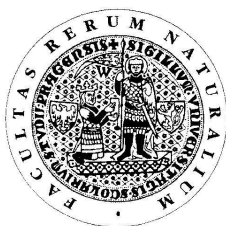


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jiřina Humpolíková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ LÉČIV DOXYCYKLIN A
DIMENHYDRINÁT POMOCÍ UHLÍKOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

Voltammetric Determination of Drugs Doxycycline and Dimenhydrinate Using Carbon Film
Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2011

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 1. června 2011

Tato bakalářská práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekty RP 14/63, LC 06035 a MSM 0021620857), projekt SVV 2011-263204 a GAČR (projekt P 206/10/P087).

Dovoluji si tímto poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za odborné vedení a dále také všem členům katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD..... | 9 |
| 1.1 | Cíl práce..... | 9 |
| 1.2 | Doxycyklin..... | 9 |
| 1.2.1 | Užití..... | 10 |
| 1.2.2 | Příprava, fyzikální vlastnosti..... | 10 |
| 1.2.3 | Metody stanovení..... | 11 |
| 1.3 | Dimenhydrinát..... | 13 |
| 1.3.1 | Užití..... | 14 |
| 1.3.2 | Příprava, fyzikální vlastnosti..... | 14 |
| 1.3.3 | Metody stanovení..... | 14 |
| 2 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 16 |
| 2.1 | Reagencie..... | 16 |
| 2.2 | Aparatura..... | 16 |
| 2.3 | Pracovní postupy..... | 17 |
| 2.4 | Stálost pracovních roztoků..... | 18 |
| 3 | VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ NA UHLÍKOVÉ FILMOVÉ..... | 21 |
| 3.1 | Doxycyklin..... | 21 |
| 3.1.2 | DC voltametrie..... | 21 |
| 3.1.1 | Diferenční pulzní voltametrie..... | 25 |
| 3.1.3 | Stanovení v léčivu – Doxyhexal..... | 30 |
| 3.2 | Dimenhydrinát..... | 33 |
| 3.2.2 | DC voltametrie..... | 33 |
| 3.2.1 | Diferenční pulzní voltametrie..... | 38 |
| 3.2.3 | Stanovení v léčivu – Travel Gum..... | 43 |
| 4 | ZÁVĚR..... | 45 |
| 5 | LITERATURA..... | 46 |

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením doxycyklinu (DX) a dimenhydrinátu (DMH) metodami DC voltametrií (DCV) a diferenční pulzní voltametrií (DPV) na uhlíkové filmové elektrodě (CFE). Byly nalezeny optimální podmínky pro voltametrické stanovení DX a DMH a za těchto podmínek proměřeny kalibrační závislosti a vypočteny meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé metody.

Jako optimální prostředí pro DCV a DPV stanovení DX na CFE bylo zvoleno prostředí BR-pufu o pH 12,0. Pro obě voltametrické metody byly získány lineární koncentrační závislosti proudu v rozmezí $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s LOQ $15,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DCV a $15,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DPV. Metodou DCV byl DX stanoven v léčivu, za stanovených podmínek, pro porovnání byl DX v léčivu stanoven také pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie v destilované vodě se shodným výsledkem.

Pro stanovení DMH bylo vybráno jako optimální prostředí roztoku BR pufu o pH 3,0 pro DCV a pH 2,0 pro DPV. Metodou DCV na CFE byla získána lineární kalibrační křivka v rozmezí $2,0 - 10,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DMH a metodou DPV na CFE $0,2 - 1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DMH s dosaženými mezemi stanovitelnosti $0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DCV a $0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DPV.

Byla sledována stabilita zásobního roztoku DX, DMH v destilované vodě pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Roztok DX byl stabilní po dobu jednoho dne a DMH po dobu jednoho měsíce.

Abstract

This bachelor's thesis concerns the determination of doxycycline (DX) and dimenhydrinate (DMH) by the methods DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) on a carbon film electrode (CFE). The optimum conditions for voltammetric determination of DX and DMH were found and under these conditions, concentration dependences were measured and the limits of quantification (LOQ) were calculated for each method.

The media of BR-buffer pH 12.0 was chosen as optimum for DCV and DPV determination of DX at CFE. For both DCV and DPV, the linear concentration dependences were obtained in concentration ranges of DX from $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ to $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ with LOQ $15,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DCV and $15,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DPV. DX was determined in drug using DCV under optimized conditions and for comparison of used voltammetric method DX in drug was determined also using UV-VIS spectrophotometry with consistent results.

The optimum medium of BR buffer pH 3.0 was chosen for determination of DMH by DCV and pH 2.0 for DPV. The calibration range $2,0 - 10,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of DMH was received using DCV and $0,2 - 1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of DMH was received using DPV at CFE with reached LOQ $0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DCV and $0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for DPV. DMH was determined in commercial drugs using DCV on founded conditions.

The stability of stock solution of DX, DMH in distilled water was monitored using UV-VIS spectrophotometry. The solution of DX was stable for one day and DMH for one month.

Předmětová hesla:

analytická chemie

elektrochemie

Klíčová slova:

voltametrie

DC voltametrie

diferenční pulzní voltametrie

filmová uhlíková elektroda

doxycyklin

dimenhydrinát

Objective Words:

Analytical Chemistry

Electrochemistry

Key Words:

Voltammetry

DC Voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

Carbon film electrode

Doxycycline

Dimenhydrinate

Seznam použitých zkratek

| | |
|-------------------|--|
| AdSV | – adsorptivní rozpouštěcí voltametrie |
| BDDE | – borem dopovaná diamantová elektroda |
| BR | – Britton – Robinson |
| c_{vz} | – koncentrace vzorku |
| CAS. R.N. | – registrační číslo (Chemical abstract service) |
| CPE | – uhlíková pastová elektroda |
| CV | – cyklická voltametrie |
| DCV | – direct current voltametrie |
| DMH | – dimenhydrinát |
| DPV | – diferenční pulzní voltametrie |
| DX | – doxycyklin |
| $E_{1/2}$, E_p | – půlvlnový potenciál, potenciál píku (v horním indexu je uváděno číslo vlny/píku) |
| I_v , I_p | – proud vlny, píku (v horním indexu je uváděno číslo vlny/píku) |
| FIA | – injekční průtoková analýza |
| GCE | – elektroda ze skelného uhlíku |
| HPLC | – vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| LC-MS | – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií |
| LLE | – extrakce kapalina-kapalina |
| LOQ | – mez stanovitelnosti |
| MEKC | – micelární elektrokinetická kapilární chromatografie |
| MMP | – metaloproteináza |
| M_r | – relativní molekulová hmotnost |
| MSPD | – extrakce disperzní tuhou fází (matrix solid–phase dispersion) |
| pH | – záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů (H_3O^+) |
| pK_a | – záporný logaritmus disociační konstanty |
| RSD | – relativní směrodatná odchylka |
| SPE | – extrakce na pevné fázi (solid fase extraction) |

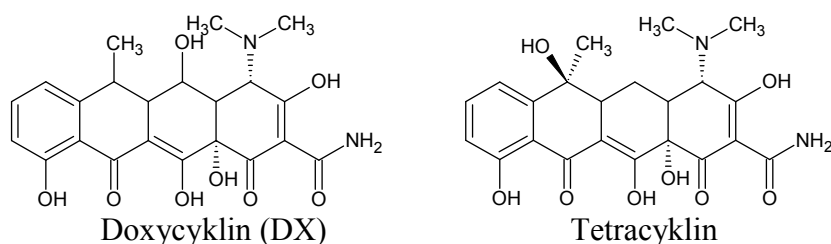
1 ÚVOD

1.1 Cíl práce

Tato práce se zabývá studiem elektrochemických vlastností doxycyklinu (DX) a dimenhydrinátu (DMH) pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC („direct current“) voltametrie (DCV). Cílem práce bylo stanovit DX a DMH na uhlíkové filmové elektrodě, určit vhodné podmínky pro stanovení a dosáhnout nejnižší možné meze stanovitelnosti.

1.2 Doxycyklin

Antibiotika jsou látky původně mikrobiálního původu, které se užívají pro léčbu infekčních onemocnění¹. DX je antibiotikum z řady tetracyklinů inhibující syntézu proteinů. Od tetracyklinu, který je nejjednodušší látkou, se odlišuje jinými substituenty na pozicích 5 a 6 (viz Obrázek 1.1), které způsobují větší rozpustnost v tucích.²



Obr. 1.1 Struktura studované látky DX a tetracyklinu, od kterého je odvozen.

DX je komerčně dostupný jako DX hyklát, který byl použit pro přípravu základních roztoků. Tabulka 1.1 obsahuje základní údaje k identifikaci.

Tab. 1.1 Základní informace

| NÁZEV | SYSTEMATICKÝ NÁZEV | SUMÁRNÍ VZOREC | CAS R.N. | M _r |
|-------------------|--|--|------------|----------------|
| Doxycyklin | 2Z,4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-2-[amino(hydroxy)methyliden]-4-(dimethylamino)-5,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-4a,5a,6,12a-tetrahydrotetracen-1,3,12(2H,4H,5H)-trion | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 564-25-0 | 444,441 |
| Doxycyklin hyklát | – | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ · HCl · 0.5 H ₂ O · 0.5 C ₂ H ₆ O | 24390-14-5 | 512,940 |

1.2.1 Užití

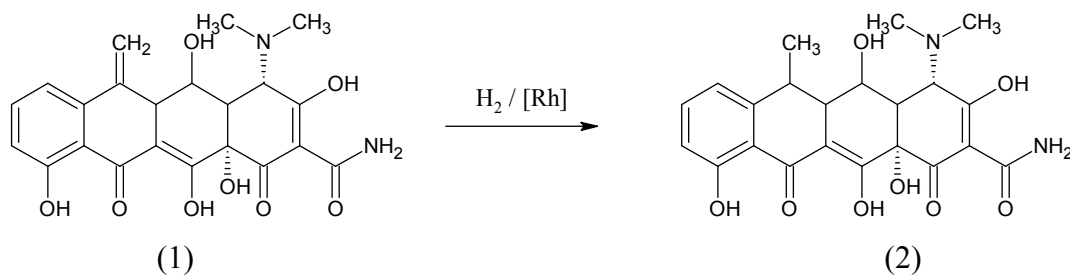
DX je efektivním inhibítorem buněčného rozmnožování, migrace a aktivity matrixových metaloproteináz (MMP), což jsou enzymy závislé na obsahu zinku a vápníku v těle, a účastní se mnoha zánětlivých pochodů včetně astmatu. Všechny tyto různé biologické efekty vycházejí z inhibice metaloproteinázy (MMP). DX byl navržen jako léčivo na nemoci způsobené MMP-9 např. nemoc zrakového ústrojí, aortálního aneurisma atd.³

Může být užíván jako lék proti růžovce (chronické kožní onemocnění u starších lidí). Má menší toxicitu a kvalitnější farmakokinetické vlastnosti než první generace tetracyklinů.² Díky vysoké rozpustnosti v tucích je DX vhodný pro distribuci do různých druhů tělových tkání. Tato vlastnost a antibakteriální efekt proti anaerobním a fakultativním Gram-negativním bakteriím se hodí pro využití antibiotika např. i u psů.⁴ Používá se také při léčbě bradavic, infekcí očí, akné, astmatu atd.

1.2.2 Příprava, fyzikální vlastnosti

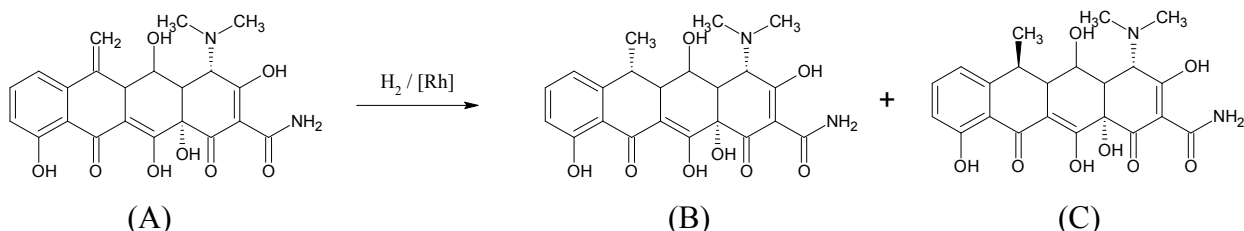
Typickým posledním krokem přípravy DX může být jedna z následujících následujících dvou reakcí:

Hydrogenace methacyklinu (1) na DX (2) za užití rhodium-carborane komplexu jako katalyzátoru.⁵ (viz Obr 1.2)



Obr. 1.2 Hydrogenace methacyklinu (1) za vzniku DX (2).

Redukce exocyklické methylenové skupiny v poloze 6 methacyklinu (A) za vzniku dvou diastereoizomerů: DX (α -epimeru, (B)) a 6-epi-DX (β -epimeru, (C)) opět užití katalyzátoru rhodium-carborane komplexu.⁶ (viz Obr. 1.3)



Obr. 1.3 Redukce methylové skupiny methacyklinu (A) a vzniku diastereoizomerů DX (B, C)

DX má žlutou barvu, pK_a nabírá hodnot 11,54; 8,85; 7,56 a 3,21. Rozpustnost ($-\log S_0$, 25 °C) DX je $2,35 \pm 0,03 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a lipofilita (rozdělení mezi oktanol a vodu, $\log P_{\text{oct}}$) byla stanovena na 0,52.⁷

1.2.3 Metody stanovení

DX (v krevní plasmě, tabletách, moči atd.) byl při vhodných podmínkách stanoven metodami separačními, spektrometrickými a elektrochemickými.

Kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrie (LC – MS) byla užitá pro stanovení DX v krevní plasmě, který z ní byl izolován pomocí extrakce kapalina-kapalina. Metoda byla použita ke sledování farmakokinetických vlastností DX v krevní plasmě.⁸

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie s UV spektrometrickou detekcí při 350 nm byla použita ke stanovení DX v tabletách a lidské moči po orálním podání.⁹

Kinetika reakce DX s peroxidem vodíku a Cu^{2+} ve vodném prostředí byla sledována za užití UV/VIS spektrometrie. V slabě alkalickém prostředí došlo k odbourání antibiotika. Kinetika reakce byla studována užitím metod počátečních rychlostí a relativních rychlostních konstant, které byly vypočítány za různých teplot. Metoda byla užitá také ke stanovení DX v kapslích léčiva.¹⁰

Přehled těchto a dalších metod stanovení DX je uveden v tabulce 1.2.

Tab. 1.2 Přehled metod stanovení DX

| CITACE | METODA | MATRICE | PREKONCENTRACE | PROSTŘEDÍ | LOD | LOQ |
|--------|------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 8 | LC – MS | krevní plasma | LLE | fosfátový pufr | 50 ng·ml ⁻¹ | 100 ng·ml ⁻¹ |
| 9 | MEKC – UV | moč | LLE | 30 mM borátový pufr | 0,96 mg·l ⁻¹ | 3,20 mg·l ⁻¹ |
| 10 | UV/VIS spektrometrie | čistý DX-HCl | - | Deionizovaná voda | 0,57 μg·ml ⁻¹ | 1,89 μg·ml ⁻¹ |
| 11 | Titrace, spektrometrie | tableta | - | voda | 0,02; 0,091 μg·ml ⁻¹ | 0,07; 0,27 μg·ml ⁻¹ |
| 12 | LC – MS | podzemní a povrchová voda | SPE | voda | - | - |
| 13 | HPLC | mléko | MSPD | Kyselina citrónová/methanol (1:9) | - | - |

Z elektrochemických metod byl DX nejčastěji stanoven pomocí ampérometrie. Jednou z těchto metod je FIA, kde byla ampérometrie užita k detekci tetracyklinových antibiotik (DX...) na borem dopované diamantové elektrodě (BDDE). Oxidace antibiotik byla sledována na různých uhlíkových elektrodách včetně skelného uhlíku, anodizované BDDE (připravené z BDDE pokryté vodivým *n*-Si ponořením do 0,1 mol·l⁻¹ KOH), za užití CV. Nejnižší detekční limit pro DX byl 10 nmol·l⁻¹ na anodizované BDDE. Metoda byla úspěšně použita pro stanovení tetracyklinových antibiotik ve formě několika druhů tablet.¹⁴

Ampérometrické detekce lze také využít ve spojení s elektroforézou pro stanovení DX. Před samotnou analýzou musí být vzorek DX antibiotika prekoncentrován, separován pomocí elektroforézy a poté elektrochemicky detekován za užití CPE. Detekční limit byl pro DX 2,1 nmol·l⁻¹. Metoda byla použita ke stanovení DX ve vzorcích hovězího masa.¹⁵

Další z elektrochemických metod stanovení DX je polarografie. Byla užita ke sledování kinetiky a stability Zn²⁺ komplexu s DX. Stabilita komplexu Zn²⁺-DX byla ze sledovaných antibiotik nejnižší. Metodou bylo dokázáno, že Zn²⁺ komplex DX může být využit při otravě zinkem.¹⁸

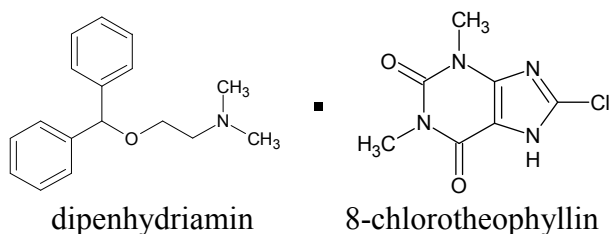
Přehled těchto a dalších elektrochemických metod pro stanovení DX je uveden v tabulce 1.3.

Tab. 1.3 Přehled elektrochemických stanovení DX

| CITACE | METODA | ELEKTRODA | PROSTŘEDÍ | POTENCIÁL DETEKCE (V) | LOD |
|--------|---|------------------------|---|--------------------------|---------------------------|
| 14 | FIA – Ampérometrická Detekce | BDDE | 0,1M fosfátový pufr | 1,6 | 10 mmol·l ⁻¹ |
| 15 | Elektroforéza | CPE | 10 mM fosfátový pufr | - | 2,1nM |
| 16 | HPLC – Ampérometrická detekce | GCE | mobilní fáze | 1,2 | - |
| 17 | FIA – Pulzní amperometrická detekce | Zlatý rotující disk | 0,1M KH ₂ PO ₄ (pH 2) | 1,1 | 1 μM |
| 18 | Polarografie | Rtuťová kapková | 1,0 mol·l ⁻¹ NaClO ₄ | - | - |
| 19 | Voltametrie, ampérometrie | GCE | 0,05 mol·l ⁻¹ fosfátový pufru (pH 2,0) | - | 0,44 μmol·l ⁻¹ |
| 20 | HPLC – Ampérometrická detekce | BDDE | Na ₂ EDTA- McIlvaine pufr (pH 4) | 1,5 | 0,1 μg·ml ⁻¹ |

1.3 Dimenhydrinát

Dimenhydrinát (DMH, Obr. 1.4) je první generací antihistaminika a nejvíce se používá jako účinná látka v léčích proti nevolnosti. Je solí dipenhydraminu a 8-chlorotheophyllinu.²¹ V tabulce 1.4 jsou uvedeny základní informace DMH.



Obr. 1.4 Struktura dimenhydrinátu

Tab. 1.4 Základní informace DMH

| NÁZEV | SYSTEMATICKÝ NÁZEV | SUMÁRNÍ VZOREC | CAS R.N. | M _r |
|---------------|--|--|----------|----------------|
| Dimenhydrinát | 2-benzhydroxy-N,N-dimethyl-ethanamin; 8-chloro-1,3-dimethyl-7H-purin-2,6-dion | C ₁₇ H ₂₁ NO · C ₇ H ₇ ClN ₄ O ₂ | 523-87-5 | 469,96 |

1.3.1 Užití

Farmakologicky se DMH využívá, jako antihistaminikum, antiemetikum (proti zvracení).²¹ Antihistaminika jsou léky užívané k utišení alergických reakcí blokováním H1 receptoru pro histamin.²² Aktivní částí u DMH je diphehydramin, který blokování H1 receptorů v centrální nervové soustavě umožňuje.²¹

1.3.2 Příprava, fyzikální vlastnosti

DMH je možno připravit rozpuštěním 8-chlorotheo-phyllinu ve slabě zásaditém organickém rozpouštědle, jako je např. methylethylketon nebo ethanol. Chlazením roztoku vznikne písčité sraženina v přibližně stejném množství, jako přidaného 8-chlorotheo-phyllinu.²³

DMH má bílou barvu, spektrum se nachází v oblasti 220-300 nm a má teplota tání 97,21°C.²⁴

1.3.3 Metody stanovení

DMH byl stanoven v krevní plazmě kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotností spektrometrií. Vzorek byl extrahován (extrakce kapalina-kapalina) v hexan/acetát roztoku a poté přenesen na chromatografickou kolonu spojenou s hmotnostním spektrometrem.²⁵

Ke stanovení DMH v tabletě byla použita UV-spektroskopie. Tableta byla rozpuštěna ve dvakrát destilované vodě. Roztok byl přefiltrován a zředěn vodou. Metoda poskytuje výsledky přesné a v širokém koncentračním rozsahu.²⁶

Přehled stanovené je zobrazen v tabulce 1.5.

Tab. 1.5 Přehled stanovení DMH

| CITACE | METODA | MATRICE | EXTRAKCE | PROSTŘEDÍ | CITLIVOST |
|--------|------------------|---------------|----------|---------------------|-----------|
| 25 | LC-MS/MS | Krevní plasma | LLE | Hexan/acetát | 0.4 ng/ml |
| 26 | UV-spektroskopie | Tableta | - | 2x destilovaná voda | - |

Z elektrochemických metod byl stanoven v tabletě pouze pomocí AdSV na rtuťové kapkové elektrodě. DMH poskytuje jeden katodický pík ($E = -0,24 \text{ V}$) po akumulaci v acetátovém pufru o pH 3,8. Kalibrační závislost pro stanovení DMH byla lineární v rozsahu $2,0 \cdot 10^{-8}$ až $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekční limit DMH při 5 minutové akumulaci byl $1,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.²⁷

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky DX a DMH (obě Sigma Aldrich) o koncentracích $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro měření kalibračních křivek a $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro měření závislosti na pH roztoku byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství látky v 10 ml destilované vody, u DMH za pomoci ultrazvukové lázně. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků sledovaných látek destilovanou vodou. Zásobní roztoky byly pro každý den měření připraveny čerstvě připravené.

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH (Lachema Ner., ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (Lachema, Brno, ČR), fosforečnou (Lachema, Brno, ČR) a octovou (Lachema Ner., ČR), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přesná hodnota pH byla měřena digitálním 3510 pH metrem Jenway (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda Milipore USA.

Další použité chemikálie: polystyren (extrudovaná forma), uhlík (Maziva Týn s.r.o., Týn nad Vltavou), dichlorethan (99,5%, Merck, Praha, ČR) a methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

2.2 Aparatura

Při voltametrických technikách, DC voltametii a diferenční pulzní voltametii, byla použita sestava Mini – and Microelectrode Systém UM μ E (ETP-21-10) se softwarem PolarPro verze 5.1, (Polaro-Sensors, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP.

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referenční použita elektroda argentchloridová typu ETP-CZ-RO1008 ($0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, EcoTrend Plus, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda ETP-CZ-PO1006 (EcoTrend Plus, ČR). Pracovní elektrodou byla uhlíková filmová elektroda (stříbrná amalgánová elektroda 2-05-11 o průměru 0,4 mm pokrytá uhlíkovým filmem, EcoTrend Plus, ČR).

Na pracovní elektrodu byl nanášen uhlíkový film, který byl pro každý den měření připravován čerstvý. Byl připraven z 0,01 g polystyrenu, 0,09 g uhlíku a 0,5 ml dichlorethanolu. Před prvním nanesením filmu byla elektroda broušena na smirkovém papíru o hrubosti 3000 navlhčeném

destilovanou vodou po dobu 2 – 3 minut, a poté doleštěna na filtračním papíru s methanolem. Po vyleštění elektrody byl nanesen uhlíkový film. Při měření závislosti vlivu pH byl po každé změně pH roztoku film elektrody vyměněn. Naopak měření kalibračních křivek probíhala bez výměny filmu. Při druhém a dalším nanášení filmu byla elektroda vyleštěna pouze filtračním papírem s methanolem.

Při DPV byly na elektrody vkládány pulzy o šířce 100 ms a modulační amplitudě 50 mV. Při technice DCV i DPV byla použita rychlost nárůstu potenciálu $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 8453 UV-Visible Spectrophotometer v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm.

Pro odstředění vzorku léčiv s obsahem DX a DMH byla použita mikrocentrifuga Denver Instrument (US) – 10000 otáček/min – po dobu 10 min.

2.3 Pracovní postupy

Při voltametrických měřeních bylo do voltametrické nádoby odpipetováno 20 – 1000 μl roztoku sledovaných látek o příslušné koncentraci a roztok byl doplněn BR puforem o příslušném pH na celkový objem 10 ml. Před měřením roztoku se studovanou látkou byl vždy proměřen základní elektrolyt. Roztok byl zbaven kyslíku probubláváním dusíkem po dobu 2 – 3 min.

Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok 30 s probubláván. Křivky základního roztoku byly změřeny třikrát a křivky se studovanou látkou pětkrát. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

U měření závislosti signálu DX na pH byl film po každé změně pH vyměněn. To bylo prováděno z důvodu četnosti měření a změny pracovního prostředí v závislosti na pH, které mohlo zapříčinit pasivaci nebo změnu chování filmu.

Jelikož měření kalibrační křivky bylo prováděno v prostředí o jednom pH, byla kalibrační křivka proměřena bez výměny filmu.

Postup při vyhodnocování křivek se lišil podle použitých voltametrických technik. Vyhodnocení DCV vlny bylo prováděno prodloužením lineární části záznamu před nástupem a po nástupu vlny a byl změřen potenciál v polovině výšky vlny. Výška DPV píku byla vyhodnocována od spojnice minim po jeho stranách, změřením velikosti proudu mezi touto spojnici a maximem píku.

Mez stanovitelnosti byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky pěti měření sledované látky o koncentraci v nejnižším bodě příslušné kalibrační přímky.²⁸

2.4 Stálost pracovních roztoků

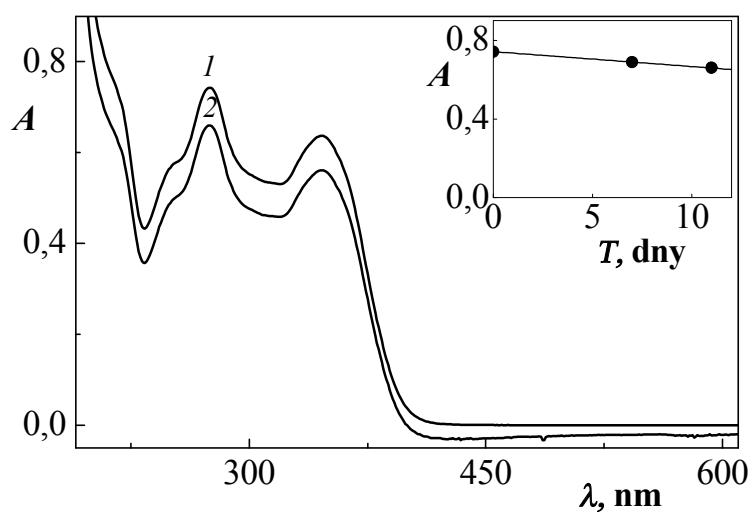
Stálost zásobního roztoku studovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Jelikož maximální hodnota absorbance byla vyšší než 1,5, byla stálost zásobního roztoku DX i DMH sledována po zředění. K tomuto účelu byly každý den měření stálosti zásobní roztoky naředěny 21 krát na výslednou koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro obě studované látky. Referentní kyveta byla naplněna destilovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce, kde měla studovaná látka absorpční maximum ($\lambda_{\text{DX}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{DMH}} = 278 \text{ nm}$) viz obrázky 2.1 a 2.2. Výsledky sledování stálosti zásobních roztoků jsou uvedeny v tabulkách 2.1 a 2.2

Stabilita DX v rámci tří hodin byla stabilní, ale po týdnu výrazně klesá, a proto bylo nutné každý den připravovat čerstvý roztok. Absorpční spektrum DX je zobrazeno na obrázku 2.1.

Stabilita DMH byla po 13 dnech o něco vyšší než absorbance čerstvého roztoku a v průběhu dní se výrazně neměnila. Z výsledků vyplývá, že zásobní roztok DMH ve vodě byl při uchování ve tmě a za laboratorních podmínek stálý po dobu nejméně 1 měsíce. Absorpční spektrum DMH je zobrazeno na obrázku 2.2.

Tab. 2.1 *Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku DX ($c = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v destilované vodě. Hodnoty relativní změny absorbance jsou vztaženy k nultému dni, kdy byl zásobní roztok připraven.*

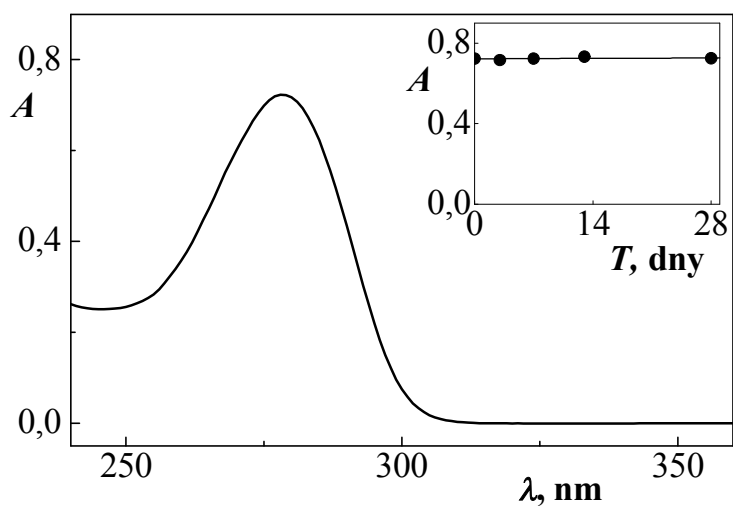
| DNY | 0 | 7 | 11 |
|-------------------|--------|--------|--------|
| A (275nm) | 0,7430 | 0,6885 | 0,6599 |
| ZMĚNA SIGNÁLU (%) | 100,0 | 92,7 | 88,8 |



Obr. 2.1 Absorpční spektrum roztoku DX ($c = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v destilované vodě. Měřeno proti destilované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Křivky – 1 čerstvý roztok, 2 – roztok po 11 dnech. Vložená závislost absorbance při vlnové délce 275 nm na čase.

Tab. 2.2 Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku DMH ($c = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v destilované vodě. Hodnoty relativní změny absorbance jsou vztaženy k nultému dni, kdy byl zásobní roztok připraven.

| DNY | 0 | 3 | 7 | 13 | 28 |
|------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| A (278nm) | 0,7232 | 0,7162 | 0,7239 | 0,7321 | 0,7244 |
| % | 100,0 | 99,0 | 100,1 | 101,2 | 100,2 |



Obr. 2.2 Absorpční spektrum roztoku DMH ($c = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v destilované vodě. Měřeno proti destilované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Vložena závislost absorbance při vlnové délce 278 nm na čase.

3 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ NA UHLÍKOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

3.1 Doxycyklin

3.1.2 DC voltametrie

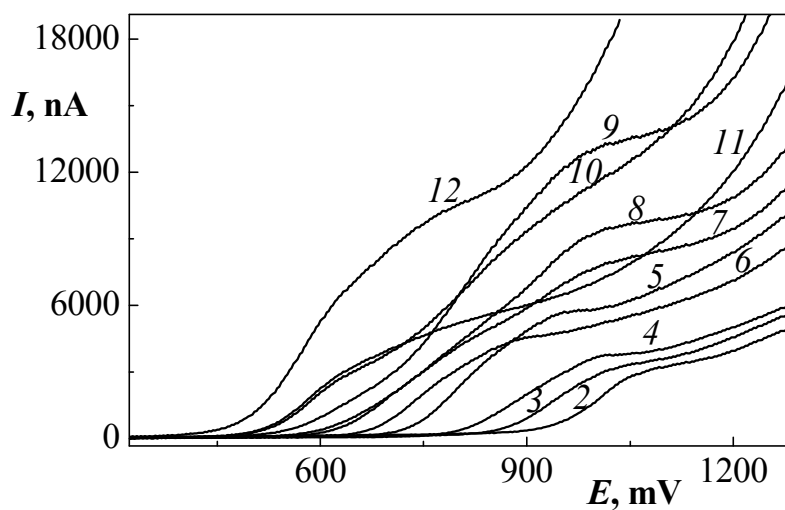
Vliv pH na chování DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DCV na CFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka poskytovala v oblasti pH 2 – 6 jednu vlnu, při pH 7 se objevily DX vlny dvě a v pH 8 a 9 byla viditelná pouze vlna druhá. DX při pH 10 stejně jako při pH 7 poskytoval opět obě dvě vlny a při pH 11 a 12 byla viditelná pouze vlna první, což mohlo být zapříčiněno splynutím dvou vln do jedné. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.1. Potenciál všech vln s rostoucím pH klesal.

Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ na pH v roztoku (viz Obr. 3.2) v rozmezí pH 2,0 – 7,0 vypočten vztah:

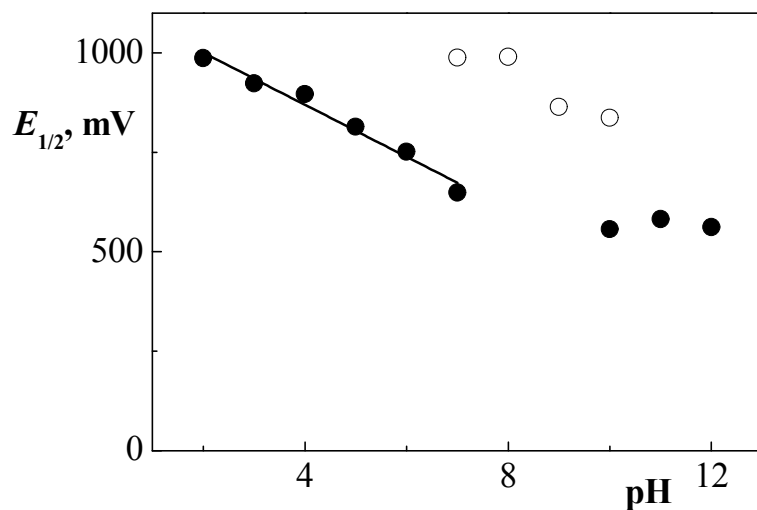
$$E_{1/2} \text{ (mV)} = -65,371 \text{ pH} + 1103,8 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9757).$$

Zjištěné hodnoty půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ a proudu vlny I_v v závislosti na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.1. Graficky je závislost $E_{1/2}$ a I_v na pH znázorněna na obrázcích 3.2 a 3.3. Ze závislosti I_v na pH je vidět, že závislost proudu vlny byla vysoce proměnná a nejvyšší signál byl v oblasti pH 12.

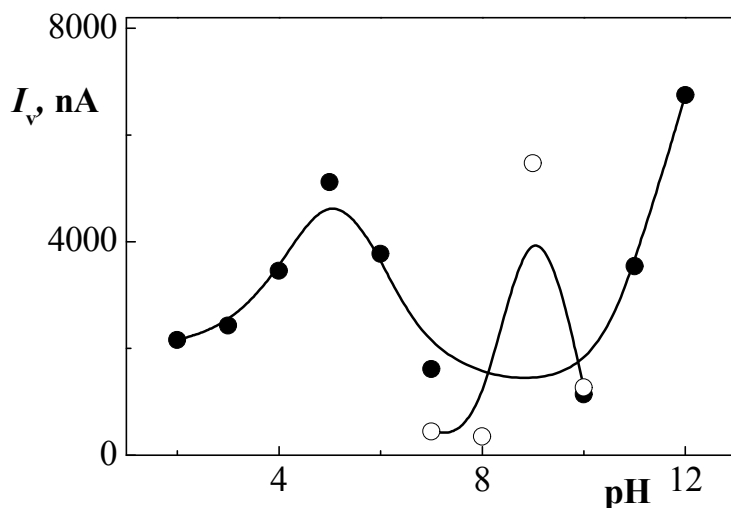
Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 12. V tomto prostředí látka poskytovala nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelnou vlnu a opakovaná měření byla stálá (RSD = 0,23 %).



Obr.3.1 Voltamogramy DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DCV na CFE v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Hodnoty pH odpovídají číslům křivek v grafu.



Obr. 3.2 Závislost půlvlnového potenciálu DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první vlna, ○ – druhá vlna.



Obr. 3.3 Závislost proudu vlny I_v DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první vlna, ○ – druhá vlna.

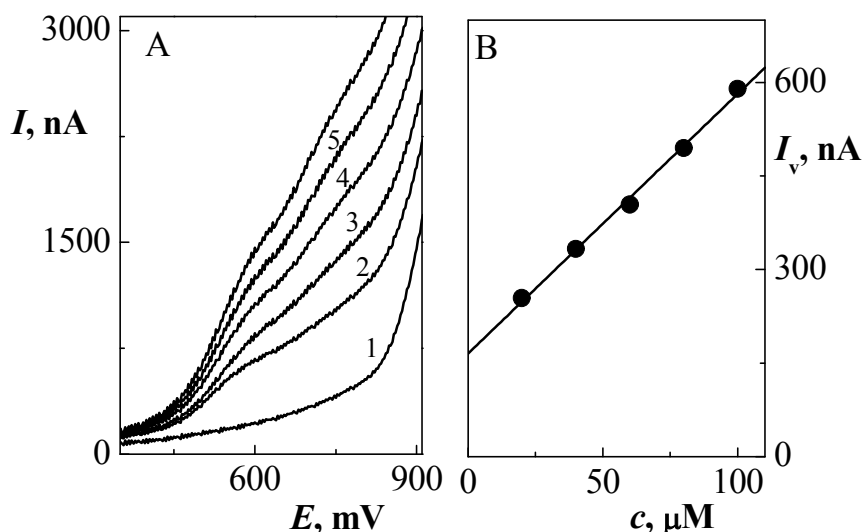
Tab. 3.1 Vliv pH na signály DX měřeno DCV na CFE ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí BR pufru.

| pH | $E_{1/2}^1$ [mV] | I_v^1 [nA] | $E_{1/2}^2$ [mV] | I_v^2 [nA] |
|------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| 2,0 | 987 | 2158 | - | - |
| 3,0 | 923 | 2430 | - | - |
| 4,0 | 896 | 3455 | - | - |
| 5,0 | 814 | 5113 | - | - |
| 6,0 | 751 | 3771 | - | - |
| 7,0 | 649 | 1613 | 988 | 443 |
| 8,0 | - | - | 990 | 351 |
| 9,0 | - | - | 864 | 5468 |
| 10,0 | 557 | 1135 | 837 | 1267 |
| 11,0 | 582 | 3543 | - | - |
| 12,0 | 562 | 6744 | - | - |

Opakovaným měřením (5 krát) při koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo ověřeno, že elektroda není látkou pasivována (RSD = 1,2 %). Koncentrační závislosti pro DX byly proměřeny metodou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12 v koncentračním rozmezí $20 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Závislosti proudu vlny na potenciálu jsou znázorněny na Obr. 3.4 (A).

Graf závislosti výšky vlny I_v na koncentraci DX v rozmezí $20 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je na Obr. 3.4 (B). Závislost výšky vln na koncentraci byla lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.2.

Pro kontrolu opakovatelnosti výšky vln při použitém režimu bylo provedeno opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dosažena mez stanovitelnosti byla $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD = 0,25 %).



Obr. 3.4 Voltamogramy DX měřené technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12. c (DX): 0 (1), 20 (2), 40 (3), 60 (4), 80 (5), 100 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a závislost proudu vlny I na koncentraci DX v rozmezí $20 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (B).

Tab. 3.2 Parametry kalibračních závislostí DX v rozmezí $20 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12.

| KONCENTRACE ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | ÚSEK (nA) | SMĚRNICE (nA. μmol^{-1} .l) | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) |
|--|--------------|---|-------------------------|--|
| 20 – 100 | 165,23 | 4,16 | 0,9966 | 15 |

3.1.1 Diferenční pulzní voltametrie

Vliv pH na chování DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DPV na CFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.5. Látka poskytovala v oblastech 2,0 – 6,0 a 11,0 – 12,0 jeden pík a při pH 7,0 – 10,0 dva. Potenciál píků, které se objevily v celé škále pH, s rostoucím pH klesal.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH (viz Obr. 3.6) v roztoku v rozmezí pH 2,0 – 10,0 pro první potenciál prvního píku E_p vypočten vztah:

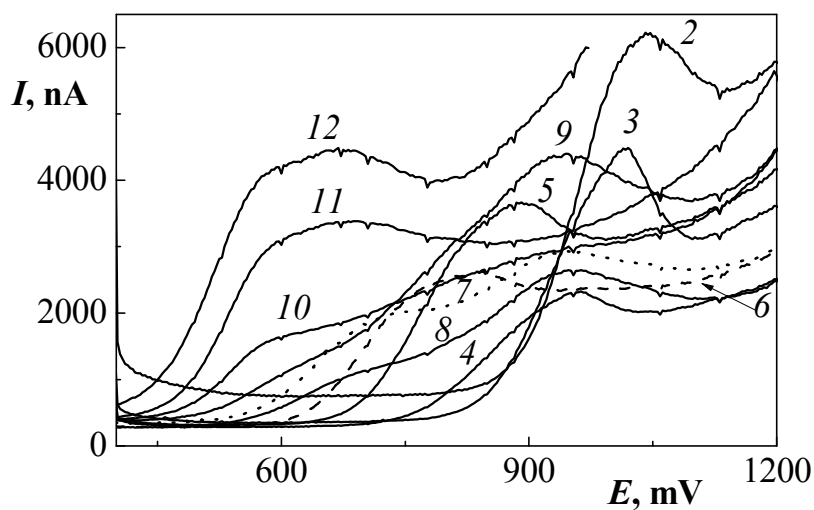
$$E_p \text{ (mV)} = -59,533 \text{ pH} + 1186 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9897)$$

Zjištěné hodnoty potenciálu píku E_p a proudu píku I_p na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.3. Graficky je závislost E_p a I_p na pH znázorněna na obrázcích 3.6 a 3.7. Ze závislosti I_p na pH vyplývá, že závislost proudu píku na pH je proměnná a nejvyššího signálu bylo dosaženo při pH 2 a 12.

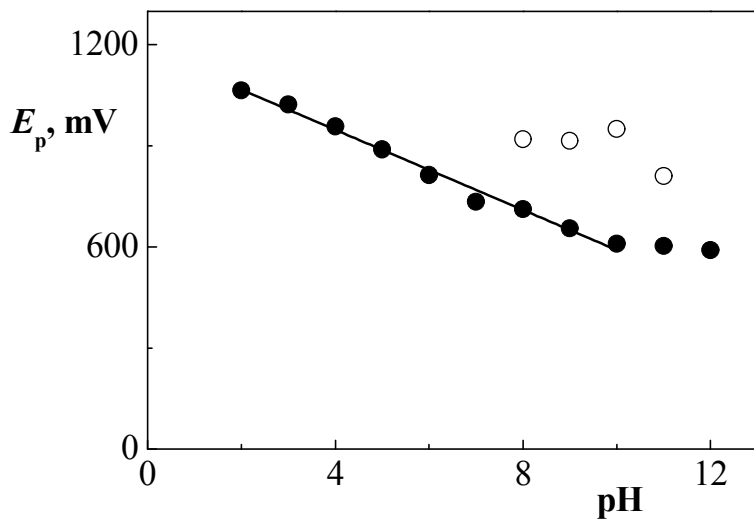
Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 12 oproti pH 2. DX poskytuje při pH 2 vysoký signál, ale při opakovaném měření signál výrazně klesnul (o více než polovinu). Na rozdíl od pH 12, kde byl signál i po pátém opakovaném měření lépe vyhodnotitelný.

Ve zvoleném prostředí o pH 12 byl roztok DX ($c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) proměřen 12 krát na jednom filmu. Z výsledků vyplývá, že signál v prvních 3 měřeních klesal, RSD = 2,5 % viz Obr. 3.8.

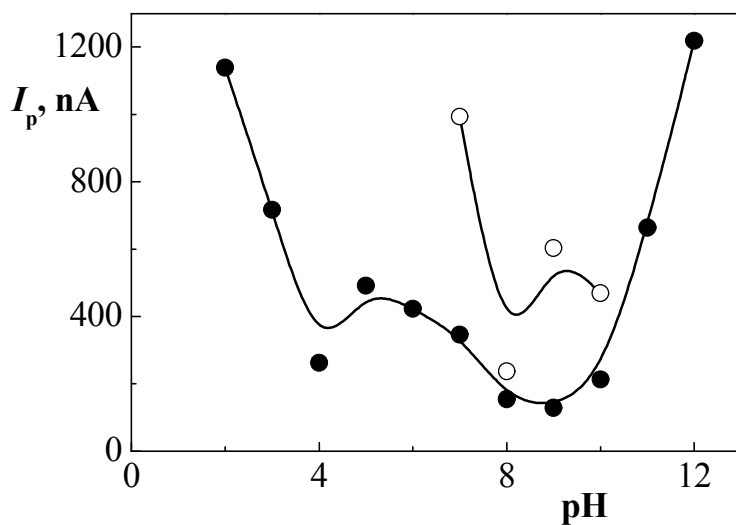
Byl sledován také vliv výměny filmu na signál elektrody. Na obrázku 3.9 je závislost signálu na pořadovém čísle filmu. Na jednom filmu bylo provedeno pět měření, film byl vyměněn celkem 12 krát. Z grafu je vidět, že signály jsou po každé výměně filmu jiné. To mohlo být ovlivněno leštěním elektrody, přípravou filmu, ale hlavně jeho nanášením na elektrodu. Proto byla měření závislostí pokud možno prováděna na jednom filmu a signál nově připravených filmů byl kontrolován, zda nevybočuje z průměrně dosahovaných hodnot.



Obr. 3.5 Voltamogramy DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DPV na CFE v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Hodnoty pH odpovídají číslům v grafu.



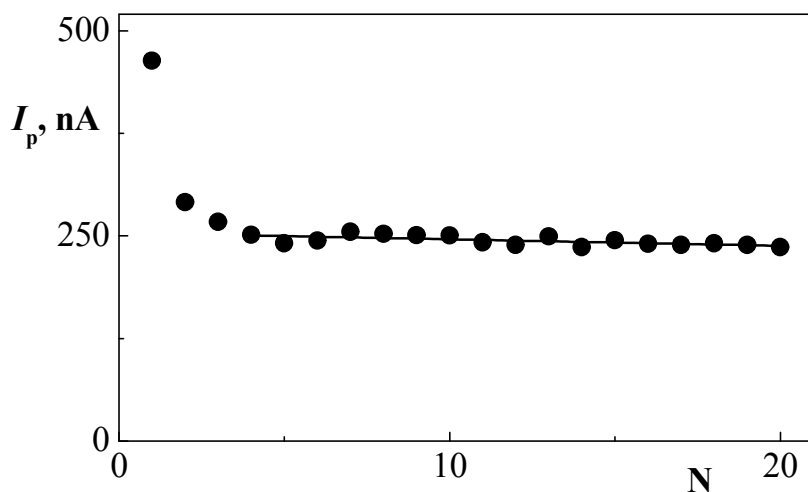
Obr. 3.6 Závislost potenciálu píku DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první pík, ○ – druhý pík.



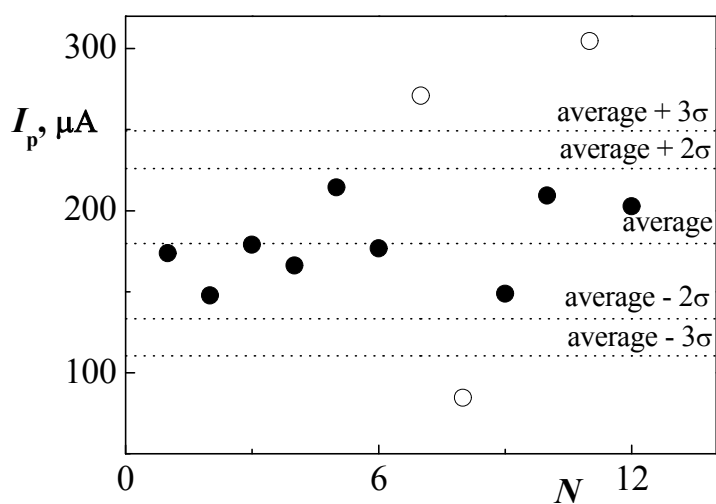
Obr. 3.7 Závislost proudu piku I_p DX ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první pik, ○ – druhý pik.

Tab. 3.3 Vliv pH na signály DX ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno DPV na CFE v prostředí BR pufru.

| pH | E_p^1 [mV] | I_p^1 [nA] | E_p^2 [mV] | I_p^2 [nA] |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2,0 | 1065 | 1139 | - | - |
| 3,0 | 1023 | 717 | - | - |
| 4,0 | 958 | 263 | - | - |
| 5,0 | 889 | 491 | - | - |
| 6,0 | 813 | 423 | - | - |
| 7,0 | 734 | 346 | 920 | 994 |
| 8,0 | 712 | 155 | 915 | 238 |
| 9,0 | 655 | 128 | 950 | 603 |
| 10,0 | 610 | 213 | 810 | 470 |
| 11,0 | 603 | 664 | - | - |
| 12,0 | 590 | 1219 | - | - |



Obr. 3.8 Závislost proudu piku I na počtu měření N při DPV DX ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na CFE, měřeno v prostředí BR pufru o pH 12.



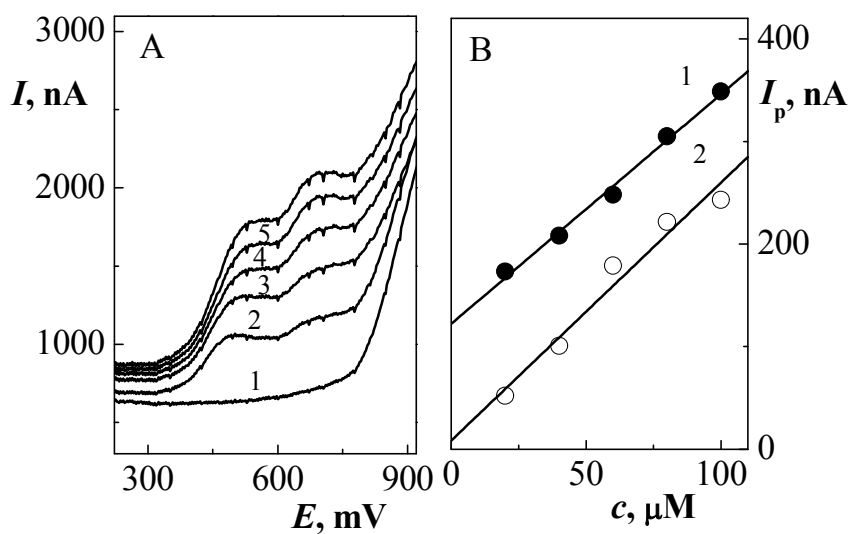
Obr. 3.9 Závislost proudu piku I_p na pořadovém čísle filmu (12krát výměna filmu) N při DPV DX ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na CFE, měřeno v prostředí BR pufru o pH 12. ● – měření ležící v daném rozsahu, ○ – odlehlá měření

Koncentrační závislost pro DX byla proměřena metodou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12 v koncentračním rozmezí 20 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Graficky je kalibrační křivka znázorněna na Obr. 3.10 (B) a závislosti výšky píku I_p na koncentraci DX 20-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou na Obr. 3.10 (A).

Při nižších koncentracích se v prostředí BR pufru o pH 12 objevují dva píky, které při sledování vlivu pH nebylo možné rozlišit, protože při koncentraci $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se píky slévaly do jednoho. Stanovení bylo založené na měření výšky prvního píku, který měl korelační koeficient více blízký jedné, než pro druhý pík.

Závislost výšky píku na koncentraci byla lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.4.

Opakovatelnost měření byla kontrolována opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Mez stanovitelnosti byla u prvního píku $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD = 0,19 %) a druhého píku $18 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD = 0,97 %).



Obr. 3.10 Voltamogramy DX měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12 a koncentraci c (DX): 0 (1); 20 (2); 40 (3), 60 (4); 80 (5); 100 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A) a závislost proudu píku I_p na koncentraci DX v rozmezí 20-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. 1 – první pík, 2 – druhý pík (B).

Tab. 3.4 *Parametry kalibračních závislostí DX v rozmezí 20-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12.*

| PÍK | KONCENTRACE ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | ÚSEK (nA) | SMĚRNICE (nA. $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$) | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) |
|-----|--|--------------|--|-------------------------|--|
| 1 | 20 – 100 | 122,23 | 2,24 | 0,9928 | 15 |
| 2 | | 8,53 | 2,51 | 0,9648 | 18 |

3.1.3 Stanovení v léčivu – Doxyhexal

DX byl stanoven pomocí DCV v tabletě antibiotika Doxyhexalu, která má deklarovaný obsah 100 mg DX. Tableta byla rozpuštěna ve vodě za pomoci ultrazvukové lázně tak, aby zásobní roztok měl koncentraci $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DX. Měření probíhala, i když byl zásobní roztok mírně zakalený.

Obsah DX v tabletě byl stanoven metodou kalibrační křivky a měřen při DCV v prostředí BR pufru o pH 12 (podle již stanovených podmínek pro DX, viz 3.1.2). Pro stanovení nemohla být použita dříve získaná kalibrační křivka, protože se změnou filmu nanášeného na elektrodu se mění její směrnice. Proto před změřením vzorku byla změřena kalibrační křivka v koncentračním rozmezí 20 – 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a následně vzorky antibiotika s očekávanou koncentrací 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Signál vzorku byl dosazen do rovnice regrese získané kalibrační přímkou a vypočtena jeho koncentrace. Vzorky byly stanoveny na třech nově připravených filmech a byl získán shodný výtěžek $98,86 \pm 0,56 \%$. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 3.5.

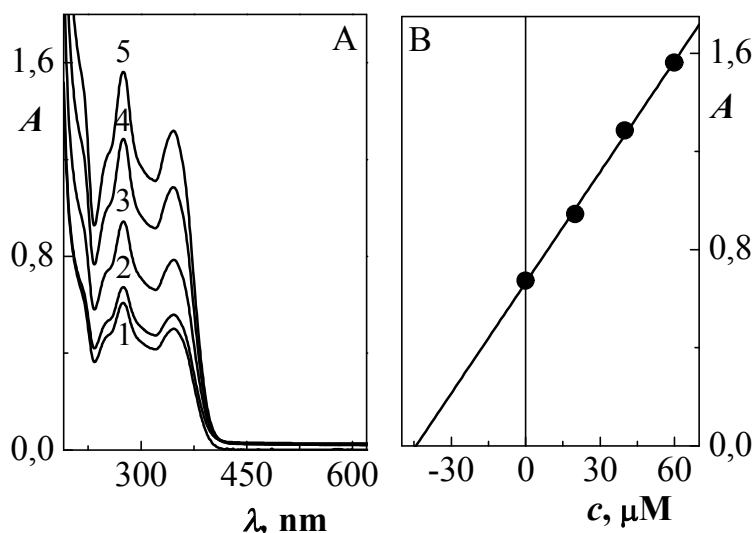
Tab. 3.5 *Parametry kalibračních závislostí DX v rozmezí 20 – 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 12.*

| KALIBRAČNÍ PŘÍMKA | ÚSEK [nA] | SMĚRNICE [nA. $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$] | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | c_{vz} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | | VÝTĚŽEK [%] |
|----------------------|--------------|--|-------------------------|---|-----------|----------------|
| | | | | Očekávaná | Vypočtená | |
| 1. | 16,987 | 5,29 | 0,9995 | | 39,59 | 98,98 |
| 2. | 12,033 | 5,56 | 0,9998 | 40,00 | 39,50 | 98,75 |
| 3. | 11,427 | 5,52 | 0,9991 | | 40,19 | 100,48 |

Stanovení DX bylo provedeno i spektrometricky metodou kalibrační křivky a standardního přídatku při vlnové délce 275 nm. Pro spektrometrické stanovení byl zásobní roztok vzorku centrifugován a následně zbaven všech pevných částic. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Byla proměřena metoda standardního přídatku. Do čtyř 10 ml odměrných baněk bylo pipetováno 400 μl zásobního roztoku vzorku tablety o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. První baňka byla doplněna po rysku. Do zbylých tří byl postupně přidán zásobní roztok standardu DX o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a to tak že do druhé byl přidán objem 200 μl , do třetí 400 μl a čtvrté 600 μl . Očekávaná koncentrace vzorku tablety v roztoku byla $40 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Baňky byly doplněny po rysku. Výtěžek stanovení byl 110,5 %. Graficky je metoda standardního přídatku spolu s křivkami znázorněna na Obr. 3.11 A a B.

Vzhledem k vysokému výtěžku stanovení DX při metodě standardního přídatku byla pro porovnání změřena kalibrační křivka v rozmezí 20 – 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a vzorek tablety s očekávanou koncentrací $40 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výtěžek stanovení byl 101,6 %.



Obr. 3.11 Absorpční spektrum DX (metoda standardního přídatku 0 – 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v destilované vodě. Měřeno proti destilované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Křivky: 1 – čistý DX ($c = 40 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), 2 – vzorek + 0 μl standardního přídatku, 3 – vzorek + 200 μl standardního přídatku, 4 – vzorek + 400 μl standardního přídatku, 5 – vzorek + 600 μl standardního přídatku. (A). Závislost A na koncentraci DX v rozmezí 0-60 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (metoda standardního přídatku). (B)

Tab. 3.6 *Parametry metody standardního přídavku a kalibrační křivky DX. Měřeno technikou UV-VIS spektrometrií.*

| METODA | ÚSEK [nA] | SMĚRNICE [nA· $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$] | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | c_{vz} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | | VÝTĚŽEK [%] |
|------------------------|--------------|--|-------------------------|---|-----------|----------------|
| | | | | Očekávaná | Vypočtená | |
| Standardní přídavek | 0,664 | 0,015 | 0,9994 | 40,00 | 44,19 | 110,5 |
| Kalibrační křivka | -0,016 | 0,016 | 0,9995 | | 40,62 | 101,6 |

3.2 Dimenhydrinát

3.2.2 DC voltametrie

Vliv pH na chování DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DCV na CFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12. Při pH 8 se objevily dvě vlny, jinak se v celé škále pH objevila pouze jedna vlna. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.12. Potenciál vln, které se objevily v celé škále pH, s rostoucím pH mírně klesal.

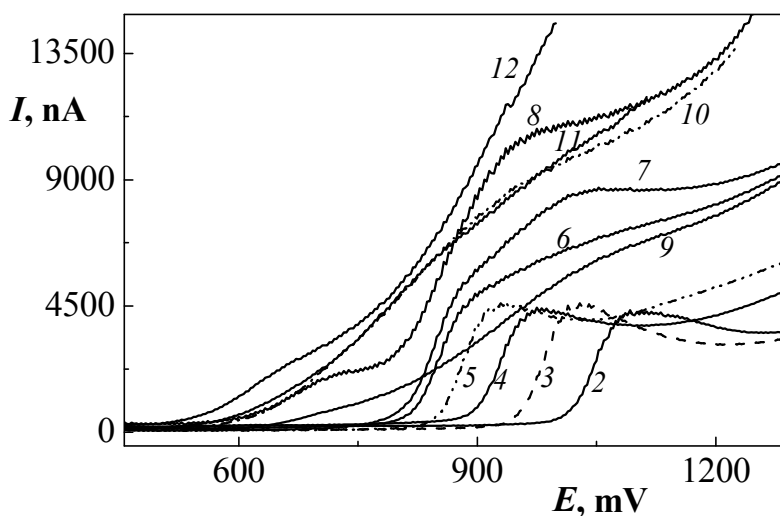
Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvlnového potenciálu na pH v roztoku (viz Obr. 3.13) v rozmezí pH 2,0 – 6,0 pro půlvlnový potenciál $E_{1/2}^1$ a v rozmezí pH 9,0 – 12,0 pro $E_{1/2}^2$ vypočten vztah:

$$E_{1/2}^1 \text{ (mV)} = -50,2 \text{ pH} + 1140,8 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9862)$$

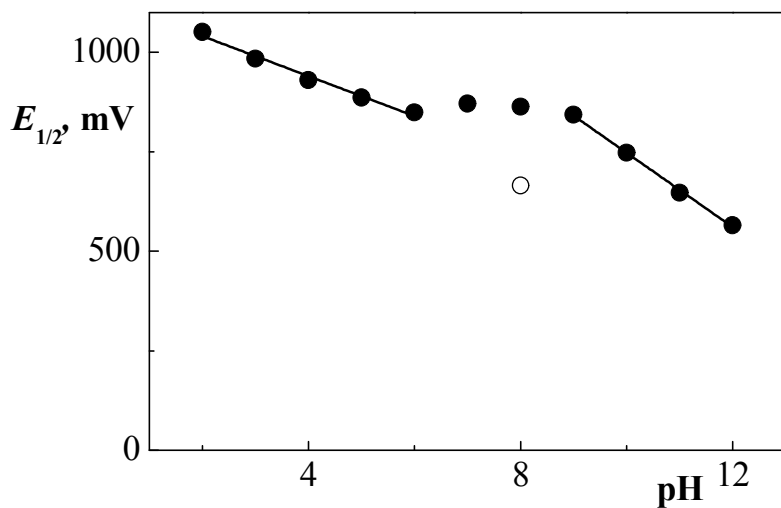
$$E_{1/2}^2 \text{ (mV)} = -93,4 \text{ pH} + 1681,2 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9983).$$

Zjištěné závislosti půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ a proudu vlny I_v na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.7. Graficky je závislost $E_{1/2}$ a I_v na pH znázorněna na obrázcích 3.13 a 3.14. Ze závislosti I_v na pH je vidět, že závislost proudu píku na pH je vysoce proměnná.

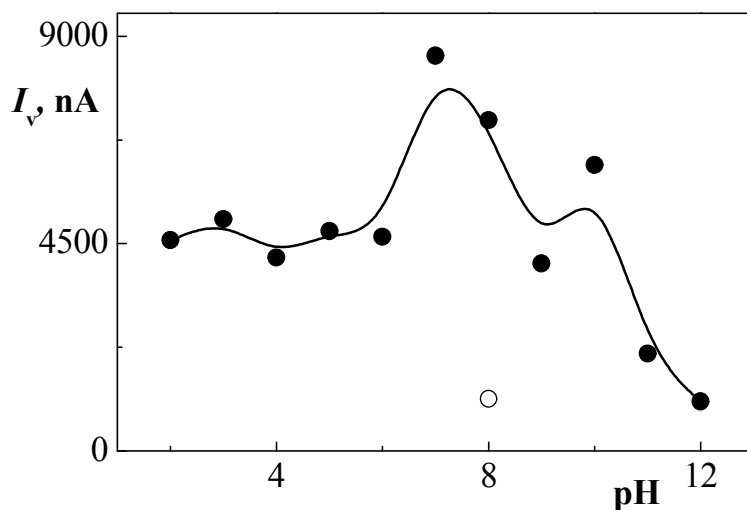
Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 3. V tomto prostředí látka poskytovala nejvyšší vlnu. V zásaditém pH jsou měření méně přesná a hůře vyhodnotitelná, zatím co DMH poskytoval stabilní výsledky v kyselém prostředí.



Obr. 3.12 Voltamogramy DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DCV na CFE v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Hodnoty pH odpovídají číslům v grafu.



Obr. 3.13 Závislost půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ vln DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první vlna (pH 2 - 12); ○ – druhá vlna (pH 8).



Obr. 3.14 Závislost proudu vln I_v DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru. ● – první vlna (pH 2 - 12); ○ – druhá vlna (pH 8).

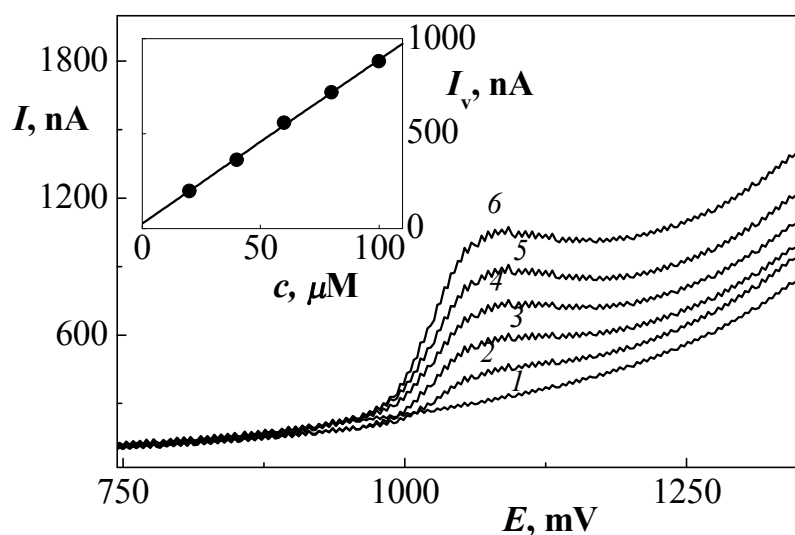
Tab. 3.7 Vliv pH na signály DMH ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno v prostředí BR pufru technikou DCV na CFE.

| pH | $E_{1/2}^1$ [mV] | I_v^1 [nA] | $E_{1/2}^2$ [mV] | I_v^2 [nA] |
|------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| 2,0 | 1051 | 4577 | - | - |
| 3,0 | 984 | 5032 | - | - |
| 4,0 | 930 | 4197 | - | - |
| 5,0 | 886 | 4768 | - | - |
| 6,0 | 849 | 4647 | - | - |
| 7,0 | 871 | 8579 | - | - |
| 8,0 | 863 | 7174 | 641 | 1401 |
| 9,0 | 843 | 4071 | - | - |
| 10,0 | 747 | 6202 | - | - |
| 11,0 | 647 | 2113 | - | - |
| 12,0 | 565 | 1074 | - | - |

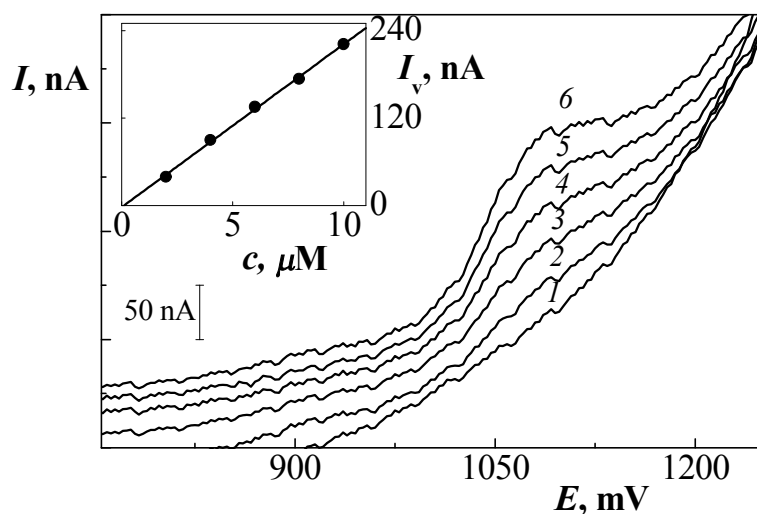
Koncentrační závislosti pro DMH byly proměřeny metodou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3 v koncentračním rozmezí 20 – 100 a 2 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Graficky jsou kalibrační křivky znázorněny na Obr. 3.15 a 3.16.

Grafy závislosti výšky vlny I_v na koncentraci DMH 20 – 100 a 2 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou na Obr. 3.15 a 3.16. Závislost výšky vln na koncentraci byla lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.8.

Kontrola opakovatelnosti výšky vln při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 2,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dosažená mez stanovitelnosti byla $0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD = 0,05 %).



Obr. 3.15 Voltamogramy DMH měřené technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3. c (DMH): 0 (1); 20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vložena závislost proudu vlny I_v na koncentraci DMH v rozmezí 20 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 3.16 Voltamogramy DMH měřené technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3. c (DMH): 0 (1); 2,0 (2); 4,0 (3); 6,0 (4); 8,0 (5); 10,0 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vložena závislost proudu vlny I_v na koncentraci DMH v rozmezí 2,0 – 10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.8 Parametry kalibračních závislostí DMH. Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3.

| | KONCENTRACE ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | ÚSEK (nA) | SMĚRNICE (nA. $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) |
|----|--|--------------|--|-------------------------|--|
| 1. | 20 – 100 | 26,58 | 8,62 | 0,9988 | - |
| 2. | 2 – 10 | -2,66 | 22,41 | 0,9983 | 0,08 |

3.2.1 Diferenční pulzní voltametrie

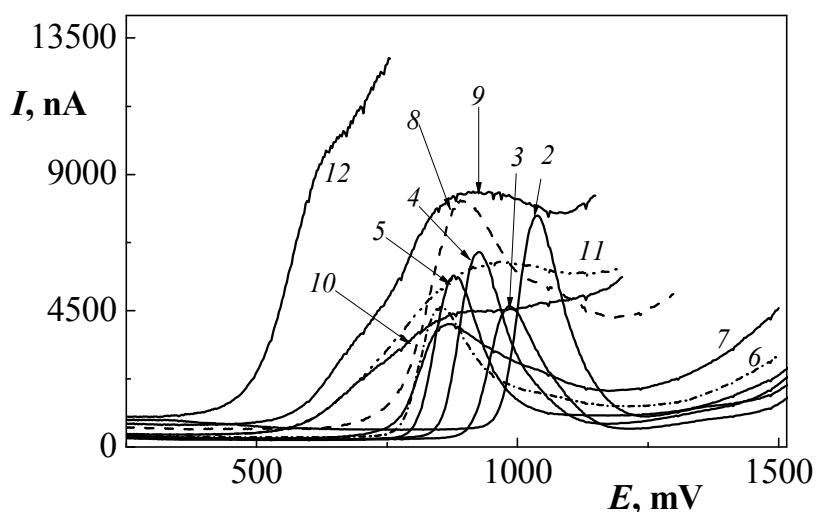
Vliv pH na chování DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DPV na CFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka poskytovala v celé oblasti pH jeden pík. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obrázek 3.17.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH (viz Obr. 3.18) v roztoku v rozmezí pH 2,0 – 10,0 vypočten vztah:

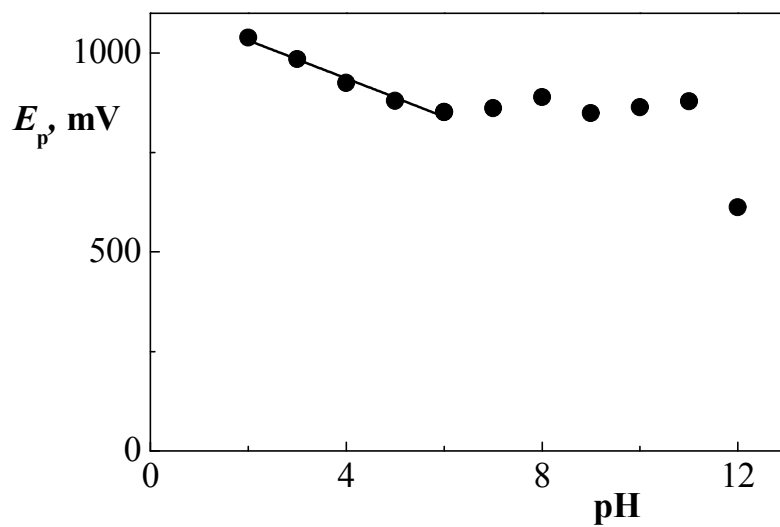
$$E_p \text{ (mV)} = -49,87 \text{ pH} + 1128 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9840).$$

Potenciál píků s rostoucím pH mírně klesal jen do pH 6. Zjištěné závislosti potenciálu píku E_p a proudu píku I_p na pH roztoku jsou uvedeny v tabulce 3.9. Graficky je závislost E_p a I_p na pH znázorněna na obrázcích 3.18 a 3.19. Závislosti I_p na pH je nepřímo úměrná.

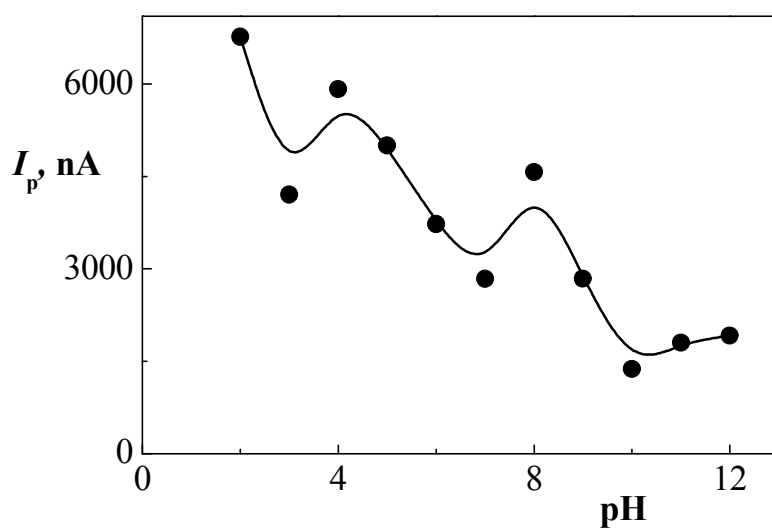
Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 2. V tomto prostředí látka poskytovala nejvyšší pík. S postupně zvyšujícím se pH se píky DMH rozšiřovaly, u pH 12 až mizely.



Obr. 3.17 Voltamogramy DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Hodnoty pH odpovídají číslům v grafu.



Obr. 3.18 Závislost potenciálu píku DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru.



Obr. 3.19 Závislost proudu píku DMH ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru.

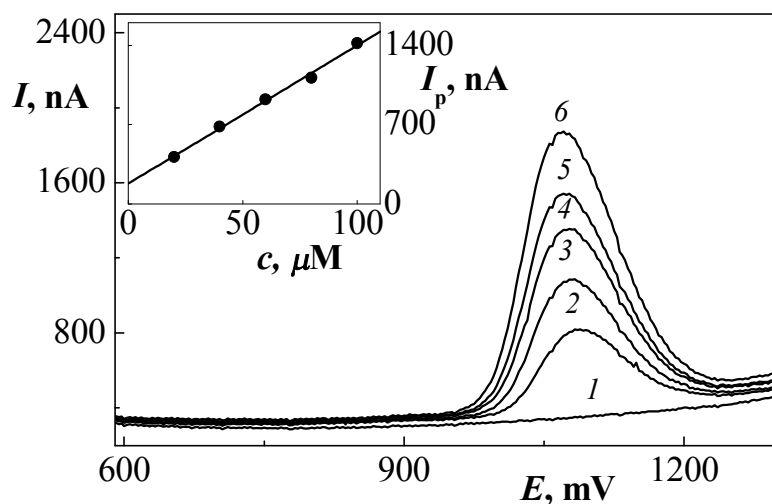
Tab. 3.9 Vliv pH na signály DMH ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru.

| pH | E_p [mV] | I_p [nA] |
|------|---------------|---------------|
| 2,0 | 1039 | 6765 |
| 3,0 | 985 | 4205 |
| 4,0 | 925 | 5917 |
| 5,0 | 880 | 5003 |
| 6,0 | 852 | 3725 |
| 7,0 | 861 | 2837 |
| 8,0 | 889 | 4571 |
| 9,0 | 849 | 2842 |
| 10,0 | 864 | 1374 |
| 11,0 | 878 | 1803 |
| 12,0 | 612 | 1915 |

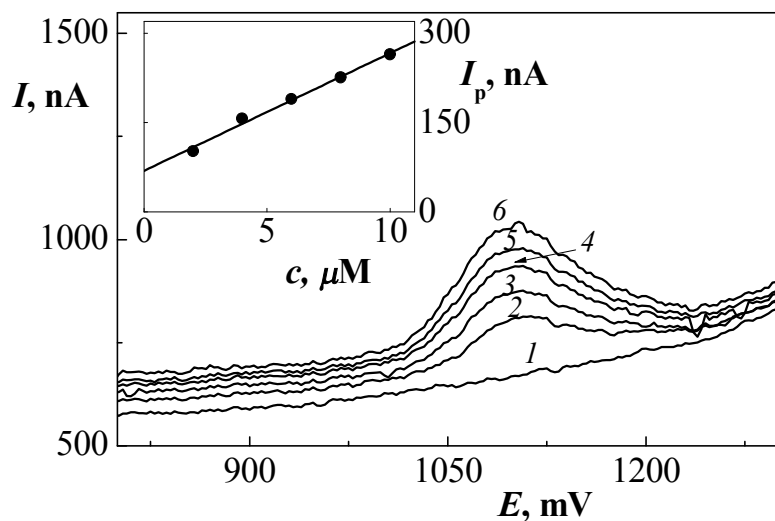
Koncentrační závislosti pro DMH byly proměřeny metodou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2 v koncentračním rozmezí 20 – 100; 2 – 10; 0,2 – 1,0 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kalibrační křivky jsou znázorněny ve vloženém grafu na obr. 3.20, 3.21 a 3.22.

Grafy závislosti výšky píku I_p na koncentraci DMH jsou na obr. 3.20, 3.21 a 3.22. Závislost výšky píků na koncentraci byla lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.10.

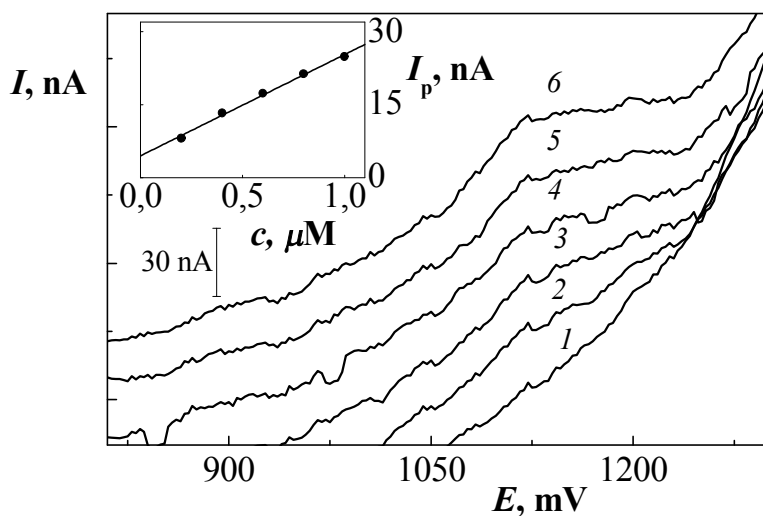
Kontrola opakovatelnosti výšky píků při použitém režimu byla provedena opakovaným změřením voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Dosažená mez stanovitelnosti byla $0,02 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (RSD = 0,04 %).



Obr. 3.20 Voltamogramy DMH měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2. c (DMH): 0 (1); 20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vložená závislost proudu píku I_p na koncentraci DMH v rozmezí 20 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 3.21 Voltamogramy DMH měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2. c (DMH): 0 (1); 2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vložená závislost proudu píku I_p na koncentraci DMH v rozmezí 2 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 3.22 Voltamogramy DMH měřené technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 2. c (DMH): 0 (1); 0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4); 0,8 (5); 1,0 (6) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Vložená závislost proudu píku I_p na koncentraci DMH v rozmezí 0,2 – 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.10 Parametry kalibračních závislostí DMH. Měřeno technikou DPV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3.

| KONCENTRACE ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | ÚSEK (nA) | SMĚRNICE (nA. μmol^{-1} .l) | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | LOQ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) |
|--|--------------|---|-------------------------|--|
| 20 – 100 | 179,77 | 12,19 | 0,9955 | - |
| 2 – 10 | 69,17 | 19,75 | 0,9919 | - |
| 0,2 – 1,0 | 4,48 | 20,84 | 0,9947 | 0,02 |

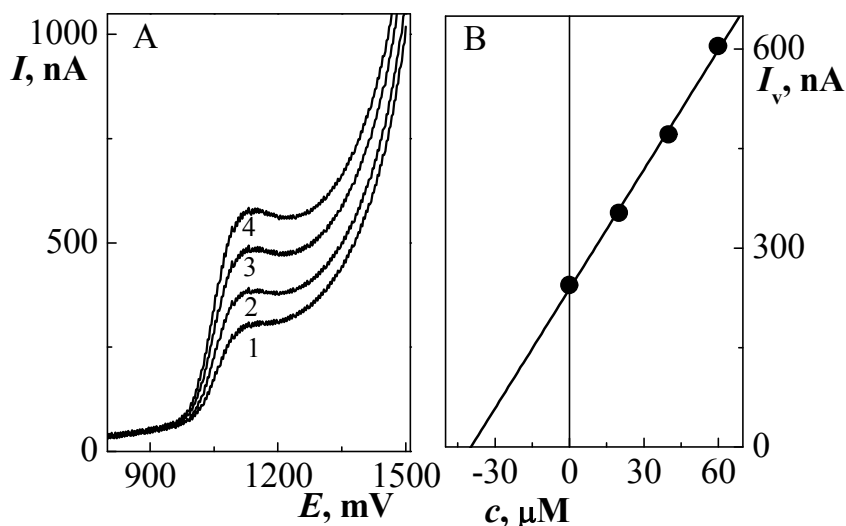
3.2.3 Stanovení v léčivu – Travel Gum

DMH byl stanoven pomocí DCV ve žvýkačce proti nevolnosti Travel Gum, která má deklarovaný obsah 50 mg DMH v každé tabletě. Tableta byla rozpuštěna ve vodě za pomoci ultrazvukové lázně tak, aby zásobní roztok měl koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DMH. Pro urychlení usazení nerozpuštěných částic v roztoku byl roztok centrifugován.

Obsah DMH v tabletě byl stanoven metodou standardního přídatku a měřen pomocí DCV v prostředí BR pufru o pH 3 (podle již stanovených podmínek pro DIM, viz 3.2.1). K 0,4 ml roztoku vzorku byl přidán BR pufr o pH 3 na celkový objem 10 ml, byla zaznamenána křivka a následně byly provedeny tři přídatky standardu (200 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), které odpovídaly nárůstu koncentrace vždy o $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dosazením do rovnice vzniklé lineární závislosti byla vypočtena koncentrace DMH v tabletě.

Výtěžek stanovení byl 99,23 %. Graficky je metoda standardního přídatku zobrazena na obrázku 3,23 a parametry křivky jsou uvedeny v tabulce 3.11.

Obsah DMH nebyl spektrometricky stanoven kvůli vysoké zakalenosti roztoku získaného po rozpuštění tablety. Tento zákal nebylo možno odstranit centrifugací, ale neměl vliv na stanovení pomocí DCV.



Obr. 3.23 Stanovení DMH metodou standardního přídatku, v koncentračním rozmezí standartu $20 - 60 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3.

Tab. 3.11 *Parametry kalibračních závislostí DMH v rozmezí 20 – 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na CFE v prostředí BR pufru o pH 3.*

| ÚSEK [nA] | SMĚRNICE [nA· $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$] | KORELAČNÍ KOEFIČIENT | c_{vz} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] | | VÝTĚŽEK (%) |
|--------------|--|-------------------------|--|-----------|----------------|
| | | | Deklarovaná | Vypočtená | |
| 238,12 | 5,999 | 0,9979 | 40,00 | 39,69 | 99,23 % |

4 ZÁVĚR

Pro stanovení doxycyklinu (DX) a dimenhydrinátu (DMH) bylo využito DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) za použití uhlíkové filmové elektrody (CFE).

DX poskytoval v prostředí BR-pufry o pH 2,0 – 12,0 jednu nebo dvě vlny při DCV a jeden nebo dva píky při DPV.

Pro DX u metody DCV a DPV bylo jako optimální pH určeno pH 12,0, při kterém byla změřena koncentrační závislost v rozsahu koncentrací 20 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočítaná mez stanovitelnosti byla 15,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DCV a pro DPV 15,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metodou DCV byl DX stanoven v léčivu antibiotika Doxyhexal metodou kalibrační křivky. Výtěžek metody byl 98,86 %. Pro srovnání byl DX v tomto léčivu stanoven pomocí voltametrie metodou standardního přídávku s výtěžkem 110,5 % a metodou kalibrační křivky s výtěžkem 101,6 %.

DMH poskytoval v prostředí BR-pufry v celém rozsahu pH jednu nebo dvě vlny pro DCV a jeden dobře vyvinutý pík pro DPV. Pro DMH u metody DCV bylo jako optimální určeno pH 3,0, při kterém byly změřeny koncentrační závislosti v rozsahu koncentrací 2,0 – 10,0 a 20,0 – 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočítaná mez stanovitelnosti byla 0,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro metodu DPV bylo jako optimální stanoveno pH 2,0, při kterém byly změřeny koncentrační závislosti v rozsahu koncentrací 0,2 – 1,0; 2,0 – 10,0 a 20,0 – 100,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočítaná mez stanovitelnosti byla 1,85 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metodu DCV byl DMH stanoven ve zvykačce proti nevolnosti TravelGum metodou standardního přídávku s výtěžkem 99,2 %. DMH nebyl stanoven spektrometricky kvůli vysokému zakalení roztoku rozpuštěného léčiva.

5 LITERATURA

1. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.: *Mikrobiologie*. 1996 ed., Marvil, 1996.
2. Valentín S., Morales A., Sánchez J. L., Rivera A.: *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2, 129 (2009). *Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea*.
3. Gueders M. M., Bertholet P., Perin F., Rocks N., Maree R., Botta V., Louis R., Foidart J.-M., Noel A. s., Evrard B., Cataldo D. D.: *Biochemical pharmacology* 75, 514 (2008). *A novel formulation of inhaled doxycycline reduces allergeninduced inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by matrix metalloproteinases and cytokines modulation in a mouse model of asthma*.
4. Wilson R. C., Douglas T. Kemp, Kitzman J. V., Goetsch D. D.: *Canadian Journal of Veterinary Research* 52, 12 (1988). *Pharmacokinetics of Doxycycline in Dogs*.
5. Pirotte B., Felekidisa A., Fontaineb M., Demonceau A., Noels A. F., Delargea J., Chizhevsky I. T., Zinevich T. V., Pisareva I. V., Bregadze V. I.: *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 1471. *Chem. Abstr.* 118:254599
6. Felekidis A., Goblet-Stachowa M., Liégeois J. F., Pirottea B., Delargea J., Demonceau A., Fontaineb M., Noelsb A. F., Chizhevskyc I. T., Zinevichc T. V., Bregadzec V. I., Dolgushinc F. M., Yanovskyc A. I., Struchkovc Y. T.: *Journal of Organometallic Chemistry* **1997**, 536, 405. *Chem. Abstr.* 127:121858
7. Bergstrom C. A. S., Strafford M., Lazorova L., Avdeef A., Luthman K., Artursson P.: *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 558 (2003). *Absorption Classification of Oral Drugs Based on Molecular Surface Properties*.
8. Selvadurai M., Meyyanathan S. N., Rajan S., Padmanaban G., Suresh B.: *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* 2, 93 (2010). *Determination of Doxycycline in Human Plasma by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Liquid-Liquid Extraction and its Application in Human Pharmacokinetics Studies*.
9. Injac R., Kac J., Kreft S., Strukelj B.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 695 (2007). *Determination of doxycycline in pharmaceuticals and human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography*.

10. Sunaric S. M., Mitic S. S., Miletic G. Z., Pavlovic A. N., Naskovic-Djokic D.: *Journal of Analytical Chemistry* 64, 231 (2009). *Determination of Doxycycline in Pharmaceuticals Based on its Degradation by Cu(II)/H₂O₂ Reagent in Aqueous Solution.*
11. Ramesh J. P., Basavaiah K., Divya M. R., Rajendraprasad N., Vinay K. B.: *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 16, 139 (2010). *Titrimetric and Spectrophotometric Determination of Doxycycline Hyclate Using Bromate-Bromide, Methyl Orange and Indigo Carmine.*
12. Lindsey M. E., Meyer M., Thurman E. M.: *Analytical Chemistry* 73, 4640 (2001). *Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry.*
13. Choma I., Pilorz K.: *Journal of liquid chromatography & related technologies* 27, 2143 (2004). *A Novel Application of Matrix Solid-Phase Dispersion for Determination of Doxycycline and Flumequine Residues in Milk.*
14. Wangfuengkanagul N., Siangproh W., Chailapakul O.: *Talanta* 64, 1183 (2004). *A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode.*
15. Lee K.-S., Park S.-H., Won S.-Y., Shim Y.-B.: *Electrophoresis* 30, 3219 (2009). *Electrophoretic total analysis of trace tetracycline antibiotics in a microchip with amperometry.*
16. Kazemifard A. G., Moore D. E.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 16, 689 (1997). *Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations.*
17. Charoenraks T., Palaharn S., Grudpan K., Siangproh W., Chailapakul O.: *Talanta* 64, 1247 (2004). *Flow injection analysis of doxycycline or chlortetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection.*
18. Khan F.: *Eclética Química* 33, 59 (2008). *Polarographic study and electrode kinetics of [Zn(II) – antibiotics – cephaloglycin] system vis a vis kinetics of electrode reactions.*

19. Vega D., Agüí L., González-Cortés A., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J. M.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 951 (2007). *Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes.*
20. Charoenraks T., Chuanuwatanakul S., Honda K., Yamaguchi Y., Chailapakul O.: *Analytical Sciences* 21, 241 (2005). *Analysis of Tetracycline Antibiotics Using HPLC with Pulsed Amperometric Detection.*
21. Kanamaru Y., Kikukawa A., Miyamoto Y., Hirafuji M.: *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32, 107 (2008). *Dimenhydrinate effect on cerebral oxygen status and salivary chromogranin-A during cognitive tasks.*
22. Liua B., Jiaa Z., Genga X., Beia J., Zhaoa Z., Jiaa Q., Zhanga H.: *European Journal of Pharmacology* 558, 21 (2007). *Selective inhibition of Kir currents by antihistamines.*
23. Cusic J. W.: *Science* 109, 574 (1949). *Note on the Chemistry of Dramamine.*
24. Avula S. G., Alexander K., Riga A.: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 99, 655 (2010). *Predicting eutectic behavior of drugs and excipients by unique calculations.*
25. Tavares V., Macedo C. C., Montanhez L., Barros F. A. P., Meurer E. C., Campos D. R., Coelho E. C., Calaffati S. A., Jr. J. P.: *Journal of Chromatography B* 853, 127 (2007). *Determination of dimenhydrinate in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry: Application to a relative bioavailability study.*
26. Cañada M. J. A., Reguera M. I. P., Dí'az A. M., Capitán-Vallvey L. F.: *Talanta* 49, 691 (1999). *Solid-phase UV spectroscopic multisensor for the simultaneous determination of caffeine, dimenhydrinate and acetaminophen by using partial least squares multicalibration.*
27. Shubietah R. M., Zuhri A. Z. A., Fogg A. G.: *Mikrochimica Acta* 130, 165 (1999). *Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Dimenhydrinate at a Hanging Mercury Drop Electrode.*
28. Inczedy J., Lengyel T., Ure A. M.: *Compendium of Analytical Nomenclature*. 1997.