

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Baptistová

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ PROKAINU
V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

The Comparison of Methods for Determination of Procaine
in Medical Formulations

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. května 2014.

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále děkuji svým rodičům a sestře za veškerou podporu při studiu.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat čtyři analytické metody pro stanovení prokainu hydrochloridu v léčivých přípravcích z hlediska preciznosti a pravdivosti stanovení a jeho časové a finanční náročnosti. Vybranými metodami jsou: bromátometrická titrace, titrace dusitanem sodným, UV spektrofotometrie a VIS spektrofotometrie. Analyzovány byly tři injekční roztoky o různých koncentracích (0,2%, 0,5% a 1,0% prokainu). Nejpreciznější výsledky poskytovalo stanovení VIS spektrofotometrií, zatímco nejméně precizní bylo stanovení pomocí UV spektrofotometrie. Pravdivé výsledky poskytly obě titrační stanovení a UV spektrofotometrie. Finančně nejvýhodnější byla UV spektrofotometrie, naopak nejdražší metodou bylo titrační stanovení dusitanem sodným. Časově nejúspornější byla bromátometrická titrace, naopak časově nejnáročnější metodou byla VIS spektrofotometrie.

Klíčová slova: prokain, bromátometrická titrace, titrace dusitanem sodným, UV a VIS spektrofotometrie.

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to compare four analytical methods for determination of procaine hydrochloride in medical formulations in terms of precision and measurement trueness, and its time, and financial cost. The selected methods are: titration with potassium bromate, titration with sodium nitrite, UV spectrophotometry, VIS spectrophotometry. Three injection solutions of different concentrations (0.2%, 0.5%, and 1.0% of procaine) were analysed. VIS spectrophotometry provides the most precise results, whereas determination by UV spectrophotometry is the least precise. Measurement trueness is found for UV spectrophotometry and both titrations. UV spectrophotometry is the cheapest method, while titration with sodium nitrite is the most expensive method. Titration with potassium bromate is the least time-consuming method, while VIS spectrophotometry is the most time-consuming method.

Keywords: procaine, bromatometric titration, titration with sodium nitrite, UV and VIS spectrophotometry

Obsah

1	Úvod a teoretická část	7
1.1	Cíl bakalářské práce	7
1.2	Prokain	7
1.2.1	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti	7
1.2.2	Syntéza	8
1.2.3	Farmakologie	9
1.2.4	Způsob podání a dávkování	9
1.2.5	Dostupné lékové formy	10
1.3	Metody pro stanovení prokainu hydrochloridu	10
1.4	Principy vybraných metod	11
1.4.1	Bromátometrická titrace	11
1.4.2	Titrace dusitanem sodným	12
1.4.3	UV spektrofotometrie	12
1.4.4	VIS spektrofotometrie	13
2	Experimentální část	14
2.1	Analyzované lékové formy	14
2.2	Použité chemikálie	15
2.3	Vlastní stanovení a vyhodnocení	15
2.3.1	Bromátometrická titrace	15
2.3.2	Titrace dusitanem sodným	17
2.3.3	UV Spektrofotometrie	19
2.3.4	VIS Spektrofotometrie	20
2.4	Statistické zpracování naměřených hodnot	22
3	Výsledky a diskuse	24
3.1	Bromátometrická titrace	24
3.2	Titrace dusitanem sodným	25
3.3	UV spektrofotometrie	26
3.4	VIS spektrofotometrie	28
3.5	Vyhodnocení vybraných metod	30
3.5.1	Vyhodnocení preciznosti a pravdivosti stanovení	30
3.5.2	Vyhodnocení finanční a časové náročnosti	32
4	Závěr	33
	Bibliografie	34

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>A</i>	absorbance
<i>c</i>	koncentrace [mol dm^{-3}]
<i>E</i>	potenciál [V]
<i>F</i>	ředící faktor
<i>L</i> _{1,2}	interval spolehlivosti
<i>m</i>	hmotnost [g]
<i>M</i>	molární hmotnost [g mol^{-1}]
<i>s_r</i>	relativní směrodatná odchylka mediánu
<i>V</i>	objem [dm^3]
<i>w</i>	obsah složky v hmotnostních procentech

1 Úvod a teoretická část

1.1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je porovnat čtyři vybrané metody (bromátometrická titrace, titrace dusitanem sodným, UV spektrofotometrie a VIS spektrofotometrie) pro stanovení prokainu ve třech injekčních roztocích o různých koncentracích z hlediska preciznosti, pravosti, časově a finanční náročnosti.

1.2 Prokain

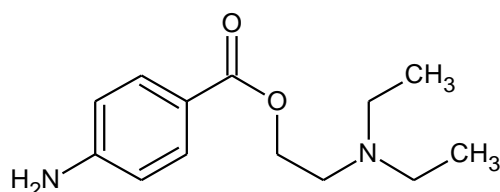
Prokain (také procain, novocain, aj.) je lokálním anestetikem esterového typu[1, 2]. Poprvé byl připraven Alfredem Einhornem v roce 1905. Jedná se o první syntetické lokální anestetikum, které plně nahradilo do té doby běžně užívaný kokain a v první polovině 20. století se stalo převládajícím přípravkem toho typu. Pro rozpustnost ve vodě se obvykle terapeuticky užívá roztoků v podobě hydrochloridů, a to nejčastěji o koncentracích 0,2–1,0%. Zároveň se prokain využívá jako referenční látka pro porovnání účinků a toxicity ostatních lokálních anestetik.

1.2.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

Prokain je aminoester kyseliny *p*-aminobenzoové, systematickým názvem 2-(diethylamino)ethyl-4-aminobenzoát, sumární vzorec $C_{13}H_{20}N_2O_2$. Strukturní vzorec

prokainu je uveden na obr. 1.1. Molekula prokainu obsahuje tedy lipofilní část (benzenamin), střední řetězec (ethylester) a hydrofilní část (diethylamin).

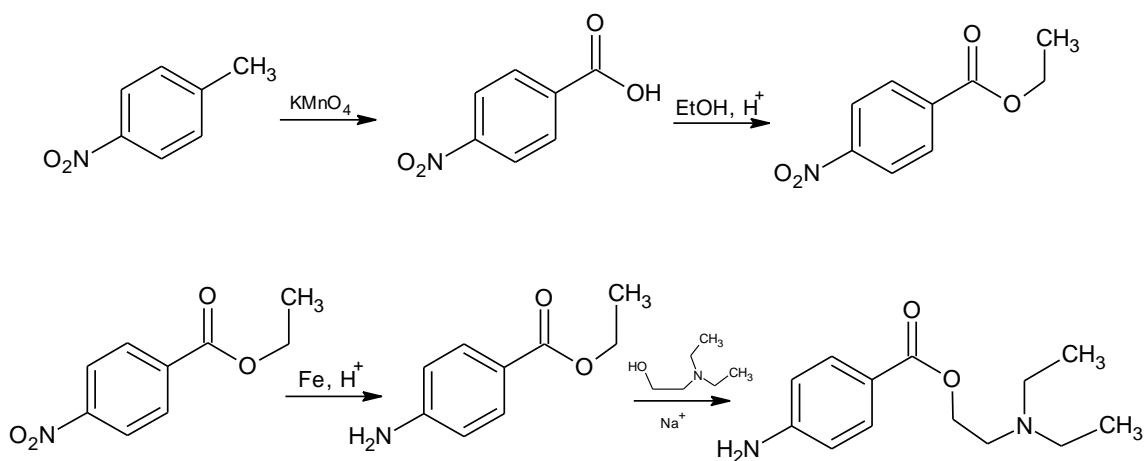
Ve formě hydrochloridu má molární hmotnost $272,77 \text{ g mol}^{-1}$, jedná se o bílý či téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly [3, 4]. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v 96% ethanolu a prakticky nerozpustný v etheru. Jeho teplota tání je $154 \text{ }^\circ\text{C}$ a $158 \text{ }^\circ\text{C}$. Hodnota pK_b prokainu při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ je 5,0.



Obr. 1.1 Strukturální vzorec prokainu

1.2.2 Syntéza

Schéma syntézy prokainu je znázorněno na obr. 1.2. Výchozí látkou pro tuto syntézu je *p*-nitrotoluen, jehož oxidací se získá *p*-nitrobenzoová kyselina [4]. Ta esterifikací s ethanolem a následnou redukcí nitroskupiny poskytne ethyl-4-aminobenzoát (tj. benzokain). Prokain se získá z benzokainu bazicky katalyzovanou trans esterifikací 2-(diethylamino)ethanolem.



Obrázek 1.2 Syntéza prokainu z *p*-nitrotoluenu (převzato z [4]).

1.2.3 Farmakologie

Principem účinku prokainu je reverzibilní utlumení až úplná blokáce vedení vzruchu nervovými axony, jež využívají sodíkové kanály pro vznik akčního potenciálu [1, 2]. Léčivo tak vyvolává v blízkosti aplikace místní znecitlivění, tzv. lokální anestezii. Účinnost prokainu je vlivem ionizace závislá na pH, přičemž se zvyšuje se vzrůstajícím pH. K nástupu účinku pak dochází při zablokování alespoň 80 % sodíkových iontových kanálů buněčné membrány nervového vlákna.

Absorpce a distribuce mají význam především pro odeznívání místního znecitlivění, nikoli pro rychlost nástupu účinku. Prokain není metabolizován v místě aplikace a jeho působení je omezeno zředěním v místě podání a absorpcí do systémové cirkulace. Absorpce je v relaci s prokrvením dané tkáně. Samotné lokální anestetikum je obvykle účinné do pěti minut po podání do tkáně, přičemž maximální plazmatická koncentrace je dosažena za deset až čtyřicet pět minut.

Prokain je snadno metabolicky hydrolyzován, a to rozštěpením esterové vazby. Děje se tak již v plazmě vlivem pseudocholinesterasy a dále v játrech. Vzniklé metabolity pak nemají lokálně anestetické účinky. Dospělý člověk hydrolyzuje prokain přibližně v množství 1 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti za minutu.

Asi 2 % z původní dávky prokainu se vylučují močí v nezměněné podobě, 90 % se přeměňuje na *p*-aminobenzoovou kyselinu a 8 % na diethylaminoethanol.

1.2.4 Způsob podání a dávkování

Roztok prokainu hydrochloridu v příslušné koncentraci se zpravidla aplikuje injekčně [1]. Je použitelný pro lokální anestezii infiltrační (aplikace do podkoží a svalstva, tj. do okolí či přímo do místa zákroku) nebo pro svodnou anestezii tenkých nervů a nervových pletení (aplikace do blízkosti nervových kmenů, ve kterých přeruší vedení vzruchu).

Dávka k infiltrační anestezii je až 60 ml 0,5% roztoku prokainu hydrochloridu. Pro periferní svodnou anestezii je dávka 100 ml 0,5% nebo 50 ml 1% roztoku. Maximální denní dávky k infiltrační a svodné anestezii pro dospělého člověka berou

v úvahu předpokládaný rozklad prokainu plazmatickými esterázami v průběhu anestezie: 250 ml 0,5% nebo 100 ml 1% roztoku prokainu hydrochloridu.

1.2.5 Dostupné lékové formy

V České republice jsou běžně k dostání injekční roztoky s obsahem 0,2 % nebo 0,5 % prokainu hydrochloridu (Ardeapharma). Dále 1,0% roztoky používané zejména ve veterinární oblasti (Bioveta). Ve Francii jsou vyráběny také injekční roztoky 1% a 2% (CDM Lavoisier) [5–7].

Injekční roztoky obsahují vedle účinné látky také chlorid sodný a thiosíran sodný pro úpravu osmotického tlaku roztoku [2]. Dále obsahují kyselinu chlorovodíkovou pro zajištění nižšího pH, při kterém se molekula vyskytuje v ionizované podobě a je tudíž stabilnější.

V neporušeném obalu je injekční roztok prokainu hydrochloridu stabilní po dobu 12 měsíců [6]. Prokain v roztocích se rozkládá hydrolýzou, tedy mechanismem obdobným jeho metabolismu. Po otevření je chemická a fyzikální stabilita prokázána po dobu 48 hodin při 25 °C. Z mikrobiologického hlediska je ovšem žádoucí používat injekční roztoky vždy bezprostředně po otevření.

Účinnost orálních lékových forem a potravinových doplňků s obsahem prokainu je sporná [8, 9].

1.3 Metody pro stanovení prokainu hydrochloridu

Je popsáno mnoho metod pro stanovení prokainu hydrochloridu. Mezi nejběžnější metody patří spektrofotometrické stanovení v UV nebo VIS oblasti, elektrometrická titrace, fluorimetrické a chemiluminiscenční metody [10]. Dále je možno využít vysokoúčinnou kapalinovou nebo plynovou chromatografii. Z elektrochemických metod lze zmínit diferenční pulsní adsorpční voltametrii [11] a vysokorychlostní pulsní

polarografii zpravidla za použití modifikovaných elektrod [12]. Tyto elektrochemické metody vykazují detekční limit v koncentracích $\mu\text{mol l}^{-1}$ až nmol l^{-1} .

Obsah prokainu v tělních tekutinách se nejčastěji stanovuje pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Detekční limit metody v plasmě či moči je $80 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit. [3]).

Lékopisnou metodou pro stanovení prokainu hydrochloridu je titrace primárních aromatických aminů dusitanem sodným s elektrochemickou indikací konce titrace [13].

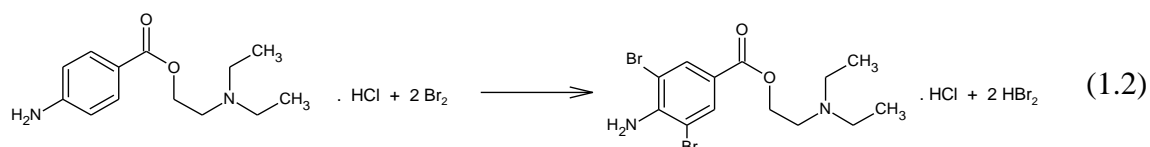
1.4 Principy vybraných metod

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány čtyři metody pro stanovení prokainu. Jsou jimi: bromátometrická titrace a titrace dusitanem sodným, UV a VIS spektrofotometrie.

1.4.1 Bromátometrická titrace

Prokain hydrochlorid lze stanovit přímou bromátometrickou titrací s visuální indikací konce titrace. Ta probíhá v prostředí kyseliny chlorovodíkové v přítomnosti nadbytku bromidu, který se k analytu přidává před začátkem titrace [14].

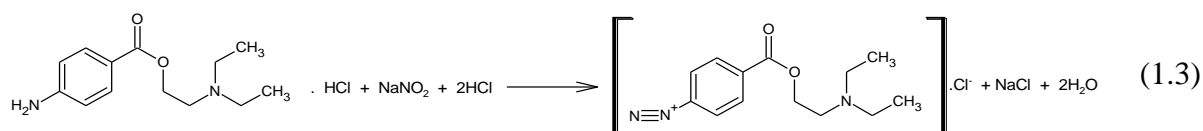
Reakcí odměrného roztoku bromičnanu s bromidem vzniká hned od počátku titrace brom, který reaguje s analytem.



K titrovanému roztoku se přidává methylová oranž (popř. methylová červeň) jako indikátor, který se odbarví při nadbytku elementárního bromu. Přímá titrace je tedy možná díky tomu, že rychlost reakce bromu s prokainem hydrochloridem je vyšší nežli reakce bromu s indikátorem.

1.4.2 Titrace dusitanem sodným

Prokain hydrochlorid jakožto primární aromatický amin podléhá v kyselém prostředí za nízké teploty diazotaci s odměrným roztokem dusitanu sodného za vzniku příslušné diazoniové soli [13].



Předpokladem pro použití tzv. diazotační metody stanovení je, aby diazotace aminoskupiny probíhala dostatečně rychle a kvantitativně, a vzniklá diazoniová sůl byla za chladu stálá. Obecně je vhodné při diazotačních reakcích titrovat za nižší teploty, tj. mezi 0 až 5 °C, kdy je analyt chlazen ledem. Kyselé prostředí se zajistí přidávkem kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové k analytu.

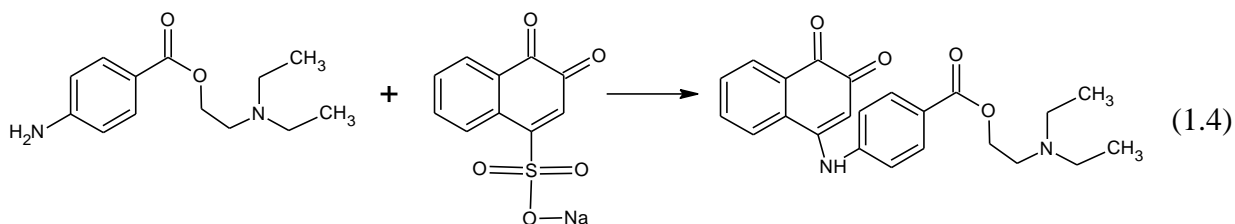
Bod ekvivalence lze nejnázne nalézt právě potenciometricky za použití indikační platinové a referenční argenticchloridové elektrody.

1.4.3 UV spektrofotometrie

Prokain hydrochlorid má v ultrafialové oblasti absorpční maximum při vlnové délce 294 nm, čehož se využívá při přímém UV spektrofotometrickém stanovení [3].

1.4.4 VIS spektrofotometrie

Principem spektrofotometrického stanovení prokainu hydrochloridu ve viditelné oblasti spektra je skutečnost, že tvoří s 1,2-naftochinon-4-sulfonovou kyselinou lososově růžový produkt.



Ten pak vykazuje maximální absorpci při vlnové délce 484 nm (cit. [10]).

2 Experimentální část

2.1 Analyzované léčivé formy

Analyzovanými léčivými formami s obsahem prokainu hydrochloridu byly následující injekční roztoky:

- injekční roztok prokainu hydrochloridu 0,2%, Ardeapharma, číslo šarže: 0303080713
- injekční roztok prokainu hydrochloridu 0,5%, Ardeapharma, číslo šarže: 0103030913
- injekční roztok prokainu hydrochloridu 1%, Spofa Praha, číslo šarže: 4010279



Obr. 2.1 Fotografie použitých léčivých forem prokainu k analýze

2.2 Použité chemikálie

- bromičnan draselný čistý, Lachema
- bromid draselný čistý, Lachema
- dodecylsulfát sodný > 98%, Fluka
- dusitan sodný p.a., Lachema
- kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová, p.a., Lachema
- kyselina chlorovodíková 35%, p.a., Lach-Ner
- methanol p.a., Sigma-Aldrich
- metylová oranž
- octová kyselina 99% p.a., Penta
- prokain hydrochlorid, Ph. Eur. referenční standard, Fluka
- sulfanilová kyselina p.a., Lachema
- trihydrát acetátu sodného p.a., Fluka

2.3 Vlastní stanovení a vyhodnocení

2.3.1 Bromátometrická titrace

1. Příprava roztoků

- Odměrný roztok bromičnanu draselného o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ($f = 1,0000$) byl připraven rozpuštěním 2,0875 g této látky ve 250 ml destilované vody.
- Kyselina chlorovodíková o koncentraci 4 mol dm^{-3} byla připravena naředěním 104,2 ml kyseliny chlorovodíkové 35% destilovanou vodou na 250 ml.

2. Vlastní stanovení

Do titrační baňky bylo pipetováno 50,00 ml 0,2% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu. K němu bylo přidáno asi 50 ml destilované vody a 0,5 g pevného bromidu draselného. Po jeho rozpuštění bylo přidáno 10 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové a několik kapek roztoku methylové oranže. Titrováno bylo z byřety o objemu 25,00 ml odměrným roztokem bromičnanu draselného. Bylo titrováno velmi pomalu a za intenzivního míchání dokud jediná kapka titračního činidla roztok neodbarvila.

Pro stanovení 0,5% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu bylo k analýze pipetováno 20,00 ml.

Pro stanovení 1,0% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu bylo k analýze pipetováno 3,10 ml a stanovení bylo provedeno pouze jedenkrát. Důvodem byl omezený objem roztoku tohoto vzorku.

3. Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích byl použit následující vztah

$$w_{\text{PH}} = \frac{3}{2} \cdot \frac{c_{\text{KBrO}_3} \cdot V_{\text{KBrO}_3} \cdot M_{\text{PH}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

kde w_{PH} je hmotnostní zlomek prokainu hydrochloridu ve vzorku [%], c_{KBrO_3} je molární koncentrace odměrného roztoku bromičnanu draselného [mol dm^{-3}], V_{KBrO_3} je objem odměrného roztoku bromičnanu draselného spotřebovaný při stanovení [dm^3], M_{PH} je molární hmotnost prokainu hydrochloridu [$272,77 \text{ g mol}^{-1}$] a V_{vzorku} je objem vzorku roztoku prokainu hydrochloridu vzatý ke stanovení [ml].

2.3.2 Titrace dusitanem sodným

1. Příprava roztoků

- Odměrný roztok dusitanu sodného byl připraven rozpuštěním 3,76 g této látky v 1 l destilované vody.
- Kyselina chlorovodíková 20% byla připravena naředěním 420 ml kyseliny chlorovodíkové 35% destilovanou vodou na 900 ml.

2. Standardizace 0,05M odměrného roztoku dusitanu sodného

Na analytických vahách bylo přesně odváženo asi 150 mg sulfanilové kyseliny. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 150ml kádinky a rozpuštěno v 30 ml kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl následně zředěn asi 15 ml destilované vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Bylo do ní vloženo magnetické míchadélko a ponořen pár elektrod pro potenciometrickou indikaci bodu ekvivalence. Jako měrná sloužila platinová elektroda, srovnávací byla elektroda argentchloridová. Byla provedena titrace odměrným roztokem dusitanem sodným o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Titrováno bylo z byrety o objemu 25,00 ml. Zpočátku byl potenciál měrné elektrody odečítán po přidavku 1,00 ml, v okolí bodu ekvivalence pak po kroku 0,10 ml. Vždy bylo vyčkáno na ustálení příslušného potenciálu.

3. Vlastní stanovení

Pipetováno bylo do 150ml kádiny 50,00 ml 0,2% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu. K němu bylo přidáno 30 ml kyseliny chlorovodíkové a 1,5 g pevného bromidu draselného. Po umístění na magnetickou míchačku a vložení míchadélka a páru elektrod (platinová – argentchloridová) byla kádinka chlazena ledem na vodní lázni. Titrováno bylo odměrným roztokem dusitanu sodného z byrety o objemu 25,00 ml za stálého míchání a chlazení. Zpočátku byl potenciál platinové elektrody odečítán po přidavku 1 ml titračního činidla, v okolí bodu ekvivalence pak po kroku 0,1 ml. Vždy bylo vyčkáno na ustálení příslušného potenciálu.

Pro stanovení 0,5% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu bylo k analýze pipetováno 20,00 ml.

Bylo pipetováno 5,00 ml 1,0% injekčního roztoku, což odpovídalo objemu právě jedné ampule s touto účinnou látkou a stanovení bylo provedeno pouze jedenkrát. Důvodem bylo omezené množství vzorku.

4. Vyhodnocení

Pro výpočet přesné koncentrace odměrného roztoku dusitanu sodného c_{NaNO_2} byl použit vztah

$$c_{\text{NaNO}_2} = \frac{m_{\text{SK}}}{M_{\text{SK}} \cdot V_{\text{NaNO}_2}} \quad (2.2)$$

kde m_{SK} je hmotnost navážky sulfanilové kyseliny [g], M_{SK} je molární hmotnost sulfanilové kyseliny [$173,20 \text{ g mol}^{-1}$] a V_{NaNO_2} je spotřeba odměrného roztoku dusitanu sodného při titraci sulfanilové kyseliny [dm^3].

Pro výpočet obsahu prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích byl použit následující vztah

$$w_{\text{PH}} = \frac{c_{\text{NaNO}_2} \cdot V_{\text{NaNO}_2} \cdot M_{\text{PH}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

kde w_{PH} je hmotnostní zlomek prokainu hydrochloridu ve vzorku [%], c_{NaNO_2} je molární koncentrace odměrného roztoku dusitanu sodného [mol dm^{-3}], V_{NaNO_2} je objem odměrného roztoku dusitanu sodného spotřebovaný při stanovení [dm^3], M_{PH} je molární hmotnost prokainu hydrochloridu [$272,77 \text{ g mol}^{-1}$] a V_{vzorku} je objem vzorku roztoku prokainu hydrochloridu vzatý ke stanovení [ml].

2.3.3 UV Spektrofotometrie

1. Příprava roztoků

- Kyselina chlorovodíková 20% byla připravena naředěním 242 ml kyseliny chlorovodíkové 35% destilovanou vodou na 500 ml.
- Standardní roztok prokainu hydrochloridu o koncentraci $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 0,00682 g této látky ve 25 ml odměrné baňce v destilované vodě po rysku. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 10,00 ml a doplněno ve 100 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.

2. Ředění roztoků vzorků

Vzorek 0,2% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu byl zředěn 10×, 0,5% vzorek 20× a 1% vzorek byl zředěn 40×. Při veškerém ředění bylo použito odměrných baněk a destilované vody. Důvodem byla optimální hodnota absorbance pro splnění Lambertova-Beerova zákona.

3. Vlastní stanovení

Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídávku. Byla připravena sada šesti roztoků o různé koncentraci standardu prokainu hydrochloridu. Do šesti odměrných baněk o objemu 5,00 ml bylo pipetováno vždy 0,125 ml naředěného vzorku a následně od druhé do šesté vzestupně 0,025, 0,050, 0,075, 0,100 a 0,125 ml standardního roztoku prokainu hydrochloridu. Doplněno bylo po rysku 20% kyselinou chlorovodíkovou.

Absorbance vzorků byla měřena v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett-Packard 8453 s diodovým polem proti roztoku 20% kyseliny chlorovodíkové. Absorbance byla odečítána při svém maximu, tedy při vlnové délce 294 nm.

4. Vyhodnocení

Obsah prokainu hydrochloridu ve vzorcích byl spočten dle vztahu

$$w_{\text{PH}} = \frac{c_{\text{PH}} \cdot V_{\text{rozt.}} \cdot M_{\text{PH}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot F \cdot 100 \quad (2.4)$$

kde w_{PH} je hmotnostní zlomek prokainu hydrochloridu ve vzorku [%], c_{PH} je molární koncentrace prokainu hydrochloridu v roztoku použitým při metodě standardního přídávku, vypočtená z rovnice regrese grafu závislosti absorbance na koncentraci standardního přídávku [mol dm^{-3}], $V_{\text{rozt.}}$ je objem připravených roztoků prokainu hydrochloridu [$5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$], M_{PH} je molární hmotnost prokainu hydrochloridu [$272,77 \text{ g mol}^{-1}$], V_{vzorku} je objem vzorku prokainu hydrochloridu vzatý ke stanovení [ml] a F je ředící faktor.

2.3.4 VIS Spektrofotometrie

1. Příprava roztoků

- Standardní roztok prokainu hydrochloridu o koncentraci $0,10 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním $0,1000 \text{ g}$ této látky v 100 ml odměrné baňce v destilované vodě po rysku. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno $1,00 \text{ ml}$ a v 10 ml odměrné baňce zředěno destilovanou vodou po rysku.
- Acetátový pufr o $\text{pH} = 3,60$ byl připraven smíšením $0,2900 \text{ g}$ trihydrátu acetátu sodného se 3 ml 99% kyseliny octové, bylo doplněno destilovanou vodou na objem 500 ml po rysku v odměrné baňce.
- Dodecylsulfát sodný 1% byl připraven rozpuštěním $0,1000 \text{ g}$ této látky ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě po rysku.
- Kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová byla připravena rozpuštěním $0,2000 \text{ g}$ této látky ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě po rysku.

2. Ředění roztoků vzorků

Vzorek 0,2% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu byl zředěn 20×, 0,5% vzorek 50× a 1% vzorek byl zředěn 100×. Při veškerém ředění bylo použito odměrných baněk a destilované vody. Důvodem byla optimální hodnota absorbance pro splnění Lambertova-Beerova zákona.

3. Vlastní stanovení

Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídávku. Byla připravena sada pěti roztoků o různé koncentraci standardu prokainu hydrochloridu. Do každé z pěti 10,00ml odměrných baněk byl pipetován vždy 1,00 ml zředěného vzorku injekčního roztoku prokainu hydrochloridu, 1,00 ml roztoku kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové, 0,30 ml roztoku dodecylsulfátu sodného, 5,00 ml acetátového pufru o pH = 3,6 a 1,00 ml methanolu. Následně bylo vzestupně od druhé do páté odměrné baňky pipetováno 0,25, 0,50, 0,75 a 1,00 ml standardního roztoku prokainu hydrochloridu. Bylo doplněno po rysku destilovanou vodou. Vzniklý roztok byl nechán stát 10 minut pro vznik barevného komplexu.

Absorbance roztoků byla měřena v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett-Packard 8453 s diodovým polem proti slepému vzorku. Absorbance byla odečítána při svém maximu, tedy při vlnové délce 484 nm.

4. Vyhodnocení

Obsah prokainu hydrochloridu ve vzorku byl spočítán dle vztahu

$$w_{\text{PH}} = \frac{c_{\text{g}} \cdot V_{\text{rozt.}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot F \cdot 100 \quad (2.5)$$

kde w_{PH} je hmotnostní zlomek prokainu hydrochloridu ve vzorku [%], c_g je hmotnostní koncentrace prokainu hydrochloridu v roztoku použitým při metodě standardního přídávku, vypočtená z rovnice regrese grafu závislosti absorbance na hmotnostní koncentraci standardního přídávku [g dm^{-3}], $V_{\text{rozt.}}$ je objem připravených roztoků prokainu hydrochloridu [$10 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$], M_{PH} je molární hmotnost prokainu hydrochloridu [$272,77 \text{ g mol}^{-1}$], V_{vzorku} je objem vzorku prokainu hydrochloridu vzatý k analýze [ml] a F je ředící faktor.

2.4 Statistické zpracování naměřených hodnot

Naměřené hodnoty byly zpracovány běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95. Všechny grafy a výpočty byly realizovány v prostředí softwarových programů OriginPro 6.0 Professional (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

U výsledků bromátometrické titrace a titrace dusitanem sodným jsou výsledky udány jako mediány s intervalem spolehlivosti a směrodatnou odchylkou mediánů. Vzhledem k tomu, že vzorku s obsahem 1% prokainu hydrochloridu bylo omezené množství a byl titračními metodami stanovován pouze jedenkrát, jsou v těchto dvou případech uvedeny pouze výsledky stanovení bez příslušného statistického zpracování.

U výsledků stanovení pomocí UV a VIS spektrofotometrie metodou standardního přídávku je výsledek tohoto stanovení udán jako hodnota odečtená z kalibrační přímky x_E s intervalem spolehlivosti vypočítaným jako násobek standardní odchylky hodnoty odečtené z kalibrační přímky s_{x_E} a kritické hodnoty Studentova t -testu, tedy $x_E \pm t s_{x_E}$. Hodnota standardní odchylky hodnoty odečtené z kalibrační přímky byla vypočítána z rovnice

$$s_{x_E} = \frac{s_{x/y}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^{-2}}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.6)$$

kde $s_{x/y}$ je standardní odchylka lineární regrese kalibrační přímky, b je směrnice této lineární regrese, n je počet bodů kalibrační přímky, \bar{y} průměr naměřených hodnot závislých proměnných, x_i hodnoty nezávislé proměnné a \bar{x} průměr naměřených hodnot nezávislých proměnných.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Bromátometrická titrace

Bromátometrickou titrací bylo možno stanovit všechny vzorky prokainu hydrochloridu. Injekční roztoky o koncentracích 0,2 % a 0,5 % obsahu prokainu hydrochloridu byly stanovovány třikrát. Roztok o koncentraci 1,0% byl stanovován pouze jedenkrát. Výsledky stanovení uvádí tabulka 3.1.

V 0,2% procentním injekčním roztoku bylo stanoveno $0,21 \pm 0,01$ % prokainu hydrochloridu ($s_r = 1,16$ %), v 0,5% injekčním roztoku bylo stanoveno $0,511 \pm 0,000$ %, a v 1,0% roztoku bylo nalezeno 1,15 % prokainu hydrochloridu.

Tabulka 3.1 Spotřeby titračního činidla $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ bromičnanu draselného a stanovené obsahy prokainu hydrochloridu v analyzovaných injekčních roztocích.

deklarovaná koncentrace prokainu hydrochloridu	stanovení	V_{KBrO_3} [ml]	w_{PH} [%]
0,20%	1.	5,10	0,209
	2.	5,15	0,211
	3.	5,05	0,207
0,50%	1.	5,00	0,511
	2.	5,00	0,511
	3.	5,00	0,511
1,00%	1.	1,75	1,15

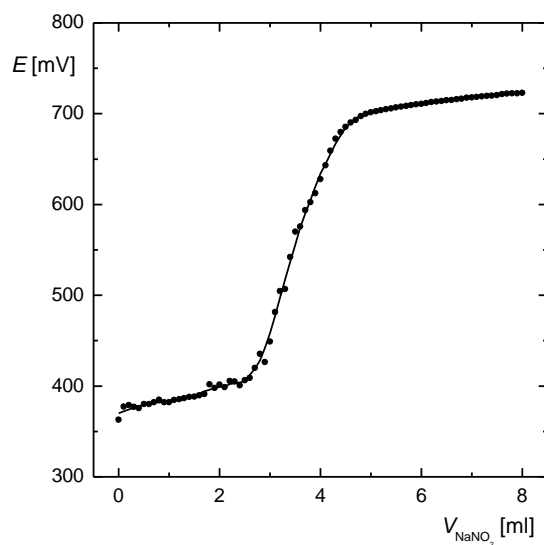
3.2 Titrace dusitanem sodným

Všechny vzorky bylo možno stanovit pomocí titrace dusitanem sodným. Přesná koncentrace použitého odměrného roztoku dusitanu sodného byla stanovena jako $0,0591 \text{ mol dm}^{-3}$. Na obr. 3.1 je pro ilustraci uvedena titrační křivka vzorku 1% injekčního roztoku prokainu hydrochloridu. Injekční roztoky o koncentracích 0,2 % a 0,5 % obsahu prokainu hydrochloridu byly stanovovány třikrát. Roztok o koncentraci 1,0% byl stanovován pouze jedenkrát. Spotřeby odměrného roztoku a výsledný obsah prokainu hydrochloridu uvádí tabulka 3.2.

V 0,2% procentním injekčním roztoku bylo stanoveno $0,20 \pm 0,01 \%$ prokainu hydrochloridu ($s_r = 2,86 \%$). V 0,5% injekčním roztoku bylo nalezeno $0,51 \pm 0,02 \%$, ($s_r = 1,88 \%$) a v 1,0% roztoku bylo nalezeno 1,13 % prokainu hydrochloridu.

Tabulka 3.2 Spotřeby titračního činidla $0,0591 \text{ mol dm}^{-3}$ dusitanu sodného a stanovené obsahy prokainu hydrochloridu v analyzovaných injekčních roztocích.

deklarovaná koncentrace prokainu hydrochloridu	stanovení	V_{NaNO_2} [ml]	w_{PH} [%]
0,20%	1.	6,30	0,203
	2.	6,00	0,193
	3.	6,20	0,200
0,50%	1.	6,30	0,508
	2.	6,40	0,516
	3.	6,20	0,500
1,00%	1.	3,50	1,13

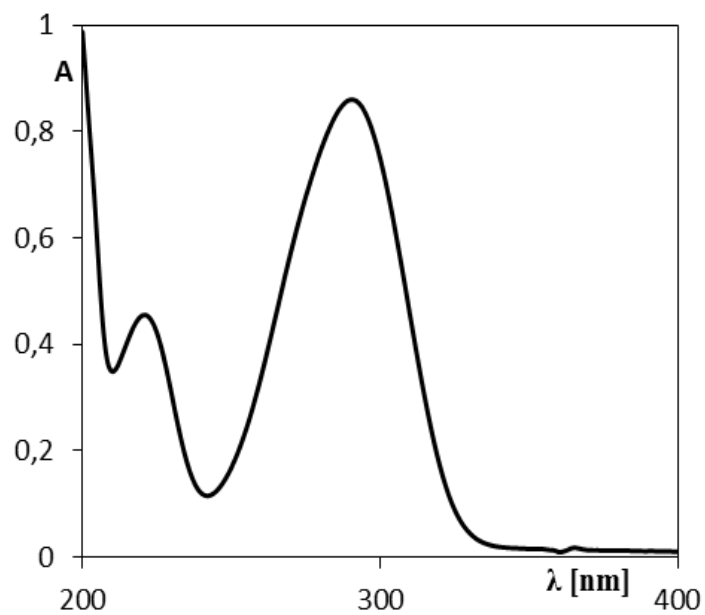


Obr. 3.1 Titrační křivka titrace 5,00 ml 1% roztoku prokainu hydrochloridu odměrným roztokem dusitanu sodného o koncentraci $0,0591 \text{ mol dm}^{-3}$ za použití indikační platinové a referenční argentchloridové elektrody.

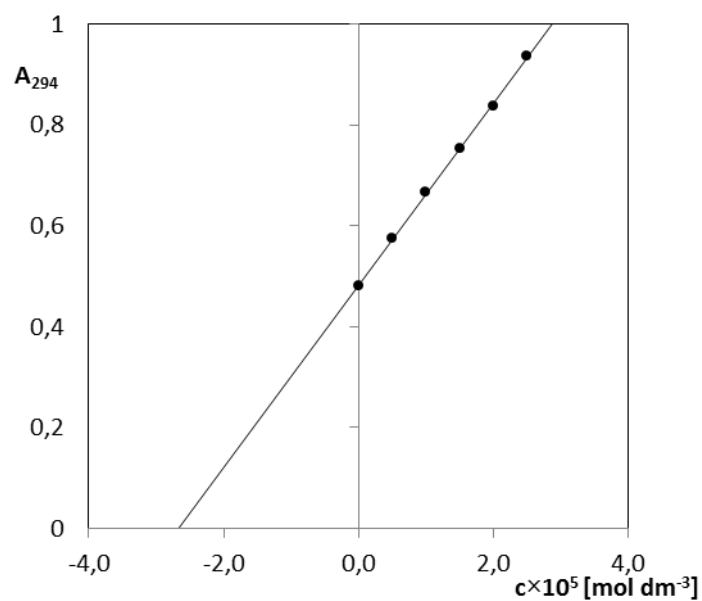
3.3 UV spektrofotometrie

Všechny vzorky bylo možno stanovit pomocí UV spektrofotometrie. Na obr. 3.2 je pro ilustraci uvedeno absorpční spektrum roztoku prokainu hydrochloridu. Všechny vzorky injekčních roztoků prokainu hydrochloridu byly stanovovány třikrát. Na obr. 3.3 je znázorněna závislost absorbance při vlnové délce 294 nm na koncentraci standardního přídatku prokainu hydrochloridu při stanovení obsahu prokainu hydrochloridu v 0,2% roztoku prokainu hydrochloridu.

Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 3.3.



Obr. 3.2 UV absorpční spektrum prokainu hydrochloridu ($c = 4,00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí 20 % kyseliny chlorovodíkové v kyvetě měrné délky 1 cm.



Obr. 3.3 Závislost absorbance při 294 nm na koncentraci standardního přídatku prokainu hydrochloridu při stanovení obsahu prokainu hydrochloridu v 0,2% roztoku prokainu hydrochloridu ($l = 1 \text{ cm}$)

Tabulka 3.3 Výsledky UV spektrofotometrického stanovení prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích o různých koncentracích této látky. Obsah prokainu hydrochloridu, interval spolehlivosti a relativní směrodatná odchylka.

deklarovaná koncentrace prokainu hydrochloridu	$w_{\text{PH}} \pm L_{1,2}$ [%]	s_r [%]
0,20%	$0,20 \pm 0,02$	0,01
0,50%	$0,51 \pm 0,05$	0,02
1,00%	$0,78 \pm 0,09$	0,04

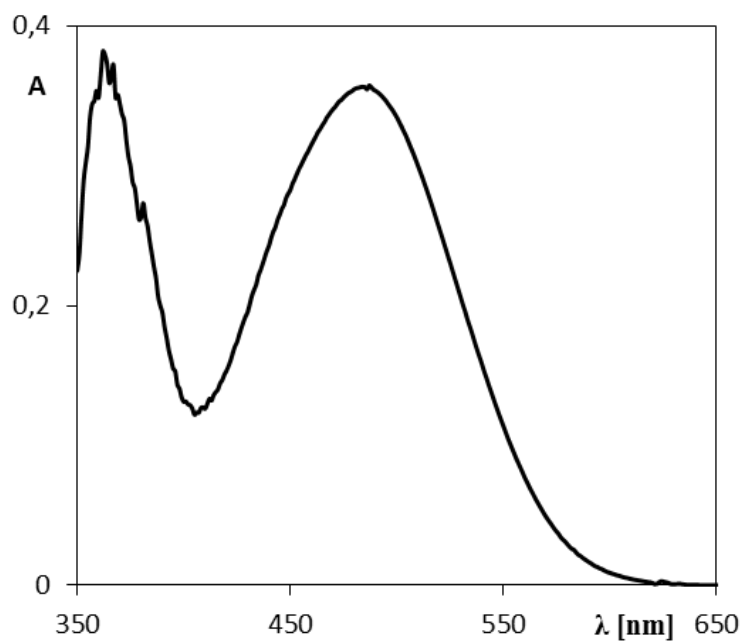
3.4 VIS spektrofotometrie

Všechny vzorky bylo možno stanovit rovněž pomocí VIS spektrofotometrie. Na obr. 3.4 je pro ilustraci uvedeno absorpční spektrum komplexu prokainu hydrochloridu s 1,2-naftochinon-4-sulfonovou kyselinou. Všechny vzorky injekčních roztoků prokainu hydrochloridu byly stanovovány třikrát. Na obr. 3.5 je znázorněna závislost absorbance při vlnové délce 484 nm na koncentraci standardního přídatku prokainu hydrochloridu při stanovení jeho obsahu v 0,5% roztoku prokainu hydrochloridu.

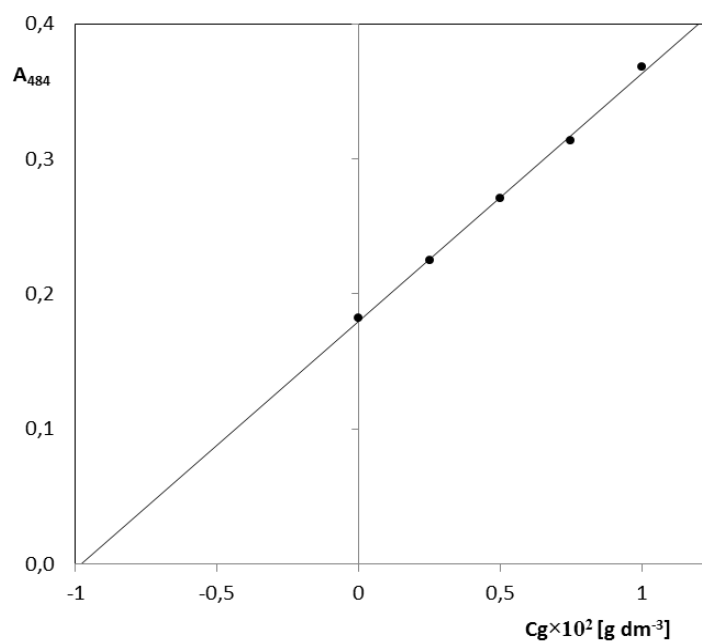
Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 3.4.

Tabulka 3.4 Výsledky VIS spektrofotometrického stanovení prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích o různých koncentracích této látky. Obsah prokainu hydrochloridu, interval spolehlivosti a relativní směrodatná odchylka.

deklarovaná koncentrace prokainu hydrochloridu	$w_{\text{PH}} \pm L_{1,2}$ [%]	s_r
0,2%	$0,17 \pm 0,00$	0,00
0,5%	$0,49 \pm 0,02$	0,01
1,0%	$0,94 \pm 0,03$	0,01



Obr. 3.4 Absorpční spektrum komplexu prokainu hydrochloridu ($c_g = 2,00 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$) s 1,2-naftochinon-4-sulfonovou kyselinou v kyvetě měrné délky 1 cm.



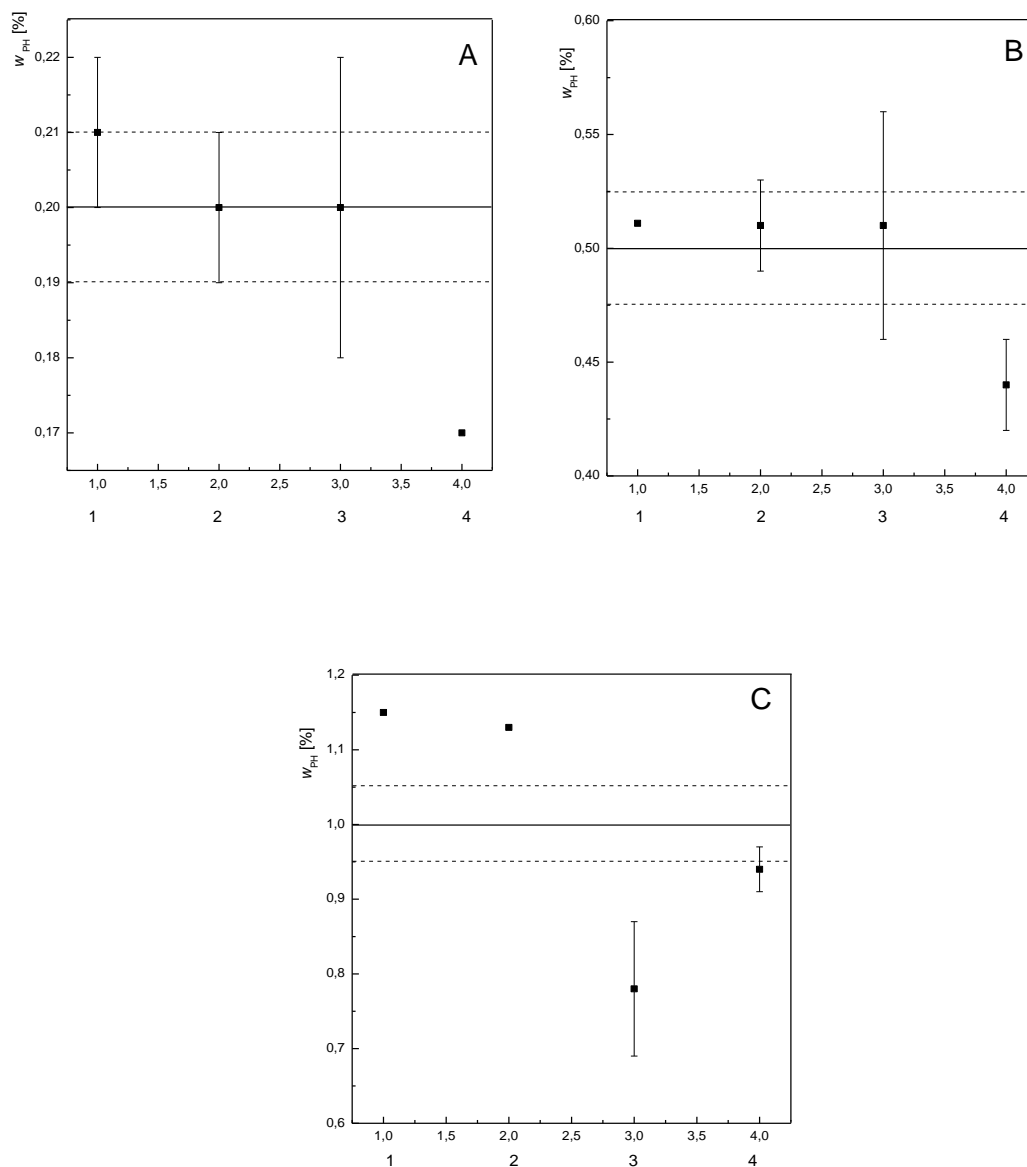
Obr. 3.5 Závislost absorbance při vlnové délce 484 nm na koncentraci standardního přídatku prokainu hydrochloridu při stanovení jeho obsahu v 0,5% roztoku prokainu hydrochloridu ($l = 1 \text{ cm}$).

3.5 Vyhodnocení vybraných metod

3.5.1 Vyhodnocení preciznosti a pravdivost stanovení

Preciznost stanovení prokainu v analyzovaných injekčních roztocích, tedy těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu, byla pro jednotlivé použité metody zhodnocena jako interval spolehlivosti. Graficky je znázorněna na obr. 3.6, ze kterého plyne, že nejméně precizním bylo stanovení UV spektrofotometrií, preciznost obou titračních stanovení je v podstatě srovnatelná, nejpreciznější pak bylo stanovení VIS spektrofotometrií.

Pravdivost stanovení, tedy těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny, byla zhodnocena na základě porovnání mediánu s referenčním rozmezím obsahu prokainu v příslušném injekčním roztoku (obr. 3.6). Podle Českého lékopisu [4] se povolený obsah účinné látky v injekčních lékových formách musí pohybovat v rozmezí 95,0–105,0 %. Z obr. 3.6 plyne, že stanovení VIS spektrofotometrií poskytovalo nepravdivé (podhodnocené) výsledky u všech tří studovaných koncentrací prokainu v injekčním roztoku. U injekčního roztoku s 1 % prokainu nebylo pravdivé žádné z použitých stanovení. Pravdivost stanovení byla tedy prokázána u bromátometrické titrace, titrace dusitanem sodným a UV spektrofotometrie.



Obr. 3.6 Grafické porovnání výsledků vybraných analytických metod (1) bromátometrická titrace, (2) titrace dusitanem sodným, (3) UV spektrofotometrie a (4) VIS spektrofotometrie pro stanovení prokainu hydrochloridu o různých koncentracích (0,2% roztok (A), 0,5% roztok (B), 1,0% roztok (C) v injekčních roztocích o různé koncentraci. Výsledky jsou vyjádřeny jako mediány s intervalem spolehlivosti. Silná čára vyznačuje deklarovaný obsah prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích, slabá pak dolní a horní mez obsahu prokainu hydrochloridu podle Českého lékopisu.

3.5.2 Vyhodnocení finanční a časové náročnosti

Finanční náročnost byla vyhodnocena jako peněžní náklady na chemikálie, které byly použité ke stanovení jednoho vzorku (tab. 3.5). Do nákladů byly zahrnuty ceny všech roztoků potřebných pro analýzu. Naopak nebyly zahrnuty ceny vzorků ani ceny roztoků použitých pro standardizaci titračního činidla. Stejně tak nebyly brány v úvahu pořizovací ceny užitého instrumentálního vybavení. Ceny jednotlivých chemikálií byly převzaty z ceníků dodavatelských společností. [15, 16]

Výrazně dražší metodou je titrace dusitanem sodným, kdy stanovení jednoho vzorku stojí 2,00 Kč. Tato skutečnost je způsobena nutností použít 30 ml 20% kyseliny chlorovodíkové pro každé stanovení. Jako nejlevnější metoda byla vyhodnocena UV spektrofotometrie. Jedno stanovení stojí pouze 0,20 Kč.

Časová náročnost byla vyhodnocena jako čas, který zabere jedno stanovení (tab. 3.5). Tedy doba, která uplyne od pipetování vzorku k analýze po samotný výpočet obsahu analytu. Do tohoto času nebyla započítána doba pro přípravu pomocných roztoků a standardizaci odměrného roztoku.

Časově nejvýhodnější je stanovení bromátometrickou titrací, které zabere v průměru 9 minut. Naopak časově nejnáročnější je stanovení pomocí VIS spektrofotometrie. Toto stanovení trvá v průměru 78 minut. Důvodem je pipetování jednotlivých roztoků do každé odměrné baňky při přípravě kalibrační řady pro metodu standardního přídatku.

Tabulka 3.5 Vyhodnocení finanční a časové náročnosti vybraných metod pro stanovení prokainu hydrochloridu v injekčních roztocích.

metoda	cena [Kč]	čas [min]
bromátometrická titrace	0,70	9
titrace dusitanem sodným	2,00	16
UV spektrofotometrie	0,20	47
VIS spektrofotometrie	1,50	78

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat čtyři vybrané metody pro stanovení prokainu ve třech injekčních roztocích o různých koncentracích z hlediska preciznosti a pravdivosti stanovení a jeho časové a finanční náročnosti.

Zvolenými metodami byly: bromátometrická titrace, titrace dusitanem sodným, UV spektrofotometrie a VIS spektrofotometrie. Nejpreciznější výsledky poskytlo stanovení VIS spektrofotometrií, nejméně precizní bylo UV spektrofotometrické stanovení. Pravdivost stanovení byla prokázána u bromátometrické titrace, titrace dusitanem sodným a UV spektrofotometrie.

Finančně nejvýhodnější byla UV spektrofotometrie, naopak nejdražší metodou bylo titrační stanovení dusitanem sodným. Časově neúspornější byla bromátometrická titrace, naopak časově nejnáročnější metodou byla VIS spektrofotometrie.

Bibliografie

- [1] Lincová, D.; Farghali, H. a kolektiv: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2007.
- [2] Ščigel, V.: *Lokální anestezie v praxi zubního lékaře*. Praha, Quintessenz bibliothek 2004.
- [3] Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdop, B.; Watts, J.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*. 4th Ed. Pharmaceutical Press, 2011.
- [4] Hamppl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2002.
- [5] <http://www.lavoisier.com/en/products/drugs/injectable-solutions/procaine-hydrochloride-ampoule_66_0-0-1.html> (cit. 30. 4. 2014)
- [6] <<http://www.ardeapharma.cz/index.php?navi=4&Prod=23>> (cit. 30. 4. 2014)
- [7] <<http://www.bioveta.cz/cs/veterinarni-divize/pripravky/katalog-pripravku/procain-bioveta-100-mg-ml-injekcni-roztok.html>> (cit. 30. 4. 2014)
- [8] <<http://www.achilleshealthmart.com/Gerovita/Gerovital-h3.htm#PROCAINE>>, (cit. 30. 4. 2014)
- [9] <<http://www.gerovitalgh3.com/>> (cit. 30. 4. 2014)
- [10] Xu, L. X.; Shen, Y. X.; Wang, H. Y.; Jiang, J. G.; Xiao, Y.: Spectrophotometric determination of procaine hydrochloride in pharmaceutical products using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as the chromogenic reagent. *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 3103–3110 (2003).
- [11] Li, N.; Duan, J.; Chen, G.: Determination of trace procaine hydrochloride by differential pulse adsorptive stripping voltammetry with a nafion modified glassy carbon electrode. *Analytical Sciences* **19**, 1587–1592 (2003).

- [12] Wei, M.; Zhou, Y.; Zhi, J.; Fu, D.; Einaga, Y.; Fujishima, A.; Wang, X.; Gu, Z.: Comparison of boron-doped diamond and glassy carbon electrodes for determination of procaine hydrochloride. *Electroanalysis* **20**, 137–143 (2008).
- [13] *Český lékopis 2009*. Praha, Grada 2009.
- [14] Hrdý, O.; Jindra, A.; Jung, Z.; Šlouf, A.; Zýka, J.: *Kvantitativní analýsa léčiv*. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství 1957, str. 423–426.
- [15] <<http://www.lach-ner.com/>>(cit. 30. 4. 2014)
- [16] <<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>> (cit. 30. 4. 2014)