

## 75 LET POLAROGRAFIE LÉCIV A BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

JIŘÍ VOLKE

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, 182 23 Praha 8, e-mail: Ludvik @ JH-INST.CAS.CZ

Tento článek je věnován 75. výročí objevu polarografie.

Došlo dne 1.IX.1997

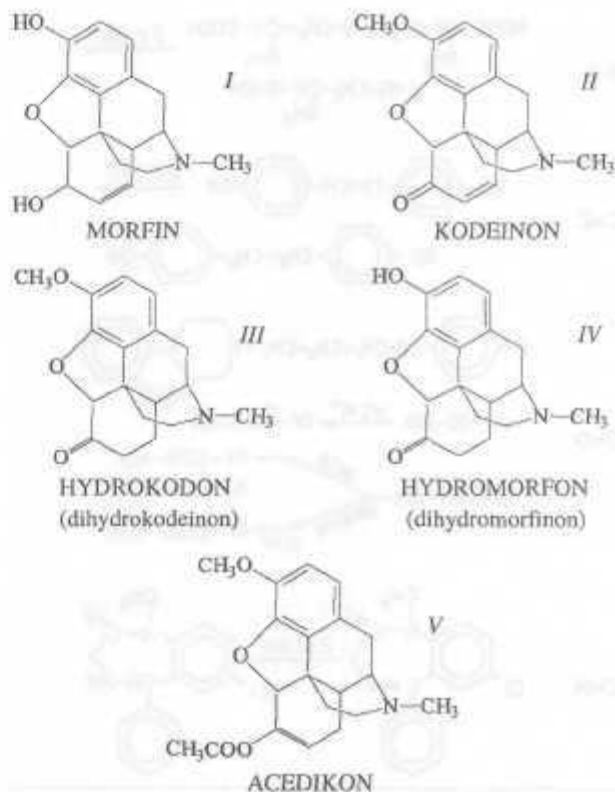
## 1. Úvod

Od samých počátků klasické dc-polarografie, tedy brzy po roce 1922, věnovala zvláště pražská škola profesora Heyrovského značnou pozornost polarografickému výzkumu organických látek, jež jsou fyziologicky aktivní nebo se dokonce používají jako léčiva. Toto studium probíhalo současně s objevováním základních vztahů dc-polarografie a cílem bylo tedy hlavně zjištění polarografické aktivity, návrh průběhu elektroodového děje v souladu se strukturním vzorcem a hlavně zjištění, zda a v jakém rozmezí je limitní proud, většinou redukční, úměrný koncentraci stanovené sloučeniny. Takový nálezn vede k možnosti analytického využití, jež bylo tehdy přednostním cílem. Popsaná situace odpovídá hlavně třicátým až padesátým létům a byla nejlépe zachycena v Březinově monografii<sup>1</sup> z roku 1952.

## 2. Historický vývoj

Vzhledem k nedokonalé znalosti funkčních, t.j. na rtuťové kapkové elektrodě redukovatelných, zřídka oxidovatelných, skupin, nebylo zaměření na některé farmakologicky významné látky právě nešťastnější: příkladem může být interpretace redukčních vln většiny alkaloidů. Výzkum tu zahájil český autor Pech<sup>2</sup>, ale nejobsáhlejší studii publikoval ve více sděleních Kirkpatrick<sup>3</sup>. Výsledkem byl poznatek, že u většiny alkaloidů dochází díky přítomnosti dusíkového atomu v molekule ke katalytické redukci hydroxoniových iontů. Pozorovaná vlna má tedy katalytický charakter,

je značně závislá na koncentraci zkoumané látky na povrchu elektrody, kde probíhá katalytický děj tvorby adduktu mezi dusíkatou látkou a protonem, po níž následuje vlastní elektrolytická redukce<sup>4</sup>. Tento mechanismus sice vede ke značné citlivosti, ale zároveň i způsobuje nespecificitu zkoumaného děje při analytické aplikaci. Navíc je podobné využití nepříjemně závislé na pH roztoku a na přítomnosti dalších povrchově aktivních látek. I když katalyticky aktivní se ukázala většina alkaloidů, je takové chování zvláště typické pro alkaloidy morfinového / a kodeinového typu, v nichž se nevyskytuje žádná redukovatelná skupina. Naproti tomu chinové alkaloidy - chinin či cinchonin - se nabízejí ke specifickému elektroreduktivnímu stanovení díky přítomnosti dvojné vazby C=N v chinolinovém kruhu<sup>2-5</sup>. Rovněž elektroaktivní se ukázaly polosyntetické oxidační produkty morfinu a kodeinu, jako je hydromorfon IV, dihydrokodon III či dihydrooxykodon (Šantavý<sup>6</sup>, Volke a Fořtová<sup>7,8</sup>). Tyto rozdíly v chování u látek jedné řady, pokud se týká



Tabulka I  
Polarograficky aktivní funkční skupiny

Aktivní skupina	Příklad
C-N	
C-O	
C-Hal	$\begin{aligned} R-CH_2-Br &\xrightarrow{2e^-, 2H^+} R-CH_3 + Br^- \\ C_6H_5Cl_6 &\xrightarrow{6e^-} C_6H_6 + 6Cl^- \end{aligned}$
N-N	
O-O	
S-S	
C=C	
C=O	$\begin{aligned} =Ar-CO-Alk &\xrightarrow{e^-, H^+} Ar-\dot{C}OH-Alk \\ &\xrightarrow{\text{acid}} Ar-\dot{C}OH-Alk \\ &\xrightarrow{\text{alkaline}} Ar-\dot{C}OH-Alk \\ &\xrightarrow{e^-, H^+} Ar-CHOH-Alk \end{aligned}$
C=N	

přírodního původu, ukázaly na význam zjišťování přítomnosti redukovatelných či oxidovatelných funkčních skupin (tab. I). Výzkumu v tomto směru byla významně zasvěcena čtyřicátá až šedesátá léta. Studie byly významně specializovány na farmaceutickou analýzu.

### 3. Současné zaměření

Ve svrhu uvedené souvislosti je možno zahrnout do farmaceutické či medicínské polarografické (voltametrické) analýzy tyto okruhy<sup>9</sup>:

- výrobní kontrola a problémy, jež plynou z předpisů pro registraci nových léčiv v jejich lékových formách,
- kvalitativní a hlavně kvantitativní stanovení drog (fyziologicky aktivních látek) v léčivých přípravcích známého i neznámého složení,

Aktivní skupina	Příklad
N=N	
N→O	
N=O	
NO2	
C=N (heterocykl.)	

- stanovení či detekce degradačních produktů či znečištěnin ve farmaceutických preparátech,
- stanovení farmaceutik a jejich metabolitů v tělních tekutinách či tkáních lidských a zvířecích (i rostlinných) se zvláštním zřetelem k toxikologii, farmakologii a k farmakokinetice.

Celkem tedy jde ve farmaceutické analýze o stanovení *in vitro*, kdežto ve farmakologii a farmakokinetice častěji o stanovení *in vivo*. Matrice, v nichž je přítomna stanovovaná látka, jsou tedy v prvním případě farmaceutické přípravky, rostlinné tkáně, suroviny a chemické produkty, ve druhém potom tělní tekutiny a tkáně, případně celé živé organismy (kupř. krev, krevní sérum, míšňi mok apod.). Vzhledem k přesnosti typické pro klasickou dc-polarografii, t.j. 2-3 % rel., jež je o něco výhodnější než ve voltametrii na pevných elektrodách (Pt, Au aC), nejsou tyto elektrochemické metody výhodné pro stanovení čistoty látek, kde je elektroaktivní látka zastoupena procentuálně těsně pod 100% matrice. Přesnost je možno v elektrochemii zvýšit využitím coulometrie nebo coulometrických titrací. dc-Polarografie umožňuje stanovení v rozmezí od  $5 \cdot 10^{-6}$  do  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  nebo poněkud níže při víceelektronových dějích, kupř. redukci aromatických nitroskupin. Elektroaktivní skupiny a počet elektronů předávaných při jejich elektrodových dějích jsou znázorněny v tabulce I. Zvýšení citlivosti, jež by obecně vyhovovalo, nebylo dosaženo kompenzací nabíjecího proudu<sup>10</sup> ani tzv. nastavovacími metodami, nýbrž teprve později metodami pulsními<sup>11</sup>.

Za této experimentální situace a s již pokročile vyvinutými základy polarografie<sup>10</sup> (Ilkovičova rovnice pro limitní difuzní proud, Heyrovského-Ilkovičova rovnice pro tvar *i-E-křivky* a Kouteckého rovnice pro tvar této křivky u ireverzibilního děje) dosáhla dc-polarografie vrcholu své aplikovatelnosti v tomto oboru a i vrcholu své popularity.

#### 4. Lékopisy

Důsledkem obliby bylo zavedení této metody do oficiálních lékopisů, nejprve v roce 1954 v Československu<sup>12</sup> a později v USA. Československý lékopis, pro který autor tohoto článku psal původní teoretickou část a účastnil se stylizace článků speciálních, předepisoval polarografické stanovení pro kyselinu askorbovou, chlortetracyklin, chloramfenikol, nikotinamid a jednu anorganickou komponentu, zinek v zinkinsulinové suspenzi. Od této doby zůstalo využití polarografických postupů v lékopisech zachováno i v dalších vydáních<sup>13,14</sup>. Ve třetím vydání českosloven-

ského lékopisu - PhBS III (Pharmacopoea Bohemoslovenica)<sup>13</sup>, jež vyšlo 1970, byla předepsána tato stanovení:

- Alcohol benzylicus (stopy benzaldehydu),
- Tabuleta hydrocodonii hydrogentartarici,
- Injectio hydroprogesteroni capronici,
- Injectio desoxycortoni acetici,
- Injectio progesteroni,
- Injectio testosteroni propionici,
- Injectio insulini,
- Injectio insulini globinati cum zinco,
- Injectio insulini amorphi cum zinco,
- Suspensio insulini cum zinco comp.,
- Suspensio insulini cryst. cum zinco,
- Injectio cinchocaini chlorati.

Paralelně s tímto vývojem byla polarografie zavedena pro stanovení některých sulfonamidů v USP XVII (1965) a objevila se i v tehdejší NDR v DAB 7. Vývoj využití polarografických či voltametrických postupů ve farmakopéjích je velmi dobře znát na posledním, čtvrtém, vydání československého lékopisu z roku 1987 (cit. <sup>14</sup>) (PhBS 4). Značně se tu snížil počet stanovení předepsaný pro čistou látku. Zůstává jen v člancích Insulinum (stanovení zinku v něm) a Riboflavinum. Naproti tomu je poměrně dobré zastoupení u lékových forem. Jde o tyto systémy podle abecedy:

- Injectio hydroxyprogesteroni capronici,
- Injectio nicotinamidi
- Obductetta methyltestosteroni (obductetta je tableta s ochranným obalem, anglicky coated tablet) (VI)
- Obductetta riboflavini,
- Tabuleta metronidazoli (IX),
- Tabuleta nicotinamidi.

Funkční skupiny, jež se takto uplatňují, jsou karbonylová s konjugovanou dvojnou vazbou, dále dusíkatý heterocyklus a nitroskupina na dusíkatém heterocyklu. Jak počet aplikací tak i využití aktivní skupiny, vesměs redukovatelné na rtuťové kapkové elektrodě, odpovídají současným znalostem výhod elektrochemických analytických metod i subjektivním faktorům, t.j. jejich oblibě mezi analytiky.

Slabostí postupů předepsaných u tablet a obductet je fakt, že se tu nevyužívá citlivosti polarografie, i klasické, jež umožňuje stanovení miligramových i menších množství, to znamená analýzu jednotlivých tablet. Předpisy v jednotlivých člancích jsou stylizovány vždy pro 20 tablet, zřejmě v analogii s těmi, kde je použita metoda (kupř. titrační) mnohem méně citlivá. Pisatel tohoto článku vždy oceňoval, kupř. při analýze morfinových a kodeinových alkaloidů<sup>7-8</sup> i 1,4-benzodiazepinových (VIII) i dalších psy-

chofarmak<sup>15,16</sup> analýzy jednotlivých tablet, kde byly výsledky podrobeny statistickému zpracování, jako je tomu u neuroleptika clozapinu (X) (tab. II). Obdobné výsledky byly získány i u těch benzodiazepinových derivátů, jejichž obsah v tabletě může být až o dva řády nižší (0,25 až 1 mg) Je tomu tak u diazepam<sup>17</sup> (VIII) nebo u lorazepam<sup>18</sup>.

Tabulka II

Polarografické stanovení clozapinu v jednotlivých tabletách (Brittonův-Robinsonův pufr, 10 % DMF)

dc-Polarografie*		dpp*	
[mg]	[%]	[mg]	[%]
9,542	95,42	9,617	96,17
9,431	94,31	9,513	95,13
9,843	98,43	10,041	100,41
9,579	95,79	9,818	98,18
9,422	94,22	9,646	96,46
9,752	87,52	9,929	99,29
9,489	94,89	9,560	95,60
9,841	98,41	10,134	101,34
9,527	95,27	9,604	96,04
9,966	99,66	10,034	100,34

$$\bar{x}_1 = 9,639$$

$$\bar{x}_1 = 9,79$$

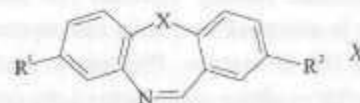
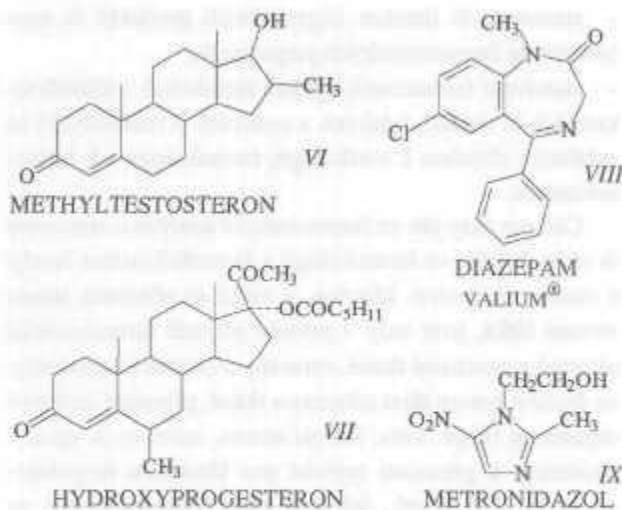
$$\bar{x}_2 = 96,39$$

$$\bar{x}_2 = 97,9$$

\* Měření pomocí dcp a dpp nebyla provedena na témže vzorku

## 5. Aplikovatelnost elektrochemických analytických metod

Zkušenosti farmaceutických analytiků ukázaly, že v tomto analytickém oboru se uplatňují polarografické postupy především u tablet a roztoků, kupř. injekčních. V těchto případech stanovovaná látka není přítomna v přehnaně nízké koncentraci, její přibližná koncentrace je známa a vzorek obsahuje málo interferujících příměsí. Takovou příměsí v suspenzi, jež je analyzována, může být tabletovací hmota, na níž se elektroaktivní látka případně adsorbuje. Na rozdíl od optických metod nepřekáží zákal, působené suspenzí excipientu. Pomocné tabletovací hmoty mohou být kupř. předželovaný kukuřičný škrob, polyvidon, karboxymethylcelulosa, stearin a hořečnatá sůl stearové kyseliny. Překvapující je, že u tablet není většinou



X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	
=CH <sub>2</sub>	H	H	PERLAPIN
=CH <sub>2</sub>	F	H	FLUPERLAPIN
=NH	Cl	H	CLOZAPIN (viz tab. II)
=S	H	Cl	CLOTHIAPIN
=O	H	Cl	LOXAPIN

třeba provádět zvláštní extrakci: prášková (i jednotlivá) tableta je obvykle po krátkou dobu protřepávána s vhodným rozpouštědlem (kupř. dimethylformamidem, acetonitrilem, methanolem a dalšími, ale i vodou). Extrakt, často bez následné filtrace, je smísen se základním roztokem, většinou vodným, jako je pufr, silná báze nebo silná kyselina. Na rozdíl od výzkumu elektrodových mechanismů je obvyklá koncentrace nevodné složky při analýze mezi 5 až 50 %. Zajišťuje tu totiž lepší rozpustnost organického analytu, nikoliv aprotické prostředí, sloužící ke zjednodušení elektrodového mechanismu. Výhodnost polarografie srovnával s jinými metodami při stanovení redukovatelných steroidů de Boer<sup>19</sup>. Došel k následujícím poznatkům tabelovaným v tabulce III.

Dolní mez citlivosti dc-polarografie leží u  $5 \cdot 10^5 \text{ mol.l}^{-1}$ , t.j. asi  $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$  průměrně velké organické molekuly. Znamená to, že takto lze stanovovat elektroaktivní vzorky ve farmaceutických preparátech, ale sotva se tak dosáhne cit-

livostí potřebných pro stanovení koncentrací farmaceutik nebo jejich metabolitů v biologických matricích, kde je jejich koncentrace až o 2-3 řády nižší: myslí se tu na krev, krevní sérum, moč, případně snad i stolicí.

Tabulka III  
Vhodnost různých metod pro analýzu kortikosteroidů<sup>a</sup>

A. Čisté látky

Metoda	Identita	Čistota	Obsah	Doba analýzy
Kolorimetrie	-	+/-	+	60 min.
UF spektrometrie	-	-	+	10
IČ spektrometrie	++	+/-	-	20
Optická rotace	+	-	+	10
Polarografie	+/-	-	++	10
TLC	+	+	-	60
GC	-	-	-	
HPLC	+	44	44	10

B. Kvantitativní analýza farmaceutických přípravků

Forma	Kolorimetrie	UV fotometrie	Polarografie	HPLC
Tablety	+/-E	+/-E	44	+/-
Vodné roztoky	+/-E	++	++	++
Alkohol. roztoky	?	++	44	++
Olejové roztoky	7	7	7	+/-
Suspenze	+/-E	++	7	7
Masti, krémy		vše 4/-E		
Čípky		vše?		

<sup>a</sup> ++ užitečná, + přijatelná, +/- případně přijatelná, - nelze užít, ? nebyla užita, E extrakce nutná, čili o 30 minut delší trvání

Toto zjištění vedlo koncem šedesátých let k výraznému poklesu užívání polarografie a voltametrie ve farmaceutické, klinické a obecně organické analýze. Taková situace zavládla navzdory Zumanovu tvrzení<sup>20</sup> v knize *Practical Polarography* z roku 1968, že polarografie patří mezi pět vedoucích instrumentálních metod organické analýzy, ale ve shodě s Elvingovým<sup>21</sup> názorem asi o rok později. V této době mizela polarografie z neakademických analytických laboratoří, především v angloamerickém světě. Situace se

však změnila v průběhu sedmdesátých let zavedením tzv. pulsních metod<sup>11,22,23</sup>, vyvinutých nejprve v Anglii. Patří mezi ně normální pulsní polarografie (npp) a voltametrie (npv), při nichž se na s časem neměnnou stejnosměrnou potenciálovou rampu vkládají lineárně rostoucí pravoúhlé potenciálové pulsy (o délce asi 50 ms). Výsledkem je sigmoidní *i-E* křivka jako v dc-polarografii podle Heyrovského. V diferenční pulsní polarografii (dpp) se na lineárně s časem rostoucí potenciálovou rampu vkládají pravoúhlé potenciálové pulsy (trvání je tu opět asi 50 ms a hodnota  $AE = 1$  až 100mV). Výsledkem je křivka s maximem v těsné blízkosti půl vlnového potenciálu  $E_{1/2}$  klasického dc-polarogramu. V prvním případě je koncentraci úměrný limitní proud, v dpp pak platí lineární závislost mezi výškou proudového píku a koncentrací. Obě zapojení prakticky eliminují nabíjecí proud indikační (většinou rtuťové kapkové) elektrody a zvyšují citlivost o jeden až dva řády. Další postupy, které mnohonásobně zvyšují citlivost, jsou rozpouštěcí (stripping) a adsorpční<sup>24</sup> rozpouštěcí postupy. V prvním z nich se před vlastní registrací analytický využitelný *i-E* křivky prekoncentruje na stacionární elektrodě zkoumaná látka kupř. redukcí při vhodném potenciálu a teprve pak se registruje *i-E* křivka reoxidace produktu primárního obohacování. Tento postup je nejvhodnější pro stanovení kationtů, ve farmaceutické chemii pro stanovení stop těžkých kovů v surovinách. U organických látek je významnější tzv. adsorpční rozpouštěcí voltametrie AdSV<sup>24,25</sup>, kde je po přesně danou dobu stanovovaná látka adsorbována na stacionární elektrodě při potenciálu elektrochemické inaktivity. Pak se registruje *i-E* křivka pro původní látku. Detekční limity a praktické dolní koncentrační limity jsou udány v tabulce IV. V literatuře je udávána nejnižší detekční koncentrace v metodě AdSV jako

Tabulka IV  
Citlivost polarografických a voltametrických metod

Metoda	Detekční limit [mol.l <sup>-1</sup> ]
dc-Polarografie	10 <sup>-5</sup>
np-Polarografie	5.10 <sup>-7</sup>
dp-Polarografie	10 <sup>-8</sup>
Square-wave polarografie	10 <sup>-8</sup>
ac-Polarografie	5.10 <sup>-7</sup>
Cyklická voltametrie	10 <sup>-5</sup>
Rozpouštěcí voltametrie	10 <sup>-10</sup>
Ads. rozp. voltametrie	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-11</sup>

$1 \cdot 10^{-11} \text{ mol.l}^{-1}$  pro methylenovou modř<sup>26</sup>. Podobně citlivé je i stanovení riboflavinu<sup>27</sup>. Obě látky se výrazně adsorbují na rtuťové elektrodě.

## 6. Automatizace

Současně s vývojem analytických technik se od šedesátých let projevil i zájem o automatizaci elektrochemických postupů. Je-li nutno analyzovat velká množství vzorků, ať už jde o lékové formy, kupř. tablety, ve spojení s testy obsahové stejnoměrnosti (je léčivá látka ve všech jednotkách zkoušeného přípravku homogenně rozptýlena a její obsah v povolených mezích?) či jiné velké počty vzorků. K takovému stanovení se náhodně rozebere vzorek 30 jednotek přípravku a v 10 jednotkách se jednotlivě stanoví obsah podle příslušného článku. První automatizovaná metoda byla publikována pro 1,4-benzodiazepinové psychofarmakum lorazepam<sup>27</sup>. Obecně může být takové stanovení založeno na

- měření proudu při konstantním potenciálu,
- automatizované coulometrické titraci, acetaminofenetolu,
- automatizované registraci celých *i-E* křivek v kombinaci s automatizovanou přípravou vzorku.

První dva postupy nejsou příliš specifické, ale bývají přesto dosti často aplikovány. U lorazepamu se však uplatnila metoda třetí. Při registraci celých dc-křivek lze totiž snadno detegovat i elektroaktivní produkty případného rozkladu, jež u prvních dvou metod mohou interferovat.

Problém byl vyřešen kombinací polarografického analyzátoru se systémem, který zaručoval kontinuální průtok. Vzorky, zde práškované tablety, jsou umístěny na vzorkovém platu. Odtud jsou vzorky jednotlivě transportovány do jednotky nazvané Solid-prep a dispergovány v rozpustidle se základním elektrolytem. Po rozpuštění je vzorek nasát do průtokového systému a automaticky zfiltrován. Po dekantaci prochází dělicí pumpou, pak je segmentován dusíkem a vstupuje do tzv. jednotky stacionárního stavu. V odvzdušňovací jednotce převede proud dusíku nasyceného rozpustidlem roztok na turbulentní kapalný film, který přechází do průtokové polarografické cely. Analyzátor a zapisovač jsou synchronizovány, aby počaly zápis v okamžiku, kdy vzorek dosáhne stacionárního stavu. Zápis probíhá v klasickém stejnosměrném modu pouze při dosažení stacionárního stavu u detekční elektrody.

Existují však i zcela nové postupy pro automatické stanovení, kupř. pro nepatrná množství sulfidů jako kontaminantů v parenterálních roztocích aminokyselin<sup>28</sup>.

## 7. Interference a dělení

Rozlišovací schopnost polarografických a voltametrických metod za přítomnosti více elektroaktivních složek v roztoku se zřetelně zlepšila při přechodu z klasické polarografie k pulsním metodám zavedeným především Barkerem<sup>22</sup> v šedesátých a sedmdesátých letech. Tato situace nemá pochopitelně velký význam u farmaceutických preparátů, kde je obvykle přítomna jediná elektroaktivní komponenta a to ještě ve velké převaze. Naproti tomu hraje významnou úlohu při stanovení ve vzorcích, kupř. biologických materiálech, kde se může vyskytovat původní látka, její metabolity ale i rozkladné produkty. V tomto druhém případě musí navzdory schopnosti rozlišit polarografické vlny či píky při rozdílu půlvolných potenciálů nebo potenciálů píků o 30 až 50 mV, předcházet některá separační technika, kupř. - to je nejstarší zdokonalení organické polarografie<sup>29-31</sup> - chromatografie na tenké vrstvě (TLC), nebo v poslední době vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). První, námi publikovaná metoda dělila směs 2-nitro-4-acetaminofenetolu a 3-nitro-4-acetaminofenetidinu<sup>15</sup>. Později byl tento postup rozšířen i na 1,4-benzodiazepiny i jejich metabolity a rozkladné produkty<sup>31</sup>. Již před těmito pracemi se pokusil o zavedení chromatografie na sloupci do polarografické analýzy Kemula<sup>32</sup>. Daleko významněji se však uplatnila HPLC s elektrochemickou detekcí. Na světovém trhu jsou detektory polarografické nebo častěji voltametrické. Byl vyvinut i pulsní detektor<sup>33</sup> se rtuťovou kapkovou elektrodou. Se zabudovaným zařízením, jež zabraňuje poruchám, lze ve spolehlivé lineární oblasti stanovovat nitrazepam od 7  $\mu\text{g}$  do 700  $\mu\text{g}$ . Tuto látku lze extrahovat z lidského séra, pak následuje chromatografie s obrácenými fázemi a elektrochemická detekce. Detekční limit je 1  $\mu\text{g}$  na vstřik. Výhodou elektrochemické detekce je specifita a poměrná citlivost, nevýhodou pak rychlá pasivace stacionární elektrody, citlivost na teplotu a obtížnější obsluha.

## 8. Prekoncentrace

Zvýšení citlivosti lze při voltametrické analýze dosáhnout prekoncentrací elektroaktivní látky na stacionární, nikoli tedy kapající elektrodě. U organických látek se nejlépe osvědčil tzv. adsorptivní stripping, kde není předřazen elektrochemický děj nýbrž pouhá adsorpce. Tím se liší od rozpouštěcích metod jimž předchází elektrochemický děj.



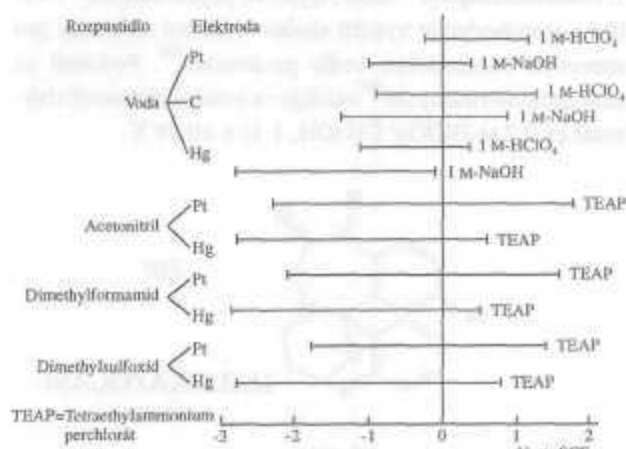
Adsorpce je u vodných roztoků podporována hydrofobními vlastnostmi stanovované látky. Nejvýraznější bývá adsorpce neutrálních částic na nenabitém povrchu elektrody. U iontových částic je adsorpce silně ovlivněna nábojem elektrody. Množství naadsorbované látky vzrůstá s dobou adsorpce, jež probíhá při vhodném potenciálu, kde ještě nedochází k elektrolytickému ději<sup>24,25</sup>. Obvykle se během adsorpce míchá. Po ukončení adsorpce a přerušení míchání se registruje voltametrická křivka v dc nebo dp modu na stacionární, i když třeba rtuťové kapkové elektrodě. Nejnižší detekční limit,  $2,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol.l}^{-1}$ , byl získán po 30 minutové prekoncentraci u riboflavinu<sup>26</sup>. Obvyklá dolní mez je v takovém případě mezi  $10^{-9}$  až  $10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ . Ve farmaceutické chemii se tato metoda osvědčila vedle vitaminů u psychofarmak 1,4-benzodiazepinového typu<sup>24</sup> a u neuroleptik dibenzoazepinové řady, jako je třeba clozepin<sup>34</sup>.

## 9. Voltametrické elektrody

Se rtuťovou kapkovou elektrodou lze dosáhnout, zvláště v nevodných rozpustidlech, velice negativních potenciálů. Je proto vhodná především pro využití redukčních dějů při potenciálech až téměř do -3 V proti nasycené kalomelové elektrodě (SCE). Na anodické straně však dochází již při  $E = +0,2$  až  $+0,3$  V proti SCE k interferencím pod vlivem anodického rozpouštění rtuti. Anodické děje lze takto jen stěží a v málo případech studovat a využít. Zde se v základním výzkumu i v analýze osvědčily neruťové elektrody stacionární i rotační - málokdy vibrační. Materiály<sup>35</sup> jsou

platina, zlato, titan i různé druhy uhlíku (grafit i skelný uhlík) a případně též elektrody z uhlíkové pasty. Potenciálové oblasti, v nichž lze pracovat, jsou znázorněny na obr. 1. Výhodnost těchto elektrod může být znázorněna na příkladu morfinu, nikoli však kodeinu<sup>36</sup>. Obě tyto látky se na rtuťové elektrodě neredukují a projevují se necharakteristickými katalytickými vlnami. Proto byla vypracována nepřímá polarografická metoda s nitrací morfinu<sup>8,51</sup>. Na elektrodě z uhlíkové pasty nebo platiny však v  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH dochází ke dvouelektronové anodické oxidaci na základě složitého sledu chemických a elektrochemických reakcí (schéma 1).

Zmínění autoři popírají za těchto podmínek aktivitu příslušného methoxyderivátu, t.j. kodeinu. Skupina pracovníků kolem britského analytika Bishopa naproti tomu nalezla



Obr.1. Potenciálové oblasti dosažitelné pro různé materiály elektrod a rozpustidla

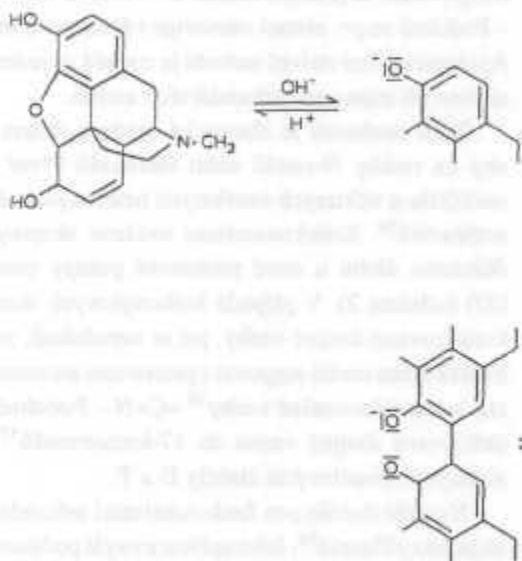


Schéma 1. Anodická oxidace morfinu

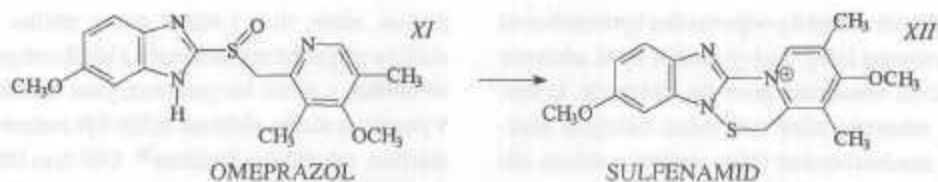


Schéma 2. Chemická struktura omeprazolu a jeho reaktivita v roztoku

anodické oxidační píky i pro kodein<sup>37</sup>. Anodické oxidace morfinu bylo využito k jeho stanovení v makovicích. Bishopova skupina prostudovala<sup>38, 46</sup> voltametrické oxidace celé řady farmaceutik a fyziologicky aktivních látek. I jinak se užívají platinové a uhlíkové elektrody v anodické voltametrii léčiv, kupř. sedmičlenných psychofarmak, buď 1,4-benzodiazepinů<sup>47</sup> nebo i u jiných psychofarmak<sup>47</sup>. Velice pozoruhodné je využití skelné uhlíkové elektrody pro stanovení butazolidinu<sup>48</sup> vedle prednisonu<sup>49</sup>. Podobně se antibiotikum rifamycin oxiduje na rotační platinové elektrodě (v 0,2 M-HClO<sub>4</sub>/ CH<sub>3</sub>OH, 1:1) u +0,58 V.

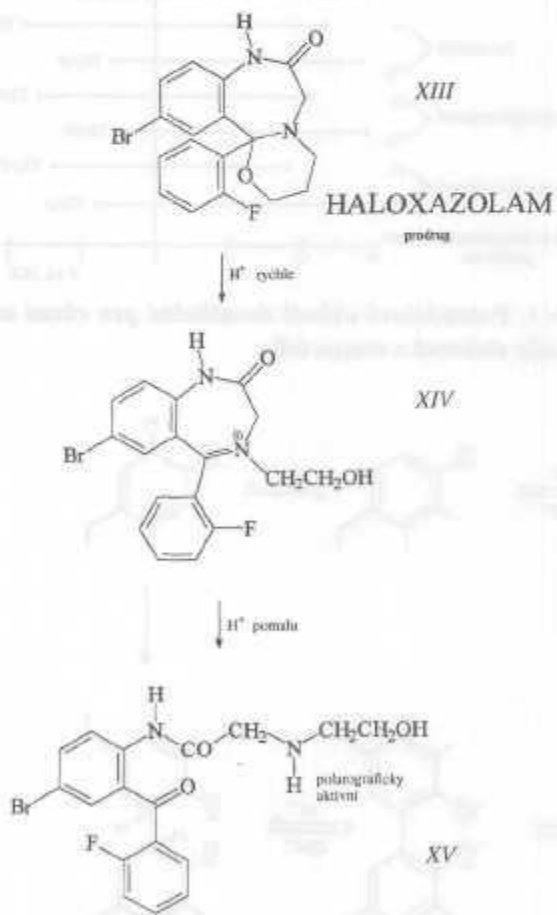


Schéma 3. Reaktivita haloxazolamu v kyselém roztoku

## 10. Funkcionalizace organických látek pro polarografickou analýzu

Neobsahuje-li organické léčivo žádnou ze svrchu uvedených funkčních, elektroaktivních skupin, je výhodné, někdy i nutné, takovou skupinu zavést do stanovované molekuly předřazenou chemickou reakcí. Vzhledem k vyhodnocování pomocí kalibrační křivky nebo standardního přídatku je nutné, aby tato reakce probíhala ne-li se stoprocentním, tedy alespoň s dostatečným (aspoň 60 %) a hlavně dokonale reprodukovatelným výtěžkem. Tato nepřímá stanovení byla dosti charakteristická pro polarografii ve farmaceutické analýze v počátcích, kdy se užívala jen rtuťová kapková elektroda. Paleta stanovitelných látek vzrostla s použitím tuhých elektrod. Děje na nich jsou shrnuty v autorově souhrném článku<sup>50</sup>.

Jedním z prvních a nejtypičtějších nepřímých postupů je stanovení původně elektroinaktivních morfinových alkaloidů, kupř. morfinu<sup>51</sup>, 3,6-diacetylmorfinu (heroinu)<sup>8</sup> či *N*-allylnormorfinu<sup>52</sup>. Podmínkou tvorby produktu je přítomnost hydroxylové skupiny na aromatickém kruhu. Tento elektroaktivní produkt je u morfinu i heroínu 2-nitromorfin (původně se předpokládalo, že se tvoří 2-nitrosomorfin). - Podobně se po nitraci stanovuje i fenazon a fenacetin<sup>53</sup>. Analogická derivativní metoda je rovněž zavedení skupiny nitroso při stanovení sekundárních aminů.

Další možností je chemická oxidace atomu dusíku či síry za tvorby *N*-oxidů nebo sulfoxidů. První reakce se osvědčila u některých dusíkatých heterocyklů, druhá u fenothiazinů<sup>54</sup>. Redukovatelnost oxidové skupiny hraje též důležitou úlohu u nové protonové pumpy omeprazolu<sup>55</sup> (XI) (schéma 2). V případě karbonylových sloučenin bez konjugované dvojné vazby, jež se neredukují, se karbonylová skupina nechá reagovat s primárním aminem za vzniku snadno redukovatelné vazby<sup>56</sup> =C=N-. Podobně se zavádí aktivovaná dvojná vazba do 17-ketosteroidů<sup>57</sup> reakcí se známými Girardovými činidly D a T.

Novější činidlo pro funkcionalizaci sekundárních aminů je pikrylfluorid<sup>54</sup>. Jeho aplikace zvýší podstatně citlivost stanovení, protože tu podle pH dochází většinou ke 12-



-elektronové redukci. U všech nepřímých stanovení po funkcionalizaci je nutno brát ohled na to, že postup je výhodný jen tehdy, když lze elektroaktivní produkt stanovit přímo v reakční směsi bez předchozí izolace. Dále je nutno uvážit, zda není příliš vysokou cenou snížení přesnosti proti přímé polarografii, k němuž dochází téměř vždy. Příkladem nevýhodného zavedení nepřímé polarografické metody za každou cenu je stanovení 1,4-benzodiazepinových psychofarmak, zde haloxazolamu<sup>59</sup> (XIII). Tato látka je velice pohodlně polarograficky stanovitelná<sup>58</sup> po vnesení do kyselého roztoku, kde dojde k rychlému otevření kyslíkatého kruhu jako u všech tricyklických látek této nejnovější generace. Hydrolyza však pokračuje dále pomalejším otevřením na příslušný 2-amino-5-brom-2-fluor benzofenon (XI), který může opět sloužit k polarografickému či spíše fotometrickému stanovení (schéma 3). V publikaci španělských autorů byla tato látka podrobena nikoli polarografické redukci, nýbrž anodické oxidaci na elektrodě ze skelného uhlíku při pH 6,3. Systematický výzkum benzofenonů této řady provedl Bishop<sup>38-46</sup>. Voltametrické stanovení však trpí nízkou reprodukovatelností i citlivostí (od  $2 \cdot 10^{-3}$  do  $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Ke stanovení dalšího benzodiazepinoxazolu, cloxazolamu, takovým postupem, je zapotřebí minimálně čtyř tablet. Pochopitelnější je jedině to, že voltametric-

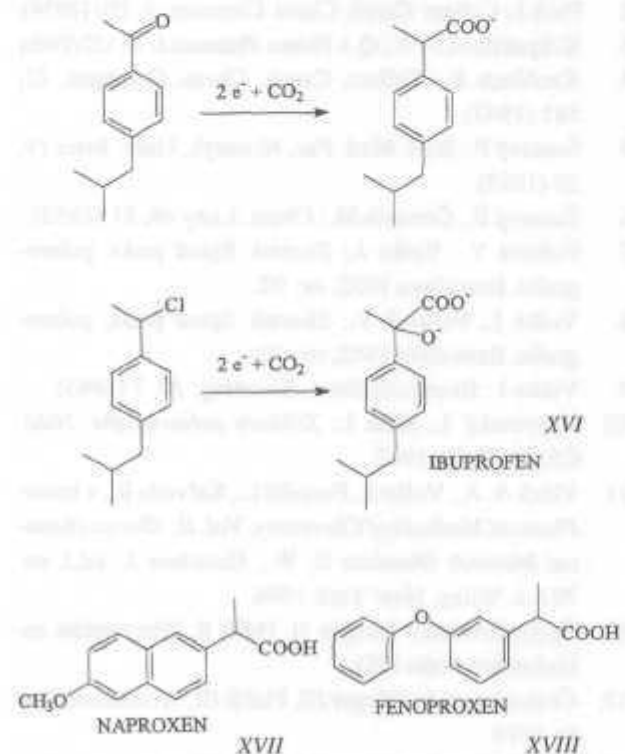


Schéma 4. Protizánětlivé látky – příprava katodickou karboxylací

ké studium oxidace těchto látek sloužilo jako základ vývoje detekce při HPLC. Souborně pojednává o nepřímých polarografických metodách ve farmaceutické chemii Oel-schläger<sup>54</sup>.

## 11. Polarografie a elektrosyntéza

Jak plyne z předchozích kapitol, postupný vývoj polarografie i voltametrie organických látek odhalil do značné hloubky mechanismy elektrodových i jim předcházejících a následných chemických reakcí a podal především důkazy o vznikajících produktech. Tyto poznatky pak byly přeneseny na syntetickou preparativní elektrochemii<sup>60</sup>. Při srovnání výsledků klasické Fichterovy monografie<sup>61</sup> z roku 1942 s populární Baizerovou velkou knihou<sup>62</sup> o padesát let později, lze pozorovat, jak právě polarografie přispěla k interpretaci mechanismů a nalezení i zavedení nových preparativních postupů. Paralelně takovou úlohu sehrála i voltametrie a potenciostatická elektrolyza. Vývoj polarografie v posledních padesáti letech se zapojil do rozšiřování této preparativní metody. Zvláště výrazné je to vidět i ve farmaceutické chemii jako vědecké disciplíně, případně i v tomto průmyslovém oboru. Farmaceutický průmysl se snaží o přípravu nebo, ve větším měřítku, o výrobu velkých a komplikovaných molekul. Elektrolyza<sup>63</sup> může tohoto cíle dosáhnout bez účasti toxických nebo nebezpečných reagentů, za normální teploty i tlaku a většinou bez toxického odpadu. Přenosem elektronu vzniká na elektrodě primárně meziproduct, který se může dále redukovat či oxidovat, ale především podléhat následné chemické reakci se složkami roztoku. Často se tvrdí, že elektrolyza je selektivní, ale ve skutečnosti se potenciálem řídí především rychlost přenosu elektronu a vlastní selektivní syntéza vyžaduje řízení následných chemických reakcí. Vyřešení problematiky následných reakcí může být potom nejobtížnější částí úkolu. Reaktivní meziproduct je většinou buď radikál, karbanion nebo i komplex přechodového kovu.

U velkých polyfunkčních molekul začíná reakce u části molekuly, jež je nejsnadněji redukovatelná nebo oxidovatelná. Aby bylo možno zaměřit reakci žadaným směrem, musí se tu často užívat chránících skupin. Většinou je zapotřebí i ohledu na stereochemickou situaci. Regioselektivity lze dosáhnout, když se udrží chiralita v dostatečné vzdálenosti od elektroaktivního centra. Obtížnější je dosáhnout chirální indukce. Zde je zapotřebí spojit chirální činidla s elektrodovou reakcí.

Vedle slavné a průmyslově významné elektrochemické dimerizace lze upozornit na reakci, jež se mohla uplatnit

u dvou cest k protizánětlivým léčivům<sup>63</sup>. Redukce organické molekuly poskytuje často karbanion, který reaguje s elektrofilem, jako je CO<sub>2</sub>. Redukce chloridu výchozí látky vede přímo k žádanému léčivu, zatímco po redukci ketonu musí následovat katalytická hydrogenace (schéma 4). Protože jsou k dispozici asymetrické katalyzátory, vzniká jediný diastereomer. Reakce vyžaduje čistá aprotická rozpustidla a anodu (Mg nebo Al), jež se při elektrolýze rozpouští.

Takových reakcí existuje poměrně značné množství a lze se o nich informovat v referátech či v monografiích. Budoucnost těchto preparativních postupů se zdá být velice nadějná.

## 12. Budoucnost polarografie ve farmaceutické chemii

Nejvyšší intenzity uplatnění dosáhla polarografie a příbuzné metody ve farmaceutické analýze i ve studiu redoxních reakcí organických látek především počátkem šedesátých let. Brzy nato byly tyto postupy do značné míry vytlačeny jednak separačními, většinou chromatografickými metodami, po nichž následovaly převážně spektrální metody jako detekční nebo sloužící k vlastnímu stanovení. Tyto metody předčily a předčí jak citlivostí tak i selektivitou klasickou dc-polarografií. To byla hlavní příčina ústupu polarografie z přízně analytiků. V předcházejících odstavcích však už bylo zmíněno, že tento nepříznivý vývoj, k němuž došlo v zápětí po udělení Nobelovy ceny v roce 1959, nebyl úplný a neznamenal zánik metody. Příznivě se tu projevilo zavedení pulsních metod Barkerem a jeho spolupracovníky a následovníky. Tyto metody udržely pozici polarografie i voltametrie, i když ne na tak vysoké úrovni jako byla před třiceti léty. Přesto je zapotřebí vzít v úvahu, že při řešení některých analytických i mechanistických problémů, u organických i anorganických sloučenin je polarografie jediná citlivá a specifická, navíc rychlá, pohodlná a konečně finančně výhodná metoda. Zdá se, že v budoucnu bude nutno vzít v úvahu, že kromě některých případů, kde je metodou hlavní, se staly polarografické a voltametrické postupy nejdůležitější paralelní metodou, která vedle zákonem či normou předepsaného postupu umožní předepsané stanovení nezávislou odlišnou metodou. Vedle této pozice na druhém místě zůstává ještě stále hojný počet analýz, kde je polarografie první a základní. Do budoucna však bude významné spojení separačních metod, kupř. HPLC, s elektrochemickou indikací při vlastním stanovení.

Je osobní zkušeností pisatele tohoto článku, že určitý pokles zájmu o polarografii v předchozích desetiletích ne-

byl způsoben jen objektivními nedostatky elektrochemických metod, nýbrž příčinami subjektivními. Je to poněkud náročnější experimentální technika a potřeba dobře zavedených, nikoli jen vyškolených pracovníků. Přitom nebývá výuka v elektrochemii na většině vysokých škol příliš hluboká ani intenzivní. V důsledku toho není nikde dostatek pracovníků v oboru. Tvzení, že pro práci v elektrochemii je zapotřebí hlubších znalostí než u jiných technik, není zcela pravdivé. Rozdíl spočívá spíše v tom, že znalosti teoretických základů elektrochemie bývají průhlednější a odbornost se snadněji pozná.

Výhodným rysem je naproti tomu u polarografie i voltametrie poměrná finanční nenáročnost většiny potřebných

přístrojů. Vsoučasné době to potvrzuje především rychlý vývoj analytické i mechanistické elektrochemie v chudší části zemí Evropské unie, nejen v Itálii, kde je už zažitá tradice, ale zvláště ve Španělsku, Portugalsku a nově i v Řecku. Výrazně se to uplatňuje i ve vyspělé části latinské Ameriky, zvláště v Chile.

## LITERATURA

1. Březina M., Zuman P.: *Polarografie v lékařství biochemii a farmacii*. Přírodovědecké nakladatelství, Praha 1952.
2. Pech J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 6, 190 (1934).
3. Kirkpatrick H. F. W.: *Q. J. Pharm. Pharmacol.* 19, 127 (1946).
4. Knobloch E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 12, 581 (1947).
5. Šantavý F.: *Bull. Med. Fac. Masaryk. Univ. Brno* 19, 29 (1945).
6. Šantavý F., Černoch M.: *Chem. Listy* 46, 81 (1952).
7. Fořtová V., Volke J.: *Sborník Sjazd prakt. polarografie*, Bratislava 1952, str. 92.
8. Volke J., Fořtová V.: *Sborník Sjazd prakt. polarografie*, Bratislava 1952, str. 104.
9. Volke J.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 10, 7 (1983).
10. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*. Nakl. ČSAV, Praha 1962.
11. Vlček A. A., Volke J., Pospíšil L., Kalvoda R., v knize: *Physical Methods of Chemistry, Vol. II: Electrochemical Methods* (Rossiter B. W., Hamilton J., ed.), str. 797. J. Wiley, New York 1986.
12. *Československý lékopis II, PhBS II*, Zdravotnické nakladatelství, Praha 1954.
13. *Československý lékopis III, PhBS III*, Avicenum, Praha 1970.
14. *Československý lékopis IV, PhBS IV*, Avicenum, Praha 1987.

15. Oelschläger H., v knize: *Electrochemistry in Research and Development* (Kalvoda R., Parsons R., ed.), str. 163. Plenum Press, New York 1985.
16. Weber J. M., Volke J.: *Pharmazie* 46, 853 (1991).
17. Oelschläger H., Volke J., Kurek E.: *Archiv Pharmaz.* 297,431 (1964).
18. Oelschläger H., Sengiin F. I.: *Pharmazie* 29, 770 (1974).
19. de Boer H. S.: *Disertace Ph.D.*, Univerzita Utrecht 1980.
20. Heyrovský J., Zuman P.: *Practical Polarography*. Academic Press, London 1968.
21. Elving P. J.: v knize: *Electroanalytical Chemistry* (Niirnberg H. W., ed.), str. 197. J. Wiley, New York 1974.
22. Barker G. C, Faircloth R. L., Gardner A. W.: *Nature-London* 181, 247 (1958).
23. Kalvoda R., Volke J., v knize: *Instrumentation in Analytical Chemistry* (Zýka J., ed.), str. 34. Ellis Horwood, New York 1991.
24. Kalvoda R.: *Anal. Chim. Acta* 138, 11 (1982).
25. Wang J.: *Stripping Analysis*. VCH-Publishers, Deerfield Beach 1985.
26. Wang J., Luo D. B., Farias P. A. M., Mahmoud J. S.: *Anal. Chem.* 57, 158 (1985).
27. Cullen M. R., Brindle M. P., Papariello G. J.: *J. Pharmacol. Sci.* 62, 1708 (1973).
28. do Nascimento P. C, Bohrer D., Tramontina J.: *Analyst* 122, 835(1997).
29. Oelschläger H., Volke J., Lim G. T.: *Arch. Pharm. (Weinheim)* 298, 213 (1965).
30. Oelschläger H., Volke J., Lim G.-T.: *Arzneim.-Forsch.* 17, 637(1967).
31. Oelschläger H., Lumbantoruan S., Volke J., Kraft G.: *Z. Anal. Chem.* 279, 257 (1976).
32. van Bennekom H. P.: *Disertace Ph.D.*, Univerzita Leiden 1981.
33. Kemula W.: *Rocz. Chemii* 26, 281 (1952).
34. Weber J. M., Volke J.: *Pharmazie* 47, 194 (1992).
35. Sawyer D. T., Sobkowiak A., Roberts, Jr., J. L.: *Electrochemistry for Chemists*, 2. vyd. J. Wiley, New York 1995.
36. Proksa B., Molnár L.: *Anal. Chim. Acta* 97, 149 (1984).
37. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 109, 143 (1984).
38. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 65 (1984).
39. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 73 (1984).
40. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 139 (1984).
41. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 229 (1984).
42. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 623 (1984).
43. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 627 (1984).
44. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 759 (1984).
45. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 913 (1984).
46. Bishop E., Hussein W.: *Analyst* 189, 965 (1984).
47. Ellaithy M. M., Volke J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 43, 812(1978)
48. Patriarche G. J., Chateau-Gosselin M., Vandenbalck J. L., Zuman P., v knize: *Electroanalytical Chemistry* (Bard A. J., ed.), sv. 11, str. 141. Marcel Dekker Inc., New York 1979.
49. Bersier P. M.: *Keynote Lecture. J. Heyrovský Memorial Congress on Polarography*, srpen 1980.
50. Volke J., ve sborníku: *Electrochemical Detectors* (Ryan T. H., ed.), str. 105. Plenum Press, New York 1984.
51. Baggesgaard-Rasmussen H., Ilver K.: *Dansk Tidsskrift Farm.* 19, 71 (1945).
52. Volke J., Volková V.: *Cesk. Farm* 4, 20 (1955).
53. Oelschläger H.: *Archiv Pharmaz.* 296,7 (1963).
54. Oelschläger H., ve sborníku: *Electrochemistry in Research and Development* (Kalvoda R., Parsons R., ed.), str. 163. Plenum Press, New York 1985.
55. Knoth. H, Oelschläger H., Volke J., Ludvík J.: *Pharmazie* 52, 685 (1997).
56. Zuman P.: *Nature* 165, 485 (1950).
57. Prelog V., Häfliger O.: *Helv. Chim. Acta* 32, 2088 (1949).
58. Volke J., Oelschläger H.: *Pharmazie* 49, 824 (1994).
59. Fernández L., Alonso R. M., Jiménez R. M., Rodríguez F. J.: *Electroanalysis* 7, 189 (1995).
60. Volke J, Liška F.: *Electrochemistry in Organic Synthesis*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1994.
61. Fichter: *Organische Elektrochemie*. T. Steinkopff, Leipzig 1942.
62. Baizer M. M., Lund H.: *Organic Electrochemistry*, 3. vyd. M. Dekker, New York 1993.
63. Genders J. D. Pletcher D.: *Chemistry & Industry*, 16 Sept. 1996.

**J. Volke (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):  
75 Years in the Polarography of Pharmaceuticals and Physiologically Active Substances**

The article assesses the significance of polarographic and voltammetric methods in pharmaceutical chemistry and analysis in the course of 75 years which elapsed since the introduction of Heyrovský's method. It involves the description of the most important application areas in this field. The paper is concluded by a consideration concerning the future development of these methods in pharmacy and/or medicine or biochemistry.