

ANNA ROGOWSKA

ROZPRAWA DOKTORSKA

ANNA ROGOWSKA

**ANALIZA WOLTAMPEROMETRYCZNA WYBRANYCH
SUBSTANCJI LECZNICZYCH W PREPARATACH
FARMACEUTYCZNYCH**

ROZPRAWA DOKTORSKA

WYKONANA W KATEDRZE I ZAKŁADZIE CHEMII ANALITYCZNEJ
AKADEMII MEDYCZNEJ W GDAŃSKU

PROMOTOR: PROF. DR HAB. MAREK WESOŁOWSKI

GDAŃSK 2007 r.

I. WSTĘP

„Szlachetne zdrowie nikt się nie dowie jako smakujesz, aż się zepsujesz”

Jan Kochanowski

Każdy chciałby w nieprzerwany sposób cieszyć się zdrowiem, niestety udaje się to nielicznym, ci zaś których zdrowie pogorszyło się, pragnęliby zażyć lek tani i skuteczny. Współczesne leki, w porównaniu z ogromnym bezrobociem i niskim dochodami, nie są tanie. Zaś na ich skuteczność składa się wiele czynników: diagnoza lekarska, zdyscyplinowanie pacjenta w przyjmowaniu leków oraz ich jakość. Współczesna ocena jakości leku oparta jest na zasadach GMP (ang. *Good Manufacturing Practice*) – Dobrej Praktyki Wytwarzania i Kontroli Jakości Leków (Rozporządzenie MZ, 2002).

Jest to zbiór zasad, wynikających z doświadczenia, których przestrzeganie gwarantuje, że wyprodukowany wyrób spełnia ustalone wymagania. Zasady GMP regulowane są przez polskie prawo farmaceutyczne, na podstawie którego Minister Zdrowia wydaje stosowane rozporządzenia (Rozporządzenie MZ, 2002) oraz przepisy Unii Europejskiej (European Agency for the Evaluation of Medical Products, 2001).

Ścisły państwowy nadzór na produkcją leków wynika z obowiązku zapewnienia należytego bezpieczeństwa obywatelom. Nadzór nad produkcją leków w Polsce składa się z dwóch równoległych systemów (Wieniawski, 2004). Pierwszy z nich dotyczy wprowadzania leków do obrotu, działa na zasadzie wydawanych indywidualnie decyzji o dopuszczeniu danego produktu leczniczego do obrotu, drugi to system nadzoru nad produkcją farmaceutyczną. Spełnienie wymagań GMP jest warunkiem na uzyskanie zezwolenia na wytwarzanie leku, a dla osób chorujących gwarantem jakości leku. W Polsce przemysł farmaceutyczny jako pierwszy wprowadził zasady GMP do produkcji.

Dobra Praktyka Wytwarzania dotyczy zarówno produkcji, jak i kontroli jakości. Prawne uwarunkowania stawiane kontroli jakości obejmują: „pobieranie prób, specyfikacje, badania, a także organizację, dokumentację i procedury zwalniania do obrotu zapewniające, że wszystkie wymagane badania zostały przeprowadzone oraz że materiały

nie są zwalniane do użytku ani produkty do obrotu i sprzedaży, zanim ich jakość nie zostanie oceniona jako zadowalająca” (Rozporządzenie MZ, 2002).

Zarządzenie to powoduje, że producent leków zobowiązany jest do:

- utworzenia działu kontroli jakości i zatrudnienia w nim osób o odpowiednich kwalifikacjach i doświadczeniu,
- wyposażenia pomieszczeń w odpowiednie urządzenia i instalacje,
- opracowania, walidacji i stosowania procedur kontroli jakości,
- walidacji procesów krytycznych oraz oceny produktu końcowego.

W procesie oceniania jakości preparatu farmaceutycznego istotne jest:

1. potwierdzenie tożsamości substancji czynnej lub jej identyfikacja,
2. badanie czystości substancji czynnej,
3. określenie zawartości substancji czynnej w badanym preparacie.

Potwierdzenie tożsamości odbywa się na podstawie danych fizykochemicznych, reakcji specyficznych opisanych w monografiach farmakopealnych lub według norm producenta. W przypadku preparatów złożonych i przy braku reakcji specyficznych, konieczne jest wcześniejsze wyizolowanie analizowanych substancji z gotowych postaci leku (Zejc, Gorczyca, 2002).

Czystość substancji stosowanych w produkcji farmaceutycznej jest problemem niezwykle istotnym. Zanieczyszczające je substancje mogą pochodzić z różnych źródeł: od substratów użytych do syntezy, z rozpuszczalników lub mogą być wynikiem reakcji ubocznych towarzyszących syntezie.

Zmiany w składzie preparatu farmaceutycznego mogą wynikać również z niewłaściwego przechowywania lub działania na niego czynników zewnętrznych przyspieszających rozkład, takich jak wilgoć lub światło słoneczne. Podczas badania czystości substancji leczniczej należy zwrócić uwagę na typ zanieczyszczenia. Do kontroli tego etapu produkcji leku wymagane jest użycie wielu metod identyfikacyjnych, gdyż zanieczyszczenia mogą być pochodzenia organicznego i nieorganicznego.

Badanie zawartości substancji czynnej jest działaniem rutynowym w procesie produkcji preparatu farmaceutycznego, ale techniki używane do tej analizy są różnorodne. Stale prowadzone są badania na opracowywaniem warunków analiz substancji leczniczych nowymi, dokładniejszymi technikami. Zawartość badanej substancji oraz odchylenia od wartości teoretycznej są ściśle określone normami. Szczególnie ważny jest dobór takich

metod analitycznych, które gwarantowałyby oznaczanie substancji leczniczej nawet na poziomie mikrogramów.

Duży wpływ na trwałość preparatu farmaceutycznego oraz na uwalnianie i wchłanianie w organizmie substancji czynnej mają substancje pomocnicze, które są składnikiem każdego leku. Obecnie substancje pomocnicze poddaje się również szczegółowej analizie jakościowej i ilościowej.

Do kontroli przebiegu produkcji oraz do kontroli jakości gotowego preparatu farmaceutycznego wykorzystywane są różne techniki analityczne. Część z nich to sprawdzone i od dawna używane techniki, np. spektrofotometria UV-Vis, a pozostałe to nowe techniki, np. spektrometria mas. 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).

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

I. Techniki instrumentalne w analizie leków

Aktualnie wiele technik analizy instrumentalnej jest wykorzystywanych do analizy substancji organicznych, które są zwykle składnikami leków. Do najczęściej używanych zalicza się: spektrofotometrię UV-Vis (Kleszczewski, Kleszczewska, 2002; Ferreyra, Ortiz, 2002), chromatografię cieczową (Zhang et al., 2004, Raines et al., 1998; Simonovska et al., 1999) i chromatografię gazową (Herrmann et al., 2001). W piśmiennictwie znajdują się także przykłady zastosowania w analizie leku: spektrometrii mas (Song et al. 1994; Fauler et al., 1996), woltamperometrii (Obendorf, Stubauer, 1995; Balon et al., 2002) i polarografii (Yardimci, Ozaltin, 2001; Jain et al., 2003). W celu dokładnego oddzielenia substancji leczniczych od pozostałych składników preparatu farmaceutycznego są łączone ze sobą różne techniki, np. spektrometria mas z chromatografią gazową lub wysokosprawną chromatografią cieczową. Wyżej wymienione metody charakteryzują się też różną granicą wykrywalności, przykładowe granice wykrywalności przedstawiono w Tabeli II.1 (Abu Zuhri, Voelter, 1997).

Tabela II.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	$1 \cdot 10^{-9}$

II. Analiza woltamperometryczna

Woltamperometria jest techniką elektroanalityczną (elektrochemiczną) (Szczepaniak, 2005). Elektrochemia jest działem analizy instrumentalnej, który zajmuje się badaniem zjawisk fizycznych i chemicznych zachodzących na granicy faz, między elektrolitem a elektrodą, związanymi z podwójną warstwą elektryczną oraz przemianami energii elektrycznej w chemiczną i odwrotnie.

Wśród metod elektroanalitycznych wyróżnia się trzy podstawowe grupy. Pierwszą stanowią metody, w których reakcje elektrodowe przebiegają przy zerowym prądzie Faraday'a, czyli bez przyłożonego napięcia zewnętrznego. Metodą taką jest potencjometria, w której do celów analitycznych wykorzystuje się pomiar siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa galwanicznego zbudowanego z dwóch elektrod niespolaryzowanych zanurzonych w roztworze elektrolitu. Druga grupa obejmuje metody, w których reakcje elektrodowe przebiegają pod wpływem przyłożonego napięcia z zewnętrznego źródła prądu stałego. Do tej grupy metod zalicza się m.in. elektrogravimetrię, polarografię, woltamperometrię, amperometrię i kulometrię. Ostatnia grupa to metody, w których nie przebiega reakcja elektrodowa. Zalicza się do nich konduktometrię, oscylometrię i dielektrometrię.

Podstawowym elementem zestawu pomiarowego w metodach elektroanalitycznych jest elektroda (półogniwo). Pod pojęciem elektrody należy rozumieć układ złożony z metalu zanurzonego w roztworze elektrolitu. Na granicy faz między metalem a elektrolitem wytwarza się podwójna warstwa elektryczna. Układ dwóch elektrod (półogniw) połączonych z zewnętrznym źródłem prądu tworzy z kolei ogniwo galwaniczne (elektryczne), a zjawisko przepływu prądu w takim układzie jest wykorzystywane w monitorowaniu różnych reakcji zachodzących podczas elektrolizy. Elektroliza stanowi także podstawę m.in. woltamperometrii, techniki, którą wykorzystano w niniejszej pracy.

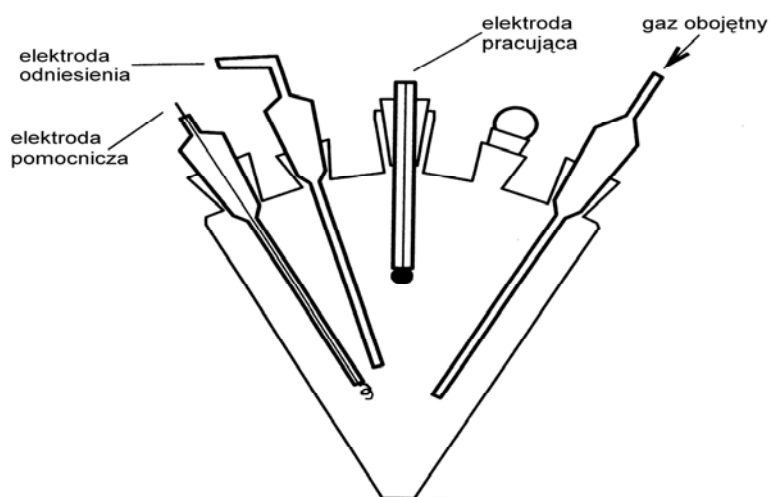
Woltamperometrią nazywa się zespół metod elektroanalitycznych polegających na pomiarze zależności między natężeniem prądu płynącego przez stacjonarną elektrodę wskaźnikową i potencjałem tej elektrody. Zależność tę opisuje funkcja $I = f(E)$, w której I oznacza natężenie prądu płynące przez roztwór podczas elektrolizy, natomiast E – napięcie przyłożone do elektrod. Pomiar odbywa się w warunkach wymuszenia określonych zmian potencjału elektrody lub napięcia ogniwa w czasie.

1. Układ pomiarowy

Woltamperometryczne ogniwo pomiarowe składa się z układu trzech elektrod, które zanurzone są w naczynku o kształcie gruszkowatym zwążającym się ku dołowi. Taka konstrukcja ułatwia zanurzenie elektrod w minimalnej objętości roztworu (Cygański, 1999; Suchacz, 2006). Do pomiarów woltamperometrycznych wykorzystujemy następujące elektrody:

- elektroda pracująca (wskaźnikowa),
- elektroda odniesienia,
- elektroda pomocnicza.

Schemat ogniwa mikroelektrolitycznego przedstawia Rys. II.1.



Rys. II.1. Schemat ogniwa mikroelektrolitycznego.

Wraz z elektrodami w roztworze analizowanym znajduje się przewód doprowadzający gaz obojętny oraz umieszczone jest mieszadło.

Przez elektrodę odniesienia nie płynie prąd, co powoduje, że potencjał tej elektrody ma stałą wartość i nie zależy od stężenia analizowanej substancji. Elektroda odniesienia jest przeważnie elektroda chlorosrebrowa lub nasycona elektroda kalomelowa. Na elektrodzie pracującej zachodzi proces elektrodowy, przez co potencjał elektrody pracującej zmienia się, a pomiar natężenia prądu tej elektrody jest podstawą analizy woltamperometrycznej. Elektroda pomocnicza nie odgrywa roli w procesie pomiaru natężenia prądu, a jest odpowiedzialna jedynie za przenoszenie prądu. Powinna być

wykonana z elektrochemicznie obojętnego przewodnika dobrze przewodzącego prąd. Funkcje elektrody pomocniczej pełnią zwykle elektrody wykonane z metali szlachetnych.

W woltamperometrii problem występowania maksimów tlenowych tworzących się w skutek redukcji tlenu na elektrodzie pracującej rozwiązano poprzez przepuszczanie przez badany roztwór gazu obojętnego. Najczęściej stosowanym gazem jest azot o dużej klasie czystości.

2. Elektrody wskaźnikowe

W woltamperometrii wykorzystywane są następujące elektrody wskaźnikowe (Szczepaniak, 2005):

- elektroda rtęciowa w postaci wiszącej kropli,
- błonkowa elektroda rtęciowa,
- statyczną elektrodą rtęciową,
- elektrody stałe o podłożu z metalu szlachetnego lub węgla szklanego,
- elektrody modyfikowane chemicznie.

Elektrodę w postaci wiszącej kropili (ang. *Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE*) skonstruowali polscy uczeni z Uniwersytetu w Warszawie, profesorowie Kemula i Kubik. W skład elektrody wchodzi szklany zbiorniczek wypełniony rtęcią (wysokiej klasy czystości). Zbiorniczek zamyka polietylenową nasadką, w której znajduje się mechanizm wyciskający kroplę rtęci (Cygański, 1999). Zbiorniczek z rtęcią połączony jest z silikonowaną kapilarą, z której wypływa rtęć.

W statycznej elektrodzie rtęciowej (ang. *Static Mercury Drop Electrode, SMDE*) i w elektrodzie rtęciowej w postaci wiszącej kropli analiza odbywa się na jednej kropli rtęci, która jest po analizie usuwana, zaś do kolejnej analizy jest formowana nowa kropla. Dzięki takiemu procesowi produkty poprzedniej analizy są usuwane. Mechanizm wyciskania rtęci powoduje, że w najnowszych elektrodach HMDE i SMDE nie występuje problem nierównej wielkości kropli rtęci, nierównomierniej polaryzacji rtęci czy nierównego napięcia powierzchniowego kropli rtęci.

Szerokie zastosowanie HMDE i SMDE w analizie związków organicznych i pierwiastków wynika z dużego zakresu potencjałów, w których można dokonywać analiz

i stale odnawialnej powierzchni elektrody, na której nie znajdują się produkty poprzednich analiz (Smyth, Vos, 1992).

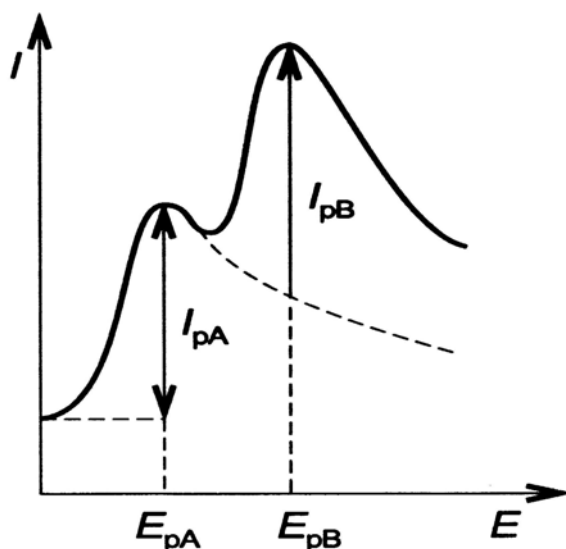
W błonkowej elektrodzie rtęciowej na powierzchni elektrody wykonanej ze srebra, platyny lub węgla szklanego osadzana w specjalnym procesie bardzo cienka warstewka rtęci, której grubość wynosi od 1-100 μm . Proces osadzania polega na zanurzeniu elektrody w roztworze rozpuszczalnych soli rtęci(II), a następnie przeprowadzane jest elektrolityczne osadzanie jonów rtęci(II) na powierzchni elektrody. Możliwość wykorzystania rozpuszczalnych soli zawierających jony rtęci(II) ma duże znaczenie dla środowiska oraz zdrowia osób wykonujących analizy woltamperometryczne.

Aktualnie dużym powodzeniem cieszą się również elektrody modyfikowane chemicznie, które konstruowane są do analiz pojedynczych substancji chemicznych. Wadą tego typu elektrod jest to, że nie mogą być zastosowane w analizie większej grupy związków.

3. Analiza jakościowa i ilościowa

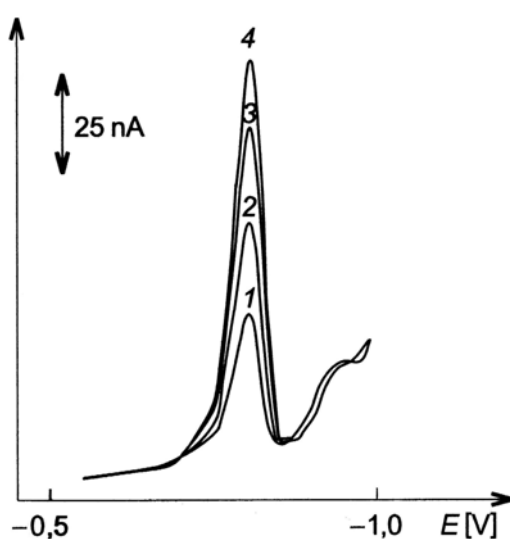
Woltamperometria wywodzi się historycznie z polarografii. W obu tych technikach mierzona jest ta sama zależność $I = f(E)$ (Kocjan, 2002). Różnią się zaś rodzajem stosowanych elektrod, przez co ich dokładność i precyzja są różne. Rodzaj stosowanych elektrod w woltamperometrii jest też istotny ze względu na toksyczny wpływ rtęci na środowisko. Substancje, które są analizowane obiema metodami muszą spełnić te same wymagania, mianowicie muszą ulegać procesom utleniania lub redukcji w warunkach analizy. Zachodzący w roztworze proces (w obu metodach) polega na dyfuzji oznaczanych substancji w kierunku elektrody pracującej, na której oznaczane substancje ulegają redukcji lub utlenieniu, przez co elektroda ulega depolaryzacji.

Analiza jakościowa oparta jest na pomiarze wartości potencjału półfali. Potencjał półfali jest to wielkość, przy którym natężenie prądu dyfuzyjnego stanowi połowę wartości granicznej. Jest to wartość charakterystyczna dla danej substancji i stanowi podstawę analizy jakościowej w woltamperometrii. Pomimo, że jest to wartość charakterystyczna, to nieznaczny wpływ na nią wywiera rodzaj użytego rozpuszczalnika i pH badanego roztworu. Na Rys. II.2 przedstawiono krzywą woltamperometryczną dwóch substancji. Na osi odciętych zaznaczony jest potencjał przyłożony do elektrody pracującej, zaś na osi rzędnych natężenie prądu płynącego przez badany roztwór.



Rys. II.2. Krzywa woltamperometryczna.

Analiza ilościowa oparta jest na wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy natężeniem prądu i stężeniem analizowanej substancji. Krzywe woltamperometryczne dla roztworów o wzrastającym stężeniu przedstawiono na Rys. II.3. Cyframi (1-4) zaznaczono fale woltamperometryczne dla roztworów o coraz wyższych stężeniach. 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 (Ly et al., 2004; Zen et al., 1999; Hotta et al., 2002).



Rys. II.3. Krzywa analizy woltamperometrycznej roztworów o wzrastającym stężeniu depolaryzatora.

4. Zakłócenia w analizie woltamperometrycznej

W związku z dużą czułością metod woltamperometrycznych pojawienie się zakłóceń w analizie ma bardzo duży wpływ na wynik oznaczeń. Często praktyką stosowaną w woltamperometrii jest dodawanie do badanego roztworu elektrolitu podstawowego, w skład którego zwykle wchodzi: elektrolit przewodzący prąd (sole mocnych kwasów i zasad), substancje powierzchniowo czynne, bufony i związki kompleksotwórcze (Szczepaniak, 2005; Smyth, Vos, 1992). Sole mocnych kwasów i zasad są odpowiedzialne za przewodnictwo elektryczne roztworu, dzięki czemu można mierzyć tylko natężenie granicznego prądu dyfuzyjnego w badanym roztworze. Związki powierzchniowo czynne (np. żelatyna) tłumią maksima prądowe. Roztwory buforowe pozwalają na rozsuniecie nie rozdzielonych fal, zaś związki kompleksotwórcze są najczęściej wykorzystywane w analizie metali do związania w kompleksy jonów przeszkadzających w analizie.

Podczas oznaczeń woltamperometrycznych i polarograficznych należy usunąć rozpuszczony w roztworze tlen, który ulega redukcji na elektrodzie pracującej. Tlen redukuje się przy dwóch potencjałach depozycji: przy $-0,05$ i $-0,9$ V (Szczepaniak, 2005). Fale te przeszkadzają w analizie. 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 azotu o wysokiej klasie czystości. Zabieg ten przeprowadzany jest przed analizą przez 100-300 s.

Oznaczane woltamperometrycznie substancje należy rozpuścić w rozpuszczalniku gwarantującym całkowite przeprowadzenie oznaczanej substancji do roztworu oraz właściwe przewodnictwo roztworu. Problem niedostatecznego przewodnictwa roztworu można rozwiązać poprzez dodatek soli obojętnych lub zmianę pH roztworu (Szczepaniak, 2005).

Istotnym problemem w analizie woltamperometrycznej są zanieczyszczenia pochodzące z rozpuszczalnika. Nawet najmniejsza ilość zanieczyszczeń może mieć istotny wpływ na wynik analizy, gdyż zarówno metale jak i związki organiczne mogą ulegać w warunkach analizy procesom utleniania i redukcji. Z zagadnieniem obecności innych substancji w analizowanym roztworze wiąże się problem analizy próbek środowiskowych, na przykład materiału roślinnego. W tym przypadku, w zależności od tego czy

analizowane są pierwiastki metaliczne czy związki organiczne, procedury postępowania z zanieczyszczeniami są różne. 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 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. Gdy ten zabieg nie daje zadowalających wyników należy wyizolować analizowany składnik z próbki. W tym przypadku należy jednak liczyć się z wydłużeniem procedury analitycznej oraz stratami związanymi z procesem izolacji.

III. Zastosowanie woltamperometrii

Techniki woltamperometryczne stwarzają możliwość analizy kationów pierwiastków metalicznych i anionów nieorganicznych oraz związków organicznych. Przy zastosowaniu odpowiedniej techniki i elektrody można badać specjację pierwiastków metalicznych w materiale biologicznym, wodach naturalnych i pożywieniu. Woltamperometria cykliczna umożliwia badanie procesów elektrodowych, zaś woltamperometria inwersyjna używana jest do oznaczania śladowych ilości pierwiastków. 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. Techniki woltamperometryczne są też często stosowane w analizie preparatów farmaceutycznych, zarówno w analizie ilościowej i jakościowej substancji czynnych jak również pomocniczych.

1. Analiza woltamperometryczna jonów nieorganicznych

Techniki woltamperometryczne są jednymi z prężniej rozwijających się. Dzieje się tak dlatego, że można za ich pomocą oznaczyć około 30 pierwiastków oraz w wielu przypadkach, mieszaniny kilku pierwiastków jednocześnie. Oprócz kationów można woltamperometrycznie oznaczać niektóre aniony. Innym niezmiernie ważnym czynnikiem jest możliwość badania specjacji pierwiastków. Największe zastosowanie w tym przypadku znalazła woltamperometria inwersyjna, która uważana jest za jedną z najczulszych, a jednocześnie najtańszych metod analizy śladowej (Kocjan, 2002). Woltamperometria jest też tańsza w porównaniu z innymi czułymi metodami, takimi jak absorpcyjna spektrometria atomowa, emisyjna spektrometria atomowa czy wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Aktualnie, w przypadku preparatów farmaceutycznych oznacza się zawartość pierwiastków metalicznych jako potencjalnych zanieczyszczeń (Pravda, Vytras, 1996) lub oznacza się wybrane pierwiastki stosowane w psychiatrii jako leki psychotropowe np. preparaty litu (Teixeira et al., 2003). Krótki przegląd głównych kierunków zastosowania woltamperometrii w analizie pierwiastków metalicznych przedstawiono w Tabeli II.2, zaś innych związków nieorganicznych w Tabeli II.3.

Tabela II.2. Wybrane przykłady zastosowania woltamperometrii w analizie pierwiastków metalicznych.

Analizowany materiał	Oznaczany pierwiastek	Literatura
Woda morską	Cd, Pb, Cu	Truzzi et al., 2002
Zwierzęta morskie	As, Se, Cu, Pb, Cd, Zn, Hg	Locatelli, Torsi, 2001
Wody rzeczne	Zn, Cd, Pb, Cu	Alonso et al., 2004
Ścieki	Ni, Na, Pb, K, Fe, Mg, Mn, Zn, Cd, Co, Cr, Cu	Zufiaurre et al., 1998
Preparaty farmaceutyczne	Se	Stoica et al., 2002
	Zn	Lutka et al., 2004
Zanieczyszczenia leków	Pb, Cd	Opoka et al., 2004
Ślina ludzka	Pb, Cd	Hardcastle et al., 2002
Sztuczny sok żołądkowy	Pb	Oomen et al., 2003
Wątroba, nerki i śledziona myszy	Ni	Pereira et al., 1998
Krew, surowica, mięśnie	Se	Raghunath et al., 2002
Mocz	Zn, Cd, Pb, Cu	Pan et al., 1993
Warzywa	Pb, As, Cd	Queirolo et al., 2000
Mleko krowie	Se, Pb	Inam, Somer, 2000

Tabela II.3. Zastosowanie woltamperometrii w analizie anionów nieorganicznych.

Analizowany materiał	Oznaczany anion	Literatura
Woda	azotany(V)	Peel et al., 2003
	tlenek azotu(II)	
Osocze	bromki	Arai et al., 1996
	chlorki	

2. Analiza woltamperometryczna związków organicznych

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 II.4 (Smyth, Vos, 1992). 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 osadzeniu oznaczanego składnika na powierzchni elektrody.

Tabela II.4. 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)

2.1 Analiza woltamperometryczna substancji biologicznie czynnych

Aktualnie woltamperometria jest często stosowana w analizie substancji biologicznie czynnych. Podobnie jak w przypadku analizy pierwiastków, można 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. Przykłady oznaczeń woltamperometrycznych różnych związków biologicznie czynnych przedstawiono w Tabeli II.5. Istotnym problemem w analizie związków organicznych jest ich niska trwałość. Substancje biologicznie czynne rozkładają się po przeprowadzeniu ich do roztworu pod wpływem rozpuszczalnika, pH roztworu, promieni światła słonecznego. Dlatego analizowane próbki trzeba przygotowywać tuż przed pomiarami, zaś analizy woltamperometryczne przeprowadzać najsprawniej jak tylko jest to możliwe. W zależności od substancji proces rozkładu trwa od kilkudziesięciu minut do kilku godzin.

Tabela II.5. Przykłady zastosowania woltamperometrii w analizie substancji biologicznie czynnych.

Analizowana substancja	Literatura
Kwasy nukleinowe	Jelen et al., 2000 Trnkova et al., 2002
Cholesterol	Nakaminami, 1999
Tiole	Al-Farawati, Van den Berg, 2001
Fenole	Kilmartin et al., 2001
Rakotwórcze zanieczyszczenia	Barek et al., 2001
Nitrowe pochodne wielocyklicznych węglowodorów aromatycznych	Barek et al., 1999

2.2 Analiza woltamperometryczna substancji leczniczych

Zdecydowana większość substancji leczniczych to związki organiczne. Aktualnie jest kilka wiodących technik analizy substancji leczniczych w preparatach farmaceutycznych, które mają porównywalne parametry dotyczące granicy oznaczalności, czułości i dokładności. Woltamperometria w porównaniu z nimi jest mniej kosztowna na etapie przygotowania próbki do analizy. W chwili obecnej opracowywane są metody analizy większości substancji leczniczych. W Tabeli II.6 zestawiałam wybrane przykłady oznaczeń woltamperometrycznych substancji leczniczych z różnych grup leków.

Tabela II.6. Wybrane przykłady zastosowania technik woltamperometrycznych w analizie substancji leczniczych.

Substancja lecznicza	Rodzaj elektrody	Technika woltamperometryczna	Piśmiennictwo
Leki działające na ośrodkowy układ nerwowy			
chlordiazepoksyd	HMDE	CV	El-Hefnawey et al., 2004
paroksetyna	elektroda z węgla szklitego	CV, DPV, SWV	Erk, Biryol, 2003
zuklopentyksol	elektroda z węgla szklitego	CV, LSV, DPV	Senturk et al., 2000
sertralina	HMDE	CV, LSV, DPV, SWV	Vela et al., 2001
nitrazepam	HMDE	CV	Correia dos Santos et al., 2002
flurazepam			
medazepam			
diazepam			
klonazepam			
haloperydol	elektroda z węgla szklitego	LSV	Saponjic et al., 1994
klozapina	HMDE	AdSV	Hammam et al., 2004
trazodon	wirująca elektroda platynowa	DPV	Dogrukol-Ak et al., 1999
wenlafaksyna	HMDE	SWV	Lima et al., 1999
kwas acetylosalicylowy	elektroda modyfikowana	SV, DPV	Campanella et al., 2004
tramadol	elektroda z węgla szklitego	CV	Halfpenny et al., 1999
prokaina	modyfikowana elektroda węglowa	DPV	Wang et al., 2002

kokaina	elektroda modyfikowana	CV	Wieczorek, Kruk, 1994
metoheksytal	HMDE	AdSV	Farghaly et al., 1999
Leki działające na układ sercowo-naczyniowy			
kaptopryl	HMDE	SWCAdSV	Ioannides et al., 2003
trimetazydyna	elektroda z węgla szklanego	CV, SWV, AdSV	Ghoneim et al., 2002a
dipirydamol	HMDE	SWV, SWCAdSV	Ghoneim et al., 2002c
nifedypina	HMDE	SWAdSV, CV, SWV	Ghoneim et al., 2003
		SWAdSV, SWV	Ozaltin et al., 2002
cylazapryl	HMDE	AdSV, DPV	Prieto et al., 2003
ramipryl		SWV, CV	
quinapryl		SWV	
doksazosyna	elektroda węglowa i modyfikowana	SWV	de Betono et al., 1999
prazosyna	elektroda z węgla szklanego	DPV	Arranz et al., 1999
fenofibrat	HMDE	CV, SWV	Yardimci, Ozaltin, 2004
amlodypina	elektroda z węgla szklanego	DPV	Altiokka et al., 2002
lacydypina	elektroda modyfikowana	CV	Crespi et al., 2001
werapamil	HMDE	AdSV	Kasim et al., 2002
nikardypina	HMDE	AdSV	Obendorf, Stubauer, 1995
diltiazem	HMDE	AdSV, CV, LSV	Ghandour et al., 2001
amiloryd	HMDE	SWAdSV	Hamman, 2004
indapamid	elektroda węglowa i modyfikowana	CV, DPV, AdSV	Radi, 2001

Leki stosowane w chorobach układu oddechowego			
kodeina	elektroda modyfikowana	SWV	Shih et al., 2002
salbutamol	elektroda z węgla szklistego i modyfikowana elektroda węglowa	CV, DPV	Boyd et al., 1994
orcyprenalina			
fenoterol			
klenbuterol	elektroda modyfikowana	DPV	Moane et al., 1996
terbutalina	elektroda z węgla szklistego	CV, SWV	Yilmaz et al., 1998
terfenadyna	HMDE	AdSV	Ghoneim et al., 2001a
loratadyna	HMDE	CAdSV	Ghoneim et al., 2001b
akriwastyna	elektroda z węgla szklistego	CV	Torres et al., 2002
terbutalina	elektroda z węgla szklistego	CV, SWV	Yilmaz et al., 1998
Leki działające na przewod pokarmowy i metabolizm			
lansoprazol	elektroda modyfikowana	CV, DPV	Radi, 2003a
pantoprazol	HMDE	SWV	Radi, 2003b
omeprazol	elektroda z węgla szklistego	CV, DPV	Radi, 2003c
Witaminy			
witamina K	elektroda z węgla szklistego	LSV, AdSV	Hart et al., 1989
witamina B ₆	elektroda z węgla szklistego	DP, CV, LSV	Uslu et al., 2001
witamina PP	elektroda z węgla szklistego	SV	Song et al., 2002

witamina C	elektroda z węgla szklitego	CV	Kleszczewska, Mielech-Lukasiewicz, 2002
witamina E	elektroda z węgla szklitego	DPV	Galeano Diaz et al., 2004
witamina B ₂	modyfikowana elektroda węglowa	CV, LSV	Marian et al., 2001
koenzym Q-10	modyfikowana elektroda węglowa	CV	Ferri et al., 1994
Hormony			
metimazol	wirująca elektroda platynowa	SWV	Aslanoglu, Peker, 2003
tyroksyna	elektroda z węgla szklitego	CV	Hu et al., 2004
melatonina	elektroda z węgla szklitego	CV	Corujo-Antuna et al., 2003
Leki stosowane w zakażeniach, przeciw pasożytnicze i przeciwgrzybicze			
cefoperazon	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, wirująca elektroda platynowa	SWV, CV	Yilmaz, Biryol, 1998
cefotaksym	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, wirująca elektroda platynowa	ASV	
cefepim	HMDE	AdSV, LSV	Palacios et al., 2003
azytromycyna	elektroda z węgla szklitego	CV, LSV, DPV	Nigovic, Simunic, 2003
ampicylina	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, SMDE	ASV, CV	Abo El-Maali, 2004
ceftriakson	HMDE	DP-AdSV	Altinoz et al., 1994
ketokonazol	HMDE	AdSV-DP, LSV	Arranz et al., 2003
mikonazol	HMDE	CSV	Pereira et al., 2002
klotrimazol	HMDE	LSV	Fijałek et al., 1992
prazykwantel	HDME	DPV	Ghoniem et al., 2002b

niklozamid	elektroda z węgla szklitego	SWV, CV	Alemu et al., 2002
pefloksacyna	HMDE	SWCAdSV	Beltagi, 2003
nitrofurantoina	HMDE	CV, SWCAdSV	Hammam, 2002
norfloksacyna	elektroda z węgla szklitego	CV, SWV	Ghoneim et al., 2001c
metronidazol	HMDE	CV	Tocher, Edwards, 1994
Leki działające na układ mięśniowo-szkieletowy			
ketorolak	elektroda modyfikowana	DPV	Hall et al., 1999
ibuprofen			
meloksykam	HMDE	SWV, DPV, SWV	Radi et al., 2001
		DPV	Beltagi et al., 2002
Leki przeciwnowotworowe			
dakarbazylna	HMDE	DPV, CV	Ordieres et al., 1988
doksorubicyna	HMDE	SWV, CV	Hahn, Lee, 2004
bleomecyna	HMDE	AdSV	Tan et al., 1997
Inne			
dorzolamid	elektroda z węgla szklitego	DPV, CV, LSV	Erk, 2003
kofeina	elektroda z węgla szklitego	SWV	Ly et al., 2004
			Zen et al., 1998

Techniki woltamperometryczne:

CV- woltamperometria cykliczna (ang. *cyclic voltammetry*)

AdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna (ang. *adsorptive stripping voltammetry*)

SWV – woltamperometria fali prostokątnej (ang. *square wave voltammetry*)

DPV- woltamperometria pulsowa różnicowa (ang. *differential pulse voltammetry*)

LSV- woltamperometria z liniowo zmieniającym się potencjałem (ang. *linear sweep voltammetry*)

CAdSV- katodowa woltamperometria adsorpcyjna (ang. *cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

SWAdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna fali prostokątnej (ang. *square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

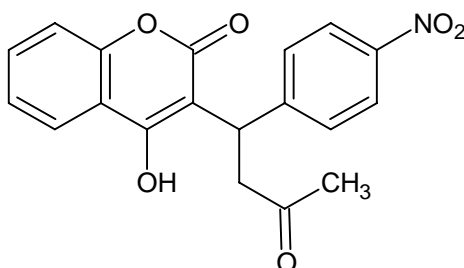
ASV- anodowa woltamperometria inwersyjna (ang. *anodic stripping voltammetry*)

DPAAdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna z impulsem różniczkowym (ang. *adsorptive stripping differential pulse voltammetry*)

SWCAdSV- katodowa adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna fali prostokątnej (ang. *square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

IV. Analizowane substancje lecznicze

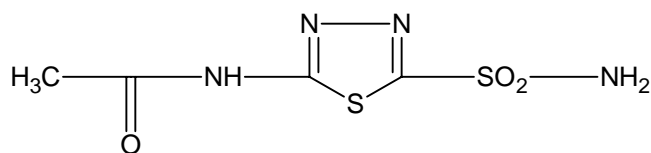
1. Acenokumarol



Acenokumarol, 4-Hydroksy-3-[1-(4-nitrofenylo)-3-oksobutylo]-2*H*-1-benzopiran-2-on, jest syntetyczną pochodną hydroksykumaryny i należy do grupy doustnych leków przeciwzakrzepowych (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Działanie tego leku polega na hamowaniu w wątrobie syntezy czynnych postaci czynników krzepnięcia krwi. Acenokumarol jest antagonistą witaminy K. Stosowany jest w zapobieganiu zakrzepicy żyłnej, w nawracających zatorach tętniczych, w skrzeplinach wewnątrz sercowych, w niektórych postaciach choroby niedokrwiennej serca oraz w leczeniu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i zatorowości płucnej (Pharmindex, 2006). Bardzo dobrze wchłania się z układu pokarmowego i aż w 98% wiąże się z białkami osocza (Farmakopea Polska VI, 2002).

Farmakopea Polska VI zaleca jako metodę analizy ilościowej, analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy długości fali 283 i 306 nm. Acenokumarol analizować można również z wykorzystaniem HPLC (Sanchez Vilegas et al., 1992).

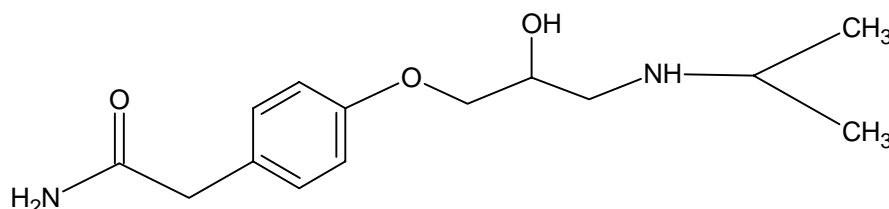
2. Acetazolamid, diuramid



Acetazolamid, N-(5-Sulfamoilo)-1,3,4-tiadiazol-2-ilo)-acetamid, należy do grupy diuretyków (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Działa na poziomie cewek nerkowych i powoduje zwiększenie wydzielenia wody, jonów wodorowęglanowych oraz w mniejszym stopniu jonów sodowych i potasowych. W gałce ocznej powoduje obniżenie ciśnienia śródgałkowego. Zmniejsza wydzielenie płynu rdzeniowo-mózgowego. Działa również przeciwdrgawkowo. Stosowany miejscowo, działa przeciwobrzękowo. Acetazolamid stosowany jest w leczeniu jaskry, padaczki i w przypadku ostrego przebiegu choroby wysokościowej. Podawany jest przy obrzękach spowodowanych niewydolnością układu krążenia i wywołanymi przez inne leki (Pharminindex, 2006).

Farmakopea Polska VI zaleca jako metodę analizy ilościowej, analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 240 i 292 nm. Do analizy diuramidu stosuje się także analizę polarograficzną (Gomez de Balugera et al., 1994), analizę z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Zarghi, Shafaati, 2002) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (Yu et al., 2005).

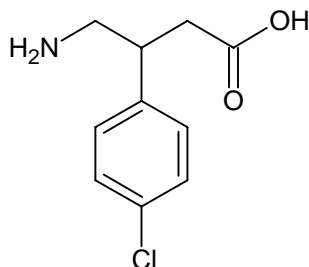
3. Atenolol



Atenolol, 4-{2-hydroksy-3-[(1-metyloetylo)-amino]-propoksy}-benzenoacetamid, należy do leków wpływających na obwodowy układ nerwowy, ale przede wszystkim jest często stosowanym lekiem kardioselektywnym (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Wykazuje zdolność do blokowania receptorów β . Obniża skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze. Stosowany jest w leczeniu ciśnienia nadciężnego w monoterapii i leczeniu skojarzonym, w chorobie niedokrwiennej serca i w arytmii.

Farmakopea Polska VI nie opisuje tej substancji. Atenolol może być analizowany potencjometrycznie (Hassan et al., 2003), spektrofotometrycznie (El-Gindy et al., 2005), voltamperometrycznie (Goyal et al., 2006; Goyal, Singh, 2005) oraz z wykorzystaniem HPLC (El-Gindy et al., 2005).

4. Baklofen

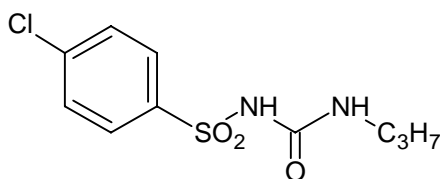


Baklofen, kwas (*RS*)-4-amino-3-(4-chlorofenylo)masłowy, jest analogiem kwasu γ -aminomasłowego i należy do grupy leków wpływających na obwodowy układ nerwowy (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Działa na poziomie rdzenia kręgowego i łagodzi bolesne przykurcze. Zmniejsza odruchowe wzmożone napięcie mięśniowe. Nie zmniejsza przewodnictwa nerwowo-mięśniowego na poziomie płytki motorycznej.

Baklofen stosowany jest w stanach skurczowych mięśni szkieletowych pochodzenia rdzeniowego, na przykład w stwardnieniu rozsianym na tle infekcyjnym, zwyrodnieniowym, urazowym, nowotworowym. Preparaty zawierające baklofen podawane są przy uszkodzeniach rdzenia kręgowego, udarach naczyniowych mózgu, porażeniu mózgowym i zapaleniu opon mózgowych. Przez to że zmniejsza dolegliwości bólowe, daje pacjentom możliwość leczenia usprawniającego (Zejc, Gorczyca, 2002).

Farmakopea Polska VI zaleca jako metodę analizy ilościowej, analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 259, 263 i 275 nm. Baklofen analizować można z wykorzystaniem HPLC (Sagirli et al., 2006), polarografii (Jain et al., 2003) i woltamperometrii (Balon et al., 2002; Doherty, Gratton, 1999).

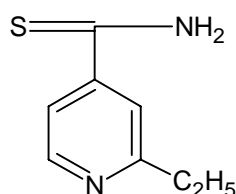
5. Chloropropamid



Chloropropamid, 1-[(4-chlorofenylo)sulfonylo]-3-propylomocznik, jest pochodną sulfomocznika i należy do doustnych środków przeciwcukrzycowych (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Jest to lek o silnym działaniu hipoglikemizującym i łagodnym działaniu antydiuretycznym. Chloropropamid stosowany jest w cukrzycy niepowikłanej typu drugiego oraz w moczówce prostej.

Farmakopea Polska VI zaleca analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 232 nm jako metodę analizy ilościowej.

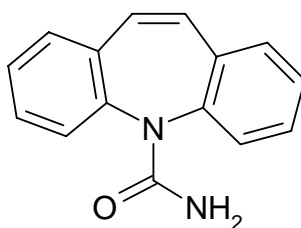
6. Etionamid



Etionamid, 2-Etylopirydyno-4-karbotioamid, jest pochodną kwasu tioizotiozotynowego (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Etionamid działa bakteriostatycznie, a w dużych dawkach bakteriobójczo na prątki gruźlicy. Lek ten jest stosowany pomocniczo w leczeniu gruźlicy płuc i pozapłucnej. Dobrze się wchłania z układu pokarmowego i dobrze przenika do płynu mózgowo-rdzeniowego. Etionamid jest stosowany w skojarzeniu z innymi lekami przeciwprątkowymi. Preparat należy podawać przez dłuższy czas, tj. 3-12 miesięcy (Zejc, Gorczyca, 2002).

Farmakopea Polska VI zaleca analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 291 nm jako metodę analizy ilościowej. Etionamid można również analizować za pomocą HPLC (Conte et al., 2001).

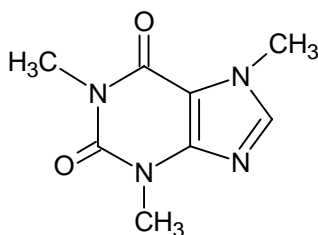
7. Karbamazepina



Karbamazepina, 5*H*-Dibenzo[*b,f*]azepino-5-karboksyamid, działa przeciw-padaczkowo, psychotropowo i reguluje nastrój (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Mechanizm działania polega na stabilizacji błon komórkowych poprzez wpływ na napięciowo zależne kanały Na⁺. Karbamazepina zapobiega rozchodzeniu się sygnałów pojawiających się w mózgu, które poprzedzają napad padaczki, dzięki czemu często udaremnia pojawienie się napadu. Podawana jest w padaczce grand-mal, padaczce częściowej, w padaczce z dominującymi zaburzeniami psychicznymi i w międzynapadowym zaburzeniu zachowania. Łagodzi bóle neuralgiczne nerwu trójdzielnego twarzy i językowo-gardłowego. Wykazuje działanie psychotropowe i regulujące nastrój (Zejc, Gorczyca, 2002). Stosowana jest w leczeniu psychozy maniakalno-depresyjnej, w leczeniu stanów hipomaniakalnych, zespołów abstynencyjnych, schizofrenicznych, schizoafektywnych oraz w leczeniu arytmii i moczówki prostej.

Farmakopea Polska VI poleca jako metodę analizy ilościowej spektrofotometrię UV-Vis przy analitycznej długości fali 237 i 285 nm. Karbamazepina może być też analizowana innymi metodami, jak polarografia (Zhang et al., 1993) i woltamperometria (Hishida, 1996).

8. Kofeina



Kofeina, 1,3,7-Trimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, jednowodna, zaliczana jest do leków o działaniu analeptycznym, czyli do leków pobudzających ośrodkowy układ nerwowy (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Pobudza ośrodki: naczynioruchowy, oddechowy, ośrodek nerwu błędnego, rozszerza mięśnie gładkie oskrzeli, zwiększa siłę skurczu i wydajność pracy mięśni prężowanych oraz działa moczopędnie. Działanie kofeiny na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych polega na ich rozszerzeniu. Kofeina pobudza ośrodek oddechowy, na skutek zwiększenia jego

wrażliwości na działanie dwutlenku węgla. Wykazuje działanie na układ przewodzący serca powodując przyspieszenie jego czynności. Wyraźnie pobudza korę mózgu powodując nasilenie aktywności psychicznej i ułatwienie percepcji wrażeń.

Pozytywnym efektem działania kofeiny jest przyspieszenie i usprawnienie procesów myślowych, zmniejszenie uczucia zmęczenia, senności i głodu. Kofeina znosi bóle głowy, gdy jest zażywana ze słabo działającymi lekami przeciwbólowymi. Lek ten pobudza również ośrodki analomiczne, tj. ośrodek przemiany materii (nasilenie glikolizy i lipolizy) i ośrodek termoregulacji (podwyższenie temperatury ciała). W nadmiarze kofeina może zmniejszyć zdolność koncentracji, wywołać bezsenność, niepokój, ból głowy czy niemożność skupienia uwagi. W bardzo dużych dawkach wywołuje owrzodzenie żołądka, duszności, drzenie kończyn, częstomocz i duszności.

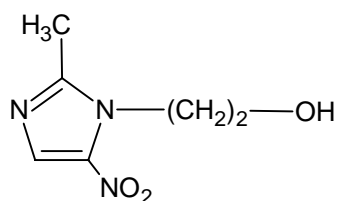
W związku z tym, że kofeina jest trudno rozpuszczalna w wodzie, dostępne w handlu preparaty są mieszaninami kofeiny z benzoanem sodu lub salicylanem sodu. Najczęściej jednak kofeina jest dodatkowym składnikiem leków przeciwbólowych. Jako lek wchłania się równie dobrze po podaniu doustnym, doodbytniczym lub pozajelitowym. Ulega prawie całkowitemu metabolizmowi i z moczem jest wydalana w postaci kwasu 1-metylomoczowego, 1-metyloksantyny oraz około 1% kofeiny nie podlega metabolizmowi.

Kofeina stosowana jest w zapaści pochodzenia sercowego i naczyniowego, w stanach wyczerpania fizycznego i umysłowego, zatruciu alkoholowym, doraźnie u chorych z podciśnieniem tętniczym oraz z lekami wykrztuśnymi i przeciwdechawicznymi (Zejc, Gorczyca, 2002).

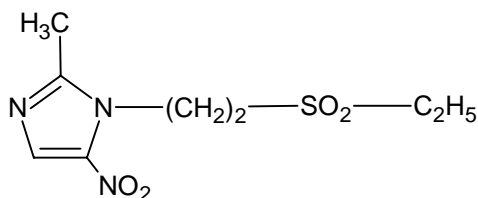
Farmakopea Polska VI poleca jako metodę analizy ilościowej spektrofotometrię UV-Vis przy analitycznej długości fali 273 nm. Kofeinę analizować można także innymi metodami, takimi jak chromatografia gazowa (Satinsky et al., 2004), wysokosprawna chromatografia cieczowa (Foenander et al., 1980), woltamperometria (Zen, Ting, 1997; Zen et al., 1998) lub amperometria (Lewis, Johnson, 1978).

9. Metronidazol

13. Tinidazol



metronidazol

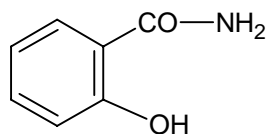


tinidazol

Obie substancje lecznicze: metronidazol, 2-(2-metylo-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)etanol, i tinidazol, 1-[2-(Etylosulfonylo)etylo]-2-metylo-5-nitroimidazol, są pochodnym 5-nitroimidazolu (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Metronidazol i tinidazol działają przeciwbakteryjnie i przeciwprzywrotniakowo. Działają na bakterie: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Clostridium* oraz pierwotniaki *Entamoeba histolytica*, *Lambliia intestinalis*. Leki zawierające te substancje podawane są również w stanach zapalnych dziąseł i zębów oraz w infekcjach pochwy. Najważniejszym jednak zastosowaniem metronidazolu i tinidazolu jest leczenie zakażeń wywołanych przez rzęsiśtkę pochwowego i inne pierwotniaki.

Farmakopea Polska VI poleca jako metodę analizy ilościowej spektrofotometrię UV-Vis przy analitycznej długości fali: dla metronidazolu 276 nm i dla tinidazolu 310 nm. Obie substancje analizować można także innymi metodami; metronidazol – woltamperometrycznie (Yarnitzky, Smyth, 1991), z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Tavakoli et al., 2007), polarograficznie (Gratteri, Cruciani, 1999), zaś tinidazol: woltamperometrycznie (Abu Zuhri et al., 1999), polarograficznie (Abu Zuhri et al., 1999) i z wykorzystaniem HPLC (Shukla et al., 2006).

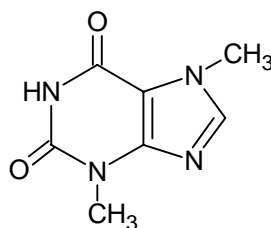
10. Salicylamid



Salicylamid, 2-Hydroksybenzamid, jest amidem kwasu salicylowego (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska, 2007). Ma działanie przeciwgorączkowe, przeciwzapalne i przeciwbólowe. Hamuje syntezę prostaglandyn. Zmniejsza obrzęk zapalny oraz ośrodkowo i obwodowo rozszerza naczynia krwionośne skóry. Nie wykazuje działania drażniącego na błonę śluzową żołądka. Podawany jest doustnie lub pozajelitowo. Bywa też składnikiem leków złożonych. Stosowany jest w chorobach reumatycznych, lumbago, zapaleniu korzonków nerwowych.

Farmakopea Polska VI poleca jako metodę analizy ilościowej spektrofotometrię UV-Vis przy analitycznej długości fali 302 nm. Salicylamid analizowany jest również z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Xu, Pang, 1987).

11. Teobromina



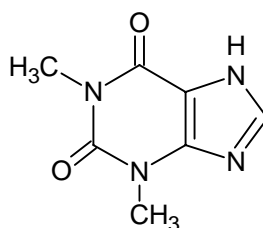
Teobromina, 3,7-Dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, (Zejc, Gorczyca, 2002) również zaliczana jest do leków analeptycznych pochodzenia naturalnego, lecz ma słabszy w porównaniu do kofeiny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy. Występuje głównie w nasionach drzewa kakaowego *Theobroma Cacao*. Wpływa na układ krążenia, oskrzela, układ nerwowy, mięśnie gładkie, szkieletowe i nerki. Działa rozszerzająco na naczynia wieńcowe oraz na kłębuszki nerkowe. Wpływa na zwiększenie przesączu moczu

pierwotnego oraz na hamowanie zwrotnego wchłaniania jonów chlorkowych w cewkach krętych.

Teobromina jest najtrudniej rozpuszczalna spośród ksantyn. Rozpuszcza się w wodzie w ilości około 0,1%, nie rozpuszcza się w etanolu i eterze etylowym. Rozpuszcza się natomiast w roztworach rozcieńczonych wodorotlenków i kwasach nieorganicznych. W preparatach farmaceutycznych występuje w postaci wolnej lub soli podwójnych z salicylanem sodu, salicylanem wapnia lub octanem sodu. Głównym narządem metabolizującym teobrominę jest wątroba. Metabolitami teobrominy wydalanyymi w największej ilości są 3- i 7-metyloksantyny. Około 10% teobrominy wydalane jest w formie niezmienionej. Teobromina stosowana jest zwykle jako składnik leków złożonych i proszków galenowych.

Farmakopea Polska VI zaleca analizę spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 273 nm. Teobrominę analizować można też wysokosprawną chromatografią cieczą (Abuirjeie et al., 1992), potencjometrycznie (Sell, 1975) lub wykorzystując chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (Dyke, Sams, 1998).

12. Teofilina



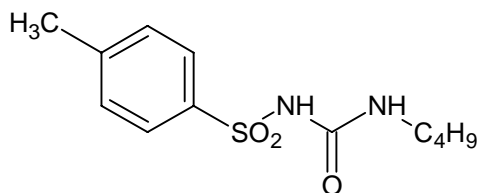
Teofilina, 1,3-Dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, jednowodna, podobnie jak teobromina i kofeina zaliczana jest do grupy leków analeptycznych (Podlewski, Chwalibogowska-Podlowska, 2007). Jej działanie ocenia się jako słabsze od kofeiny, zaś silniejsze od teobrominy. Teofilina występuje głównie w liściach herbaty *Thea sinensis*, choć obecnie produkowana jest syntetycznie. Jej właściwości są identyczne jak teobrominy i kofeiny.

W związku z tym, że jest to substancja trudno rozpuszczalna w wodzie i często w postaci czystej drażni błonę śluzową żołądka, w leczeniu stosowane są pochodne

teofiliny. Najczęściej stosowanymi pochodnymi są: aminofilina i diprofilina, które lepiej rozpuszczają się w wodzie i wchłaniają się z układu pokarmowego (Podlewski, Chwalibogowska-Podlowska, 2007).

Farmakopea Polska VI zaleca analizę metodami spektrofotometrycznymi UV-Vis przy analitycznej długości fali 273 nm. Teofilinę analizować można z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Thomas et al., 2004), woltamperometrii (Zimmerman et al., 1992), potencjometrycznie (Riahi et al., 2005) lub chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (Budavari et al., 2001).

14. Tolbutamid



Tolbutamid, 3-Butylo-1-[(4-metylofenylo)sulfonylo]-mocznik, jest pochodną sulfonylomocznika (Podlewski, Chwalibogowska-Podlowska, 2007). Lek ten obniża poziom cukru we krwi dzięki zwiększonemu wydzielaniu insuliny w trzustce. Stosowany jest w cukrzycy typu II pojawiającej się w dojrzałym wieku na skutek niedostatecznego wydzielania insuliny.

Farmakopea Polska VI zaleca analizę metodą spektrofotometryczną UV-Vis przy analitycznej długości fali 257, 263, 268, 274 nm. Tolbutamid analizować można również z wykorzystaniem HPLC (Csillag et al., 1989).

Tabela II.6. Wybrane przykłady zastosowania technik woltamperometrycznych w analizie substancji leczniczych.

Substancja lecznicza	Rodzaj elektrody	Technika woltamperometryczna	Piśmiennictwo
Leki działające na ośrodkowy układ nerwowy			
chlordiazepoksyd	HMDE	CV	El-Hefnawey et al., 2004
paroksetyna	elektroda z węgla szklitego	CV, DPV, SWV	Erk, Biryol, 2003
zulklopiksol	elektroda z węgla szklitego	CV, LSV, DPV	Senturk et al., 2000
sertralina	HMDE	CV, LSV, DPV, SWV	Vela et al., 2001
nitrazepam	HMDE	CV	Correia dos Santos et al., 2002
flurazepam			
medazepam			
diazepam			
klonazepam			
haloperydol	elektroda z węgla szklitego	LSV	Saponjic et al., 1994
klozapina	HMDE	AdSV	Hammam et al., 2004
trazodon	wirująca elektroda platynowa	DPV	Dogrukol-Ak et al., 1999
wenlafaksyna	HMDE	SWV	Lima et al., 1999
kwasy acetylosalicylowe	elektroda modyfikowana	SV, DPV	Campanella et al., 2004
tramadol	elektroda z węgla szklitego	CV	Halfpenny et al., 1999
prokaina	modyfikowana elektroda węglowa	DPV	Wang et al., 2002

kokaina	elektroda modyfikowana	CV	Wieczorek, Kruk, 1994
metoheksytal	HMDE	AdSV	Farghaly et al., 1999
Leki działające na układ sercowo-naczyniowy			
kaptopryl	HMDE	SWCAdSV	Ioannides et al., 2003
trimetazydyna	elektroda z węgla szklitego	CV, SWV, AdSV	Ghoneim et al., 2002a
dipirydamol	HMDE	SWV, SWCAdSV	Ghoneim et al., 2002c
nifedypina	HMDE	SWAdSV, CV, SWV	Ghoneim et al., 2003
		SWAdSV, SWV	Ozaltin et al., 2002
cylazapryl	HMDE	AdSV, DPV	Prieto et al., 2003
ramipryl		SWV, CV	
quinapryl		SWV	
doksazosyna	elektroda węglowa i modyfikowana	SWV	de Betono et al., 1999
prazosyna	elektroda z węgla szklitego	DPV	Arranz et al., 1999
fenofibrat	HMDE	CV, SWV	Yardimci, Ozaltin, 2004
amlodypina	elektroda z węgla szklitego	DPV	Altiokka et al., 2002
lacydypina	elektroda modyfikowana	CV	Crespi et al., 2001
werapamil	HMDE	AdSV	Kasim et al., 2002
nikardypina	HMDE	AdSV	Obendorf, Stubauer, 1995
diltiazem	HMDE	AdSV, CV, LSV	Ghandour et al., 2001
amiloryd	HMDE	SWAdSV	Hamman, 2004
indapamid	elektroda węglowa i modyfikowana	CV, DPV, AdSV	Radi, 2001

Leki stosowane w chorobach układu oddechowego			
kodeina	elektroda modyfikowana	SWV	Shih et al., 2002
salbutamol	elektroda z węgla szklistego i modyfikowana elektroda węglowa	CV, DPV	Boyd et al., 1994
orcyprenalina			
fenoterol			
klenbuterol	elektroda modyfikowana	DPV	Moane et al., 1996
terbutalina	elektroda z węgla szklistego	CV, SWV	Yilmaz et al., 1998
terfenadyna	HMDE	AdSV	Ghoneim et al., 2001a
loratadyna	HMDE	CAdSV	Ghoneim et al., 2001b
akriwastyna	elektroda z węgla szklistego	CV	Torres et al., 2002
terbutalina	elektroda z węgla szklistego	CV, SWV	Yilmaz et al., 1998
Leki działające na przewod pokarmowy i metabolizm			
lansoprazol	elektroda modyfikowana	CV, DPV	Radi, 2003a
pantoprazol	HMDE	SWV	Radi, 2003b
omeprazol	elektroda z węgla szklistego	CV, DPV	Radi, 2003c
Witaminy			
witamina K	elektroda z węgla szklistego	LSV, AdSV	Hart et al., 1989
witamina B ₆	elektroda z węgla szklistego	DP, CV, LSV	Uslu et al., 2001
witamina PP	elektroda z węgla szklistego	SV	Song et al., 2002

witamina C	elektroda z węgla szklitego	CV	Kleszczewska, Mielech-Lukasiewicz, 2002
witamina E	elektroda z węgla szklitego	DPV	Galeano Diaz et al., 2004
witamina B ₂	modyfikowana elektroda węglowa	CV, LSV	Marian et al., 2001
koenzym Q-10	modyfikowana elektroda węglowa	CV	Ferri et al., 1994
Hormony			
metimazol	wirująca elektroda platynowa	SWV	Aslanoglu, Peker, 2003
tyroksyna	elektroda z węgla szklitego	CV	Hu et al., 2004
melatonina	elektroda z węgla szklitego	CV	Corujo-Antuna et al., 2003
Leki stosowane w zakażeniach, przeciw pasożytnicze i przeciwgrzybicze			
cefoperazon	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, wirująca elektroda platynowa	SWV, CV	Yilmaz, Biryol, 1998
cefotaksym	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, wirująca elektroda platynowa	ASV	
cefepim	HMDE	AdSV, LSV	Palacios et al., 2003
azytromycyna	elektroda z węgla szklitego	CV, LSV, DPV	Nigovic, Simunic, 2003
ampicylina	elektroda z węgla szklitego, elektroda modyfikowana, SMDE	ASV, CV	Abo El-Maali, 2004
ceftriakson	HMDE	DP-AdSV	Altinoz et al., 1994
ketokonazol	HMDE	AdSV-DP, LSV	Arranz et al., 2003
mikonazol	HMDE	CSV	Pereira et al., 2002
klotrimazol	HMDE	LSV	Fijałek et al., 1992
prazykwantel	HDME	DPV	Ghoniem et al., 2002b

niklozamid	elektroda z węgla szklistego	SWV, CV	Alemu et al., 2002
pefloksacyna	HMDE	SWCAdSV	Beltagi, 2003
nitrofurantoina	HMDE	CV, SWCAdSV	Hammam, 2002
norfloksacyna	elektroda z węgla szklistego	CV, SWV	Ghoneim et al., 2001c
metronidazol	HMDE	CV	Tocher, Edwards, 1994
Leki działające na układ mięśniowo-szkieletowy			
ketorolak	elektroda modyfikowana	DPV	Hall et al., 1999
ibuprofen			
meloksykam	HMDE	SWV, DPV, SWV	Radi et al., 2001
		DPV	Beltagi et al., 2002
Leki przeciwnowotworowe			
dakarbazyna	HMDE	DPV, CV	Ordieres et al., 1988
doksorubicyna	HMDE	SWV, CV	Hahn, Lee, 2004
bleomecyna	HMDE	AdSV	Tan et al., 1997
Inne			
dorzolamid	elektroda z węgla szklistego	DPV, CV, LSV	Erk, 2003
kofeina	elektroda z węgla szklistego	SWV	Ly et al., 2004
			Zen et al., 1998

Techniki woltamperometryczne:

CV- woltamperometria cykliczna (ang. *cyclic voltammetry*)

AdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna (ang. *adsorptive stripping voltammetry*)

SWV – woltamperometria fali prostokątnej (ang. *square wave voltammetry*)

DPV- woltamperometria pulsowa różnicowa (ang. *differential pulse voltammetry*)

LSV- woltamperometria z liniowo zmieniającym się potencjałem (ang. *linear sweep voltammetry*)

CAdSV- katodowa woltamperometria adsorpcyjna (ang. *cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

SWAdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna fali prostokątnej (ang. *square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

ASV- anodowa woltamperometria inwersyjna (ang. *anodic stripping voltammetry*)

DPAAdSV- adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna z impulsem różniczkowym (ang. *adsorptive stripping differential pulse voltammetry*)

SWCAdSV- katodowa adsorpcyjna woltamperometria inwersyjna fali prostokątnej (ang. *square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*)

III. CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie woltamperometrycznych metod analizy ilościowej wybranych substancji leczniczych w preparatach farmaceutycznych, charakteryzujących się wysoką czułością i selektywnością oznaczeń z nadzieją, że opracowane procedury analityczne umożliwią zastosowanie woltamperometrii jako metody oznaczania niektórych substancji leczniczych w rutynowej kontroli handlowych preparatów farmaceutycznych, jako techniki alternatywnej w stosunku do obecnie używanych metod. Pozwoli to w wielu przypadkach na skrócenie czasu potrzebnego na wykonanie analizy, zmniejszenie ilości zużywanych odczynników, a w szczególności rezygnację z rozpuszczalników organicznych, co jest ważne zarówno ze względu na koszt jak i wpływ na środowisko.

Analizie woltamperometrycznej poddano substancje lecznicze posiadające w strukturze ugrupowania o właściwościach utleniająco-redukujących w warunkach pomiaru woltamperometrycznego, takie jak acenokumarol, acetazolamid, atenolol, baklofen, chloropropamid, etionamid, karbamazepina, kofeina, metronidazol, salicylamid, teobromina, teofilina, tinidazol i tolbutamid. Badania wstępne polegały na wyborze odpowiedniej techniki i właściwych warunków analizy woltamperometrycznej odpowiedniej elektrody pracującej oraz na doborze właściwego stężenia analizowanych roztworów, składu elektrolitu podstawowego ze szczególnym uwzględnieniem stężenia użytego rozpuszczalnika z uwzględnieniem jego wpływu na trwałość próbek w warunkach oznaczenia.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

I. Substancje badane i odczynniki

1. Substancje lecznicze

Analizowane w niniejszej pracy substancje lecznicze i ich charakterystykę fizykochemiczną przedstawiono w Tabeli IV.1.

2. Odczynniki

W pracy wykorzystano następujące odczynniki chemiczne (w nawiasach podano producenta oraz stopień czystości – aceton (POCh, cz.d.a.), chlorek metylenu (POCh, cz.d.a.), chloroform (POCh, cz.d.a.), tetrachlorek węgla (POCh, cz.d.a.), metanol (POCh, cz.d.a.), etanol (POCh, cz.d.a.), amoniak (POCh, cz.d.a.), kwas azotowy(V) (Sigma, Niemcy, cz.d.a.), kwas siarkowy(IV) (POCh, cz.d.a.), kwas siarkowy(VI) (POCh, cz.d.a.), kwas solny (POCh, cz.d.a.), wodorotlenek potasu (POCh, cz.d.a.), wodorotlenek sodu (POCh, cz.d.a.).

Stosowano wodę redestylowaną, którą otrzymywano w aparacie kwarcowym do podwójnej destylacji wody (Heraeus Quarzglas, Destamat, Niemcy) oraz azot do analizy woltamperometrycznej (klasa czystości 6.0, Gazy Medyczne, Linde Gaz, Polska).

Tabela IV.1. Charakterystyka fizykochemiczna substancji leczniczych użytych w badaniach.

L.p.	Substancja lecznicza	Wzór sumaryczny	Grupy chemiczne ulegające utlenieniu lub redukcji	Rozpuszczalność		Numer serii	Producent
				woda	inne rozpuszczalniki		
1.	Acenokumarol	C ₁₉ H ₁₅ NO ₆	grupy nitrowa i ketonowa	rozpuszczalny	wodorotlenki sodu i potasu, etanol	B 3420401/99	Polfa, Warszawa
2.	Acetazolamid	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂	pierwszorzędowa grupa aminowa i grupy sulfotlenkowe	nie rozpuszczalny	wodorotlenki sodu i potasu	250301	Polpharma S.A.
3.	Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	grupy aminowa i amidowe	trudno rozpuszczalny	wodorotlenki sodu i potasu	99001714	Polpharma S.A.
4.	Baklofen	C ₁₀ H ₁₂ Cl NO ₂	pierwszorzędowa grupa aminowa i grupa karboksylowa	trudno rozpuszczalny	wodorotlenki sodu i potasu	1020400	Polpharma S.A.
5.	Chloropropamid	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	grupy sulfotlenkowe i amidowe	nierozpuszczalny	etanol	1031199	Polpharma S.A.
6.	Etionamid	C ₈ H ₁₀ N ₂ S	grupa sulfidowa	nierozpuszczalny	etanol	19F0341	Sigma, Niemcy
7.	Karbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	grupy amidowe	nierozpuszczalna	chlorek metylenu, etanol	1150102	Polpharma S.A.
8.	Kofeina	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	grupy aminowe, drugo- i trzeciorzędowa	trudno rozpuszczalna	wodorotlenki sodu i potasu, etanol	70351002	Azienda Chimica E Farmaceutica S.P.A., Włochy
9.	Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	grupa nitrowa	trudno rozpuszczalny	etanol	2100302	Polpharma S.A.
10.	Salicylamid	C ₉ H ₉ NO ₄	grupy amidowe	nierozpuszczalny	etanol	256401 1085	Fluka Chemica, Niemcy
11.	Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	grupy aminowe, drugo- i trzeciorzędowa	trudno rozpuszczalna	wodorotlenki sodu i potasu, kwasy nieorganiczne	10811151	Pharma-Zentrale GmbH, Niemcy
12.	Teofilina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	grupy aminowe, drugo- i trzeciorzędowa	trudno rozpuszczalna	wodorotlenki sodu i potasu, kwasy nieorganiczne	41520001	Azienda Chimica E Farmaceutica S.P.A., Włochy
13.	Timidazol	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	grupy nitrowa i sulfotlenkowa	nierozpuszczalny	etanol	1071099	Polpharma S.A.
14.	Tolbutamid	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	grupy sulfotlenkowe i amidowe	trudno rozpuszczalny	wodorotlenki sodu i potasu, etanol	1070600	Polpharma S.A.

Tabela IV.2. Rozpuszczalność analizowanych substancji w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach.

L.p.	Substancja lecznicza	Woda	CH ₃ OH C ₂ H ₅ OH	Aceton	CH ₃ Cl	CHCl ₃	CCl ₄	H ₂ SO ₄		HCl		HNO ₃		Amoniak	KOH NaOH
								rozc.	stęż.	rozc.	stęż.	rozc.	stęż.		
1.	Acenokumarol	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
2.	Acetazolamid	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
3.	Atenolol	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+
4.	Baklofen	-	-	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+
5.	Chloropropamid	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
6.	Etionamid	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	Karbamazepina	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	Kofeina	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9.	Metronidazol	-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	Salicylamid	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	Teobromina	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+
12.	Teofilina	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+
13.	Tinidazol	-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	Tolbutamid	+/-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+

(+) substancja bardzo dobrze rozpuszczalna, (-) substancja nierozpuszczalna, (+/-) substancja trudno rozpuszczalna.

II. Aparatura

Woltamperometr, model 757 VA Computrace, wyposażony w elektrody – elektrodę platynową, rotacyjną elektrodę dyskową, elektrodę z wiszącą kroplą rtęci i elektrodę chlorosrebrową, system regulacji ciśnienia azotu, oprogramowanie komputerowe (Methrohm Ltd., Szwajcaria).

Spektrofotometr UV-Vis, model Shimadzu UV-1202, wyposażony w kuwety kwarcowe o grubości 1 cm (Shimadzu Europa Gmgh, Niemcy).

III. Metodyka badań

1. Opracowywanie warunków analizy woltamperometrycznej

1.1 Badanie rozpuszczalności substancji leczniczych

W pierwszym etapie analizy dobrano rozpuszczalniki, gwarantujące rozpuszczenie się badanych substancji leczniczych. Badano rozpuszczalność analizowanych substancji w wodzie, metanolu, etanolu, acetonie, chlorku metylenu, chloroformie, tetrachlorku węgla, rozcieńczonych i stężonych roztworach kwasów – solnym, azotowym(V) i siarkowym(VI), amoniaku, oraz w rozcieńczonych i stężonych roztworach wodorotlenków sodu i potasu, a wyniki tych badań zestawiono w Tabeli IV.2.

Z analizy tych danych wynika, że w wodzie rozpuszcza się dobrze tylko acenokumarol, w znikomym stopniu rozpuszcza się atenolol, kofeina, teobromina, teofilina i tolbutamid, natomiast nie rozpuszcza się w wodzie acetazolamid, baklofen, chloropropamid, etionamid, karbamazepina, metronidazol, salicylamid i tinidazol. Bardzo dobrym rozpuszczalnikiem dla większości analizowanych substancji są natomiast roztwory wodorotlenków sodu i potasu, nie rozpuszcza się w nich jedynie chloropropamid, etionamid, karbamazepina, metronidazol, salicylamid i tinidazol.

W przypadku, gdy badana substancja rozpuszczała się w danym rozpuszczalniku umożliwiając analizę woltamperometryczną, analizowano ją stosując różne warunki analizy. Zmieniało przede wszystkim potencjał początkowy i końcowy w zakresie od $-2,0$ do $+2,0$ V, potencjał osadzania w zakresie od $-0,5$ do $+2,0$ V, oraz czas osadzania w

zakresie od 60 do 400 s. Postępowanie to miało na celu taki dobór rozpuszczalników dla badanych substancji, aby w wyniku analizy woltamperometrycznej ich roztworów uzyskać dobrze wykształcone piki.

Na podstawie uzyskanych woltamperogramów zidentyfikowano te przypadki, w których użyty rozpuszczalnik nie przyniósł pożądanego efektu, tj. nie zapewnił uzyskania fal woltamperometrycznych o odpowiednim kształcie, a w niektórych przypadkach nie uzyskano proporcjonalnej zależności pomiędzy stężeniem analizowanej substancji a natężeniem prądu płynącego przez roztwór.

W związku z tym, że chloropropamid, etionamid, karbamazepina, metronidazol, salicylamid i tinidazol rozpuszczają się tylko w silnie niepolarnych rozpuszczalnikach (metanol, etanol, aceton, chlorek metylenu, chloroform i tetrachlorek węgla), nie jest możliwa analiza woltamperometryczna wymienionych substancji z powodu braku przewodnictwa elektronów w ich roztworach.

1.2 Dobór stężenia roztworu wodorotlenku sodu

Analizy woltamperometryczne wykonane w podanych w poprzednim rozdziale warunkach dla roztworów badanych substancji w różnych rozpuszczalnikach wykazały, że najlepszym rozpuszczalnikiem dla tych substancji będzie roztwór wodorotlenku sodu. W celu dobrania odpowiedniego stężenia i objętości roztworu wodorotlenku sodu dla określonej substancji, przygotowano dziesięć roztworów NaOH w zakresie stężeń od 0,05 do 0,5 mol/l, o wartościach stężeń zmieniających się co 0,05 mol/l.

Następnie zestawione w Tabeli IV.3 odważki badanych substancji rozpuszczano w odpowiedniej objętości roztworu wodorotlenku sodu o określonym stężeniu w kolbce miarowej, rozcieńczano wodą redestylowaną do objętości 100 ml, i po wymieszaniu rejestrowano ich fale woltamperometryczne. Jeśli wynik analizy przedstawiał pojedynczą krzywą o smukłym kształcie, to do analizowanego roztworu dodawano co najmniej 2-3 krotnie kolejną porcję tej samej substancji w celu stwierdzenia, czy zachodzi liniowa zależność pomiędzy stężeniem badanej substancji a natężeniem prądu rejestrowanego w trakcie analizy woltamperometrycznej.

Tabela IV.3. Masy odważek użyte podczas analizy woltamperometrycznej substancji leczniczych rozpuszczonych w roztworach wodorotlenku sodu o różnych stężeniach.

Analizowana substancji	Masa odważki [g]
Acenokumarol	0,0350
Acetazolamid	0,0220
Atenolol	0,0270
Baklofen	0,0210
Kofeina	0,0190
Teobromina	0,0180
Teofilina	0,0180
Tolbutamid	0,0270

Wyniki analizy woltamperometrycznej dla acenkumarolu i tolbutamidu nie były jednak zadowalające, nie uzyskano pojedynczego pik woltamperometrycznego, a podstawa pik była bardzo szeroka. W przypadku niektórych analiz pojawił się pojedynczy pik, który jednak podczas każdej następnej analizy występował przy innym potencjale depozycji.

W przypadku baklofenu, krzywa woltamperometryczna przedstawiała pojedynczy pik o właściwym kształcie. Zachowana była prostoliniowa zależność pomiędzy stężeniem analizowanej substancji a natężeniem prądu płynącego przez badany roztwór, nie uzyskano jednak zależności liniowej podczas analizy baklofenu w preparacie farmaceutycznym Baclofen (Polpharma). Przebieg analizy woltamperometrycznej może sugerować w tym przypadku jednoczesną analizę dwóch substancji przy tym samym potencjale depozycji.

W efekcie przeprowadzonych badań zestawiono w Tabeli IV.4 wartości stężeń i objętości roztworu wodorotlenku sodu, jakie należy użyć do rozpuszczenia analizowanych substancji w celu uzyskania fal woltamperometrycznych najbardziej przydatnych dla celów analitycznych.

Tabela IV.4. Stężenie i objętość roztworu wodorotlenku sodu, użytego do rozpuszczenia analizowanych substancji leczniczych.

Analizowana substancja	Stężenie roztworu NaOH [mol/l]	Objętość roztworu NaOH [ml]
Acenokumarol	0,5	15
Acetazolamid	0,3	150
Atenolol	0,1	400
Baklofen	0,5	50
Kofeina	0,5	100
Teobromina	0,5	10
Teofilina	0,5	100
Tolbutamid	0,5	100

1.4 Rotacyjna elektroda dyskowa

W związku z brakiem pozytywnego efektu analizy acenokumarolu, baklofenu i tolbutamidu przy zastosowaniu elektrody z wiszącą kroplą rtęci, postanowiono przeprowadzić analizę woltamperometryczną tych substancji zastępując dotychczas stosowaną elektrodę HMDE, rotacyjną elektrodą dyskową. Jest to elektroda grafitowa, na powierzchni której na początku każdego dnia, w którym dokonywano pomiarów woltamperometrycznych, wytwarzano z roztworu octanu rtęci(II) warstewkę rtęci.

Procedurę osadzania filmu rtęci na powierzchni elektrody realizowano zgodnie z zaleceniami producenta woltamperometru (Instrukcja Metrohm, 1998). Elektrodę przed preparowaniem filmu rtęci czyszczono przez polerowanie pastą uzyskaną przez zwilżenie ok. 1 g tlenku glin niewielką ilością wody redestylowanej, a następnie po zamontowaniu w statywie umieszczano w zlewce, w której znajdował się roztwór zawierający 200 μ l kwasu solnego i 50 μ l jonów Hg^{2+} w 10 ml wody redestylowanej. Roztwór przygotowywano rozpuszczając około 0,16 g octanu rtęci(II) w 100 ml wody redestylowanej.

Analizę woltamperometryczną z udziałem tak przygotowanej rotacyjnej elektrody dyskowej realizowano stosując następujące warunki analizy: potencjał początkowy $-1,2$ V, końcowy $+2,0$ V, potencjał osadzania $-0,4$ V, czas osadzania 10 s.

Analiza acenokumarolu, baklofenu i tolbutamidu umożliwiła uzyskanie prawidłowego kształtu fali woltamperometrycznej, jednak brak jest zależności liniowej

między stężeniem tych substancji a natężeniem prądu. Z tego względu zrezygnowano z analizy wyżej wymienionych substancji techniką woltamperometryczną.

Z przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań wynika, że w opisanych w powyżej warunkach możliwa jest analiza woltamperometryczna acetazolamidu, atenololu, kofeiny, teobrominy i teofiliny.

2. Analiza woltamperometryczna

Wszystkie pomiary woltamperometryczne analizowanych w niniejszej pracy substancji najkorzystniej jest przeprowadzać techniką impulsu różniczkowego, stosując następujące warunki analizy – szybkość przemiataania potencjału 0,015 V/s, rozmiar kropli rtęci 4, czas osadzania 180 s, czas równoważenia 5 s, szybkość obrotu mieszadła 2000 rpm, czas przedmuchiwania azotem 300 s. Pozostałe, dobierane indywidualnie dla badanych związków parametry analizy woltamperometrycznej zestawiono w Tabeli IV.5.

Tabela IV.5. Warunki analizy woltamperometrycznej analizowanych substancji leczniczych.

Warunki analizy woltamperometrycznej	Analizowane substancje				
	acetazolamid	atenolol	kofeina	teobromina	teofilina
Potencjał początkowy [V]	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1
Potencjał końcowy [V]	+0,3	+0,4	+0,5	+0,5	+0,5
Potencjał osadzania [V]	+0,15	+0,2	+0,1	+0,1	+0,1

2.1 Przygotowanie krzywych kalibracyjnych

W celu przygotowania roztworów wzorcowych niezbędnych do wyznaczenia krzywych kalibracyjnych dla analizowanych woltamperometrycznie substancji, odważono podane w Tabeli IV.6 ilości substancji, które następnie przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o poj. 1000 ml (atenolol i acetazolamid), lub 100 ml (kofeina, teobromina i teofilina), rozpuszczono w odpowiedniej ilości roztworu wodorotlenku sodu (Tabela IV.4), i rozcieńczono wodą redestylowaną do odpowiedniej objętości. Uzyskano tym sposobem roztwory wzorcowe analizowanych substancji leczniczych o stężeniu równym 10^{-3} mol/l.

Tabela IV.6. Masy odważek substancji leczniczych użyte do sporządzenia roztworów wzorcowych do analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej.

Analizowana substancja	Masa odważki [g]	
	Analiza woltamperometryczna	Analiza spektrofotometryczna
Acetazolamid	0,2224	0,2223
Atenolol	0,2681	0,2673
Kofeina	0,0191	0,1001
Teobromina	0,0180	0,1093
Teofilina	0,0180	0,1094

Z tak przygotowanych roztworów wzorcowych acetazolamidu i atenololu, pobierano kolejno objętości roztworu podane w Tabelach IV.7 i IV.8, rozcieńczano w kolbce miarowej o poj. 100 ml wodą redestylowaną, po czym 10 ml tak rozcieńczonego roztworu przenoszono do naczynka i analizowano woltamperometrycznie. W przypadku kofeiny, teobrominy i teofiliny pobierano kolejno objętości roztworu podane w Tabelach IV.9-IV.11, przenoszono do naczynka woltamperometrycznego, i po rozcieńczeniu wodą redestylowaną do objętości 10 ml, analizowano.

Uzyskane wyniki zestawiono w Tabelach IV.7-IV.11 i oszacowano statystycznie wyznaczając średnią arytmetyczną (\bar{x}_{sr}), odchylenie standardowe (S), współczynnik zmienności (CV) i przedział ufności ($\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$) (Czermiński et al., 1992; Łomnicki, 1999; Pawlaczyk, Zając, 1999).

Tabela IV.7. Ocena statystyczna wyznaczonej woltamperometrycznie krzywej kalibracyjnej dla acetazolamidu.

Objętość roztworu wzorcowego [ml]	Stężenie [mol/10 ml]	Zakres natężenia prądu [μ A]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
5	$5,09 \cdot 10^{-6}$	2,47 – 2,65	2,55	0,21	8,23	$2,55 \pm 0,15$
10	$9,99 \cdot 10^{-6}$	4,75 – 4,85	4,80	0,10	2,08	$4,80 \pm 0,07$
15	$1,50 \cdot 10^{-5}$	7,52 – 7,62	7,57	0,12	1,58	$7,57 \pm 0,09$
20	$2,00 \cdot 10^{-5}$	9,39 – 9,51	9,46	0,17	1,80	$9,46 \pm 0,12$

Tabela IV.8. Ocena statystyczna wyznaczonej woltamperometrycznie krzywej kalibracyjnej dla atenololu.

Objętość roztworu wzorcowego [ml]	Stężenie [mol/10 ml]	Zakres natężenia prądu [μ A]	x_{sr} n=10	S	CV [%]	$x_{\text{sr}} \pm t_{0,95} \cdot S_{x_{\text{sr}}}$
1	$1,01 \cdot 10^{-7}$	0,64 – 0,65	0,64	$1,15 \cdot 10^{-2}$	1,80	$0,64 \pm 0,01$
2	$2,01 \cdot 10^{-7}$	1,00 – 1,09	1,03	$5,15 \cdot 10^{-2}$	5,00	$1,03 \pm 0,04$
4	$4,03 \cdot 10^{-7}$	2,05 – 2,12	2,09	$8,57 \cdot 10^{-2}$	4,10	$2,09 \pm 0,06$
6	$6,04 \cdot 10^{-7}$	2,95 – 3,11	3,01	0,24	7,97	$3,01 \pm 0,17$
8	$8,05 \cdot 10^{-7}$	3,91 – 4,03	3,96	0,14	3,53	$3,96 \pm 0,10$
10	$1,01 \cdot 10^{-6}$	4,76 – 4,84	4,80	0,11	2,29	$4,80 \pm 0,08$
12	$1,21 \cdot 10^{-6}$	6,65 – 6,69	6,67	$5,15 \cdot 10^{-2}$	0,77	$6,67 \pm 0,04$

Tabela IV.9. Ocena statystyczna wyznaczonej woltamperometrycznie krzywej kalibracyjnej dla kofeiny.

Objętość roztworu wzorcowego [ml]	Stężenie [mol/10 ml]	Zakres natężenia prądu [μ A]	x_{sr} n=10	S	CV [%]	$x_{\text{sr}} \pm t_{0,95} \cdot S_{x_{\text{sr}}}$
0,1	$8,94 \cdot 10^{-6}$	0,59 – 0,89	0,74	0,05	6,76	$0,74 \pm 0,04$
0,2	$1,79 \cdot 10^{-5}$	1,09 – 1,19	1,14	0,03	2,63	$1,14 \pm 0,02$
0,4	$3,58 \cdot 10^{-5}$	2,17 – 2,43	2,29	0,09	3,93	$2,29 \pm 0,06$
0,8	$7,17 \cdot 10^{-5}$	3,41 – 3,60	3,49	0,13	3,73	$3,49 \pm 0,09$
1,0	$8,94 \cdot 10^{-5}$	4,44 – 4,59	4,53	0,12	2,65	$4,53 \pm 0,09$
1,2	$1,07 \cdot 10^{-4}$	5,30 – 5,45	5,38	0,10	1,86	$5,38 \pm 0,07$
1,4	$1,25 \cdot 10^{-4}$	6,18 – 6,27	6,22	0,05	0,80	$6,22 \pm 0,04$

Tabela IV.10. Ocena statystyczna wyznaczonej woltamperometrycznie krzywej kalibracyjnej dla teobrominy.

Objętość roztworu wzorcowego [ml]	Stężenie [mol/10 ml]	Zakres natężenia prądu [μ A]	x_{sr} n=10	S	CV [%]	$x_{\text{sr}} \pm t_{0,95} \cdot S_{x_{\text{sr}}}$
2,0	$2,00 \cdot 10^{-4}$	5,88 – 6,90	6,58	0,93	14,13	$6,58 \pm 0,67$
2,3	$2,30 \cdot 10^{-4}$	6,75 – 7,09	6,96	0,36	5,17	$6,96 \pm 0,26$
3,3	$3,30 \cdot 10^{-4}$	7,98 – 8,25	8,17	0,24	2,94	$8,17 \pm 0,17$
3,5	$3,50 \cdot 10^{-4}$	8,04 – 8,38	8,30	0,31	3,73	$8,30 \pm 0,22$
3,7	$3,70 \cdot 10^{-4}$	8,27 – 8,55	8,44	0,31	3,67	$8,44 \pm 0,22$
4,0	$4,00 \cdot 10^{-4}$	8,42 – 8,85	8,74	0,46	5,26	$8,74 \pm 0,33$
4,3	$4,20 \cdot 10^{-4}$	8,48 – 8,92	8,81	0,42	4,77	$8,81 \pm 0,30$
4,7	$4,70 \cdot 10^{-4}$	8,92 – 9,50	9,35	0,61	6,52	$9,35 \pm 0,44$
5,0	$5,00 \cdot 10^{-4}$	9,10 – 9,70	9,50	0,62	6,53	$9,50 \pm 0,44$

Tabela IV.11. Ocena statystyczna wyznaczonej woltamperometrycznie krzywej kalibracyjnej dla teofiliny.

Objętość roztworu wzorcowego [ml]	Stężenie [mol/10 ml]	Zakres natężenia prądu [μ A]	x_{sr} n=10	S	CV [%]	$x_{\text{sr}} \pm t_{0,95} \cdot S_{x_{\text{sr}}}$
0,8	$7,27 \cdot 10^{-5}$	3,38 – 3,59	3,48	0,21	6,03	$3,48 \pm 0,15$
1,0	$9,09 \cdot 10^{-5}$	4,27 – 4,60	4,42	0,30	6,77	$4,42 \pm 0,21$
2,0	$1,82 \cdot 10^{-4}$	6,61 – 6,83	6,66	0,21	3,15	$6,66 \pm 0,15$
3,0	$2,72 \cdot 10^{-4}$	7,72 – 8,11	7,94	0,41	5,16	$7,94 \pm 0,29$
4,0	$3,63 \cdot 10^{-4}$	8,49 – 9,23	8,91	0,80	8,98	$8,91 \pm 0,57$

Na podstawie uzyskanych wyników średniego natężenia prądu dla danego stężenia roztworu wzorcowego analizowanej substancji wykreślono krzywe kalibracyjne, które zestawiono w Tabeli IV.12 i przedstawiono graficznie na Rys. IV.1, IV.3, IV.5, IV.7 i IV.9.

Tabela IV.12. Równania krzywych kalibracyjnych substancji analizowanych woltamperometrycznie.

Analizowana substancja	Równanie regresji	Współczynnik korelacji
Acetazolamid	$i = 4,72 \cdot 10^5 \cdot c + 0,1838$	0,9976
Atenolol	$i = 4,65 \cdot 10^6 \cdot c + 0,1685$	0,9994
Kofeina	$i = 46558,29 \cdot c + 0,3661$	0,9976
Teobromina	$i = 9704,22 \cdot c + 4,78$	0,9921
Teofilina	$i = 18298,47 \cdot c + 2,69$	0,9768

2.2 Analiza ilościowa preparatów farmaceutycznych

Analizie woltamperometrycznej poddano 29 preparatów farmaceutycznych, które zakupiono w aptekach na terenie Gdańska. Zawartość substancji leczniczych oraz skład chemiczny (substancje pomocnicze) preparatów zawierających acetazolamid, atenolol, kofeinę, teobrominę i teofilinę podano w Tabelach IV.13-IV.15.

Pierwszy etap przygotowania próbek badanych preparatów do analizy polegał na określeniu masy pojedynczej tabletki. W tym celu na wadze analitycznej ważono 10 tabletek określonego preparatu farmaceutycznego, a uzyskany wynik dzielono przez 10.

Następnie badane tabletki rozdrabniano w moździerz porcelanowym, a sproszkowaną masę tabletkową przenoszono do naczynka wagowego.

W następnym etapie analizy, ze sproszkowanej masy tabletkowej przygotowano roztwór badanego preparatu, który zawierał substancję czynną o stężeniu takim samym, jak stężenie roztworu wzorcowego tej substancji użyte do sporządzenia krzywej kalibracyjnej, tj. 10^{-3} mol/l. W tym celu odważono na wadze analitycznej podane w Tabelach IV.16-IV.18 ilości sproszkowanych mas tabletkowych zestawionych w Tabelach IV.13-IV.15 handlowych preparatów farmaceutycznych zawierających acetazolamid, atenolol, kofeinę, teobrominę i teofilinę. Odważki przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych o poj. 1000 ml, rozpuszczono w podanej w Tabeli IV.4 objętości roztworu wodorotlenku sodu i po rozcieńczeniu wodą redestylowaną, dokładnie wymieszano.

Następnie, na podstawie uprzednio wyznaczonych krzywych kalibracyjnych (Rys. IV.1, IV.3, IV.5, IV.7 i IV.9), wybrano najczęściej trzy stężenia – z początku, środka i końca krzywej kalibracyjnej, a następnie z roztworów badanych preparatów o stężeniu 10^{-3} mol/l przygotowano roztwory zawierające substancję leczniczą o stężeniu porównywalnym ze stężeniem tej substancji wybranym z początku, środka i końca krzywej kalibracyjnej. W związku z tym, z roztworów badanych preparatów pobrano dla większości preparatów trzy różne objętości (podane w Tabelach V.1-V.6, V.8-V.24 oraz V.26-V.31) i po przeniesieniu do kolbek miarowych o poj. 100 ml rozcieńczono wodą redestylowaną. Przygotowane w ten sposób najczęściej trzy roztwory badanego preparatu analizowano woltamperometrycznie w takich samych warunkach, w jakich analizowano roztwory wzorcowe tych samych substancji podczas wyznaczania krzywych kalibracyjnych. Każdą analizę powtarzano sześciokrotnie.

Zawartość substancji leczniczych w badanych preparatach farmaceutycznych obliczano korzystając z podanych w Tabeli IV.12 równań krzywych kalibracyjnych, zestawionych w Tabeli IV.19 mas molowych analizowanych substancji oraz uwzględniając krotność rozcieńczeń. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabelach V.1-V.6, V.8-V.24 oraz V.26-V.31.

Tabela IV.13. Charakterystyka analizowanych preparatów farmaceutycznych zawierających acetazolamid i atenolol jako substancje lecznicze.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu*	Masa tabletki [g]	Substancja czynna	Substancje pomocnicze	Producent	Nr serii Data ważności
1.	Diuramid	0,2900	acetazolamid 250 mg	skrobia ziemniaczana talk skrobi glikolan sodu	Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A.	50205 02.2010
2.	Atenolol 25	0,0882	atenolol 25 mg	brak danych	Sanofi-Synthelabo Sp. z o.o.	610306 03.2009
3.	Atenolol 50	0,1770	atenolol 50 mg	brak danych	Sanofi-Synthelabo Sp. z o.o.	041205 12.2008
4.	Atenolol 100	0,3533	atenolol 100 mg	brak danych	Sanofi-Synthelabo Sp. z o.o.	321009 10.2008
5.	Atenolol	0,3014	atenolol 50 mg	brak danych	Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A.	21205 02.2008
6.	Normocard	0,1616	atenolol 50 mg	celuloza mikrokrystaliczna PH 101 polietylenoglikol 6000 celuloza mikrokrystaliczna PH102 sól sodowa karboksymetylocelulozy stearynian magnezu ditiLENek krzemu koloidalny laurylosiarczan sodu talk	Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa	01LY0605 06.2010

* – Wszystkie analizowane preparaty farmaceutyczne zawierające acetazolamid i atenolol są tabletkami.

Tabela IV.14. Charakterystyka analizowanych preparatów farmaceutycznych zawierających kofeinę jako substancję leczniczą.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu	Postać leku	Masa tabletki [g]	Substancja czynna	Substancje pomocnicze	Producent	Nr serii Data ważności
1.	Antygrypin	tabletki	0,4174	kwas acetylosalicylowy 0,300 g kofeina 0,050 g	celuloza krzemionka koloidalna kwas stearynowy poprzecznie usieciowana karboksylometyloceluloza	Farmaceutyczno-Chemiczna Spółdzielnia Pracy „Galenus”	101004 10.2006
2.	Apap Extra	tabletki powlekane	0,6519	paracetamol 0,500 g kofeina 0,0650 g	poliwinylopirolidon, woda oczyszczona skrobia kukurydziana, metyloceluloza talk stearynian wapnia hydroksypropylometyloceluloza glikol polietylenowy	US Pharmacia	006 03.2007
3.	Aspirin Activ	tabletki	0,6505	kwas acetylosalicylowy 0,500 g kofeina 0,050 g	celuloza skrobia kukurydziana	Bayer Healthcare AG	BTT01WH 03.2008
4.	Cefalgin	tabletki	0,6985	paracetamol 0,250 g propylofenazon 0,150 g kofeina 0,050 g	brak danych	Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne Polfa	31103 11.2006
5.	Codipar Plus	tabletki powlekane	0,6907	paracetamol 0,500 g kofeina 0,0650 g	celuloza mikrokrystaliczna skrobia ziemniaczna poliwinylopirolidon K30 talk stearynian magnezu koloidalny dwutlenek krzemu kroskarmeloza sodowa hydroksypropylometyloceluloza polietylenoglikol 6000	GlaxoSmithKline Customer Healthcare	I05040 05.2005
6.	Coffecorn forte	tabletki drażowane	0,3969	kofeina 100 mg winian ergotaminy 1 mg	skrobia ziemniaczana laktoza metyloceluloza	Farmaceutyczna Spółdzielnia Pracy „Filofarm”	01042006 03.2008

					stearynian magnezu talk sacharoza błękit brylantowy		
7.	Coffecorn mite	tabletki drażowane	0,2995	kofeina 25 mg winian ergotaminy 500 µg	skrobia ziemniaczana laktoza metyloceluloza stearynian magnezu talk sacharoza błękit brylantowy	Farmaceutyczna Spółdzielnia Pracy „Filofarm”	01042006 03.2008
8.	Coffepirine	tabletki	0,3246	kwas acetylosalicylowy 0,450 g kofeina 0,050 g	skrobia ziemniaczana talk	P.P.H. „Marcmed- Pączkowski” S.J.	08.06.06. 06.2009
9.	Coldrex MaxGrip C	tabletki	0,7500	paracetamol 0,500 g kofeina 0,0250 g chlorowodorek fenylefedryny 0,005 g wodzian terpinu 0,020 g kwas askorbowy 0,030 g	skrobia rozpuszczalna skrobia kukurydziana sorbonian potasu	GlaxoSmithKline Customer Healthcare	050860 10.2009
10.	Grippostad C	kapsułki	0,3992	paracetamol 0,200 g kwas askorbowy 0,150 g kofeina 0,0250 g wodoromaleinian chlorofenyraminy 0,0025 g	żelatyna tristearynian glicerolu laktoza żółcień chinolinowa-E104 ertrozyna – E127 ditlenek tytanu – E171	STADA Arzneimittel AG	1943 06.2009
11.	Kopiryna	tabletki	0,3287	kwas acetylosalicylowy 0,400 g kofeina 0,050 g	skrobia ziemniaczana	Medicofarma Sp. z o.o.	090106 01.2009
12.	Neopyrin Asa	tabletki	0,6431	kwas acetylosalicylowy 0,300 g paracetamol 0,100 g kofeina 0,050 g	laktoza skrobia modyfikowana celuloza mikrokryształiczna behenian glicerolu krzemionka koloidalna poliwinylopirolidon liniowy poliwinylopirolidon usieciowany kwas stearynowy	Biofarm Sp. z o.o.	010306 03.2009
13.	Panadol Extra	tabletki powlekane	0,6886	paracetamol 0,500 g kofeina 0,0650 g	skrobia sorbonian potasu	GlaxoSmithKline Customer Healthcare	060097 09.2009

14.	Sarindo	tabletki	0,6559	paracetamol 0,250 g propylofenazon 0,150 g kofeina 0,050 g	hydroksypropylometyloceluloza celuloza mikrokryształiczna kazeina talk skrobia kukurydziana stearynian magnezu koloidalny ditlenek krzemu	Laboratoires Roche Nicholas	L2W659 12.2010
15.	Solpadeine	tabletki	0,6481	paracetamol 0,500 g fosforan kodeiny 0,008 g kofeina 0,030 g	stearynian magnezu skrobia kukurydziana skrobia żelatynowa sorbonian potasu poliwidon talk celuloza mikrokryształiczna kwas stearynowy	SmithKline Beecham Customer Healthcare	050757 08.2010
16.	Tabletki przeciw grypie	tabletki	0,3978	kwas acetylosalicylowy 0,300 g kofeina 0,050 g	mikrokryształiczna celuloza talk kwas stearynowy	Centfarm Sp. z o.o.	020904 09.2007
17.	Tabletki przeciw grypie	tabletki	0,3991	kwas acetylosalicylowy 0,300 g kofeina 0,050 g	skrobia ziemniaczana	Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A.	11205 12.2008

Tabela IV.15. Charakterystyka analizowanych preparatów farmaceutycznych zawierających teobrominę i teofilinę jako substancje lecznicze.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu	Postać leku	Masa tabletki [g]	Substancja czynna	Substancje pomocnicze	Producent	Nr serii Data ważności
1.	Theopaverin	tabletki	0,3934	teobromina 300 mg chlorowodorek papaweryny 40 mg	brak danych	Polfa Pabianice	10903 09.2006
2.	Theoplus 100 mg	tabletki o przedłużonym działaniu	0,1659	teofilina bezwodna 100 mg	laktoza	Pierre Fabre Medicament	G00364 06.2009
3.	Theospirex retard 150 mg	tabletki powlekane	0,1815	teofilina bezwodna 150 mg	polimetakrylan amoniowy poliwinylopirolidon talk, stearynian magnezu koloidalny ditlenek krzemu trioctan glicerolu glikol polietylenowy 6000 hydroksypropylometyloceluloza	Biofarm Sp. z o.o.	030306 03.2009
4.	Theospirex retard 300 mg	tabletki powlekane o przedłużonym działaniu	0,2362	teofilina bezwodna 300 mg	brak danych	Biofarm Sp. z o.o.	060206 02.2009
5.	Theovent 100	tabletki	0,1802	teofilina bezwodna 100 mg	laktoza skrobia kukurydziana glikolan sodowy skrobi koloidalny ditlenek krzemu stearynian magnezu celuloza mikrokrystaliczna	GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A.	L02002 01.2008
6.	Theovent 300	tabletki o przedłużonym działaniu	0,5006	teofilina bezwodna 300 mg	glikolan sodowy skrobi talk, stearynian magnezu celuloza mikrokrystaliczna Syloid 244, emulsja SE2 cytrynian trietylu Eudragit RS-30D Eudragit RL-30D	GlaxoSmithKline Pharmaceuticals S.A.	J01017 01.2006

Tabela IV.16. Masy odważek preparatów farmaceutycznych zawierających acetazolamid i atenolol.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu	Masa odważki [g]	
		Analiza woltamperometryczna	Analiza spektrofotometryczna
1.	Diuramid	0,2224	0,2574
2.	Atenolol 25	0,9424	0,3531
3.	Atenolol 50	1,6038	0,3585
4.	Atenolol / Polpharma	0,9368	0,6086
5.	Normocard	0,8539	0,3233
6.	Atenolol 100	0,9411	0,3565

Tabela IV.17. Masy odważek preparatów farmaceutycznych zawierających kofeinę.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu	Masa odważki [g]	
		Analiza woltamperometryczna	Analiza spektrofotometryczna
1.	Antygrypin	1,3309	0,8353
2.	Apap Extra	1,9502	1,0304
3.	Aspirin Activ	1,9522	1,3012
4.	Cefalgin	2,7108	1,3600
5.	Codipar Plus	2,0525	0,6239
6.	Coffecorn mite	2,3257	0,1210
7.	Coffecorn forte	0,7721	0,3969
8.	Coffepirine	1,2511	0,6280
9.	Coldrex MaxGrip C	5,8440	3,0031
10.	Grippostad C	3,0303	1,6016
11.	Kopiryna	1,2719	0,5581
12.	Neopyrin Asa	2,5004	1,2872
13.	Panadol Extra	2,4613	1,2703
14.	Saridon	2,4582	1,2236
15.	Solpadeine	4,1807	2,1680
16.	Tabletki przeciw grypie Centfarm	1,5461	0,7925
17.	Tabletki przeciw grypie Polpharma	1,5500	0,7978

Tabela IV.18. Masy odważek preparatów farmaceutycznych zawierających teobrominę i teofilinę.

L.p.	Nazwa handlowa preparatu	Masa odważki [g]	
		Analiza woltamperometryczna	Analiza spektrofotometryczna
1.	Theopaverin	0,0280	0,1310
2.	Theoplus 100 mg	0,3281	0,1695
3.	Theovent 100	0,3584	0,1806
4.	Theospirex retard 150 mg	0,2398	0,1838
5.	Theovent 300	0,3001	0,1677
6.	Theospirex retard 300	0,2362	0,1283

Tabela IV.19. Masy molowe analizowanych substancji leczniczych.

Analizowana substancja	Masa molowa
Acetazolamid	222,24
Atenolol	266,34
Kofeina	194,17
Teobromina	180,17
Teofilina	180,17

3. Analiza spektrofotometryczna

W celu oceny nowo opracowanych metod woltamperometrycznego oznaczania acetazolamidu, atenololu, kofeiny, teobrominy i teofiliny w preparatach farmaceutycznych, przeprowadzono analizę ilościową tych preparatów techniką spektrofotometryczną. Wszystkie pomiary przeprowadzono przy długościach fal zestawionych w Tabeli IV.20, stosując kuwety o grubości warstwy absorbującej 1 cm, względem wody redestylowanej jako roztworu wzorcowego.

Tabela IV.20. Analityczne długości fal dla oznaczanych substancji leczniczych.

Analizowana substancja	Analityczna długość fali [nm]	Piśmiennictwo
Acetazolamid	292	Farmakopea Polska VI, 2002
Atenolol	274	Al-Ghannam, 2006 El-Gindy et al., 2005
Kofeina	273	Farmakopea Polska VI, 2002 Erk, 2000
Teobromina	273	Farmakopea Polska VI, 2002 Erk, 2000
Teofilina	273	Farmakopea Polska VI, 2002 Erk, 2000

3.1 Przygotowanie krzywych kalibracyjnych

W celu przygotowania roztworów wzorcowych niezbędnych do wyznaczenia krzywych kalibracyjnych dla analizowanych spektrofotometrycznie substancji, odważono na wadze analitycznej podane w Tabeli IV.6 ilości substancji, które następnie przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o poj. 1000 ml, rozpuszczono w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/l, po czym dokładnie wymieszano. Uzyskano tym sposobem roztwory wzorcowe analizowanych substancji o stężeniu równym 10^{-3} mol/l.

Z tak przygotowanych roztworów wzorcowych acetazolamidu, atenololu, kofeiny, teobrominy i teofiliny pobierano objętości roztworu podane w Tabelach IV.21-IV.25, przenoszono do kolbek miarowych o poj. 100 ml, rozcieńczano roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/l, po czym analizowano spektrofotometrycznie.

Wykonano po dziesięć pomiarów dla danego roztworu. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabelach IV.21-IV.25 i oszacowano statystycznie wyznaczając średnią arytmetyczną (x_{sr}), odchylenie standardowe (S), współczynnik zmienności (CV) i przedział ufności ($x_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{x_{sr}}$) (Czermiński et al., 1992; Łomnicki, 1999; Pawlaczyk, Zajac, 1999).

Tabela IV.21. Ocena statystyczna wyznaczonej spektrofotometrycznie krzywej kalibracyjnej dla acetazolamidu.

Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie [mol/100 ml]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
2,0	$1,92 \cdot 10^{-5}$	0,25	$3,00 \cdot 10^{-3}$	1,20	$0,25 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
3,0	$2,88 \cdot 10^{-5}$	0,37	$5,66 \cdot 10^{-3}$	1,53	$0,37 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
4,0	$3,85 \cdot 10^{-5}$	0,49	$2,00 \cdot 10^{-3}$	1,54	$0,49 \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$
6,0	$5,77 \cdot 10^{-5}$	0,71	$4,96 \cdot 10^{-3}$	0,70	$0,71 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
7,0	$6,70 \cdot 10^{-5}$	0,83	$3,59 \cdot 10^{-3}$	0,43	$0,83 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
8,0	$7,69 \cdot 10^{-5}$	0,94	$5,25 \cdot 10^{-3}$	0,56	$0,94 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$

Tabela IV.22. Ocena statystyczna wyznaczonej spektrofotometrycznie krzywej kalibracyjnej dla atenololu.

Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie [mol/100 ml]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
8,0	$8,03 \cdot 10^{-5}$	0,10	$3,32 \cdot 10^{-3}$	3,32	$0,10 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
12,0	$1,20 \cdot 10^{-4}$	0,15	$4,24 \cdot 10^{-3}$	2,83	$0,15 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
18,0	$1,81 \cdot 10^{-4}$	0,21	$4,52 \cdot 10^{-3}$	2,15	$0,21 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
25,0	$2,51 \cdot 10^{-4}$	0,30	$8,29 \cdot 10^{-3}$	2,76	$0,30 \pm 6,0 \cdot 10^{-3}$
35,0	$3,51 \cdot 10^{-4}$	0,42	$5,28 \cdot 10^{-3}$	1,26	$0,42 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
50,0	$5,02 \cdot 10^{-4}$	0,58	$4,27 \cdot 10^{-3}$	0,74	$0,58 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
70,0	$7,03 \cdot 10^{-4}$	0,83	$7,15 \cdot 10^{-3}$	0,86	$0,83 \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$
90,0	$8,03 \cdot 10^{-4}$	0,95	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,11	$0,95 \pm 7,0 \cdot 10^{-4}$

Tabela IV.23. Ocena statystyczna wyznaczonej spektrofotometrycznie krzywej kalibracyjnej dla kofeiny.

Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie [mol/100 ml]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
3,0	$1,54 \cdot 10^{-5}$	0,11	$2,58 \cdot 10^{-3}$	2,34	$0,11 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
4,0	$2,06 \cdot 10^{-5}$	0,15	$2,91 \cdot 10^{-3}$	1,94	$0,15 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
5,0	$2,57 \cdot 10^{-5}$	0,20	$6,83 \cdot 10^{-3}$	3,41	$0,20 \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$
6,0	$3,09 \cdot 10^{-5}$	0,25	$3,79 \cdot 10^{-3}$	1,52	$0,25 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
7,0	$3,60 \cdot 10^{-5}$	0,29	$5,72 \cdot 10^{-3}$	1,97	$0,29 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
8,0	$4,12 \cdot 10^{-5}$	0,34	$5,03 \cdot 10^{-3}$	1,48	$0,34 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
9,0	$4,63 \cdot 10^{-5}$	0,39	$2,67 \cdot 10^{-3}$	0,68	$0,39 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
10,0	$5,15 \cdot 10^{-5}$	0,45	$1,65 \cdot 10^{-2}$	3,67	$0,45 \pm 1,0 \cdot 10^{-2}$
11,0	$5,66 \cdot 10^{-5}$	0,51	$2,50 \cdot 10^{-3}$	0,49	$0,51 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
12,0	$6,18 \cdot 10^{-5}$	0,55	$2,77 \cdot 10^{-3}$	0,50	$0,55 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
13,0	$6,69 \cdot 10^{-5}$	0,59	$2,60 \cdot 10^{-3}$	0,44	$0,59 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
14,0	$7,21 \cdot 10^{-5}$	0,63	$3,42 \cdot 10^{-3}$	0,54	$0,63 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
15,0	$7,72 \cdot 10^{-5}$	0,67	$4,02 \cdot 10^{-3}$	0,60	$0,67 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
16,0	$8,24 \cdot 10^{-5}$	0,71	$4,46 \cdot 10^{-3}$	0,63	$0,71 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
17,0	$8,76 \cdot 10^{-5}$	0,74	$2,24 \cdot 10^{-3}$	0,30	$0,74 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$

Tabela IV.24. Ocena statystyczna wyznaczonej spektrofotometrycznie krzywej kalibracyjnej dla teobrominy.

Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie [mol/100 ml]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
3,0	$1,82 \cdot 10^{-6}$	0,15	$3,61 \cdot 10^{-3}$	2,41	$0,15 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
4,0	$2,42 \cdot 10^{-6}$	0,22	$2,67 \cdot 10^{-4}$	0,12	$0,22 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
5,0	$3,03 \cdot 10^{-6}$	0,29	$5,41 \cdot 10^{-3}$	1,87	$0,29 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
6,0	$3,64 \cdot 10^{-6}$	0,37	$3,42 \cdot 10^{-3}$	0,92	$0,37 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
7,0	$4,25 \cdot 10^{-6}$	0,44	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,23	$0,44 \pm 7,0 \cdot 10^{-4}$
8,0	$4,85 \cdot 10^{-6}$	0,51	$3,67 \cdot 10^{-3}$	0,72	$0,51 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
9,0	$5,46 \cdot 10^{-6}$	0,58	$5,85 \cdot 10^{-3}$	1,01	$0,58 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
10,0	$6,07 \cdot 10^{-6}$	0,65	$3,67 \cdot 10^{-3}$	0,56	$0,65 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
11,0	$6,67 \cdot 10^{-6}$	0,72	$1,08 \cdot 10^{-2}$	1,50	$0,72 \pm 8,0 \cdot 10^{-3}$
12,0	$7,28 \cdot 10^{-6}$	0,79	$5,98 \cdot 10^{-3}$	0,77	$0,79 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$

Tabela IV.25. Ocena statystyczna wyznaczonej spektrofotometrycznie krzywej kalibracyjnej dla teofiliny.

Objętość roztworu podstawowego [ml]	Stężenie [mol/100 ml]	\bar{x}_{sr} n=10	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
3,0	$1,82 \cdot 10^{-5}$	0,14	$6,99 \cdot 10^{-3}$	4,99	$0,14 \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$
4,0	$2,43 \cdot 10^{-5}$	0,22	$3,67 \cdot 10^{-3}$	1,67	$0,22 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
5,0	$3,04 \cdot 10^{-5}$	0,30	$1,30 \cdot 10^{-2}$	4,33	$0,30 \pm 9,0 \cdot 10^{-3}$
6,0	$3,64 \cdot 10^{-5}$	0,37	$5,19 \cdot 10^{-3}$	1,40	$0,37 \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
7,0	$4,25 \cdot 10^{-5}$	0,44	$1,67 \cdot 10^{-3}$	0,38	$0,44 \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$
8,0	$4,86 \cdot 10^{-5}$	0,52	$2,50 \cdot 10^{-3}$	0,48	$0,52 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
9,0	$5,46 \cdot 10^{-5}$	0,58	$1,49 \cdot 10^{-3}$	0,26	$0,58 \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$
10,0	$6,07 \cdot 10^{-5}$	0,64	$4,27 \cdot 10^{-3}$	0,67	$0,64 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$
11,0	$6,68 \cdot 10^{-5}$	0,72	$3,07 \cdot 10^{-3}$	0,43	$0,72 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
12,0	$7,29 \cdot 10^{-5}$	0,78	$7,46 \cdot 10^{-3}$	0,96	$0,78 \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$

Na podstawie wartości absorpcji dla kolejnych stężeń roztworów wzorcowych wykreślono krzywe kalibracyjne, które zestawiono w Tabeli IV.26 i przedstawiono graficznie na Rys. IV.2, IV.4, IV.6, IV.8 i IV.10.

Tabela IV.26. Równania krzywych kalibracyjnych substancji analizowanych spektrofotometrycznie.

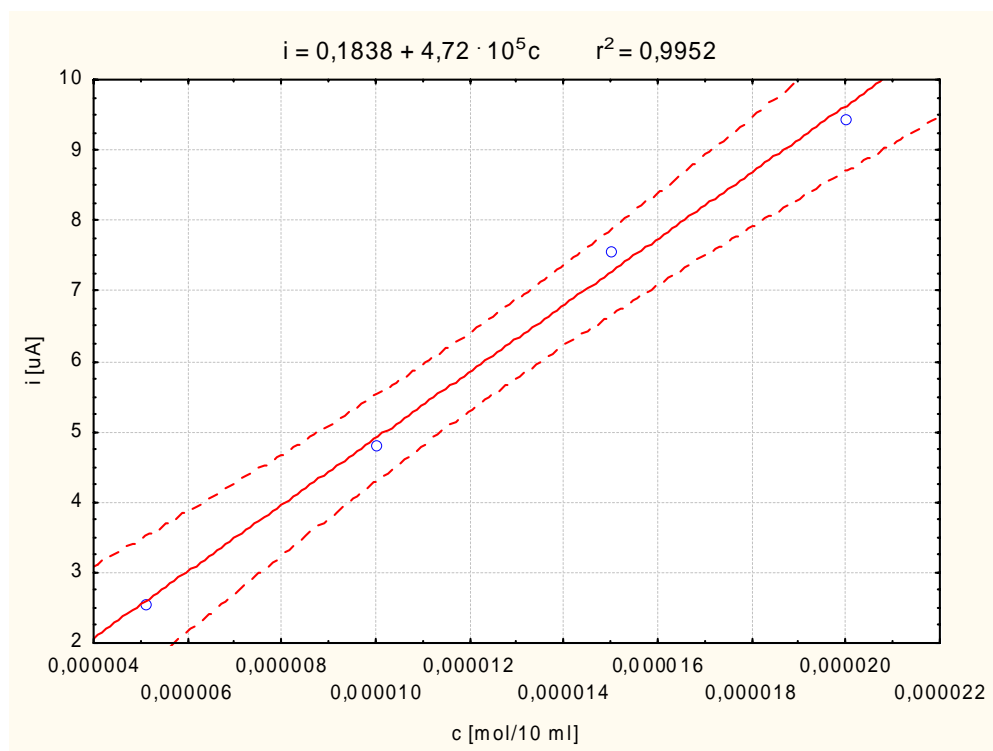
Analizowana substancja	Równanie regresji	Współczynnik korelacji
Acetazolamid	$A = 11971,27 \cdot c + 0,0228$	0,9998
Atenolol	$A = 1177,26 \cdot c + 0,0009$	0,9997
Kofeina	$A = 9111,10 \cdot c - 0,0299$	0,9983
Teobromina	$A = 1,18 \cdot 10^{-5} \cdot c - 0,0663$	0,9999
Teofilina	$A = 11750,98 \cdot c - 0,0642$	0,9994

3.2 Analiza ilościowa preparatów farmaceutycznych

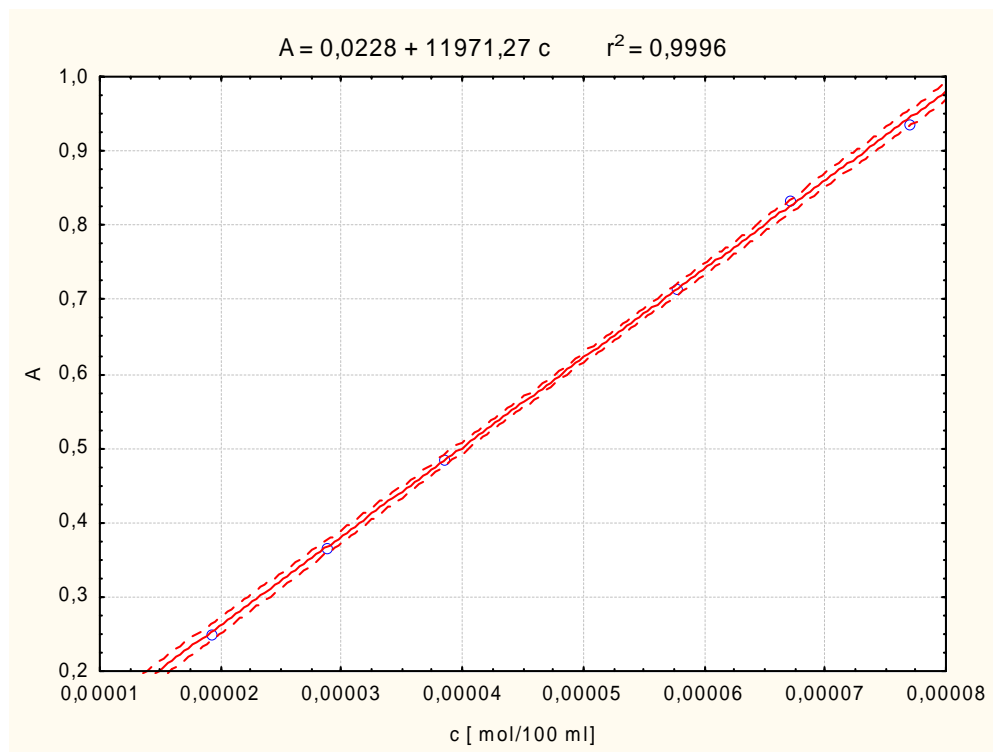
Analizie spektrofotometrycznej poddano te same preparaty farmaceutyczne, które analizowano voltamperometrycznie (Tabele IV.13-IV.15). Na wadze analitycznej odważono podane w trzeciej kolumnie Tabel IV.16-IV.18 ilości sproszkowanych mas tabletkowych badanych preparatów, przeniesiono je ilościowo do kolb miarowych o poj. 1000 ml, rozpuszczono w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 mol/l, po czym po

dokładnym wymieszaniu dopełniono tym samym roztworem wodorotlenku sodu do objętości 1 litra. Z tak przygotowanych roztworów pobierano podane w Tabelach V.1-V.6, V.8-V.24 oraz V.26-V.31 trzy objętości, a w pojedynczych przypadkach cztery objętości analizowanych roztworów, przenoszono je do kolbek miarowych o poj. 100 ml i po rozcieńczeniu roztworem wodorotlenkiem sodu o stężeniu 0,1 mol/l, mierzono absorbancję roztworów przy tej samej długości fali, przy której wyznaczano krzywe kalibracyjne. Każdą analizę powtarzano sześciokrotnie.

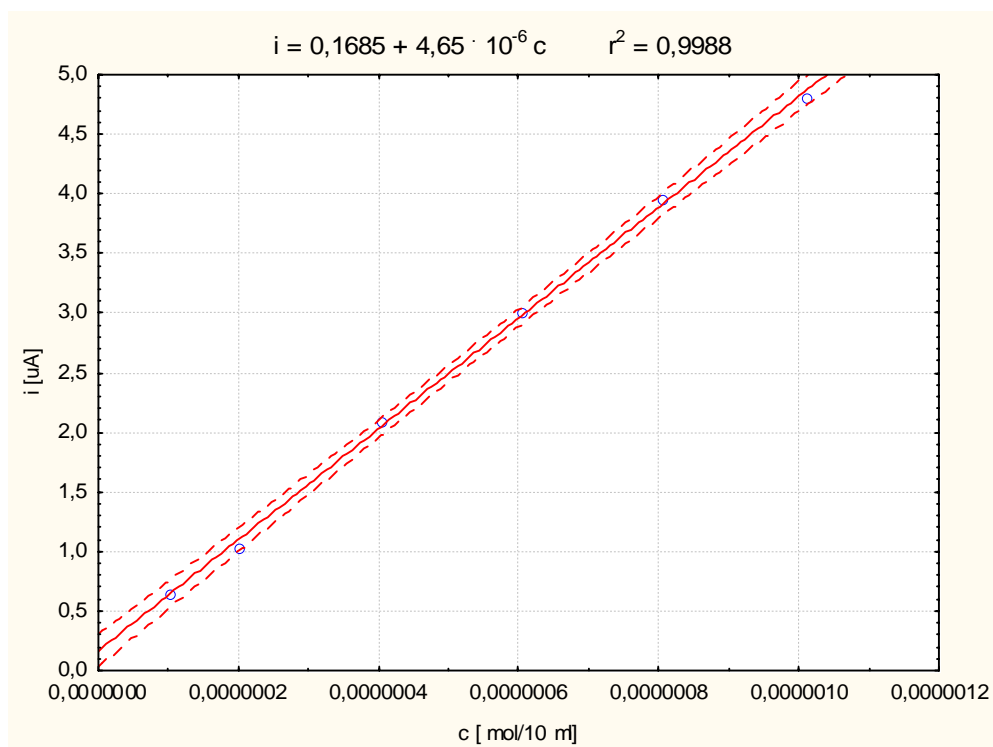
Zawartość substancji leczniczych w badanych preparatach farmaceutycznych obliczano korzystając z podanych w Tabeli IV.26 równań krzywych kalibracyjnych, zestawionych w Tabeli IV.19 mas molowych analizowanych substancji oraz uwzględniając krotność rozcieńczeń. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabelach V.1-V.6, V.8-V.24 oraz V.26-V.31.



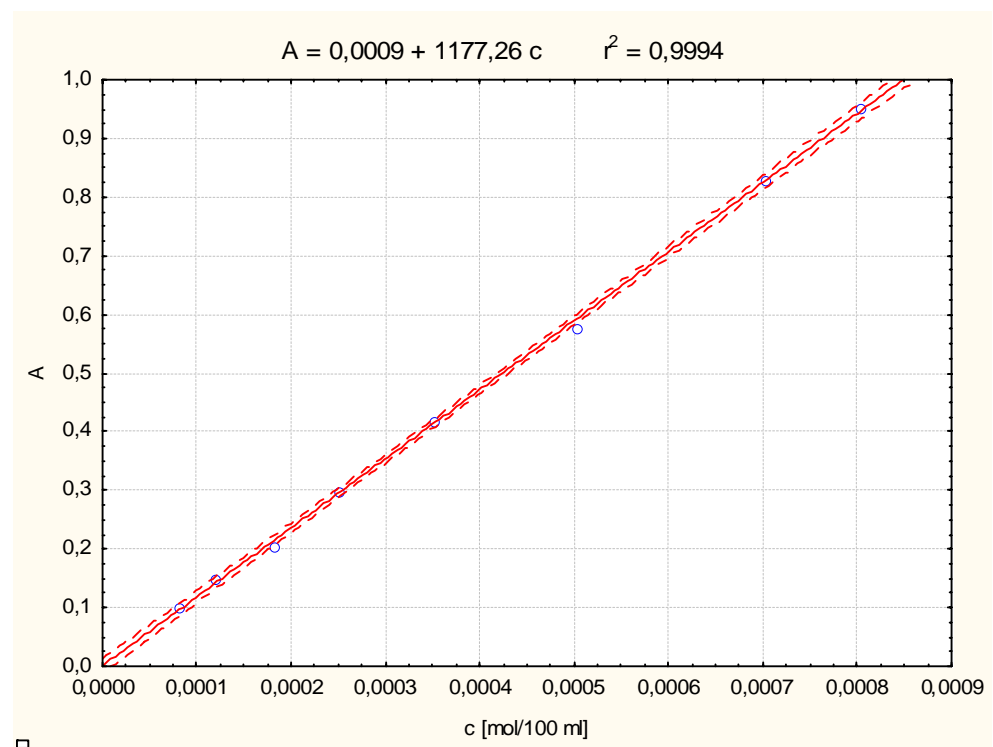
Rys. IV.1. Krzywa wzorcowa dla analizy woltamperometrycznej acetazolamidu.



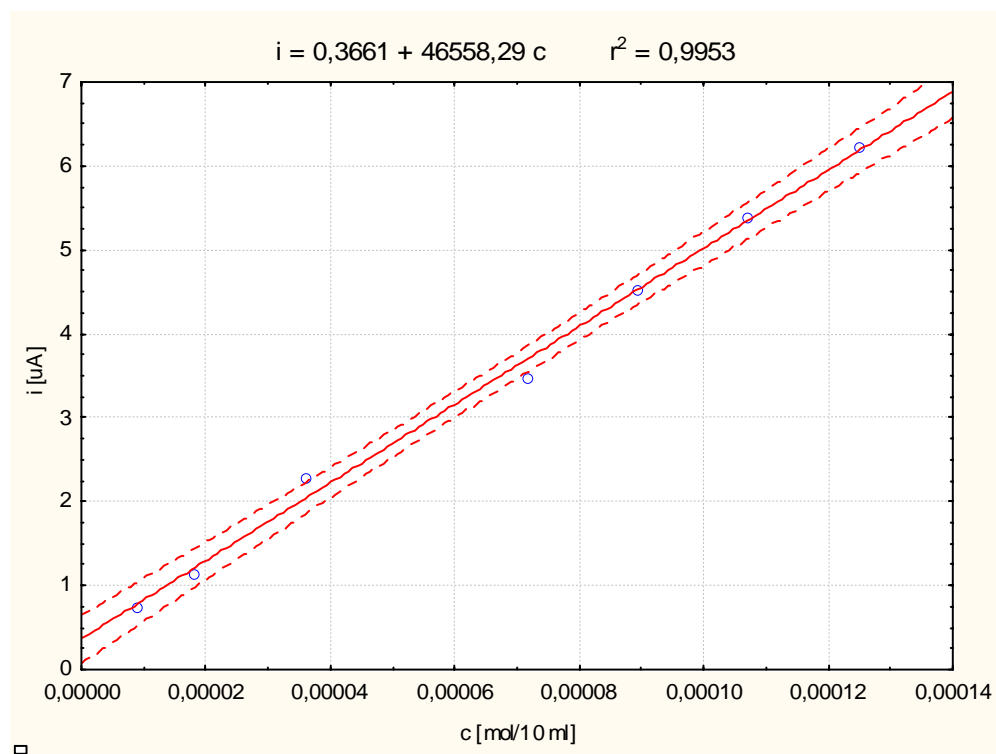
Rys. IV.2. Krzywa wzorcowa dla analizy spektrofotometrycznej acetazolamidu.



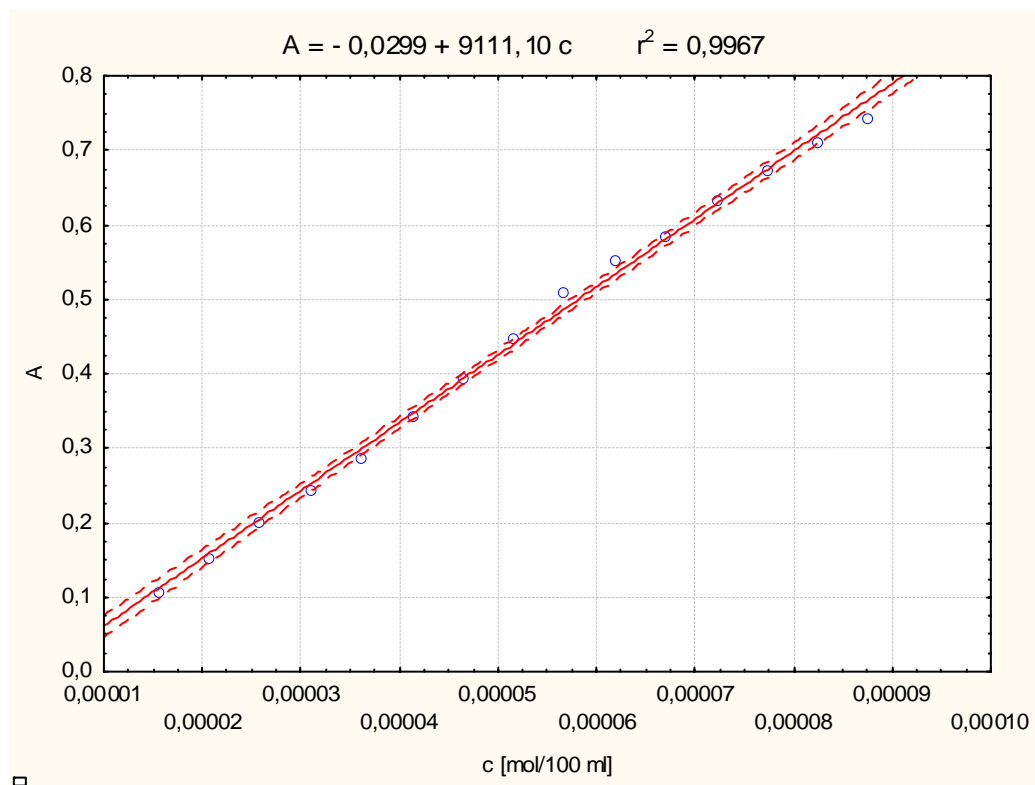
Rys. IV.3. Krzywa wzorcowa dla analizy woltamperometrycznej atenololu.



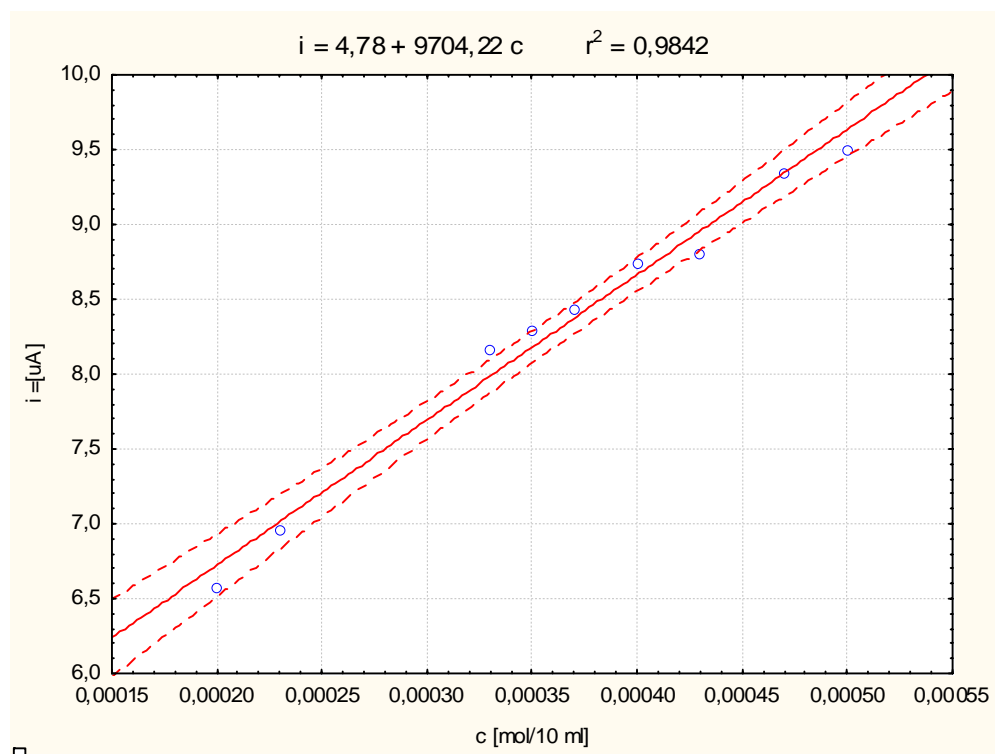
Rys. IV.4. Krzywa wzorcowa dla analizy spektrofotometrycznej atenololu.



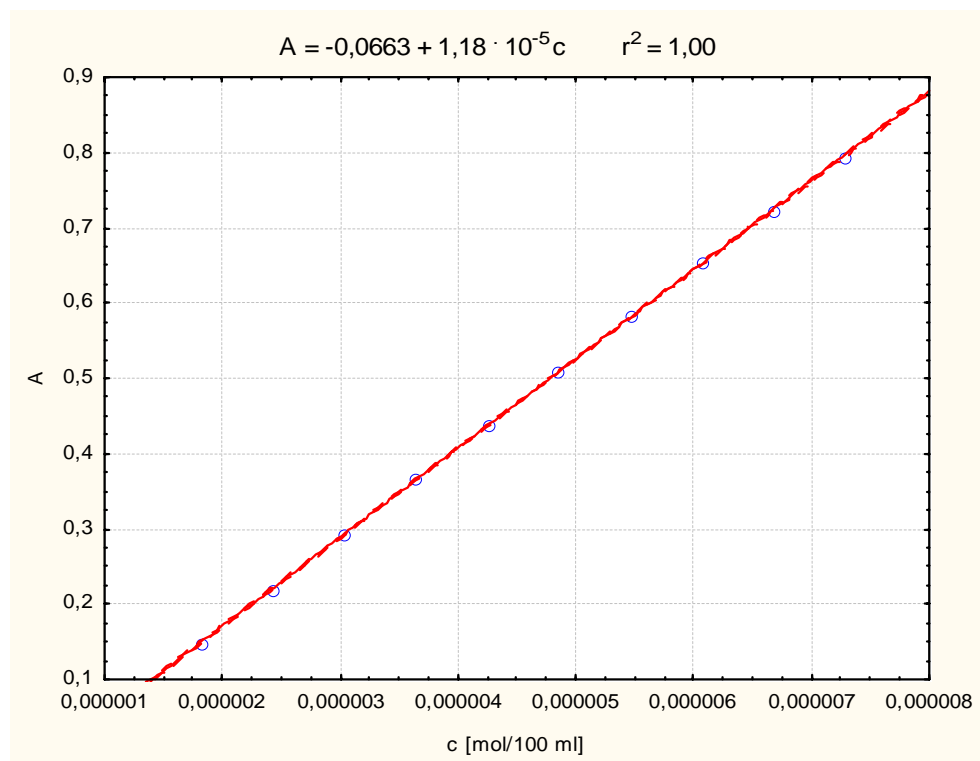
Rys. IV.5. Krzywa wzorcowa dla analizy woltamperometrycznej kofeiny.



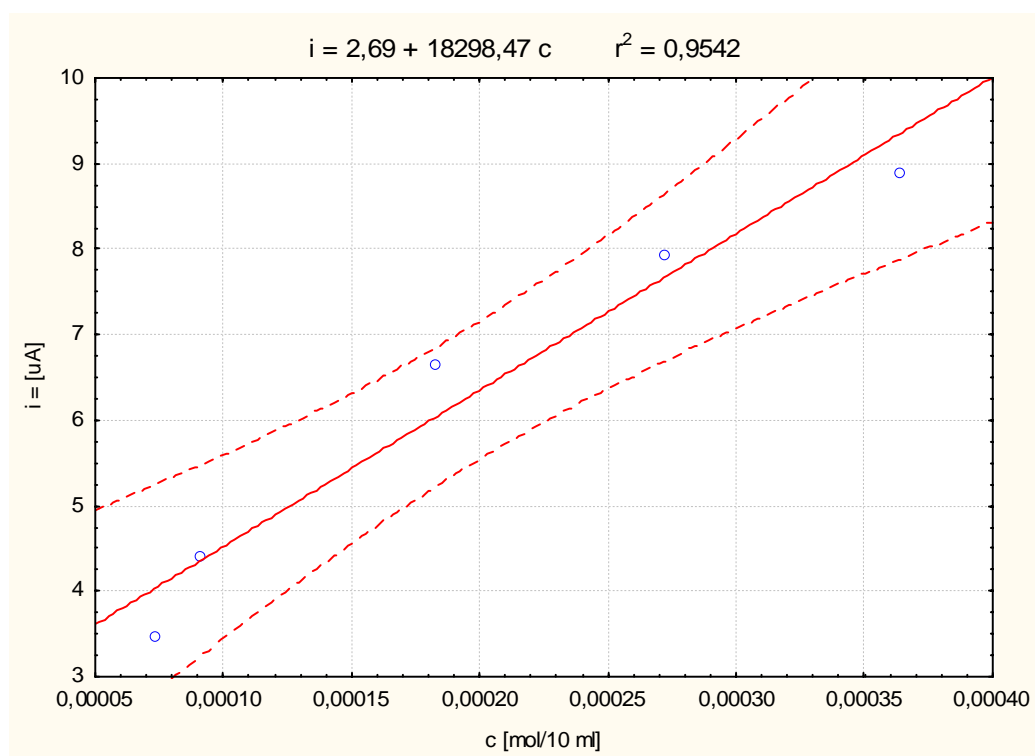
Rys. IV.6. Krzywa wzorcowa dla analizy spektrofotometrycznej kofeiny.



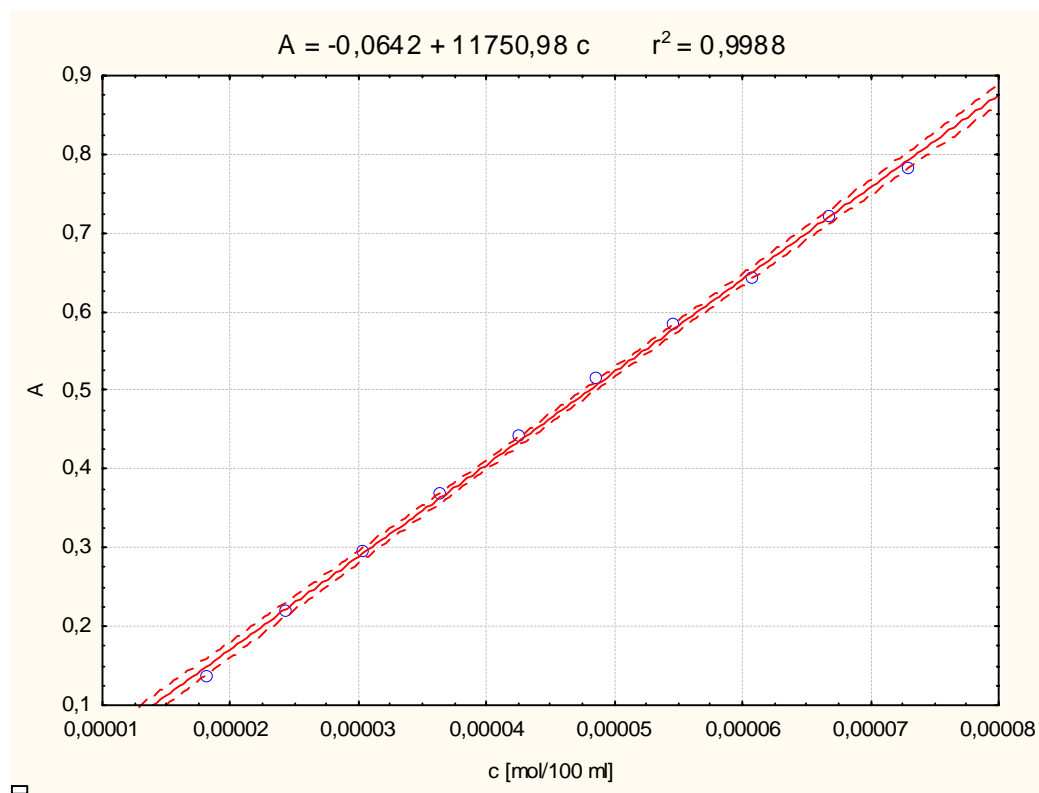
Rys. IV.7. Krzywa wzorcowa dla analizy woltamperometrycznej teobrominy.



Rys. IV.8. Krzywa wzorcowa dla analizy spektrofotometrycznej teobrominy.



Rys. IV.9. Krzywa wzorcowa dla analizy woltamperometrycznej teofiliny.

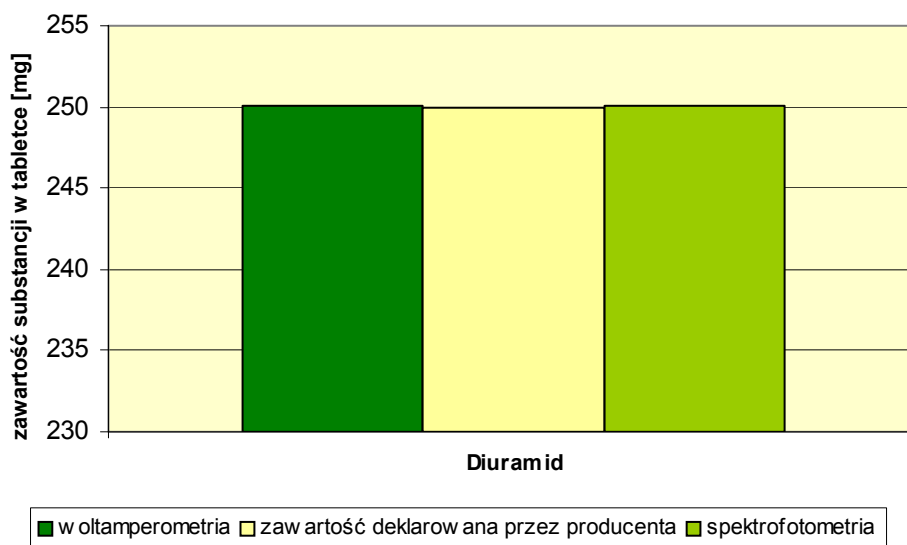


Rys. IV.10. Krzywa wzorcowa dla analizy spektrofotometrycznej teofiliny.

V. WYNIKI DOŚWIADCZEŃ I DYSKUSJA

1. Analiza acetazolamidu w preparacie Diuramid

W literaturze brak jest doniesień na temat analizy woltamperometrycznej preparatów farmaceutycznych zawierających acetazolamid. Zestawione w Tabeli V.1 wyniki oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych acetazolamidu w preparacie Diuramid nie różnią się od siebie i wykazują bardzo dobrą zgodność z danymi deklarowanymi przez producenta odnośnie zawartości substancji czynnej w tabletkach (Tabela IV.13). Odchylenia standardowe i współczynniki zmienności przyjmują wartości bardzo małe, wskazując na wysoką precyzję oznaczeń zarówno spektrofotometrycznych, jak i woltamperometrycznych (Szyszko, 1982). Graficznie wyniki oznaczeń acetazolamidu w tabletkach Diuramid przedstawiono na Rys. V.1.



Rys. V.1. Zawartość acetazolamidu w preparacie Diuramid.

W celu potwierdzenia przydatności techniki woltamperometrycznej w analizie ilościowej badanych substancji leczniczych w zawierających je preparatach, równolegle przeprowadzono analizę spektrofotometryczną tych samych preparatów farmaceutycznych, a uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej (Czermiński et al., 1992; Łomnicki, 1999; Pawlaczyk, Zając, 1999).

Porównanie wyników uzyskanych dwoma różnymi metodami sprowadza się do ustalenia, czy wyniki oznaczeń przeprowadzonych tymi metodami należą do tej samej zbiorowości (Pawlaczyk, Zając, 1999). W tym celu przeprowadza się najczęściej test jednorodności dwóch wariancji oraz ocenę istotności różnicy między wynikami uzyskanymi tymi metodami.

Jednorodność wariancji metod – woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej stwierdzono stosując test F-Snedokora:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{przy założeniu} \quad S_1^2 > S_2^2$$

Wartość F uzyskaną na podstawie estymatorów wariancji S_1^2 i S_2^2 dla zbioru próbek analizowanych tymi metodami o liczebności odpowiednio n_1 i n_2 , porównuje się z wartościami krytycznymi $F\alpha(n_1 - 1, n_2 - 1)$, zestawionymi dla danego poziomu istotności w odpowiednich tabelach. Jeżeli $F \leq F\alpha(n_1 - 1, n_2 - 1)$, wówczas obie metody nie różnią się w sposób istotny pod względem precyzji, natomiast gdy $F > F\alpha(n_1 - 1, n_2 - 1)$, druga metoda jest bardziej precyzyjna.

Ocena istotności różnicy między wynikami uzyskanymi zastosowanymi metodami – woltamperometryczną i spektrofotometryczną służy do weryfikacji hipotezy, że wartości przeciętne w dwóch populacjach są sobie równe. Ocenę tę przeprowadza się za pomocą testu t-Studenta przy założeniu, że wyniki w badanych populacjach charakteryzują się rozkładem normalnym oraz spełniają warunek równości wariancji. Ponieważ dla wszystkich badanych preparatów liczebności serii pomiarów uzyskanych stosowanymi metodami są równe ($n_1 = n_2 = n$), empiryczną wartość t z testu t-Studenta obliczono ze wzoru:

$$t = \frac{(\bar{x}_{sr1} - \bar{x}_{sr2})}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \cdot \sqrt{n}$$

Wartość t porównuje się z zestawionymi w tabelach wartościami krytycznymi współczynnika $t_{\alpha, f}$ dla przyjętego poziomu istotności α i danej liczby stopni swobody $f = n_1 + n_2 - 2$. Jeżeli obliczona wartość $t \leq t_{\alpha, f}$, to różnica między wynikami uzyskanymi zastosowanymi metodami nie jest istotna, natomiast w przypadku gdy $t > t_{\alpha, f}$, to średnie

arytmetyczne nie są równe i otrzymane wyniki nie należą do tej samej zbiorowości generalnej.

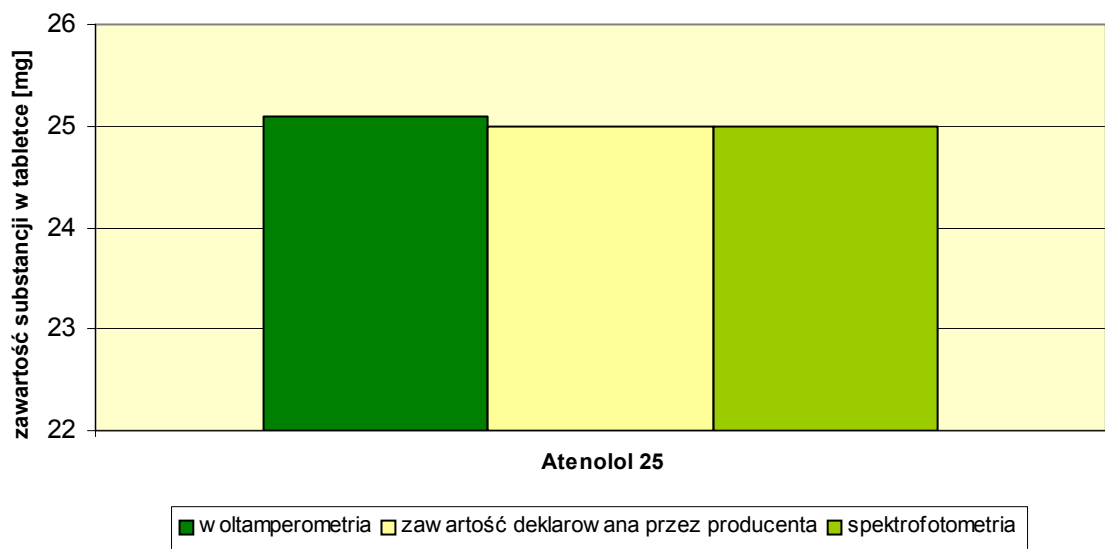
Przeprowadzone obliczenia wykazały, że obie metody nie różnią się pod względem precyzji, a uzyskane wyniki należą do tej samej zbiorowości generalnej, tzn. wyniki oznaczeń woltamperometrycznych potwierdzają w całym zakresie wyniki uzyskane techniką spektrofotometryczną.

2. Analiza atenololu w preparatach farmaceutycznych

Handlowe preparaty farmaceutyczne zawierające atenolol można podzielić na trzy grupy biorąc za kryterium zawartość substancji czynnej w tabletkach. Do grupy pierwszej zaliczono Atenolol 25 (Sanofi-Synthelabo) zawierający 25 mg substancji leczniczej, do grupy drugiej włączono preparaty zawierające 50 mg atenololu – Atenolol 50 (Sanofi-Synthelabo), Atenolol (Polpharma) i Normocard (Polfa, Warszawa), natomiast grupę trzecią stanowią tabletki Atenolol 100 (Sanofi-Synthelabo), zawierające 100 mg substancji leczniczej. Ocenę statystyczną wyników oznaczeń atenololu w zawierających go tabletkach metodami woltamperometryczną i spektrofotometryczną – średnią arytmetyczną (\bar{x}_{sr}), odchylenie standardowe (S), współczynnik zmienności (CV) i przedział ufności ($\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$), zestawiono w Tabelach V.2-V.6 (Czermiński et al., 1992; Łomnicki, 1999; Pawlaczyk, Zając, 1999).

Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej preparatu Atenolol 25 (Sanofi-Synthelabo) są zgodne z deklarowaną przez producenta ilością substancji leczniczej (25 mg) w tabletkach (Tabela IV.13). Tylko w przypadku oznaczania stężenia atenololu z górnego zakresu krzywej wzorcowej techniką woltamperometryczną, uzyskano wynik nieznacznie zaniżony, ale odznaczający się najlepszą precyzją w stosunku do pozostałych oznaczeń tak woltamperometrycznych, jak i spektrofotometrycznych.

Z analizy zestawionych w Tabeli V.2 i przedstawionych graficznie na Rys. V.2 wyników oznaczeń wynika, że współczynnik zmienności przyjmują niewielkie wartości kwalifikując oznaczenia do grupy mniej dokładnych pomiarów naukowych (Szyszko, 1982). Test jednorodności dwóch wariancji wskazał na porównywalną precyzję oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych, natomiast z analizy istotności różnicy między wynikami uzyskanymi tymi metodami wynika, że oznaczenia nie różnią się istotnie statystycznie.



Rys. V.2. Zawartość atenololu w preparacie Atenolol 25.

Tabela V.1. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej acetazolamidu w preparacie Diuramid.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość acetazolamidu w tabletku [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
3,7	1,91 – 1,94	247,61 – 251,92	249,76	4,31	1,72	249,76 ± 4,52
7,5	3,71 – 3,73	249,57 – 250,10	249,92	0,67	0,27	249,92 ± 0,70
11,0	5,35 – 5,38	249,31 – 250,76	250,04	1,24	0,50	250,04 ± 1,30
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
2,0	0,214 – 0,217	247,64 – 250,78	250,09	3,11	1,24	250,09 ± 3,24
4,0	0,454 – 0,457	249,31 – 250,88	250,10	1,34	0,54	250,10 ± 1,41
6,0	0,694 – 0,696	249,87 – 250,56	250,04	0,71	0,28	250,04 ± 0,74
8,0	0,932 – 0,935	249,63 – 250,41	250,06	0,87	0,35	250,06 ± 0,91

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.2. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej atenololu w preparacie Atenolol 25 (Sanofi-Synthelabo).

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość atenololu w tabletku [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,09 – 1,12	24,70 – 25,50	25,09	0,69	2,74	25,09 ± 0,72
6,0	2,50 – 2,53	24,99 – 25,32	25,12	0,31	1,24	25,12 ± 0,33
8,0	3,82 – 3,85	24,46 – 24,67	24,59	0,20	0,81	24,59 ± 0,21
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
78,0	0,099 – 0,102	24,75 – 25,49	25,00	0,76	3,05	25,00 ± 0,80
90,0	0,114 – 0,117	24,67 – 25,31	25,09	0,66	2,64	25,09 ± 0,70

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.3. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej atenololu w preparacie Atenolol 50 (Sanofi-Synthelabo).

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość atenololu w tabletku [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,5	1,32 – 1,34	49,51 – 50,36	49,94	0,93	1,86	49,94 ± 0,98
4,5	2,25 – 2,28	49,72 – 50,44	49,96	0,74	1,49	49,96 ± 0,78
7,0	3,41 – 3,44	49,77 – 50,23	50,00	0,39	0,78	50,00 ± 0,41
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
23,0	0,101 – 0,104	49,15 – 50,60	49,95	1,22	2,44	49,95 ± 1,28
65,0	0,291 – 0,294	49,79 – 50,33	49,97	0,56	1,12	49,97 ± 0,59
85,0	0,381 – 0,384	49,61 – 50,23	49,92	0,63	1,26	49,92 ± 0,66

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.4. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej atenololu w preparacie Atenolol (Polpharma).

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość atenololu w tabletku [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,09 – 1,11	49,59 – 50,66	50,02	0,98	1,97	50,22 ± 1,43
6,0	2,93 – 2,95	49,53 – 49,89	49,71	0,28	0,56	49,71 ± 0,29
8,0	3,85 – 3,87	49,53 – 49,80	49,62	0,27	0,54	49,62 ± 0,28
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
20,0	0,110 – 0,111	49,84 – 50,29	50,07	0,60	1,21	50,07 ± 0,63
50,0	0,221 – 0,224	49,87 – 50,54	50,13	0,64	1,28	50,13 ± 0,67
80,0	0,354 – 0,357	49,85 – 50,27	50,06	0,36	0,72	50,06 ± 0,38

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.5. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej atenololu w preparacie Normocard.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość atenololu w tabletku [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,08 – 1,10	49,40 – 50,48	50,12	1,08	2,15	50,12 ± 1,13
4,0	2,01 – 2,03	49,90 – 50,44	50,03	0,50	0,99	50,13 ± 0,52
7,0	3,35 – 3,37	49,26 – 49,57	49,44	0,29	0,58	49,44 ± 0,30
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
25,0	0,108 – 0,110	49,26 – 50,17	49,86	0,90	1,81	49,86 ± 0,95
50,0	0,219 – 0,221	49,73 – 50,19	49,96	0,36	0,71	49,96 ± 0,37
80,0	0,352 – 0,354	49,88 – 50,17	50,00	0,27	0,54	50,00 ± 0,28

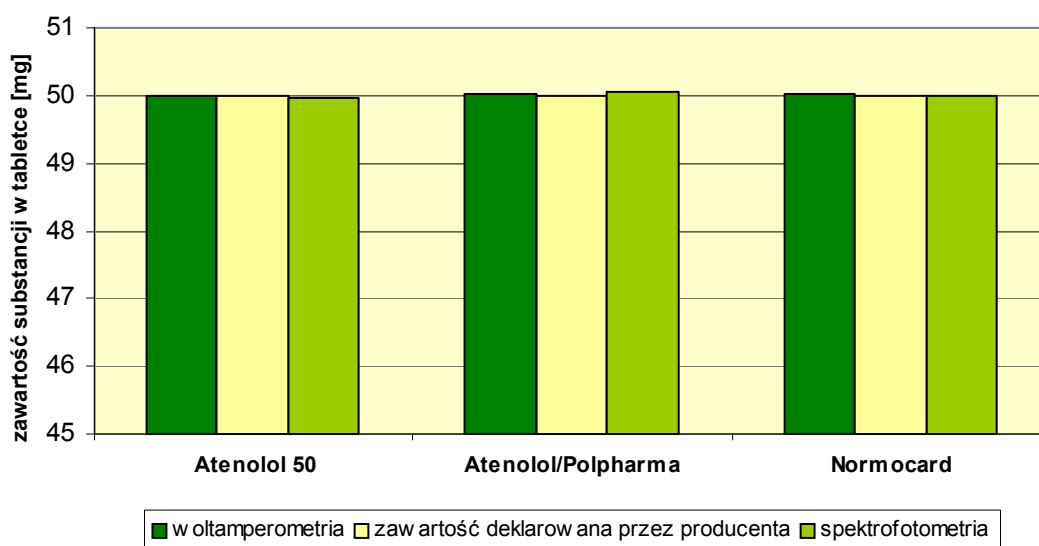
* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.6. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej atenololu w preparacie Atenolol 100 (Sanofi-Synthelabo).

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość atenololu w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
5,0	2,69 – 2,78	108,40 – 112,30	110,02	4,09	3,72	110,02 ± 4,29
7,0	3,61 – 3,65	105,70 – 106,90	106,30	1,04	0,98	106,30 ± 1,09
10,0	4,99 – 5,02	103,70 – 104,30	103,93	0,57	0,55	103,93 ± 0,60
12,0	6,08 – 6,11	105,90 – 106,50	106,17	0,59	0,56	106,17 ± 0,62
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
25,0	0,110 – 0,113	99,46 – 102,15	100,50	2,57	2,55	100,50 ± 2,69
60,0	0,266 – 0,268	99,73 – 100,48	100,04	0,90	0,90	100,04 ± 0,95
80,0	0,355 – 0,358	99,74 – 100,58	100,16	0,72	0,72	100,16 ± 0,76

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Grupę drugą reprezentowały preparaty zawierające 50 mg atenololu, wyniki analiz woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych dla tych preparatów – Atenolol 50 (Sanofi-Synthelabo), Atenolol (Polpharma) i Normocard, zestawiono w Tabelach V.3-V.5 oraz przedstawiono graficznie na Rys. V.3. Analiza tych danych wskazuje na dużą zgodność wyników oznaczeń woltamperometrycznych ze spektrofotometrycznymi oraz na niskie wartości odchyłeń standardowych i współczynników zmienności. Na ich podstawie przeprowadzone oznaczenia można zakwalifikować do grupy niej dokładnych pomiarów naukowych, dla których współczynniki zmienności znajdują się w granicach wartości, od 0,3 do 3,0 % (Szyszko, 1982). Należy także zaznaczyć, że uzyskane dane są zgodne z ilością substancji leczniczej w tabletkę deklarowaną przez producenta (Tabela IV.13) oraz nie różnią się istotnie statystycznie od wyników analiz spektrofotometrycznych (Pawlaczyk, Zając, 1999; Łomnicki, 1999; Czermiński et al., 1992).

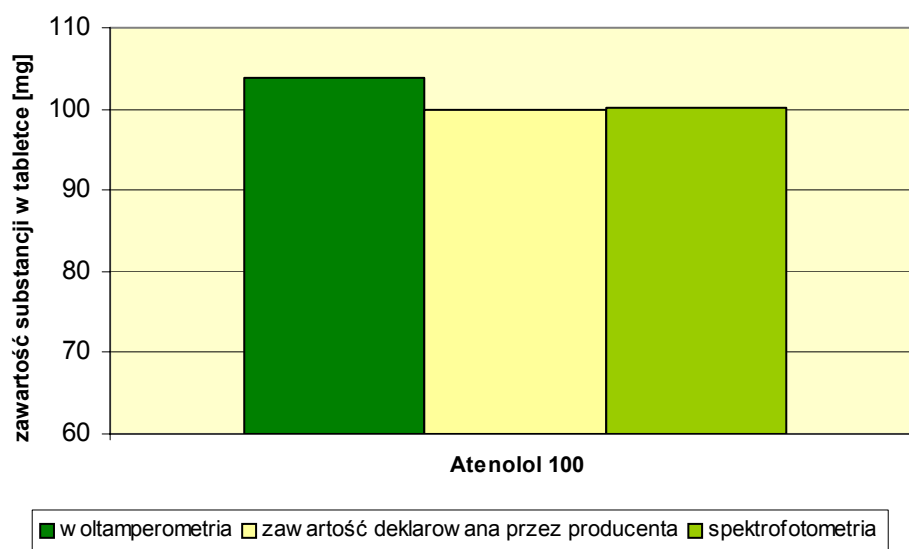


Rys. V.3. Zawartość atenololu w preparatach: Atenolol 50 (Sanofi-Synthelabo, Atenolol (Polpharma) i Normocard.

Wyniki oznaczeń substancji czynnej w preparacie Atenolol 100 zestawiono w Tabeli V.6 oraz zilustrowano graficznie na Rys. V.4. W przypadku tego preparatu, zawartość atenololu oznaczona metodą spektrofotometryczną jest dokładnie taka sama, jak zawartość substancji czynnej w tabletkę deklarowana przez producenta (Tabela IV.13). Odwrotnie wygląda sytuacja w przypadku analiz woltamperometrycznych. Zawartość atenololu w tabletkę mieści się w granicach 104-110 mg, jest więc zawyżona w stosunku do rzeczywistej zawartości substancji czynnej w preparacie. Szczególnie wysoką

zawartość atenololu oznaczono próbce o stężeniu substancji czynnej mieszczącej się w dolnym zakresie krzywej kalibracyjnej. Także precyzja i przedział ufności dla tego stężenia były znacznie wyższe w porównaniu z danymi dla oznaczeń przeprowadzonych w pozostałych zakresach krzywej wzorcowej.

Analiza istotności różnicy między wynikami uzyskanymi zastosowanymi metodami wykazała, że średnie arytmetyczne w badanych populacjach nie są równe, tj. otrzymane wyniki nie należą do tej samej zbiorowości generalnej.



Rys. V.4. Zawartość atenololu w preparacie Atenolol 100.

Wszystkie oznaczenia atenololu w zawierających je preparatach farmaceutycznych, z wyjątkiem woltamperometrycznej analizy tabletek Atenolol 100 (Sanofi-Synthelabo), doprowadziły do uzyskania wyników zgodnych z wartościami deklarowanymi przez wytwórców tych leków. Wyniki oznaczeń woltamperometrycznych wykazywały bardzo dużą zgodność z wynikami analiz spektrofotometrycznych, od których nie różniły się istotnie statystycznie.

Podobnie przedstawia się sytuacja w przypadku analizy danych literaturowych na temat analizy woltamperometrycznej handlowych preparatów farmaceutycznych zawierających tę substancję leczniczą. Stosowne wartości zestawiono w Tabeli V.7.

W piśmiennictwie brak jest natomiast danych umożliwiających porównanie wyników analizy woltamperometrycznej z wynikami oznaczeń atenololu w preparatach farmaceutycznych innymi metodami analitycznymi. Uzyskane w ramach tej pracy dane

wskazują na dużą użyteczność techniki woltamperometrycznej w analizie atenololu w preparatach o różnej zawartości substancji czynnej.

Tabela V.7. Analiza woltamperometryczna preparatów farmaceutycznych zawierających atenolol.

Preparat farmaceutyczny	Goyal, Singh, 2006		Goyal et al., 2006	
	Wartość deklarowana [mmol]	Wynik analizy [mmol]	Wartość deklarowana [mg/tabletka]	Wynik analizy [mg/tabletka]
Tenopress	0,700	0,670	50	49,83
Tenolol	1,050	1,049	25	24,04
Atecard	0,350	0,350	25	24,26
Zibloc	0,470	0,447	50	49,17

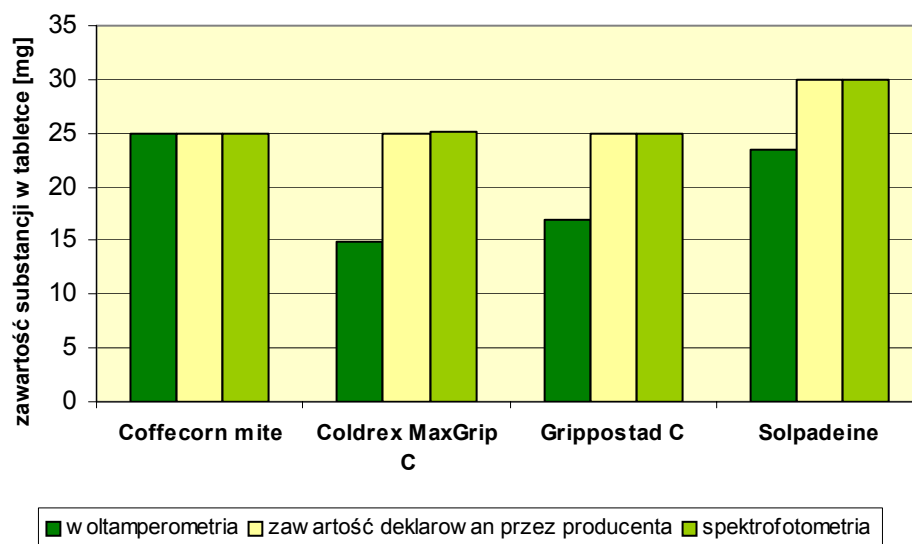
3. Analiza kofeiny w preparatach farmaceutycznych

W celu ułatwienia porównania wyników oznaczeń metodami woltamperometryczną i spektrofotometryczną zawartości kofeiny w badanych preparatach farmaceutycznych, analizowane preparaty podzielono na cztery grupy biorąc pod uwagę zawartość substancji leczniczej w tabletkach. Grupa pierwsza obejmowała cztery leki – Coffecorn mite, Coldrex MaxGrip C, Grippostad C i Solpadeine, które zawierają od 25 do 30 mg kofeiny w tabletkach. Preparatów zawierających 50 mg kofeiny było dziewięć – Antygrypin, Aspirin Activ, Cefalgin, Coffepirine, Kopiryna, Neopyrin Asa, Saridon, Tabletki przeciw grypie (Centfarm) i Tabletki przeciw grypie (Polpharma). Grupę trzecią stanowiły trzy preparaty zawierające 65 mg kofeiny – Apap Extra, Codipar Plus i Panadol Extra, natomiast grupę czwartą reprezentował jeden preparat, Coffecorn forte, zawierający 100 mg kofeiny.

Preparat Coffecorn mite jest jedynym lekiem w tej grupie, który pomijając śladową ilość winianu ergotaminy, zawiera tylko kofeinę jako składnik aktywny, bez udziału jakiegokolwiek innej substancji o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym.

Wyniki przeprowadzonych analiz zestawiono w Tabeli V.8 oraz przedstawiono graficznie na Rys. V.5. Wynika z nich, że deklarowana przez producenta zawartość kofeiny, 25 mg w tabletkach (Tabela IV.14), pokrywa się w wartościami uzyskanymi w trakcie oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych. Wyniki uzyskane obiema technikami nie różnią się istotnie statystycznie, a parametry statystyczne – wartości

odchyłeń standardowych i współczynników zmienności wskazują na porównywalną precyzję oznaczeń uzyskiwanych tymi technikami.



Rys. V.5. Zawartość kofeiny w preparacie Coffecorn mite, Coldrex Maxgrip C, Grippostad C i Solpadeine.

Pozostałe preparaty z tej grupy zawierają poza kofeiną także paracetamol w ilości 20 lub 50 mg w tabletkach, natomiast preparat Grippostad C, oprócz obu wymienionych składników zawiera jeszcze kwas askorbowy w ilości 150 mg. Zestawione w Tabelach V.9-V.11 wyniki analizy woltamperometrycznej dla preparatów Coldrex MaxGrip C, Grippostad C i Solpadeine wykazały, że technika ta nie nadaje się do oznaczeń kofeiny w analizowanych preparatach bez uprzedniego oddzielenia substancji czynnej od matrycy. Uzyskane wyniki, szczególnie w przypadku preparatów Coldrex MaxGrip C i Grippostad C odzwierciedlają 3/5 rzeczywistej zawartości substancji leczniczej w tabletkach. Wyniki analizy spektrofotometrycznej są natomiast zgodne z wartościami deklarowanymi przez wytwórców tych leków, co odzwierciedla Rys. V.5.

Analiza statystyczna istotności różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi tymi metodami dla preparatów Coldrex MaxGrip C, Grippostad C i Solpadeine potwierdziła, że średnie arytmetyczne w badanych populacjach nie są równe, tj. otrzymane wyniki nie należą do tej samej zbiorowości generalnej (Pawlaczyk, Zając, 1999; Łomnicki, 1999; Czermiński et al., 1992).

Tabela V.8. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Coffecorn mite.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tablecie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
3,0	1,75 – 1,77	24,77 – 25,13	25,01	0,36	1,44	25,01 ± 0,38
5,0	2,69 – 2,71	24,96 – 25,18	25,03	0,22	0,86	25,03 ± 0,23
8,0	4,08 – 4,10	24,93 – 25,07	25,01	0,13	0,52	25,01 ± 0,14
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,203 – 0,208	24,57 – 25,10	24,82	0,45	1,83	24,82 ± 0,48
10,0	0,442 – 0,445	24,89 – 25,05	24,98	0,16	0,64	24,98 ± 0,17
14,0	0,631 – 0,636	24,90 – 25,09	24,99	0,16	0,64	24,99 ± 0,17

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.9. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Coldrex MaxGrip C.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkę [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	1,43 – 1,46	14,42 – 14,83	14,65	0,35	2,37	14,65 ± 0,37
6,0	1,99 – 2,03	14,68 – 15,04	14,88	0,35	2,37	14,88 ± 0,37
8,0	2,42 – 2,45	13,92 – 14,13	14,05	0,20	1,43	14,05 ± 0,21
10,0	2,88 – 2,93	13,63 – 13,90	13,78	0,27	1,93	13,78 ± 0,28
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,204 – 0,206	24,90 – 25,11	25,04	0,21	0,85	25,04 ± 0,22
9,0	0,393 – 0,395	25,01 – 25,13	25,07	0,13	0,52	25,07 ± 0,14
14,0	0,628 – 0,629	25,01 – 25,05	25,04	0,05	0,20	25,04 ± 0,05

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.10. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Grippostad C.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	1,53 – 1,57	15,99 – 16,54	16,24	0,50	3,07	16,24 ± 0,52
6,0	2,20 – 2,25	16,79 – 17,25	17,01	0,47	2,74	17,01 ± 0,49
8,0	2,73 – 2,77	16,23 – 16,51	16,32	0,26	1,58	16,32 ± 0,27
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,203 – 0,208	24,74 – 25,27	24,96	0,46	1,85	24,96 ± 0,49
10,0	0,438 – 0,442	24,85 – 25,07	24,96	0,24	0,97	24,96 ± 0,25
15,0	0,673 – 0,678	24,89 – 25,07	24,96	0,21	0,83	24,96 ± 0,22

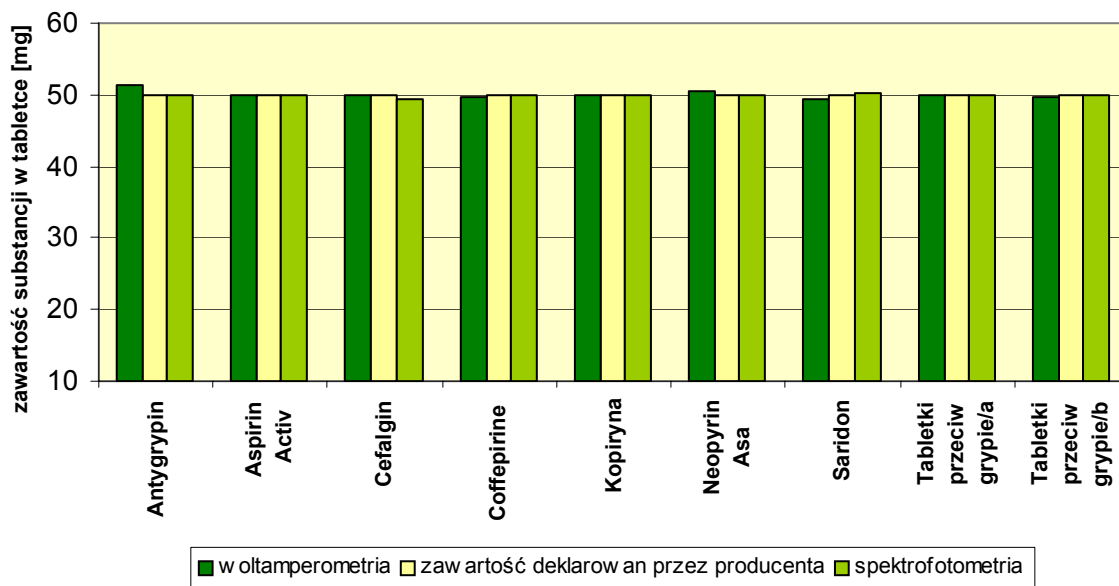
* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.11. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Solpadeine.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	0,963 – 0,966	19,30 – 19,39	19,34	0,09	0,45	19,34 ± 0,09
5,0	2,02 – 2,06	21,39 – 21,69	21,55	0,32	1,50	21,55 ± 0,34
7,0	2,89 – 2,93	23,31 – 23,68	23,45	0,31	1,34	23,45 ± 0,33
10,0	3,59 – 3,62	20,84 – 21,01	20,92	0,21	1,02	20,92 ± 0,22
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,205 – 0,206	29,93 – 30,06	30,02	0,16	0,55	30,02 ± 0,17
9,0	0,394 – 0,395	30,00 – 30,08	30,03	0,10	0,34	30,03 ± 0,11
14,0	0,628 – 0,632	29,94 – 30,12	30,03	0,17	0,57	30,03 ± 0,18

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Wyniki analiz woltaperometrycznych i spektrofotometrycznych dla preparatów grupy drugiej – Antygrypin, Aspirin Activ, Cefalgin, Coffepirine, Kopiryna, Neopyrin Asa, Saridon, Tabletki przeciw grypie (Centfarm) i Tabletki przeciw grypie (Polpharma), zestawiono w Tabelach V.12-V.20 oraz przedstawiono graficznie na Rys. V.6.



Rys. V.6. Zawartość kofeiny w preparatach zawierających 50 mg kofeiny.
a – Tabletki przeciw grypie (Centfarm), b – Tabletki przeciw grypie (Polpharma).

Analiza tych danych pozwala stwierdzić, że we wszystkich pozostałych przypadkach zawartość substancji czynnej oznaczona woltamperometrycznie w badanych preparatach jest w zasadzie zgodna z zawartością kofeiny deklarowaną przez wytwórców preparatów (Tabela IV.14).

W przypadku dwóch preparatów – Antygrypin i Saridon, uzyskano zawyżony wyniki oznaczeń woltamperometrycznych dla kofeiny. Uogólniając, precyzja oznaczeń woltamperometrycznych okazała się jednak lepsza w porównaniu z precyzją oznaczeń spektrofotometrycznych preparatów zawierających 50 mg kofeiny. Współczynniki zmienności oznaczeń woltamperometrycznych tylko w dwóch przypadkach były większe od 3, dla tabletek Kopiryna – 3,16 % i Neopyrin Asa – 3,21 %.

Należy zaznaczyć, że oznaczenia spektrofotometryczne dokładnie odzwierciedlają zawartość kofeiny w analizowanych preparatach, jako zgodną z danymi deklarowanymi przez producentów (Tabela IV.14). Współczynniki zmienności dla pomiarów spektrofotometrycznych osiągały wartości porównywalne ze współczynnikami zmienności

dla oznaczeń woltamperometrycznych, jednak w kilku przypadkach przekroczyły wartość 3 – 3,47% (Kopiryna), 3,32 % (Neopyrin Asa), 4,50 % (Tabletki przeciw grypie, Centfarm) i 3,91 % (Tabletki przeciw grypie, Polpharma). Tak wysokie wartości współczynników zmienności występowały tylko w przypadku niskich zakresów stężeń na krzywych kalibracyjnych.

Tabela V.12. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Antygrypin.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
6,0	2,70 – 2,72	50,88 – 51,31	51,31	0,52	1,01	51,31 ± 0,54
8,0	3,57 – 3,59	52,38 – 52,71	52,71	0,26	0,49	52,71 ± 0,27
10,0	4,34 – 4,37	51,98 – 52,37	52,37	0,33	0,63	52,37 ± 0,35
12,0	5,11 – 5,13	51,71 – 51,92	51,92	0,23	0,44	51,92 ± 0,24
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,205 – 0,206	50,03 – 50,24	50,10	0,27	0,53	50,10 ± 0,28
8,0	0,345 – 0,348	49,91 – 50,30	50,11	0,44	0,88	50,11 ± 0,46
14,0	0,626 – 0,629	49,89 – 50,12	50,04	0,24	0,47	50,04 ± 0,25

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.13. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Aspirin Activ.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
5	1,08 – 1,09	49,65 – 50,35	50,00	0,94	1,88	50,00 ± 0,99
10	2,15 – 2,17	49,63 – 50,18	49,90	0,60	1,21	49,90 ± 0,63
15	3,23 – 3,25	49,79 – 50,15	50,03	0,36	0,72	50,03 ± 0,38
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,204 – 0,205	49,83 – 50,05	49,98	0,28	0,56	49,98 ± 0,29
10,0	0,438 – 0,441	49,84 – 50,16	49,99	0,27	0,54	49,99 ± 0,28
15,0	0,674 – 0,676	49,99 – 50,13	50,08	0,14	0,28	50,08 ± 0,15

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.14. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Cefalgin.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 10)						
3,0	1,75 – 1,78	49,65 – 50,73	50,01	1,43	2,87	50,01 ± 1,03
6,0	3,14 – 3,17	49,75 – 50,29	49,99	0,69	1,38	49,99 ± 0,49
11,0	5,46 – 5,49	49,84 – 50,14	50,01	0,38	0,77	50,01 ± 0,27
analiza spektrofotometryczna (n = 10)						
4,0	0,140 – 0,145	44,57 – 45,94	45,43	1,19	2,61	45,43 ± 0,85
9,0	0,383 – 0,385	49,37 – 49,61	49,42	0,32	0,65	49,42 ± 0,23
14,0	0,632 – 0,635	51,20 – 51,44	51,35	0,28	0,54	51,35 ± 0,20

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.15. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Coffepirine.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
6,0	3,02 – 3,05	47,86 – 48,40	48,10	0,66	1,38	48,10 ± 0,70
10,0	4,92 – 4,94	49,27 – 49,49	49,40	0,20	0,41	49,40 ± 0,21
12,0	5,87 – 5,90	49,63 – 49,90	49,73	0,26	0,51	49,73 ± 0,27
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,193 – 0,197	49,10 – 50,20	49,69	0,94	1,89	49,69 ± 0,99
9,0	0,375 – 0,380	49,55 – 50,17	49,90	0,62	1,24	49,90 ± 0,65
14,0	0,603 – 0,608	49,80 – 50,19	49,94	0,37	0,74	49,94 ± 0,39

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.16. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Kopiryna.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	2,20 – 2,24	49,41 – 50,49	50,00	0,88	1,76	50,00 ± 0,92
4,0	3,14 – 3,16	49,83 – 50,18	49,98	0,32	0,65	49,98 ± 0,34
6,0	4,09 – 4,10	49,13 – 50,30	49,71	1,57	3,16	49,71 ± 1,65
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,164 – 0,170	48,68 – 50,18	49,56	1,72	3,47	49,56 ± 1,81
10,0	0,365 – 0,370	49,57 – 50,19	49,96	0,53	1,05	49,96 ± 0,55
14,0	0,523 – 0,528	49,57 – 50,02	49,79	0,42	0,84	49,79 ± 0,44

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.17. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Neopyrin Asa.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,28 – 1,31	49,01 – 50,62	49,73	1,60	3,21	49,73 ± 1,67
3,5	2,00 – 2,03	50,07 – 50,99	50,48	0,91	1,81	50,48 ± 0,96
4,0	2,28 – 2,31	51,32 – 52,13	51,68	0,80	1,55	51,68 ± 0,84
5,0	2,73 – 2,76	50,71 – 51,14	50,99	0,41	0,80	50,99 ± 0,43
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,153 – 0,159	48,68 – 50,28	49,39	1,64	3,32	49,39 ± 1,72
11,0	0,483 – 0,489	49,65 – 50,23	49,92	0,57	1,13	49,92 ± 0,59
15,0	0,672 – 0,675	49,82 – 49,96	49,88	0,13	0,26	49,88 ± 0,14

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.18. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Saridon.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkę [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	2,20 – 2,26	51,57 – 52,69	52,19	1,01	1,93	52,19 ± 1,06
5,0	2,55 – 2,62	48,60 – 50,16	49,49	1,42	2,88	49,49 ± 1,49
6,0	3,32 – 3,36	54,78 – 55,60	55,29	0,78	1,42	55,29 ± 0,82
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
0,5	0,211 – 0,217	49,85 – 51,12	50,20	1,26	2,50	50,20 ± 1,32
1,0	0,404 – 0,410	45,49 – 46,13	45,83	0,53	1,16	45,83 ± 0,56
1,8	0,728 – 0,736	44,46 – 44,93	44,67	0,47	1,06	44,67 ± 0,50

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.19. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Tabletki przeciw grypie (Centfarm).

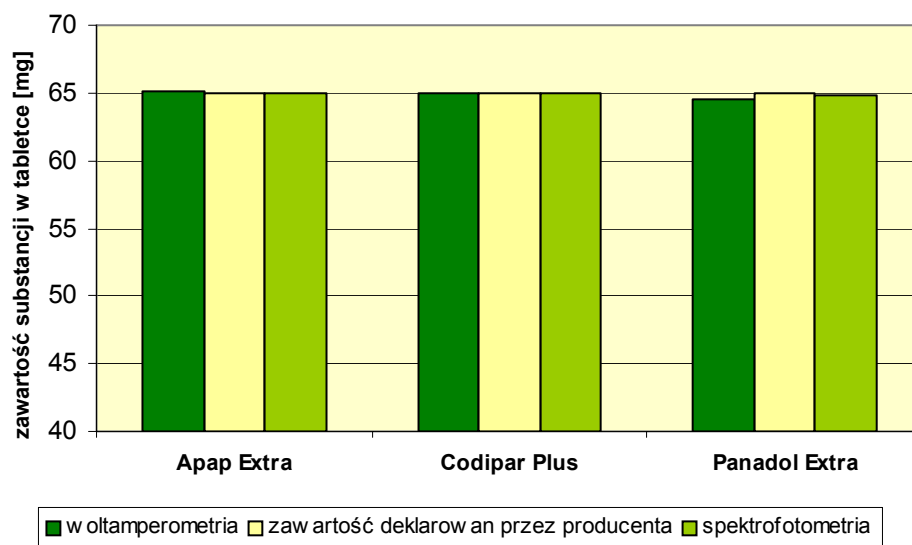
Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	2,22 – 2,24	49,77 – 50,26	49,97	0,45	0,90	49,97 ± 0,50
6,0	3,15 – 3,17	49,79 – 50,14	49,97	0,38	0,77	49,97 ± 0,40
8,0	4,08 – 4,10	49,81 – 50,08	49,94	0,21	0,42	49,94 ± 0,22
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,156 – 0,158	49,71 – 52,25	50,40	2,27	4,50	50,40 ± 2,38
10,0	0,438 – 0,439	50,05 – 50,16	50,09	0,14	0,28	50,09 ± 0,15
14,0	0,624 – 0,626	49,96 – 50,12	50,03	0,15	0,29	50,03 ± 0,15

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.20. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Tabletki przeciw grypie (Polpharma).

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,28 – 1,30	49,07 – 50,14	49,79	1,07	2,14	49,79 ± 1,12
4,0	2,19 – 2,22	48,96 – 49,77	49,32	0,68	1,38	49,32 ± 0,72
6,0	3,10 – 3,15	48,92 – 49,82	49,46	0,79	1,59	49,46 ± 0,83
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,157 – 0,159	48,81 – 50,35	49,84	1,95	3,91	49,84 ± 2,04
10,0	0,439 – 0,441	49,99 – 50,20	50,08	0,25	0,51	50,08 ± 0,27
15,0	0,674 – 0,676	50,01 – 50,18	50,10	0,22	0,44	50,10 ± 0,23

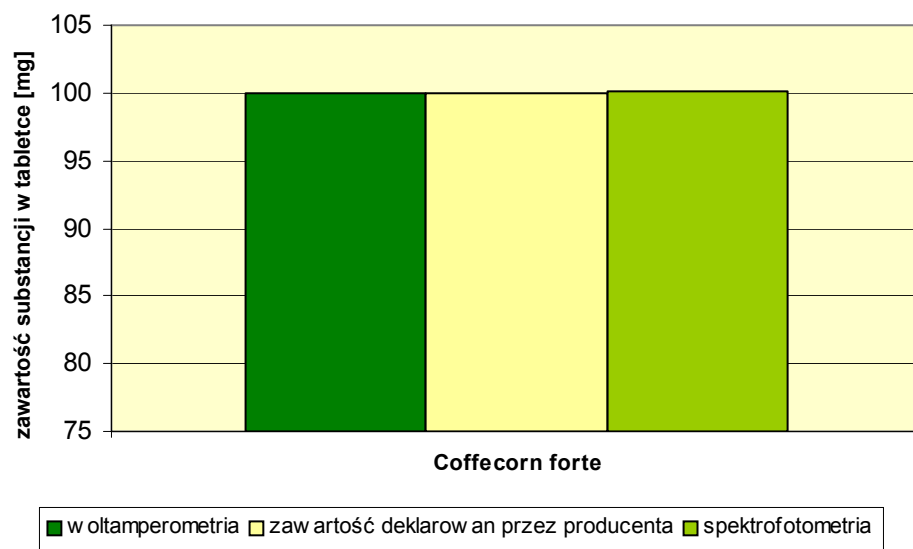
* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.



Rys. V.7. Zawartość kofeiny w preparatach Apap Extra, Codipar Plus i Panadol Extra.

Do grupy trzeciej preparatów należą tabletki zawierające 65 mg kofeiny. Wyniki analiz woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych dla preparatów Apap Extra, Codipar Plus i Panadol Extra zestawiono w Tabelach V.21-V.23 i zilustrowano graficznie na Rys. V.7. Wyniki oznaczeń woltamperometrycznych są zgodne z wynikami analiz spektrofotometrycznych oraz zawartością kofeiny deklarowaną przez producentów tych preparatów farmaceutycznych (Tabela IV.14). Precyzja wszystkich oznaczeń jest bardzo dobra, można je zakwalifikować do grupy mniej dokładnych pomiarów naukowych, dla których współczynniki zmienności przyjmują wartości, odpowiednio – 0,3-3,0 % (Szyszko, 2002).

Grupę czwartą stanowi preparat Coffecorn forte. W skład tabletek tego preparatu wchodzi tylko 100 mg kofeiny i w śladowej ilości winian ergotaminy. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej zestawiono w Tabeli V.24 i zilustrowano graficznie na Rys. V.8. Są one zgodne z wartością deklarowaną przez producenta (Tabela IV.14), i z wynikami analizy spektrofotometrycznej. Precyzja oznaczeń jest bardzo dobra.



Rys. V.8. Zawartość kofeiny w preparacie Coffecorn forte.

Tabela V.21. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Apap Extra.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkę [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	2,22 – 2,25	64,61 – 65,66	65,14	0,90	1,38	65,14 ± 0,94
7,0	3,61 – 3,67	64,60 – 65,80	65,30	1,06	1,63	65,30 ± 1,11
10,0	5,08 – 5,11	65,72 – 66,13	65,92	0,35	0,53	65,92 ± 0,37
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
0,6	0,258 – 0,261	64,70 – 65,37	65,04	0,58	0,89	65,04 ± 0,61
1,0	0,451 – 0,454	64,84 – 65,24	65,04	0,40	0,62	65,04 ± 0,42
1,4	0,644 – 0,647	64,90 – 65,19	65,04	0,33	0,50	65,04 ± 0,34

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.22. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Codipar Plus.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
1,5	1,05 – 1,07	63,99 – 65,85	65,08	1,71	2,63	65,08 ± 1,80
2,0	1,28 – 1,30	64,13 – 65,53	64,95	1,29	1,99	64,95 ± 1,35
3,0	1,74 – 1,77	64,27 – 65,63	64,97	1,17	1,81	64,97 ± 1,23
5,0	2,67 – 2,69	64,67 – 65,23	65,00	0,52	0,79	65,00 ± 0,54
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
2,0	0,520 – 0,523	64,87 – 65,50	65,11	0,54	0,83	65,11 ± 0,57
3,0	0,795 – 0,798	64,87 – 65,11	64,96	0,23	0,35	64,96 ± 0,24
3,7	0,988 – 0,991	64,91 – 65,10	65,05	0,21	0,32	65,05 ± 0,22

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.23. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Panadol Extra.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,0	1,46 – 1,49	63,82 – 65,57	64,60	1,47	2,28	64,60 ± 1,55
4,0	2,54 – 2,59	63,41 – 64,87	64,44	1,48	2,30	64,44 ± 1,56
6,0	3,65 – 3,69	63,86 – 64,64	64,38	0,72	1,12	64,38 ± 0,75
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,192 – 0,196	64,08 – 65,24	64,61	0,94	1,46	64,61 ± 0,99
9,0	0,473 – 0,477	64,55 – 65,07	64,79	0,54	0,84	64,79 ± 0,57
14,0	0,753 – 0,759	64,60 – 65,02	64,80	0,42	0,65	64,80 ± 0,44

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.24. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej kofeiny w preparacie Coffecorn forte.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość kofeiny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
4,0	2,23 – 2,24	99,89 – 100,43	100,16	0,72	0,72	100,16 ± 0,76
7,0	3,62 – 3,64	99,65 – 100,27	100,01	0,57	0,57	100,01 ± 0,60
10,0	5,02 – 5,04	99,77 – 100,20	100,02	0,40	0,40	100,02 ± 0,42
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,205 – 0,206	99,94 – 100,37	100,08	0,54	0,54	100,08 ± 0,57
9,0	0,393 – 0,396	99,96 – 199,79	100,18	0,79	0,79	100,18 ± 0,83
14,0	0,628 – 0,630	99,97 – 100,27	100,10	0,28	0,28	100,10 ± 0,29

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

W piśmiennictwie znajdują się nieliczne doniesienia na temat analizy woltamperometrycznej kofeiny w preparatach farmaceutycznych. Wyniki tych analiz zestawiono w Tabeli V.25. Analizowano między innymi woltamperometrycznie preparaty zawierające jednocześnie kofeinę i paracetamol (Lau et al., 1989). Z kolei Zen i Ting analizowali równocześnie kofeinę i acetaminofen w preparatach stosując chemicznie modyfikowaną elektrodę (Zen, Ting, 1997). Do rozpuszczenia składników analizowanych preparatów zastosowano inny rozpuszczalnik niż wodorotlenek sodu i inne elektrody wskaźnikowe, a uzyskane wyniki były zgodne z wartościami deklarowanymi przez producentów analizowanych preparatów.

Zagadnienie jednoczesnego oznaczania kilku składników w tabletkach lub wybranego składnika w obecności innych substancji o podobnych właściwościach jest często poruszany w literaturze. Analizowana kofeina jest rozpuszczana w rozpuszczalnikach o różnym pH i polarności. Są też prace o wpływie rozpuszczalnika, pH roztworu i różnych parametrów woltamperometrycznych na wartość natężenia prądu (Muszalska et al., 2000; do Socorro Maia Quintino et al., 2002; Hotta et al., 2002; Ly et al., 2004; Zen et al., 1998). Z publikacji tych wynika, że czynniki te mają znaczący wpływ na wartość natężenia prądu i potencjału depozycji.

Dane zamieszczone w wyżej cytowanych publikacjach wskazują, że w porównaniu do wyników oznaczeń kofeiny technikami wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektrofotometrii UV-Vis, analiza woltamperometryczna okazała się dokładniejszą i bardziej precyzyjną metodą oznaczania tej substancji w preparatach farmaceutycznych, przy czym koszt analiz woltamperometrycznych jest niższy. Nie bez znaczenia jest też krótszy czas potrzebny do wykonania pojedynczej analizy oraz niska szkodliwość odczynników stosowanych w trakcie analiz woltamperometrycznych na środowisko.

Tabela V.25. Wyniki oznaczeń voltamperometrycznych kofeiny w preparatach farmaceutycznych.

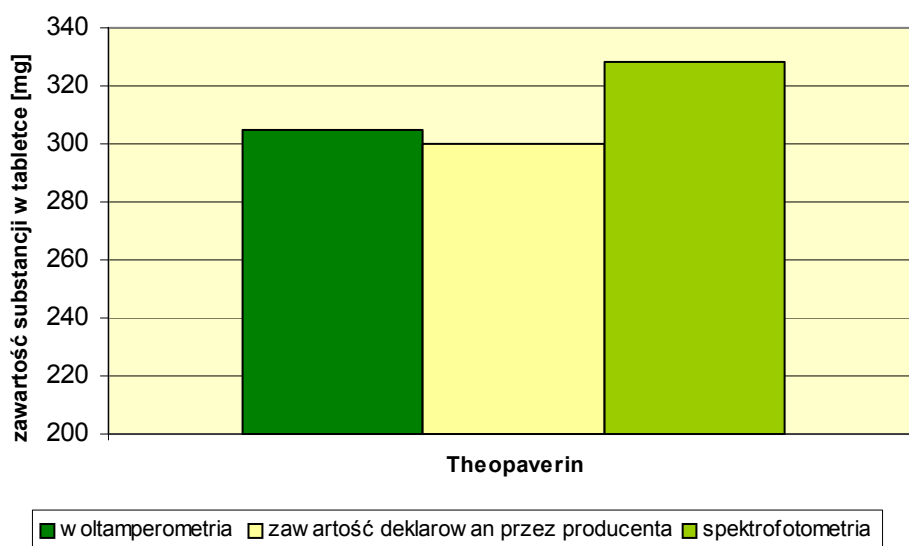
Piśmiennictwo	Oznaczenie voltamperometryczne		Oznaczenie HPLC		Oznaczenie spektrofotometryczne	
	Wartość deklarowana [mg]	Wartość oznaczona [mg]	Wartość deklarowana [mg]	Wartość oznaczona [mg]	Wartość deklarowana [g]	Wartość oznaczona [g]
Muszalska et al., 2000					0,2106	0,2121
					0,2369	0,2352
					0,2893	0,2868
do Socorro Maia Quintino et al., 2002	0,500*	0,498*			0,500	0,504
		0,523*				0,520
	0,650*	0,651*			0,650	0,655
		0,659*				0,650
Lau et al., 1989	30	31,5	30	31,0		
		29,6		31,1		
	50	53,7	50	52,7		
		45,9		43,6		
	15	15,3	15	15,3		
	Zen, Ting, 1997	65	54,0			

* – wartość deklarowaną i oznaczoną podano w gramach.

4. Analiza teobrominy w preparacie Theopaverin

Wyniki oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych teobrominy w tabletkach Theopaverin zestawiono w Tabeli V.26 oraz przedstawiono graficznie na Rys. V.9. Uzyskane wyniki odbiegają od wartości deklarowanej przez wytwórcę leku (Tabela IV.15), ale nie więcej niż 10 % zawartości aktywnego składnika.

W piśmiennictwie brak jest danych na temat analizy woltamperometrycznej teobrominy. Jedyny artykuł na temat analizy preparatu Theopaverin dotyczy zastosowania miareczkowania potencjometrycznego w środowisku niewodnym (Sell E., 1975). Wyniki analizy teobrominy w tym preparacie nie różnią się od wartości deklarowanych przez producenta, a średni odzysk metody wynosi 88,40 %.

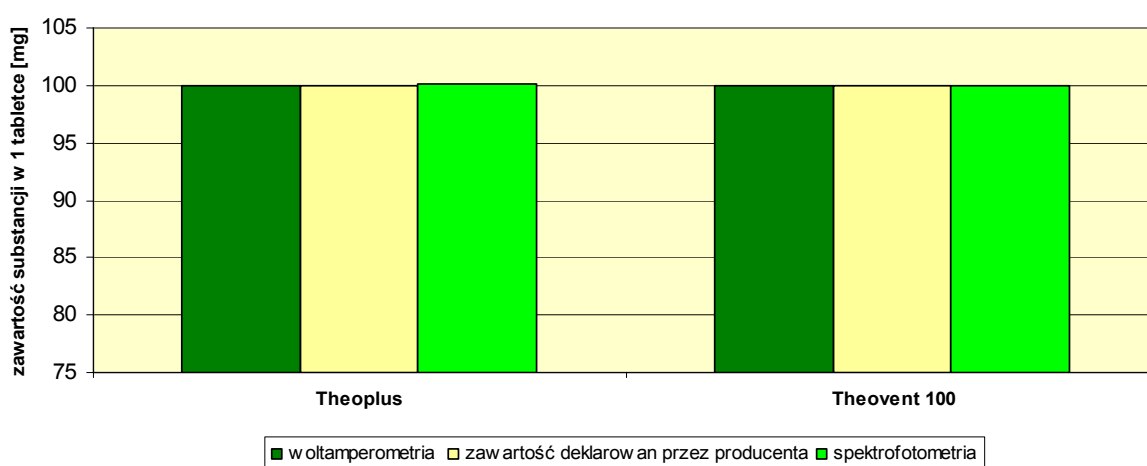


Rys. V.9. Zawartość teobrominy w preparacie Theopaverin.

5. Analiza teofiliny w preparatach farmaceutycznych

Preparaty zawierające teofilinę można podzielić na trzy grupy – tabletki zawierające 100 mg teofiliny (Theoplus 100 mg i Theovent 100), preparat Theospirex retard 150 mg, tabletki zawierające 300 mg teofiliny – Theovent 300 i Theospirex retard 300 mg.

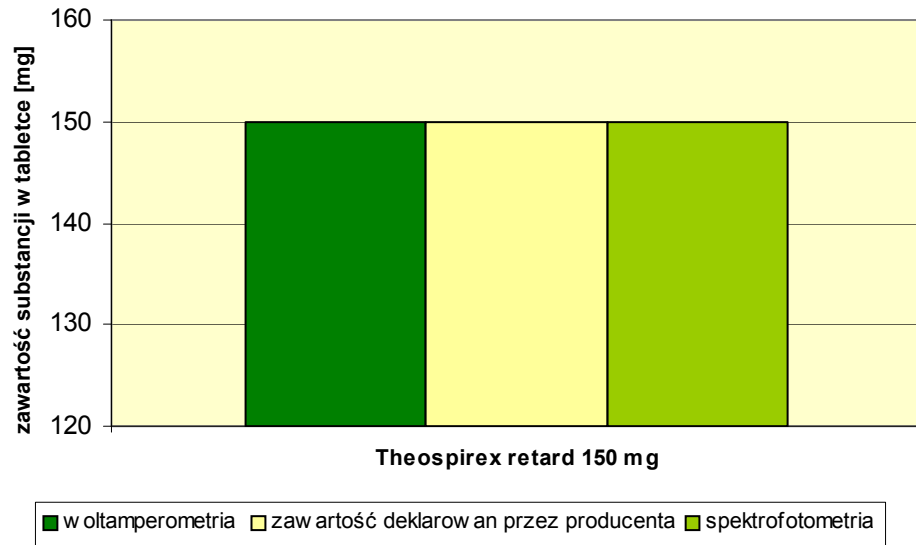
Analiza woltamperometryczna i spektrofotometryczna preparatów Theoplus 100 mg i Theovent 100 wykazała porównywalną z deklarowaną przez producenta zawartość teofiliny w tabletkach (Tabela IV.15). Uzyskane wyniki zestawiono w Tabelach V.27-V.28 oraz zilustrowano graficznie na Rys. V.10. Wyniki analizy woltamperometrycznej preparatu Theoplus 100 mg są bardziej dokładne w porównaniu z wynikami analizy spektrofotometrycznej, natomiast w przypadku tabletek Theovent 100 stwierdzono, że w podobnym stopniu wyniki oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych były zbliżone do wartości deklarowanych przez producenta.



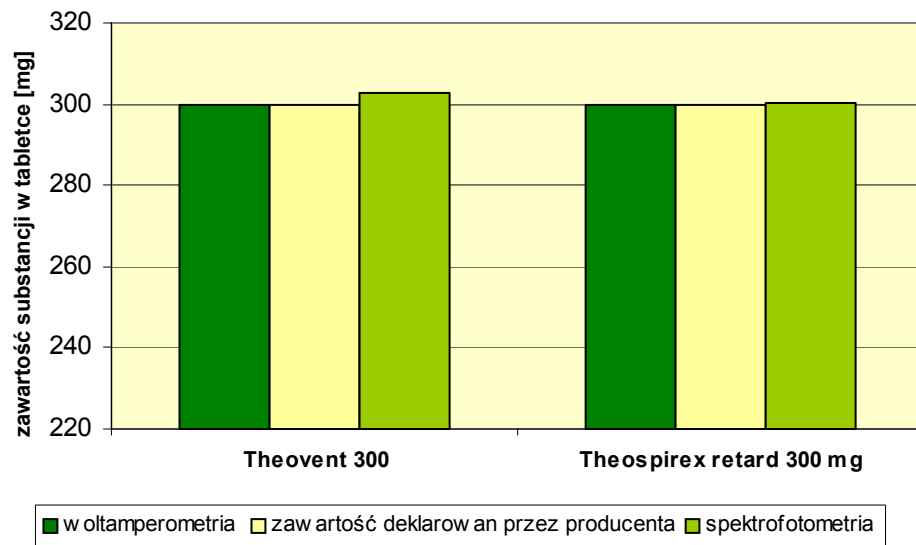
Rys. V.10. Zawartość kofeiny w preparatach Theoplus 100 mg i Theovent 100.

Wyniki oznaczeń substancji czynnej w preparacie Theospirex retard 150 zestawiono w Tabeli V.29 oraz przedstawiono graficznie na Rys. V.11. Z tych danych wynika, że zarówno techniką woltamperometryczną, jak i spektrofotometryczną uzyskano wyniki zgodne z danymi deklarowanymi przez producenta (Tabela IV.15). Współczynniki zmienności oznaczeń są niższe od 0,78 %.

W grupie trzeciej znajdują się dwa preparaty Theovent 300 i Theospirex retard 300 mg. Analiza woltamperometryczna i spektrofotometryczna obu tych preparatów wykazała zawartość teofiliny w tabletkach identyczną z deklarowaną przez producenta (Tabela IV.15). Uzyskane wyniki przedstawione są w Tabelach V.30-V.31 oraz zilustrowane graficznie na Rys. V.12. Współczynniki zmienności w analizie woltamperometrycznej są w zasadzie zgodne z wartościami współczynników zmienności dla oznaczeń spektrofotometrycznych.



Rys. V.11. Zawartość teofiliny w preparacie Theospirex retard 150.



Rys. V.12. Zawartość teofiliny w preparatach Theospirex retard 300 i Theovent 300.

Tabela V.26. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teobrominy w preparacie Theopaverin.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teobrominy w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
2,1	6,17 – 6,48	208,40 – 251,40	230,12	36,50	15,86	230,12 ± 38,31
3,8	8,36 – 8,69	292,90 – 319,90	304,70	24,35	7,99	304,70 ± 25,56
4,5	8,75 – 9,07	274,30 – 296,50	284,76	14,99	5,26	284,76 ± 15,73
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
5,0	0,229 – 0,244	344,00 – 344,90	344,54	1,15	0,33	344,54 ± 1,21
7,0	0,473 – 0,479	311,10 – 328,90	322,25	23,51	7,30	322,25 ± 24,68
8,0	0,687 – 0,697	328,40 – 329,10	328,47	0,54	0,16	328,47 ± 0,57
10,0	0,915 – 0,929	327,70 – 329,50	328,05	1,44	0,44	328,05 ± 1,52

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.27. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teofiliny w preparacie Theoplus 100 mg.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teofiliny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
7,0	4,29 – 4,31	99,57 – 100,82	99,99	1,25	1,25	99,99 ± 1,31
20,0	6,69 – 6,72	99,57 – 100,32	99,99	0,74	0,74	99,99 ± 0,78
30,0	8,70 – 8,73	99,74 – 100,24	99,99	0,43	0,43	99,99 ± 0,45
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,201 – 0,204	99,49 – 100,61	100,11	1,37	1,37	100,11 ± 1,44
8,0	0,463 – 0,471	98,89 – 100,39	100,05	1,49	1,49	100,05 ± 1,57
11,0	0,667 – 0,671	99,75 – 100,29	100,09	0,54	0,54	100,09 ± 0,57

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.28. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teofiliny w preparacie Theovent 100.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teofiliny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
8,0	4,29 – 4,32	99,01 – 100,87	100,15	1,77	1,77	100,15 ± 1,86
20,0	6,72 – 6,73	99,75 – 100,24	100,04	0,45	0,45	100,04 ± 0,47
30,0	8,73 – 8,79	99,67 – 100,66	100,06	0,83	0,83	100,06 ± 0,88
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,197 – 0,199	99,90 – 100,66	100,22	0,91	0,91	100,22 ± 0,96
7,0	0,392 – 0,395	99,14 – 100,58	99,94	1,19	1,19	99,94 ± 1,25
11,0	0,654 – 0,656	99,88 – 100,16	100,00	0,34	0,34	100,00 ± 0,35

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.29. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teofiliny w preparacie Theospirex retard 150 mg.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teofiliny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
20,0	6,70 – 6,73	149,42 – 150,54	149,98	0,96	0,64	149,98 ± 1,01
30,0	8,71 – 8,74	149,54 – 150,29	149,96	0,63	0,42	149,96 ± 0,66
40,0	10,71 – 10,75	149,42 – 150,17	149,95	0,73	0,49	149,95 ± 0,77
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,331 – 0,334	149,59 – 150,72	149,97	1,17	0,78	149,97 ± 1,22
7,0	0,628 – 0,631	149,72 – 150,37	149,97	0,62	0,41	149,97 ± 0,65
10,0	0,926 – 0,927	149,92 – 150,07	149,97	0,19	0,13	149,97 ± 0,20

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.30. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teofiliny w preparacie Theovent 300.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teofiliny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 10)						
12,0	4,87 – 4,89	298,42 – 301,16	300,02	4,26	1,42	300,02 ± 3,05
22,0	6,69 – 6,72	298,81 – 301,81	300,06	2,45	0,82	300,06 ± 1,75
32,0	8,52 – 8,55	299,47 – 301,02	300,33	1,68	0,56	300,33 ± 1,20
analiza spektrofotometryczna (n = 10)						
6,0	0,332 – 0,336	302,20 – 305,30	302,98	3,04	1,00	302,98 ± 2,18
7,0	0,373 – 0,384	285,90 – 293,00	290,41	9,59	3,30	290,41 ± 6,86
8,0	0,440 – 0,444	288,50 – 290,70	289,93	2,51	0,87	289,93 ± 1,80
11,0	0,673 – 0,677	306,70 – 308,40	307,86	1,81	0,59	307,86 ± 1,29

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Tabela V.31. Wyniki analizy woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej teofiliny w preparacie Theospirex retard 300 mg.

Objętość analizowanego roztworu [ml]	Zakres mierzonego sygnału analitycznego*	Zawartość teofiliny w tabletkie [mg]	\bar{x}_{sr} [mg]	S	CV [%]	$\bar{x}_{sr} \pm t_{0,95} \cdot S_{\bar{x}_{sr}}$
analiza woltamperometryczna (n = 6)						
8,0	4,26 – 4,28	297,95 – 301,74	300,16	3,50	1,16	300,16 ± 3,67
20,0	6,30 – 6,66	299,08 – 301,36	300,02	2,18	0,73	300,02 ± 2,29
30,0	8,60 – 8,63	299,08 – 300,60	300,10	1,57	0,52	300,10 ± 1,65
analiza spektrofotometryczna (n = 6)						
4,0	0,213 – 0,215	299,13 – 301,29	300,21	2,37	0,79	300,21 ± 2,48
7,0	0,422 – 0,424	299,81 – 301,04	300,22	1,23	0,41	300,22 ± 1,29
11,0	0,700 – 0,702	299,88 – 300,66	300,08	0,80	0,27	300,08 ± 0,84

* – natężenie prądu w μA w przypadku pomiarów woltamperometrycznych, absorbancja w przypadku pomiarów spektrofotometrycznych.

Zamieszczone w piśmiennictwie dane na temat analizy woltamperometrycznej teofiliny w handlowych preparatach farmaceutycznych wykazały, że w tabletkach Neulin zawierających 250 mg teofiliny oznaczono substancję czynną z odzyskiem od 97,5 do 102,5 %, natomiast w preparacie Lasma (300 mg teofiliny w tabletkach) odzysk wyniósł od 97,5 do 104,0 % (Shubietah et al., 1994). Z kolei dla preparatów, których nazw nie zamieszczono w publikacji odzysk wynosił, dla ampulek od $93,90 \pm 1,24$ % do $102,25 \pm 2,44$ %, a dla tabletek od $99,10 \pm 1,24$ % do $101,25 \pm 1,68$ % (Zen et al., 1999).

W powyższych publikacjach zwrócono również uwagę na wpływ rozpuszczalnika, pH środowiska i rodzaj buforu na wyniki oznaczeń woltamperometrycznych (Shubietah et al., 1994; Riahi et al., 2005).

VI. WNIOSKI

1. Stosując technikę impulsu różnicowego, elektrodę z wiszącą kroplą rtęci (HMDE) jako elektrodę wskaźnikową i roztwór wodorotlenku sodu jako rozpuszczalnik, opracowano warunki analizy woltamperometrycznej acetazolamidu, atenololu, kofeiny, teobrominy i teofiliny w zawierających je preparatach farmaceutycznych.

2. Stwierdzono, że woltamperometria umożliwia szybkie, precyzyjne i dokładne oznaczenie zawartości substancji leczniczych w 24 spośród 29 analizowanych preparatów farmaceutycznych. Dużą zaletą nowo opracowanych procedur jest możliwość określenia ilości substancji czynnych w preparatach bez konieczności oddzielania ich od matrycy.

3. Wyniki oznaczeń woltamperometrycznych okazały się za wysokie w przypadku teofiliny w tabletkach Atenolol 100. Natomiast w przypadku tabletek Coldrex MaxGrip C, Grippostad C i Solphadeine uzyskano zaniżoną ilość kofeiny, i teobrominy w tabletkach Theopaverin. Uzyskane wyniki różniły się istotnie statystycznie od wyników oznaczeń spektrofotometrycznych oraz od ilości substancji czynnej deklarowanej przez wytwórców leków.

4. W celu oceny nowo opracowanych metod woltamperometrycznego oznaczania acetazolamidu, atenololu, kofeiny, teobrominy i teofiliny w badanych, handlowych preparatach farmaceutycznych, przeprowadzono analizę ilościową tych samych preparatów techniką spektrofotometryczną, stosując roztwór wodorotlenku sodu jako rozpuszczalnik.

5. Uzyskane wyniki oznaczeń woltamperometrycznych i spektrofotometrycznych oceniono statystycznie stosując test jednorodności dwóch wariancji F-Snedokora i ocenę istotności różnicy między wynikami uzyskanymi tymi metodami, testem t-Studenta. W obu testach wartość obliczona była mniejsza od wartości krytycznych dla danego poziomu istotności i liczby stopni swobody wskazując, że metoda woltamperometryczna nie różni się w sposób istotny pod względem precyzji od metody spektrofotometrycznej, a różnica między wynikami uzyskanymi zastosowanymi metodami nie jest istotna.

6. W efekcie przeprowadzonych badań potwierdzono fakt, że analiza woltamperometryczna jest dokładną i precyzyjną metodą oznaczania substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych. Ważną zaletą oznaczeń woltamperometrycznych jest niski koszt pojedynczej analizy, mała szkodliwość odczynników stosowanych w analizie oraz krótki czas potrzebny do wykonania pojedynczej analizy.

VII. PIŚMIENNICTWO

- Abo El-Maali N., 2004, *Voltammetric analysis of drugs*, *Bioelectrochemistry*, 64, 99-107.
- Abu Zuhri A.Z., Al-Khalil S., Shubietah R.M., El-Hroub I., 1999, *Electrochemical study on the determination of tinidazole in tablets*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 881-886.
- Abu Zuhri A.Z., Voelter W., 1997, *Application of adsorptive stripping voltammetry for the trace analysis of metals, pharmaceuticals and biomolecules*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360, 1-9.
- Abuirjeie M.A., El-Din M.S., Mahmoud I.I., 1992, *Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in various food products using derivative UV-spectrophotometric techniques and high-performance liquid chromatography*, *Journal of Liquid Chromatography*, 15, 101-125.
- Alemu H., Wagana P., Tseki P.F., 2002, *Voltammetric determination of niclosamide at a glassy carbon electrode*, *Analyst*, 127, 129-134.
- Al-Farawati R., Van den Berg C.M.G., 2001, *Thiols in coastal waters of the western North Sea and English Channel*, *Environmental Science and Technology*, 35, 1902-1911.
- Al-Ghannam S.M., 2006, *A simple spectrophotometric method for the determination of beta-blockers in dosage forms*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 151-156.
- Alonso E., Santos A., Callejon M., Jimenez J.C., 2004, *Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadiamar river basin*, *Chemosphere*, 56, 561-570.
- Altinoz S., Ozer D., Temizer A., Yuksel N., 1994, *Determination of ceftriaxone in aqueous humour and serum samples by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry*, *Analyst*, 119, 1575-1577.
- Altiokka G., Dogrukol-Ak D., Tuncel M., Aboul-Enein H.Y., 2002, *Determination of amlodipine in pharmaceutical formulations by differential-pulse voltammetry with a glassy carbon electrode*, *Archiv der Pharmazie*, 335, 104-108.

- Arai K., Kusu F., Noguchi N., Takamura K., Osawa H., 1996, *Selective determination of chloride and bromide ions in serum by cyclic voltammetry*, *Analytical Biochemistry*, 240, 109-113.
- Arranz A., De Betono S.F., Echevarria C., Moreda J.M., Cid A., Valentin J.F.A., 1999, *Voltammetric and spectrophotometric techniques for the determination of the antihypertensive drug prazosin in urine and formulations*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 797-807.
- Arranz P., Arranz A., Moreda J.M., Cid A., Arranz J.F., 2003, *Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 589-596.
- Aslanoglu M., Peker N., 2003, *Potentiometric and voltammetric determination of methimazole*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 1143-1147.
- Balon N., Kriem B., Weiss M., Rostain J.C., 2002, *GABA (A) receptors in the pars compacta and GABA (B) receptors in the pars reticulata of rat substantia nigra modulate the striatal dopamine release*, *Neurochemical Research*, 27, 373-379.
- Barek J., Cvacka J., Muck A., Quaiserova V., Zima J., 2001, *Electrochemical methods for monitoring of environmental carcinogens*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369, 556-562.
- Barek J., Pumera M., Muck A., Kaderabkova M., Zima J., 1998, *Polarographic and voltammetric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*, *Analytica Chimica Acta*, 393, 141-146.
- Beltagi A.M., 2003, *Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 1079-1088.
- Beltagi A.M., Ghoneim A.M., Radi A., 2002, *Electrochemical reduction of meloxicam at mercury electrode and its determination in tablets*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 795-801.
- de Betono S.F., Arranz G.A., Arranz Valentin J.F., 1999, *UV-spectrophotometry and square wave voltammetry at nafion-modified carbon-paste electrode for the determination of doxazosin in urine and formulations*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 621-630.
- Boyd D., Rodriguez J.R.B., Ordieres A.J.M., Blanco P.T., Smyth M.R., 1994, *Voltammetric study of salbutamol, fenoterol and metaproterenol at unmodified and Nafion-modified carbon paste electrode*, *Analyst*, 119, 1979-1984.

- Budavari Z., Zeiko R., Marton S., Racz I., 2001, *Study of the theophylline content of single coated particles by gas chromatography/mass spectrometry*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 27, 991-995.
- Campanella L., Bonanni A., Bellantoni D., Favero G., Tomassetti M., 2004, *Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 36, 91-99.
- Conte J.E., Wang G., Lin E.T., Zurlinden E., 2001, *High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods for the determination of ethionamide in human plasma, bronchoalveolar lavage fluid and alveolar cells*, Journal of Chromatography B, 753, 343-353.
- Correia dos Santos M.M., Famila V., Simoes Goncalves M.L., 2002, *Copper-psychoactive drug complexes: a voltammetric approach to complexation by 1,4-benzodiazepines*, Analytical Biochemistry, 303, 111-119.
- Corujo-Antuna J.L., Abad-Villar E.M., Fernandez-Abedul M.T., Costa-Garcia A., 2003, *Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceuticals*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31, 421-429.
- Crespi F., Vecchiato E., Lazzarini C., Gaviraghi G., 2001, *Electrochemical evidence that lacidipine stimulates release of nitrogen monoxide in rat aorta*, Neuroscience Letters, 298, 171-174.
- Csillag K., Vereczkey L., Gachalyi B., 1989, *Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of tolbutamide and its metabolites in human plasma and urine using photodiode-array detection*, Journal of Chromatography B, 490, 355-363.
- Cygański A., 1999, *Podstawy metod elektroanalitycznych*, WNT, wyd. V, Warszawa.
- Czermiński J.B., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A., 1992, *Metody statystyczne dla chemików*, PWN, wyd. II, Warszawa.
- Dogrukol-Ak D., Zaimoglu V., Tuncel M., 1999, *Voltammetry of trazodone by platinum electrode and its determination in tablets using DP technique in the rotating conditions*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 7, 215-220.
- Doherty M.D., Gratton A., 1999, *Effects of medial prefrontal cortical injections of GABA receptor agonists and antagonists on the local and nucleus accumbens dopamine responses to stress*, Synapse, 32, 288-300.

- Dyke T.M., Sams R.A., 1998, *Detection and determination of theobromine and caffeine in urine after administration of chocolate-coated peanuts to horses*, Journal of Analytical Toxicology, 22, 112-116.
- El-Gindy A., Emara S., Mostafa Ah., 2005, *HPLC and chemometric-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of atenolol, amiloride hydrochloride and chlorthalidone*, Farmaco, 60, 269-278.
- El-Hefnawey G.B., El-Hallag I.S., Ghoneim E.M., Ghoneim M.M., 2004, *Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, 75-86.
- Erk N., 2000, *Assay of ephedrine hydrochloride and theophylline in pharmaceutical formulations by differential-derivative spectroscopy*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23, 255-261.
- Erk N., 2003, *Voltammetric and HPLC determination of dorzolamide hydrochloride in eye drops*, Pharmazie, 58, 870-873.
- Erk N., Biryol I., 2003, *Voltammetric and HPLC techniques for the determination of paroxetine hydrochloride*, Pharmazie, 58, 699-704.
- European Agency for the Evaluation of Medical Products “Note for Guidance on Parametric Release”, 2001, EMEA/CPMP/QWP/3015/99, London.
- Farghaly O.A., El-Wadood H.M., Ghandour M.A., 1999, *Anodic adsorptive stripping voltammetric determination of the anesthetic drug: methohexital sodium*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21, 233-240.
- Farmakopea Polska VI*, 2002, Wydawnictwo Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Warszawa.
- Fauler G., Leis H.J., Schalamon J., Muntean W., Gleispach H., 1996, *Method for the determination of vitamin K1(20) in human plasma by stable isotope dilution/gas chromatography/mass spectrometry*, Journal of Mass Spectrometry, 31, 655-660.
- Ferreira C.F., Ortiz C.S., 2002, *Simultaneous spectrophotometric determination of phenilpropanolamine HCl, caffeine and diazepam in tablets*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29, 811-818.
- Ferri E., Gattavecchia E., Feroci G., Battino M., 1994, *Interaction between reactive oxygen species and coenzyme Q10 in an aprotic medium: A cyclic voltammetry study*, Molecular Aspects of Medicine, 15, 83-88.

- Fijałek Z., Chodkowski J., Warowna M., 1992, *Polarographic examination of drugs derived from imidazol. I. Clotrimazole and ketoconazole*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 49, 1-5.
- Foenander T., Birkett D.J., Miners J.O., Wing L.M., 1980, *The simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in plasma by high performance liquid chromatography*, *Clinical Biochemistry*, 13, 132-134.
- Galeano Diaz T., Duran Meras I., Guiberteau Cabanillas A., Alexandre Franco M.F., 2004, *Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least squares calibration: Analysis in vegetable oil samples*, *Analytica Chimica Acta*, 511, 231-238.
- Ghandour M.A., Aboul Kasim E., Ali A.M.M., El-Haty M.T., Ahmed M.M., 2001, *Adsorptive stripping voltammetric determination of antihypertensive agent: diltiazem*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 443-451.
- Ghoneim M.M., Issa R., Tawfik A., 2001a, *Assay of terfenadine in pharmaceutical formulation and human plasma by adsorptive stripping voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 593-598.
- Ghoneim M.M., Khashaba P.Y., Beltagi A.M., 2002a, *Determination of trimetazidine HCl by adsorptive stripping square-wave voltammetry at a glassy carbon electrode*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 235-241.
- Ghoneim M.M., Mabrouk M.M., Hassaneim A.M., Tawfik A., 2001b, *Polarographic behaviour of loratadine and its direct determination in pharmaceutical formulation and human plasma by cathodic adsorptive stripping voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 933-939.
- Ghoneim M.M., Mabrouk M.M., Tawfik A., 2002b, *Direct determination of praziquantel in pharmaceutical formulations and human plasma by cathodic adsorptive stripping differential-pulse voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1311-1318.
- Ghoneim M.M., Radi A., Beltagi A.M., 2001c, *Determination of Norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on a glassy carbon electrode*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 205-210.
- Ghoneim M.M., Tawfik A., Khashaba P.Y., 2003, *Cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetric determination of nifedipine drug in bulk, pharmaceutical formulation and human serum*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 369-375.

- Ghoneim M.M., Tawfik A., Radi A., 2002c, *Assay of dipyrindamole in human serum using cathodic adsorptive square-wave stripping voltammetry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 374, 289-293.
- Gomez de Balugera Z., Arantzazu Goicolea M., Barrio R.J., 1994, *Joint determination of todralazine and acetazolamide in human serum by differential pulse polarography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 12, 883-887.
- Goyal R.N., Gupta V.K., Oyama M., Bachheti N., 2006, *Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode*, Electrochemistry Communications, 8, 65-70.
- Goyal R.N., Singh S.P., 2006, *Voltammetric determination of atenolol at C₆₀ – modified glassy carbon electrodes*, Talanta, 69, 932-937.
- Gratteri P., Cruciani G., 1999, *Experimental design and multivariate calibration in the development, set-up and validation of a differential pulse polarographic and UV spectrophotometric method for the simultaneous plasmatic determination of the therapeutic metronidazole-pefloxacin combination*, Analyst, 124, 1683-1688.
- Hahn Y., Lee H.Y., 2004, *Electrochemical behavior and square wave voltammetric determination of doxorubicin hydrochloride*, Archives of Pharmacal Research, 27, 31-34.
- Halfpenny D.M., Callado L.F., Hopwood S.E., Bamigbade T.A., Langford R.M., Stamford J.A., 1999, *Effects of tramadol stereoisomers on norepinephrine efflux and uptake in the rat locus coeruleus measured by real time voltammetry*, British Journal of Anaesthesia, 83, 909-915.
- Hall S.R., Milne B., Loomis Ch., 1999, *Spinal action of ketorolac, S(+)- and R(-)- ibuprofen on non-noxious activation of the catechol oxidation in the rat locus coeruleus: evidence for central role of prostaglandins in the strychnine model of allodynia*, Anesthesiology, 90, 165-173.
- Hammam E., 2002, *Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 651-659.
- Hammam E., 2004, *Behavior and quantification studies of amiloride drug using cyclic and square-wave adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, 1109-1116.
- Hammam E., Tawfik A., Ghoneim M.M., 2004, *Adsorptive stripping voltammetric quantification of the antipsychotic drug clozapine in bulk form, pharmaceutical*

- formulation and human serum at a mercury electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 36, 149-156.
- Hardcastle J.L., West C.E., Compton R.G., 2002, *The membrane free sonoelectro-analytical determination of trace levels of lead and cadmium in human saliva*, Analyst, 127, 1495-1501.
- Hart J.P., Wring S.A., Morgan I.C., 1989, *Pre-concentration of vitamin K1 (phylloquinone) at carbon paste electrodes and its determination in plasma by adsorptive stripping voltammetry*, Analyst, 114, 933-937.
- Hassan S.S., Abou-Sekkina M.M., El-Ries M.A., Wassel A., 2003, *Polymeric matrix membrane sensors for sensitive potentiometric determination of some beta-blockers in pharmaceutical preparations*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32, 175-180.
- Herrmann W., Schorr H., Purschwitz K., Rassoul F., Richter V., 2001, *Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians*, Clinical Chemistry, 47, 1094-1101.
- Hishida R., 1996, *A neuropharmacological study of carbamazepine on dopaminergic system in the rat striatum*, Hirosaki Medical Journal, 48, 101-108.
- Hotta H., Ueda M., Nagano S., Tsujino Y., Koyama J., Osakai T., 2002, *Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms*, Analytical Biochemistry, 303, 66-72.
- Hu C., He Q., Li Q., Hu S., 2004, *Enhanced reduction and determination of trace thyroxine at carbon paste electrode in the presence of trace cetyltrimethylammonium bromide*, Analytical Science, 20, 1049-1054.
- Inam R., Somer G., 2000, *A direct method for the determination of selenium and lead in cow's milk by differential pulse stripping voltammetry*, Food Chemistry, 69, 345-350.
- Instrukcja Metrohm 8.757.8013, 1998, Metrohm Ltd., Szwajcaria.
- Ioannides X., Economou A., Voulgaropoulos A., 2003, *A study of the determination of the hypertensive drug captopril by square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33, 309-316.
- Jain S., Jain N.K., Pitre K.S., 2003, *Electrochemical analysis and analgesic behavior of Zn(II)-baclofen complex*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31, 1035-1039.
- Jelen F., Vetterl V., Belusa P., Hason S., 2000, *Adsorptive stripping analysis of DNA with admittance detection*, Electroanalysis, 12, 987-992.

- Kasim E.A., Ghandour M.A., El-Haty M.T., Ahmed M.M., 2002, *Determination of verapamil by adsorptive stripping voltammetry in urine and pharmaceutical formulations*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 921-929.
- Kilmartin P.A., Zou H., Waterhouse A.L., 2001, *A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1957-1965.
- Kleszczewska E., Mielech-Łukasiewicz K., 2002, *Elektrochemiczne badania procesu utleniania witaminy C techniką woltamperometryczną*, Farmacja Polska, 58, 920-922.
- Kleszczewski T., Kleszczewska E., 2002, *Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in biological matters*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29, 755-759.
- Kocjan R., 2002, *Chemia analityczna, Analiza instrumentalna*, PZWL, wyd. II, Warszawa.
- Lau O.W., Luk S.F., Cheung Y.M., 1989, *Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode*, Analyst, 114, 1047-1051.
- Lewis E.C., Johnson D.C., 1978, *Evaluation of glassy-carbon electrode for amperometric detection of selected methylxanthines in serum after their separation by reversed-phase chromatography*, Clinical Chemistry, 24, 1711-1719.
- Lima J.L., Loo D.V., Delerue-Matos C., da Silva A.S., 1999, *Electrochemical behaviour of venlafaxine and its determination in pharmaceutical products using square wave voltammetry*, Farmaco, 54, 145-148.
- Locatelli C., Torsi G., 2001, *Heavy metal determination in aquatic species for food purposes*, Annali di Chimica, 91, 65-72.
- Lutka A., Kokot Z., Powidzka H., 2004, *Validation of electrochemical determination of zinc in selected pharmaceutical preparations*, Acta Poloniae Pharmaceutica, 61, 243-247.
- Ly S.Y., Jung Y.S., Kim M.H., Han I.K., Jung W.W., Kim H.S., 2004, *Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry*, Mikrochimica Acta, 146, 207-213.
- Łomnicki A., 1999, *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*, PWN, wyd. II, Warszawa.
- Marian I.O., Bonciocat N., Sandulescu R., Cecilia F., 2001, *Direct voltammetry for vitamin B₂ determination in aqueous solution using glassy carbon electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 24, 1175-1179.

- Moane S., Smyth M.R., O'Keeffe M., 1996, *Differential-pulse voltammetric determination of clenbuterol in bovine urine using a Nafion-modified carbon paste electrode*, *Analyst*, 121, 779-784.
- Muszalska I., Zając M., Wróbel G., Nogowska M., 2000, *UV/Vis spectrophotometric methods for determination of caffeine and phenylephrine hydrochloride in complex pharmaceutical preparations, validation of the methods*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 57, 247-252.
- Nakaminami T., Ito S., Kuwabata S., Yoneyama H., 1999, *Amperometric determination of total cholesterol at gold electrodes covalently modified with cholesterol oxidase and cholesterol esterase with use of thionin as an electron mediator*, *Analytical Chemistry*, 71, 1068-1076.
- Nigovic B., Simunic B., 2003, *Voltammetric assay of azithromycin in pharmaceutical dosage forms*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 197-202.
- Obendorf D., Stubauer G., 1995, *Adsorptive stripping voltammetry of nicardipine at a HMDE; determination of trace levels nicardipine in blood and urine*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 1339-1348.
- Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J., Van den Hoop M.A., 2003, *Lead speciation in artificial human digestive fluid*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 107-115.
- Opoka W., Krzek J., Kierszniewska A., Rzeszutko W., 2004, *Direct determination of Pb(II) and Cd(II) ions as impurities in some homeopathic drugs by using stripping voltammetry*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61, 3-7.
- Ordieres A.J.M., Garcia A.C., Blanco P.T., Smyth W.F., 1988, *An electroanalytical study of the anticancer drug dacarbazine*, *Analytical Chimica Acta*, 202, 141-149.
- Ozaltin N., Yardimci C., Suslu I., 2002, *Determination of nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 573-582.
- Palacios F.J., Mochon M.C., Sanchez J.C., Carranza J.H., 2003, *Adsorptive stripping voltammetric determination of cefepime at the mercury electrode in human urine and cerebrospinal fluid, and differential pulse polarographic determination in serum*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 1854-1859.
- Pan T.C., Horng C.J., Lin S.R., Lin T.H., Huang C.W., 1993, *Simultaneous determination of Zn, Cd, Pb, and Cu in urine of patients with blackfoot disease using anodic stripping voltammetry*, *Biological Trace Element Research*, 38, 233-241.

- Pawlaczyk J., Zając M., 1999, *Walidacja metod analizy chemicznej. Przykłady walidacji metod*, Wydawnictwo Akademii Medycznej w Poznaniu, Poznań.
- Peel J.W., Reddy K.J., Sullivan B.P., Bowen J.M., 2003, *Electrocatalytic reduction of nitrate in water*, *Water Research*, 37, 2512-2519.
- Pereira F.C., Stradiotto N.R., Zanoni M.V., 2002, *Voltammetric characteristics of miconazole and its cathodic stripping voltammetric determination*, *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 74, 425-432.
- Pereira M.C., Pereira M.L., Sousa J.P., 1998, *Evaluation of nickel toxicity on liver, spleen and kidney of mice after administration of high-dose metal ion*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 40, 40-47.
- Pharmindex, Kompendium Leków*, 2006, Wydawnictwo CMP Media Poland, Warszawa.
- Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlewska A., 2007, *Leki współczesnej terapii*, Wydawnictwo Split Trading, wyd. XVII, Warszawa.
- Pravda M., Vytras K., 1996, *Application of stripping voltammetry to trace lead analysis in intermediates and final products of syntheses of pharmaceuticals*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 765-771.
- Prieto J.A., Jimenez R.M., Alonso R.M., 2003, *Square wave voltammetric determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations*, *Farmaco*, 58, 343-350.
- Queirolo F., Stegen S., Restovic M., Paz M., Ostapczuk P., Schwuger M.J., Munoz L., 2000, *Total arsenic, lead, and cadmium levels in vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile*, *Science of the Total Environment*, 255, 75-84.
- Radi A., 2001, *Stripping voltammetric determination of indapamide in serum at castor oil-based carbon paste electrodes*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 413-419.
- Radi A., 2003a, *Anodic voltammetric assay of lansoprazole and omeprazole on a carbon paste electrode*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 1007-1012.
- Radi A., 2003b, *Square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry of pantoprazole*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 687-692.
- Radi A., 2003c, *Anodic voltammetric assay of lansoprazole and omeprazole on carbon paste electrode*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 1007-1012.
- Radi A., Ghoneim M., Beltagi A., 2001, *Cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetry of the anti-inflammatory drug meloxicam*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1257-1260.

- Raghunath R., Tripathi R.M., Mahapatra S., Sadasivan S., 2002, *Selenium levels in biological matrices in adult population of Mumbai, India*, Science of the Total Environment, 285, 21-27.
- Raines D.A., Yusuf A., Jabak M.H., Ahmed W.S., Karcioğlu Z.A., El-Yazigi, 1998, *Simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of azithromycin and two of its metabolites in human tears and plasma*, Therapeutic Drug Monitoring, 20, 680-684.
- Riahi S., Mousavi M.F., Bathaie S.Z., Shamsipur M., 2005, *A novel potentiometric sensor for selective determination of theophylline: Theoretical and practical investigations*, Analytica Chimica Acta, 548, 192-198.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 3 grudnia 2002, Dz. U. Nr 224, Poz. 1882, załącznik, „Wymagania Dobrej Praktyki Wytwarzania”, część XVII, pkt. 3.
- Sagirli O., Cetin S.M., Onal A., 2006, *Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 42, 618-624.
- Sanchez Villegas J.M., Piqueras J., Nicolau I., Pico M., Soler J.A., Monasterio J., 1992, *Resistance to antivitamins K*, Sangre, 37, 297-298.
- Saponjic R.M., Mueller K., Krug D., Kunko P.M., 1994, *The effects of haloperidol, scopolamine, and MK-801 on amphetamine-induced increases in ascorbic and uric acid as determined by voltammetry in vivo*, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 48, 161-168.
- Satinsky D., Neto I., Solich P., Sklenakova H., Conceicao M., Montenegro B.S., Araujo A.N., 2004, *Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets*, Journal of Separation Science, 27, 529-536.
- Sell E., 1975, *Potentiometric determination of theopaverin components in nonaqueous media*, Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy, 27, 561-565.
- Senturk Z., Ozkan S.A., Ozkan Y., Aboul-Enein H.Y., 2000, *Voltammetric investigation of oxidation of zuclopenthixol and application to its determination in dosage forms and in drug dissolution studies*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 22, 315-323.
- Shih Y., Zen J.M., Yang H.H., 2002, *Determination of codeine in urine and drug formulations using a clay-modified screen-printed carbon electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29, 827-833.

- Shubietah R.M., Zuhri A.Z.A., Fogg A.G., 1994, *Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of theophylline at a hanging mercury drop electrode*, Analyst, 119, 1967-1970.
- Shukla I.C., Dwivedi P.K., Kumar S., Singh B.K., Dubey A., 2006, *A new HPLC method for the determination of ciprofloxacin and tinidazole in their pharmaceutical preparations*, Journal of the Indian Chemical Society, 83, 1163-1164.
- Simonovska B., Andresek S., Vovk I., Prosek M., 1999, *High-performance thin-layer chromatography method for monitoring norfloxacin residues on pharmaceutical equipment surfaces*, Journal of Chromatography A, 862, 209-215.
- Smyth M.R., Vos J.G., 1992, *Analytical voltammetry*, Elsevier, vol. 27, New York.
- do Socorro Maia Quintino M., Corbo D., Bertotti M., Angnes L., 2002, *Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions*, Talanta, 58, 943-949.
- Song D., Zhang S., Kohlhof K., 1994, *Determination of chlordiazepoxide in mouse plasma by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, 660, 95-101.
- Song J.F., He P., Guo W., 2002, *Study on the polarographic catalytic wave of vitamin P in the presence of persulfate and its application*, Analytical Biochemistry, 304, 212-219.
- Stoica A.L., Babaua G.R., Iorgulescu E.E., Marinescu D., Baiulescu G.E., 2002, *Differential pulse cathodic stripping voltammetric determination of selenium in pharmaceutical products*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 1425-1429.
- Suchacz B., 2006, *Wybrane techniki woltamperometrii inwersyjnej i cyklicznej w analizie substancji leczniczych*, Farmacja Polska, 62, 463-469.
- Szczepaniak W., 2005, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, wyd. V, Warszawa.
- Szysko E., 1982, *Instrumentalne metody analityczne*, PZWL, wyd. V, Warszawa.
- Tan X., Hu J., Li Q., 1997, *Adsorptive stripping voltammetry of bleomycin*, Analyst, 122, 991-994.
- Tavakoli N., Varshosaz J., Dorkoosh F., Zargarzadeh M.R., 2007, *Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 325-329.

- Teixeira M.F., Moraes F.C., Cavaleiro E.T., Bocchi N., 2003, *Differential pulse anodic voltammetric determination of lithium ions in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with spinel-type manganese oxide*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31, 537-543.
- Thomas J.B., Yen J.H., Schantz M.M., Porter B.J., Sharpless K.E., 2004, *Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3259-3263.
- Tocher J.H., Edwards D.I., 1994, *Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases*, Biochemical Pharmacology, 48, 1089-1094.
- Torres R. F., Mochon M. C., Sanchez J.C., Lopez M.A.B., Perez A.G., 2002, *Electrochemical behaviour and determination of acrivastine in pharmaceuticals and human urine*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 1215-1222.
- Trnkova L., Kizek R., Dracka O., 2002, *Elimination voltammetry of nucleic acids on silver electrodes*, Bioelectrochemistry, 55, 131-133.
- Truzzi C., Lambertucci L., Gambini G., Scarponi G., 2002, *Optimization of square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) for the simultaneous determination of Cd, Pb, and Cu in seawater and comparison with differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV)*, Annali di Chimica, 92, 313-326.
- Uslu B., Demircigil B.T., Ozkan S.A., Senturk Z., Aboul-Enein H.Y., 2001, *Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablet formulations by differential pulse voltammetry*, Pharmazie, 56, 938-942.
- Vela M.H., Quinaz Garcia M.B., Montenegro M.C., 2001, *Electrochemical behaviour of sertraline at a hanging mercury drop electrode and its determination in pharmaceutical products*, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 369, 563-566.
- Wang Ch.Y., Hu X.Y., Jin G.D., Leng Z.Z., 2002, *Differential pulse adsorption voltammetry for determination of procaine hydrochloride at a pumice modified carbon paste electrode in pharmaceutical preparations and urine*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 131-139.
- Wieczorek W.J., Kruk Z.L., 1994, *A quantitative comparison on the effects of benztropine, cocaine and nomifensine on electrically evoked dopamine overflow and rate of re-uptake in the caudate putamen and nucleus accumbens in the rat brain slice*, Brain Research, 657, 42-50.

- Wieniawski W., 2004, *Nowe podejście do kontroli leków w przemyśle farmaceutycznym – kontrola procesu w miejsce kontroli produktu końcowego*, Farmacja Polska, 60, 1049-1057.
- Xu X., Pang K.S., 1987, *High-performance liquid chromatographic method for the quantitation of salicylamide and its metabolites in biological fluids*, Journal of Chromatography A, 420, 313-327.
- Yardimci C., Ozaltin N., 2001, *Electrochemical studies and differential pulse polarographic analysis of lansoprazole in pharmaceuticals*, Analyst, 126, 361-366.
- Yardimci C., Ozaltin N., 2004, *Electrochemical studies and square-wave voltammetric determination of fenofibrate in pharmaceutical formulations*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 495-498.
- Yarnitzky C., Smyth W.F., 1991, *Square wave polarographic and voltammetric analysis of selected electroreducible drugs*, International Journal of Pharmaceutics, 75, 161-169.
- Yilmaz N., Biryol I., 1998, *Anodic voltammetry of cefotaxime*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17, 1335-1344.
- Yilmaz N., Ozkan S.A., Uslu B., Senturk Z., Biryol I., 1998, *Determination of terbutaline based on oxidation by voltammetry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17, 349-355.
- Yu S., Li S., Yang H., Lee F., Wu J.T., Qian M.G., 2005, *A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19, 250-254.
- Zarghi A., Shafaati A., 2002, *Rapid determination of acetazolamide in human plasma*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28, 169-172.
- Zejc A., Gorczyca M., 2002, *Chemia leków*, PZWL, wyd. II, Warszawa.
- Zen J.M., Ting Y.S., 1997, *Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode*, Analytica Chimica Acta, 342, 175-180.
- Zen J.M., Ting Y.S., Shih Y., 1998, *Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode*, Analyst, 123, 1145-1147.
- Zen J.M., Yu T.Y., Shih Y., 1999, *Determination of theophylline in tea and drug formulation using a Nafion/lead – ruthenium oxide pyrochlore chemically modified electrode*, Talanta, 50, 635-640.

- Zhang X.Z., Gan Y.R., Zhao F.N., 2004, *Determination of salbutamol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system*, Journal of Chromatographic Science, 42, 263-267.
- Zhang Z.Q., Chen S.Z., Huang W.L., Xu F., 1993, *Polarographic determination of carbamazepine in the presence of sodium lauryl sulfate*, Acta Pharmaceutica Sinica, 28, 312-316.
- Zimmerman J.B., Kennedy R.T., Wightman R.M., 1992, *Evoked neuronal activity accompanied by transmitter release increases oxygen concentration in rat striatum in vivo but not in vitro*, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 12, 629-637.
- Zufiaurre R., Olivar A., Chamorro P., Nerin A., Callizo A., 1998, *Speciation of metals in sewage sludge for agricultural uses*, Analyst, 123, 255-259.