami konieczne jest wyizolowanie analizowanego składnika z próbki, co wydłuża czas analizy.

Termin **woltamperometria** określa grupę metod elektroanalitycznych, w których natężenie prądu płynącego przez elektrodę wskaźnikową o stałej powierzchni zależy od potencjału tej elektrody. Najczęściej wykorzystywane do badania i oznaczania leków są techniki:

- woltamperometrii cyklicznej- CV,
- woltamperometrii pulsowej różnicowej- DPV
- woltamperometrii zmiennoprądowej prostokątnej- SWV.

Zasada działania metod woltamperometrycznych opiera się, na pomiarze prądu (I) przepływającego przez elektrodę pracującą, a którego natężenie zależy od stężenia elektroaktywnej substancji. Potencjał elektrody pracującej jest stały w czasie. W woltamperometrycznych metodach pomiaru mamy do czynienia z pomiarem natężenia dyfuzyjnego prądu granicznego jako funkcji stężenia substancji elektrodowo czynnej.

$$I = f(c)$$

c - stężenie substancji badanej,

I - prąd dyfuzyjny.

W wyniku przeprowadzenia eksperymentu woltamperometrycznego uzyskuje się krzywą zależności prądu od napięcia polaryzującego nazywaną krzywą woltamperometryczną lub woltamogramem. W zależności od zastosowanej techniki pomiarowej krzywa ma charakter fali, symetrycznego piku bądź piku niesymetrycznego. Każda z takich krzywych niesie informację jakościową, ilościową oraz o przebiegu reakcji elektrodowej.

Interpretacja jakościowa. Informacja o rodzaju substancji ulegającej reakcji elektrodowej związana jest z położeniem piku lub fali na osi potencjałów. Położenie to określone jest przez potencjał piku (E_p). Wielkości te są charakterystyczne dla poszczególnych depolaryzatorów, jednak należy podkreślić, że oprócz depolaryzatora na wartość charakterystycznego potencjału ma wpływ użyta elektroda, rodzaj i stężenie elektrolitu podstawowego, obecność

substancji kompleksujących, temperatura oraz niektóre parametry pomiarowe takie jak szybkość zmian potencjału elektrody (szybkość polaryzacji) czy amplituda impulsu.

Interpretacja ilościowa oparta jest na wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy natężeniem prądu i stężeniem analizowanej substancji. Wartość natężenia prądu jest też w praktyce uzależniona od innych parametrów, takich jak obecność w roztworze substancji o podobnym potencjale depozycji i większym stężeniu od składnika oznaczanego oraz pH roztworu.

W metodach woltamperometrycznych wyróżnia się następujące metody szacowania stężenia:

1. Metoda krzywej wzorcowej (polega na badaniu zależności między natężeniem dyfuzyjnym prądu, a stężeniem substancji oznaczonej. W tym celu bada się w warunkach odniesienia próbki o różnej znanej ilości substancji.

2. Pomiar bezwzględny - w tej metodzie wykorzystuje się wzór na wartość prądu charakterystyczny dla metody woltamperometrycznej, którą jest prowadzony pomiar.

3. Metoda wzorca wewnętrznego - polega na pomiarze względnej wartości natężenia dyfuzyjnego prądu roztworów o takim samym stężeniu, ale innym składzie.

Badania powinny być wykonane w stałej temperaturze. Jeden z badanych roztworów przyjmujemy za wzorcowy. Względem niego określamy stężenie roztworu badanego.

4. Metoda dodatku wzorca - polega na mierzeniu natężenia prądu dyfuzyjnego próbki i ponownym jego badaniu po dodaniu znanej ilości składnika oznaczonego.

Woltamperometrycznie, w przypadku preparatów farmaceutycznych można oznaczać zawartość wybranych pierwiastków stosowanych jako leki psychotropowe, np. preparaty litu w psychiatrii. Jednak zdecydowana większość substancji leczniczych to związki organiczne.

Woltamperometrycznie można analizować związki organiczne, które w swej strukturze posiadają ugrupowania ulegające procesom utleniania i redukcji.

Przykłady grup funkcyjnych ulegających procesom redoks przedstawiono w Tabeli 2. Proces wymiany elektronów przez analizowaną substancję jest niezbędnym kryterium w większości technik analizy woltamperometrycznej związków organicznych. Tylko technika adsorpcyjnej woltamperometrii inwersyjnej oparta jest na innym procesie, tj. na osadzaniu oznaczanego składnika na powierzchni elektrody.

Tabela 2. Ugrupowania ulegające procesom redoks w warunkach analizy woltamperometrycznej.

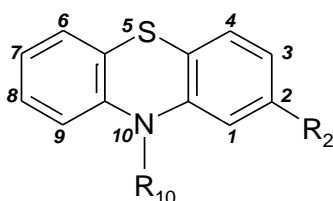
Ugrupowania ulegające procesom redoks	
-NH ₂	-NH ₃ ⁺
=C=O	-NH-
-NO	=P-O-
-NO ₂	-SH
=C=C=	-NH-CO-NH-
=C=S	-NH-CS-NH-
=C=N-	-NH-R ₁ R ₂ ⁺
-N=N-	-NH-NH ₂
-O-O-	-SO ₂
=SO	-OH (fenol)

Podobnie jak w przypadku analizy pierwiastków, można woltamperometrycznie oznaczać kilka substancji organicznych jednocześnie, warunkiem takiego oznaczenia jest konieczność zajścia procesu utleniania lub redukcji badanego związku i wystąpienie różnicy w potencjale depozycji pomiędzy badanymi substancjami.

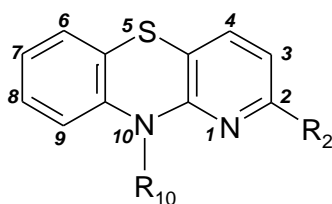
Charakterystyka badanych leków

Pochodne fenotiazyny i azafenotiazyny stanowią liczną grupę heterocyklicznych związków organicznych o cennych właściwościach leczniczych. Stosowane są głównie w psychozach i poważnych schorzeniach psychicznych oraz jako leki przeciwwymiotne i przeciwhistaminowe. Wiele z nich wpływa także na czynności obwodowego układu nerwowego. Określane są mianem neuroleptyków lub leków antypsychotycznych.

Cząsteczki pochodnych fenotiazyny zbudowane są z aromatycznego układu trójpierścieniowego, zawierającego heteroatomy siarki i azotu oraz alifatyczne lub heterocykliczne podstawniki najczęściej w pozycji 2 i 10 układu fenotiazynowego.



Pochodne azafenotiazyny, to analogi fenotiazyny, w których jeden z pierścieni benzenowych zastąpiony został pierścieniem pirydynowym.

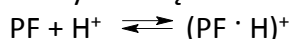


Pochodne azafenotiazyny wprowadzono do lecznictwa jako środki przeciwuczuleniowe, później zastosowano je w leczeniu zaburzeń psychicznych. Obecnie stosowane są jako leki o działaniu neuroleptycznym (protypendyl), przeciwhistaminowym (izotypendyl), przeciwwymiotnym (oksypendyl) i przeciwkaszlowym (pipazetat).

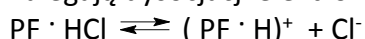
Właściwości fizyczne i chemiczne

Pochodne fenotiazyny (PF) i azafenotiazyny (PA) należą do zasad organicznych i mogą występować:

- w postaci wolnych zasad jako oleiste ciecze, które w środowisku kwasowym przyłączają jon wodorowy tworząc kation pochodnej fenotiazyny lub azafenotiazyny:



- w postaci soli - głównie jako chlorowodorki, rzadziej winiany, dimetylosulfoniacy lub maleiniany (pochodne fenotiazyny), chlorowodorki i dichlorowodorki (pochodne azafenotiazyny). Są to substancje krystaliczne o barwie białej lub żółtej, dobrze rozpuszczalne w wodzie i niektórych rozpuszczalnikach organicznych. W roztworach wodnych ulegają dysocjacji elektrolitycznej z odszczepieniem kationu pochodnej:



Cechą wspólną pochodnych fenotiazyny jest ich charakter zasadowy wynikający z obecności w położeniu 10 ugrupowania dimetyloaminoalkilowego, piperydylowego lub piperazynowego. Atom azotu w położeniu 10 układu fenotiazynowego jest praktycznie pozbawiony właściwości zasadowych na skutek elektronossącego działania pierścieni aromatycznych i obecności elektrofilowego atomu siarki.

Pochodne fenotiazyny są termicznie trwałe do temperatury około 200° C, powyżej tej temperatury ulegają rozkładowi. Wartości stałych dysocjacji pochodnych fenotiazyny (wyrażone w postaci pK_a) są zbliżone i mieszczą się w zakresie 9.2-9.42. Zmiana podstawnika w pozycji 2 układu fenotiazynowego w zasadzie nie wpływa na zmianę wartości pK_a, natomiast podstawnik w położeniu 10 układu fenotiazynowego powoduje nieznaczny wzrost wartości pK_a.

Związki te wykazują właściwości luminescencyjne lub przy naświetlaniu promieniowaniem nadfioletowym - fluorescencyjne, niektóre zaś mają właściwości fotosensybilizujące. Właściwości te tłumaczy się występowaniem w pierścieniach aromatycznych układu fenotiazynowego elektronów π, które w odpowiednich warunkach ulegają wzbudzeniu i przy przejściu do stanu podstawowego emitują kwant energii.

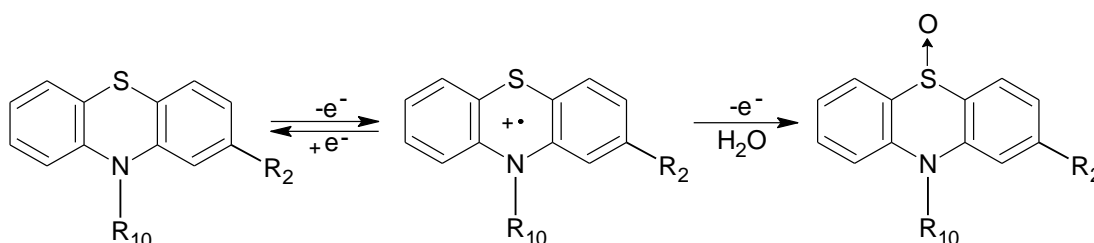
Pod wpływem wielu utleniaczy wodne roztwory pochodnych fenotiazyny łatwo utleniają się tworząc barwne produkty. Barwa tworzących się produktów utleniania jest ściśle związana z budową pochodnych fenotiazyny i zależy głównie od rodzaju podstawnika w pozycji 2 i 10. Najczęściej uzyskiwane barwy form utlenionych pochodnych fenotiazyny to - czerwona (np. chloropromazyna) pomarańczowa (np. promazyna), rzadziej - fioletowa (lewomepromazyna, metopromazyna) lub niebieska (tiorydazyna). Barwne produkty

utleniania pochodnych fenotiazyny pojawiają się przy potencjałach w zakresie od **+0.7 do +0.85 V**. Wartości tych potencjałów maleją nieznacznie ze wzrostem kwasowości roztworu.

Mechanizm procesu utleniania pochodnych fenotiazyny i azafenotiazyny

Pochodne fenotiazyny posiadają układ aromatyczny bogaty w zdelokalizowane elektrony π oraz elektroujemne atomy siarki i azotu zapewniające tym związkom silne właściwości redukujące. Pochodne fenotiazyny mogą ulegać utlenianiu chemicznemu, elektrochemicznemu i fotoutlenianiu.

Proces chemicznego utleniania pochodnych fenotiazyny zawierających podstawniki w pozycji 2 i 10 jest procesem dwustopniowym. W pierwszym etapie utleniania tworzy się kationorodnik. Jest to etap odwracalny z udziałem jednego elektronu. Etap drugi to jednoelektronowy proces utleniania kationorodnika do bezbarwnego sulfotlenku; jest to etap nieodwracalny. Przebieg procesu utleniania w sposób ogólny przedstawiono poniżej:



Mechanizm fotoutleniania pochodnych fenotiazyny i azafenotiazyny jest złożony, a w wyniku reakcji powstaje duża liczba produktów. Szczególnie wrażliwy na czynniki utleniające jest atom siarki w układzie trójcyklicznym. Reakcjom utlenienia, katalizowanym przez jony metali ciężkich i światło, ulegają również, choć w mniejszym stopniu, atomy azotu i węgla. W procesie rozkładu powstają nietrwałe formy wolnorodnikowe, które tworzą następnie odpowiednie sulfotlenki, sulfony, N-tlenki, fenole oraz związki o charakterze dimerów.

Elektrochemiczne utlenianie pochodnych fenotiazyny i azafenotiazyny przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap utleniania pochodnych fenotiazyny – odwracalny, jest reakcją utleniania pochodnej fenotiazyny (lub azafenotiazyny) do kationorodnika. Trwałość otrzymanego kationorodnika zależy od podstawników R_2 i R_{10} oraz od rodzaju i pH użytego elektrolitu podstawowego. Drugi etap jest reakcją nieodwracalną prowadzącą do powstania sulfotlenku.

Elektrochemiczne utlenianie pochodnych fenotiazyny przebiega przy potencjałach w zakresie **od +0.52 V do +0.7 V**, przy czym ze wzrostem stężenia kwasu obserwuje się niższy potencjał utleniania badanych związków.

Istnieją liczne pochodne fenotiazyny i azafenotiazyny różniące się podstawnikami R_2 i R_{10} , w związku z tym interesujące stały się badania wpływu podstawników na charakterystykę elektrochemiczną badanych związków. Stwierdzono, że na potencjał półfali ma wpływ rodzaj podstawnika R_2 i R_{10} , przy czym utlenianie było trudniejsze im bardziej elektroujemny był podstawnik R_2 :



W przypadku podstawników R_{10} wykazano, że obecność dwóch atomów węgla w łańcuchu powoduje niewielki wpływ na potencjał półfali ($E_{1/2}$), natomiast obecność trzech atomów węgla w łańcuchu działa izolująco na azot w pierścieniu fenotiazynowym i dlatego nie zaobserwowano wpływu na potencjał półfali. Stężenie badanej pochodnej fenotiazyny i temperatura nie powodowały zmian wartości $E_{1/2}$.

Celem ćwiczenia jest wykorzystanie technik woltamperometrycznych (woltamperometrii cyklicznej-CV i woltamperometrii zmiennoprądowej prostokątnej- SWV) do badania i oznaczania wybranych leków w preparatach farmaceutycznych.

Aparatura i układ pomiarowy

Elektroda pracująca (WE), zwana też wskaźnikową, jest elektrodą polaryzowaną. Powinna mieć jak najmniejszą powierzchnię, gdyż mierzone prądy mogą wpłynąć na stężenie mierzonej substancji. Elektroda odniesienia (RE), jest to elektroda niepolaryzowalna, a jej powierzchnia powinna być duża, aby przepływający przez nią prąd nie powodował zmiany potencjału. Stosuje się też trzecią elektrodę - elektrodę pomocniczą (CE) i przepływa przez nią prąd. Układ trójelektrodowy wymaga zastosowania potencjostatu, w który zwykle wbudowany jest analizator elektrochemiczny.

W roztworze badanym, oprócz substancji oznaczanej, obecny jest celowo dodany elektrolit podstawowy zapewniający przewodnictwo roztworu. Elektrolit podstawowy powinien spełniać następujące wymagania:

- powinien zapewniać wystarczająco szeroki zakres potencjałów umożliwiający oznaczenie obecnych w próbce depolaryzatorów,
- nie powinien tworzyć z depolaryzatorami soli nierozpuszczalnych.

Spośród często stosowanych elektrolitów podstawowych wymienić można KCl, KNO_3 , HCl, NaOH oraz bufory amonowy, fosforanowy, octanowy i wiele innych. Od elektrolitu podstawowego zależy położenie pików lub fali na osi potencjałów.

Podczas oznaczeń woltamperometrycznych należy usunąć rozpuszczony w roztworze tlen. Tlen z badanego roztworu, bez względu na rodzaj rozpuszczalnika, jego pH czy też rodzaj analizowanej substancji (metale lub związki organiczne), usuwany jest poprzez przepuszczenie przez roztwór badany gazu obojętnego – azotu lub argonu.

Część eksperymentalna

Układ pomiarowy składa się z 3 elektrod: pracującej - elektroda z węgla szklanego ($0,07\text{ cm}^2$); odniesienia - nasyconej elektrody kalomelowej (SCE) i pomocniczej – drutu platynowego.

Przyrząd elektrochemiczny: AUTOLAB 128N, firmy Metrohm-Autolab, wyposażony w program NOVA 1.10. do rejestracji i analizy danych.

Odczynniki:

Roztwór badanego leku - chloropromazyny ($M=355,3\text{ g/mol}$) o stężeniu $0,002\text{ mol/l}$ przygotować poprzez rozpuszczenie odpowiedniej odważki w wodzie Milli Q.

Elektrolit podstawowy: bufor Brittona-Robinsona o $\text{pH}=1,8$.

Warunki pomiarowe	Dla krzywych tła	Dla krzywych z analitem (szeroki zakres potencjałów)	Dla krzywych z analitem (wąski zakres potencjałów)
Zakres potencjałów	od -0,3 V do 1,3 V	od -0,3 V do 1,3 V	od 0,3 V do 0,8 V
Szybkość polaryzacji	100 mV/s	100 mV/s	100 mV/s
Liczba cykli	10	3	3

Doświadczenie 1

Badanie procesu elektrootleniania chloropromazyny metodą woltamperometrii cyklicznej

- Do naczynka elektrolitycznego dodać 20 ml roztworu elektrolitu podstawowego (bufor Brittona-Robinsona o pH=1.8) oraz umieścić w nim 3 elektrody. Przed pomiarem odtleniać roztwór badany strumieniem argonu w czasie 10 min. Zarejestrować metodą CV cykliczną krzywą woltamperometryczną elektrolitu (krzywą tła).
- Następnie do roztworu elektrolitu dodać $9.57 \cdot 10^{-5}$ mol/l (1.0 ml) chloropromazyny i zarejestrować cykliczną krzywą woltamperometryczną w szerokim zakresie potencjałów.
- Następnie ponownie zarejestrować cykliczną krzywą woltamperometryczną chloropromazyny w wąskim zakresie potencjałów.

Scharakteryzować otrzymane krzywe CV chloropromazyny. Określić jakim procesom odpowiadają otrzymane piki utleniania i redukcji.

Doświadczenie 2

Badanie wpływu stężenia analitu na wartości rejestrowanych pików utleniania chloropromazyny metodą woltamperometrii zmiennoprądowej prostokątnej.

Warunki pomiarowe	
Zakres potencjałów	od 0,2 V do 0,8 V
Amplituda	25 mV
Częstotliwość	15 Hz
Wielkość schodka	4 mV

- Do naczynka elektrolitycznego dodać 20 ml roztworu elektrolitu podstawowego (bufor Brittona-Robinsona o pH=1.8) oraz umieścić w nim 3 elektrody. Przed pomiarem odtleniać roztwór badany strumieniem argonu w czasie 10 min. Zarejestrować metodą krzywą elektrolitu podstawowego metodą SWV(krzywą tła).

- b) Do naczynka elektrolitycznego dodać wzrastające stężenia chloropromazyny i rejestrować krzywe SWV. Po dodaniu analitu przed każdym pomiarem wymieszać roztwór strumieniem argonu.

C_p CPM [mol/L]	V_p [ml]	V_k [ml]	C_k CPM [mol/L]	I [A]	E [V]
0.002	0.03	20+0.03			
	0.2				
	0.4				
	0.8				
	1.1				
	1.5				
	2.3				

Na podstawie uzyskanych krzywych wykonać krzywą wzorcową do oznaczania chloropromazyny.

Doświadczenie 3

Analiza chloropromazyny w preparacie farmaceutycznym.

- a) Przygotować 3 tabletki preparatu farmaceutycznego chloropromazyny, poprzez ich rozgniecenie w moździerzu. Odpowiednią ilość substancji (odpowiadającą jednej tabletkie - 25 mg CPM) rozpuścić w kolbie na 25 ml i dopełnić wodą do kreski. Otrzymany roztwór dobrze wymieszać przez 5 min, a następnie przesączyć przez sączek. Do analizy woltamperometrycznej pobrać 1 ml otrzymanego przesączu.
- b) Do naczynka elektrolitycznego dodać 20 ml roztworu elektrolitu podstawowego (bufor Brittona-Robinsona o pH=1.8) oraz umieścić w nim 3 elektrody. Przed pomiarem odtleniać roztwór badany strumieniem argonu w czasie 10 min. Zarejestrować metodą CV cykliczną krzywą woltamperometryczną elektrolitu (krzywą tła).
- c) Do naczynka elektrolitycznego dodać przygotowany roztwór chloropromazyny z preparatu farmaceutycznego i zarejestrować krzywą SWV. Analizę powtórzyć 3 krotnie.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz równania krzywej wzorcowej obliczyć zawartość chloropromazyny w preparacie farmaceutycznym.

Wymagania:

1. Podstawy metod woltamperometrycznych najczęściej wykorzystywanych do badania leków.
2. Możliwości, zalety i ograniczenia metod woltamperometrycznych w analizie leków.
3. Charakterystyka związków badanych podczas ćwiczeń.

Literatura:

1. Cygański A, Metody elektroanalizy, WNT, Warszawa 1991.
2. Bard A., Electrochemical methods, Fundamental and Applications, New York, 1980.
3. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, Warszawa 2004.