

VYUŽITIE VSÁDZKOVEJ INJEKČNEJ ANALÝZY PRI ELEKTROCHEMICKOM STANOVENÍ WARFARÍNU

VICTÓRIA ŽUŽIČOVÁ a VLASTIMIL VYSKOČIL

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 00 Praha 2, Česká republika
victoria.zuzicova@natur.cuni.cz

Kľúčové slová: warfarín, vsádzková injekčná analýza, ampérometria, sieťotlačová uhlíková elektróda, analýza liečiv

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20250014>

Úvod

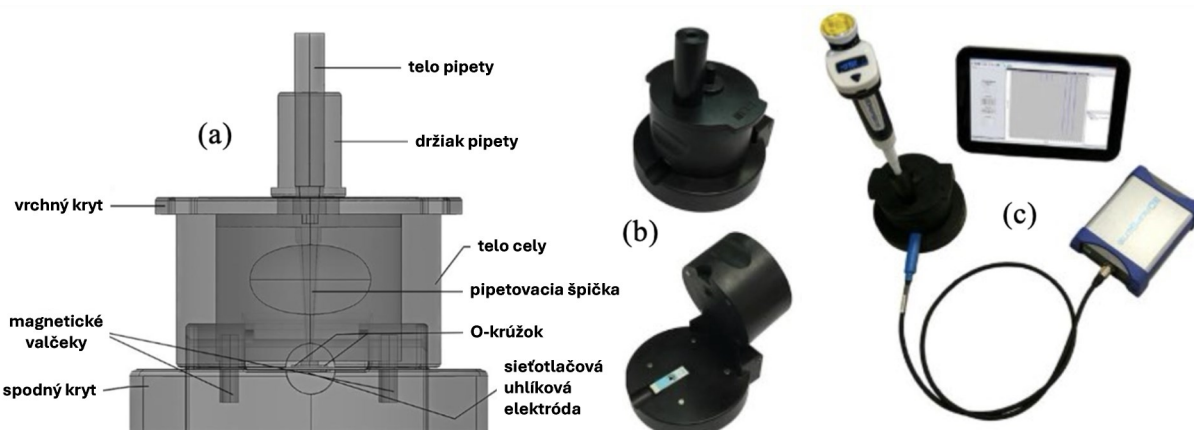
Vsádzková injekčná analýza (z angl. batch injection analysis, BIA) je elektroanalytická technika, ktorej podstatou je dávkovanie malého objemu vzorky priamo k povrchu detektoru. Odpoveď má tvar píku s nasledujúcim rýchlym poklesom signálu na základnú líniu. Medzi hlavné výhody tejto techniky patrí rýchlosť analýzy, nízka spotreba vzorky a ďalších chemikálií, ekonomická a priestorová nenáročnosť a vďaka využitiu automatickej pipety aj reprodukovateľnosť výsledkov. BIA môže byť kombinovaná s viacerými druhmi detekcie s využitím elektrochemických či optických techník. V tejto práci bola využitá ampérometrická detekcia, ktorej jednou z hlavných výhod je, že vzorku je možné dávkovať do detekčnej cely aj bez prítomnosti základného elektrolytu. BIA v kombinácii s elektrochemickou detekciou nachádza uplatnenie v envi-

ronmentálnej analýze, potravinárskom a farmaceutickom priemysle či v klinickej diagnostike^{1,2}.

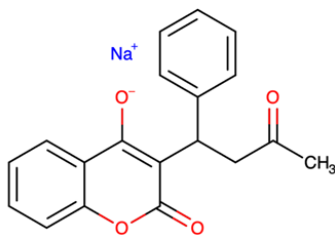
S cieľom miniaturizácie a automatizácie bývajú čoraz častejšie využívané sieťotlačové elektródy (SPE), ktoré sú navrhnuté v trojelektrodovom systéme zloženom z pracovnej, referenčnej a pomocnej elektródy vytlačených na dosťičke, spravidla z keramiky alebo plastu. Komerčne dostupné tlačéné elektródy je možné ďalej modifikovať, a tak sú využívané pre široké spektrum aplikácií³. Spojenie BIA-SPE (obr. 1) prináša výhody v podobe jednoduchej manipulácie, malej spotreby vzorky, nízkych nákladov, rýchlosti analýzy a robustnosti, a tak predstavujú vhodný systém pre prenosné zariadenia⁴.

Warfarín (obr. 2), systematickým názvom 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-fenylbutyl)kumarín, je antikoagulačné liečivo predpisované pacientom pri prevencii a liečbe žilovej trombózy a komplikáciách spojených s fibriláciou predsiení a náhradou srdcových chlopní. Ako liečivo sa využíva jeho sodná soľ, ktorá je dobre rozpustná vo vode. Warfarín účinkuje prostredníctvom inhibície regenerácie vitamínu K. Tá je potrebná k aktivácii koagulačných faktorov a antikoagulačných proteínov, čím dochádza k narušeniu koagulačnej kaskády⁶. Metódy jeho stanovenia majú vzhľadom k veľmi úzkemu terapeutickému indexu ($2,0\text{--}5,0\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) v praxi zásadný význam. Preto je potrebná presná, rýchla a jednoduchá metóda, pomocou ktorej je možné efektívne určiť hladinu koncentrácie warfarínu pri antikoagulačnej liečbe pacienta. Vyššia dávka môže mať fatálne následky, pretože spôsobuje zvýšené riziko krvácania a závažné komplikácie⁷.

Cieľom tejto práce bolo štúdium elektrochemického chovania warfarínu sodného na sieťotlačovej uhlíkovej elektróde (SPCE). Hlavným predmetom bolo nájdenie



Obr. 1. (a) Schéma BIA-SPE systému; (b) elektrochemická BIA-SPE cely (c); prenosný systém pozostávajúci z BIA-SPE cely, automatickej mikropipety, prenosného potenciostatu a vyhodnocovacieho zariadenia. Prevzaté a upravené z cit.⁵



Obr. 2. Štruktúrny vzorec warfarínu sodného

optimálnych podmienok pre stanovenie uvedenej látky technikou vsádzkovej injekčnej analýzy s ampérometrickou detekciou⁸ (BIA-AD) so zámerom vyvinúť elektroanalytickú metódu pre stanovenie obsahu liečiva v tablete.

Experimentálna časť

Chemikálie a vzorky

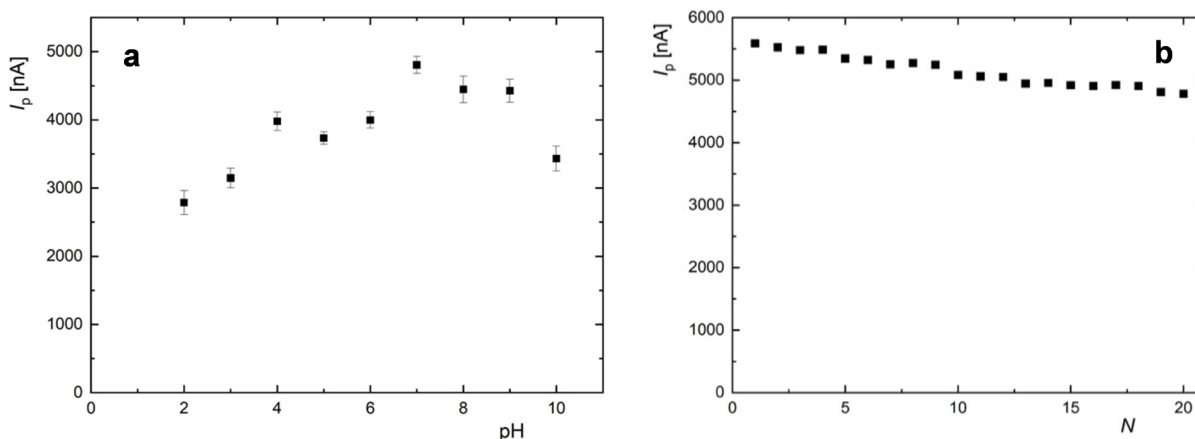
Zásobný roztok warfarínu sodného (WAR, Sigma-Aldrich, USA) o koncentrácii $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ bol pripravený v etanole (98 %, Penta, Praha, ČR). Roztoky WAR o nižšej koncentrácii boli pripravené presným riedením zásobného roztoku WAR základným elektrolytom. Základným elektrolytom bol Brittonov-Robinsonov (BR) pufer, pripravený zmiešaním zásaditej zložky (NaOH (p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentrácii $0,2 \text{ mol l}^{-1}$) a kyslej zložky (85% H_3PO_4 , H_3BO_3 (obidve p.a., Lach:NER, Neratovice, ČR) a 99,8% CH_3COOH (p.a., Penta, Praha, ČR) o koncentrácii kyselín $0,04 \text{ mol l}^{-1}$). Pre stanovenie obsahu účinnej látky v liekovej forme boli využité tablety Warfarin Orion (Orion Corporation, Fínsko) s obsahom účinnej látky v tablete 5 mg.

Aparatúra

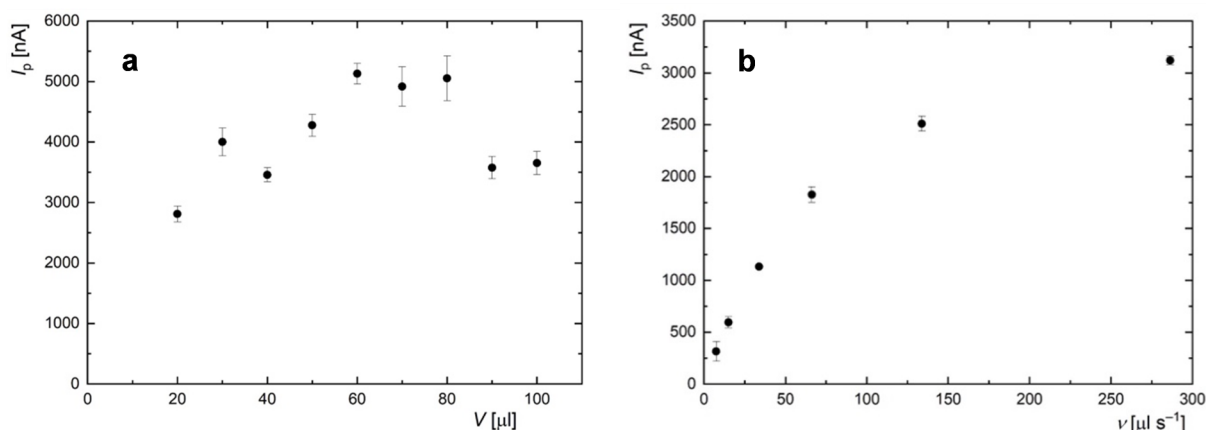
Na meranie bola využitá zostava BIASPE02 (DropSens, Španielsko) pozostávajúca z cely a programovateľnej pipety Gilson PIPETMAN M ($20\text{--}200 \mu\text{l}$). Pipeta bola programovaná pomocou softwaru Pipetting Mode Builder (Gilson, USA). Pre záznam merania bola využitá zostava Eco-Tribo Polarograf so softwarom Polar Pro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha, ČR) riadená operačným systémom Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Všetky merania boli uskutočnené v trojelektrodovom zapojení s využitím komerčne tlačenej uhlíkovej elektródy (DRP-110, DropSens, Španielsko). Na meranie pH pri príprave BR pufru bol použitý pH-meter Jenway 3501 (Jenway, Veľká Británia). Spektrofotometrické merania boli vykonané na prístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) ovládanom programom UV-Visible ChemStation 9.01 v kremenných kvetách o hrúbke $1,0 \text{ cm}$.

Výsledky a diskusia

Vplyv pH na elektrochemické chovanie WAR na SPCE bol sledovaný technikou BIA-AD v prostredí BR pufru v rozmedzí pH $2,0\text{--}12,0$. Detekčný potenciál ($+1,0 \text{ V}$) bol zvolený na základe záznamu DC voltampérometrie tak, aby bol väčší ako potenciál oxidačného píku pre všetky hodnoty pH. Pre hodnoty pH $2,0\text{--}10,0$ boli získané dobre vyvinuté ampérometrické píky (dáta nie sú zobrazené) odpovedajúce ireverzibilnej oxidácii WAR. Pri vyšších hodnotách pH dochádzalo k výraznému nárastu pozadia a píky nebolo možné spoľahlivo vyhodnotiť, preto neboli ďalej uvažované. Na obr. 3a je zobrazená závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR na pH. Na základe najvyššej prúdovej odozvy a nízkej relatívnej smerodajnej odchýlky opakovaných stanovení ($n = 5$) bolo prostredie o pH $7,0$ zvolené ako optimálne. Pre zvolené prostredie



Obr. 3. (a) Závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH roztoku zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH $2,0\text{--}10,0$; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál $+1,0 \text{ V}$, dávkovaný objem $40 \mu\text{l}$, rýchlosť dávkovania $286,3 \mu\text{l s}^{-1}$. (b) Závislosť I_p na poradovom čísle stanovenia (N) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH $7,0$; detekčný potenciál $+1,0 \text{ V}$, dávkovaný objem $40 \mu\text{l}$, rýchlosť dávkovania $286,3 \mu\text{l s}^{-1}$.



Obr. 4. (a) Závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na dávkovanom objeme roztoku (V) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál +1,0 V, rýchlosť dávkovania $286,3 \text{ μl s}^{-1}$. (b) Závislosť I_p WAR ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na rýchlosti dávkovania roztoku (v) zaznamenaná technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0; chybové úsečky pre $n = 5$; detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl

bolo meranie zopakované 20krát po sebe (obr. 3b) na stanovenie opakovateľnosti merania pri koncentrácii WAR $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a bola dosiahnutá uspokojivá relatívna smerodajná odchýlka 4,8 % ($n = 20$).

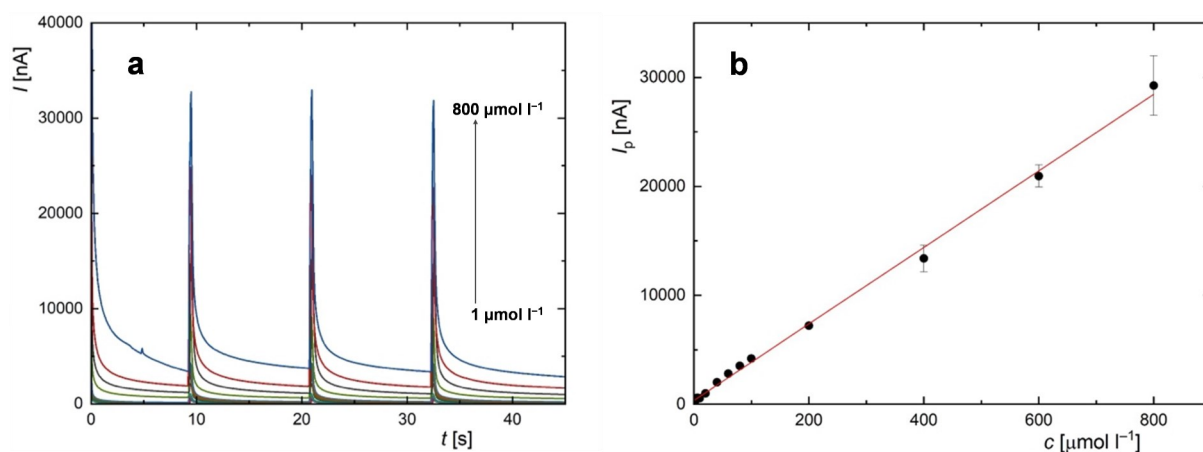
V prostredí BR pufru o pH 7,0 bola sledovaná závislosť signálu analytu na detekčnom potenciáli v rozsahu +0,7 až +1,3 V (dáta nie sú zobrazené). Najvyššia prúdová odozva bola dosiahnutá pri potenciáli +1,0 V, preto bola zvolená ako optimálna pre ďalšie merania. Pri vyšších hodnotách dochádzalo k postupnému nárastu prúdu pozadia.

Ďalšie parametre ovplyvňujúce signál analytu súvisia s nastavením pipety. Obr. 4a znázorňuje vplyv dávkovaného objemu (20–100 μl) a obr. 4b vplyv rýchlosti dávkovania. Ako optimálny bol zvolený objem 60 μl, pri ktorom je dosiahnutá vyššia prúdová odozva a zároveň umožňuje tri

stanovenia v jednom meraní (maximálny objem špičky pipety je 200 μl). Na automatickej pipete je možné nastaviť šesť módov odpovedajúcich rýchlostiam dávkovania $7,5\text{--}286,3 \text{ μl s}^{-1}$. Pri najvyššej rýchlosti boli dosiahnuté dobre vyvinuté píky s najvyššou prúdovou odozvou, preto bola zvolená pre ďalšie merania rýchlosť $286,3 \text{ μl s}^{-1}$.

Koncentračná závislosť WAR v prostredí BR pufru o pH 7,0 bola meraná v rozsahu koncentrácií $1 \cdot 10^{-6} \text{--} 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Ampérogramy pre lineárnu oblasť koncentrácií ($1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) sú uvedené na obr. 5a. Na obr. 5b je zobrazená odpovedajúca koncentračná závislosť s rovnicou regresie $I_p [\text{nA}] = 35,1c [\text{μmol l}^{-1}] + 350$; $r^2 = 0,9989$. Bola stanovená medza detekcie (LOD ; $3\sigma/k$) $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a medza stanoviteľnosti (LOQ ; $10\sigma/k$) $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Za optimálnych podmienok bolo stanovené množstvo WAR v tableťoch Warfarin Orion 5 mg metódou prídavku



Obr. 5. (a) Ampérogramy zaznamenané technikou BIA-AD na SPCE v prostredí BR pufru o pH 7,0 pre rozsah koncentrácií roztoku WAR $1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl , rýchlosť dávkovania $286,3 \text{ μl s}^{-1}$. (b) Koncentračná závislosť výšky ampérometrického píku (I_p) na koncentrácii WAR; chybové úsečky pro $n = 5$; rovnica regresie pre lineárnu oblasť koncentrácií ($1 \cdot 10^{-6} \text{--} 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$): $I_p [\text{nA}] = 35,1c [\text{μmol l}^{-1}] + 350$; $r^2 = 0,9989$

šandardu. Zásobný roztok tablety bol pripravený z navážky 0,1057 g homogenizovanej tablety doplnenej do 100 ml etanolom. Pre meranie boli pripravené 10ml roztoky BR pufru o pH 7,0 s obsahom 200 μl zásobného roztoku liečiva bez prídavku a s prídavkom 25 μl zásobného roztoku šandardu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$), ktorého objem sa v meraných roztokoch zvyšoval vždy o 25 μl . Stanovenie prebiehalo v rozsahu teoretických koncentrácií $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Bola získaná rovnica koncentračnej závislosti prídavku šandardu v tvare $I_p [\text{nA}] = 79,9c [\mu\text{mol l}^{-1}] + 1865$; $r^2 = 0,9986$.

Ako referenčná metóda k ampérometrickému stanoveniu WAR v liekovej forme bola využitá UV-VIS absorpčná spektrofotometria. Stanovenie bolo vykonané metódou prídavku šandardu v rozsahu teoretických koncentrácií $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Koncentračná závislosť bola zostrojená z hodnôt absorbiancií v maxime ($\lambda_{\text{max}} = 308 \text{ nm}$). Bola získaná rovnica koncentračnej závislosti prídavku šandardu v tvare $A_{308} [\text{AU}] = 0,0153c [\mu\text{mol l}^{-1}] + 0,431$; $r^2 = 0,9990$.

Z parametrov koncentračných závislostí bola vypočítaná hmotnosť účinnej látky v jednej tablete a vzťahnutá voči hodnote deklarovanej výrobcom, teda 5 mg. Pre ampérometrické stanovenie technikou BIA bola stanovená výťažnosť 103,8 %, pre spektrofotometrické stanovenie 99,6 %. Výťažnosť vyvinutej ampérometrickej metódy voči analytickej referenčnej metóde bola určená na 104,2 %.

Záver

V tejto práci boli hľadané optimálne podmienky pre stanovenie warfarínu sodného (WAR) technikou vsádzkovej injekčnej analýzy s ampérometrickou detekciou (BIA-AD) na sieťotlačovej uhlíkovej elektróde (SPCE) s cieľom využiť metódu pre stanovenie obsahu účinnej látky v liekovej forme. Optimalizácia experimentálnych podmienok prebiehala v prostredí Brittonovho-Robinsonovho (BR) pufru o pH 7,0. Boli nájdené optimálne parametre stanovenia: detekčný potenciál +1,0 V, dávkovaný objem 60 μl , rýchlosť dávkovania 286,3 $\mu\text{l s}^{-1}$. Lineárna oblasť koncentračnej závislosti bola určená v rozsahu $1,0 \cdot 10^{-6} - 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a bola dosiahnutá medza detekcie $LOD = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a odpovedajúca medza stanoviteľnosti $LOQ = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Vyvinutá metóda bola využitá pre stanovenie obsahu účinnej látky v tabletách Warfarin Orion 5 mg a bola porovnávaná s UV-VIS absorpčnou spektrofotometriou. Výťažnosť vyvinutej ampérometrickej metódy voči analytickej referenčnej metóde bola určená na 104,2 %.

BIA-AD v spojení s SPCE sa v tejto práci preukázala ako rýchla, efektívna, jednoduchá a cenovo nenáročná metóda na stanovenie látok vo farmaceutických vzorkách.

LITERATÚRA

1. Quintino M. S. M., Angnes L.: *Electroanalysis* 16, 513 (2004).
2. Haššo M., Švorc L.: *Monatsh. Chem.* 153, 985 (2022).
3. Couto R. A. S., Lima J. L. F. C., Quinaz M. B.: *Talanta* 146, 801 (2016).
4. Stefano J. S., Dias A. C., Arantes I. V., Costa B. M., Silva L. A., Richter E. M., Banks C. E., Muñoz R. A.: *Electroanalysis* 31, 518 (2018).
5. Richter E. M., Tormin T. F., Cunha R. R., Silva W. P., Pérez-Junquera A., Fanjul-Bolado P., Hernández-Santos D., Muñoz R. A. A.: *Electroanalysis* 28, 1856 (2016).
6. Ufer M.: *Clin. Pharmacokinet.* 44, 1227 (2005).
7. Saeedi L., Ahmadi S., Thompson M., Hashemi P., Ramezani Z.: *Chemosensors* 10, 44 (2022).
8. Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 113, 703 (2019).

V. Žužičová and V. Vyskočil (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, Czech Republic): **Application of Batch Injection Analysis in the Electrochemical Determination of Warfarin**

In this work, the optimum conditions for the determination of warfarin sodium (WAR) by the technique of batch injection analysis with amperometric detection (BIA-AD) on a screen-printed carbon electrode (SPCE) were sought in order to use the method for the determination of the content of the active substance in the dosage form. Optimization of the experimental conditions was carried out in a Britton-Robinson (BR) buffer medium at pH 7.0. The optimum determination parameters were found: a detection potential of +1.0 V, a dosing volume of 60 μL , and a dosing rate of 286.3 $\mu\text{L s}^{-1}$. The linear region of concentration dependence was determined in the range of $1.0 \cdot 10^{-6} - 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, and the limit of detection $LOD = 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and the corresponding limit of quantification $LOQ = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ were achieved. The developed method was applied for the determination of the active substance content in Warfarin Orion 5 mg tablets and was compared with UV-VIS absorption spectrophotometry. The recovery of the developed amperometric method against the analytical reference method was determined to be 104.2%. The BIA-AD in conjunction with the SPCE was demonstrated in this work to be a rapid, efficient, simple, and inexpensive method for the determination of substances in pharmaceutical samples.

Keywords: warfarin, batch injection analysis, amperometry, screen-printed carbon electrode, drug analysis



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoli média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.